



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Patrícia Nunes dos Santos

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSSURFACTANTE
E LIPÍDEOS POR *Penicillium spinulosum* (UCP1347)
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Recife

2016

Patrícia Nunes dos Santos

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSURFACTANTE
E LIPÍDEOS POR *Penicillium spinulosum* (UCP1347)
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

Recife

2016

Santos, P. N.

Produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum*
(UCP1347) utilizando resíduos agroindustriais
Recife, 2016, p 63

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco.
Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de
Processos Ambientais, 2016.

1. Fungo Filamentoso. 2. Biossurfactantes. 3. Lipídeos 4. Resíduos industriais.
Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
Centro de Ciências e Tecnologia.

Produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum* (UCP1347) utilizando resíduos agroindustriais

PATRÍCIA NUNES DOS SANTOS

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco- UNICAP

Prof^a Dr^a. Armanda Saconi Messias
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a Dr^a Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

*O SENHOR é o meu rochedo,
minha fortaleza e meu libertador. Meu
DEUS é a minha rocha, onde encontro
refúgio, meu escudo, força de minha
salvação e minha cidadela.*

Salmo 17:3

Dedico

À minha família: meus pais, **Maria das Graças e Arlindo** "*in memoriam*"; meus irmãos, **Cristiane, Luiz Carlos e Leonardo**;

Meus sobrinhos, **Tháisa Sophia e Lucas Gabriel**, e meu esposo, **Eder Campos-Junior**, por serem, simplesmente, quem são e por tudo que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por minha existência e por me dar forças nos momentos difíceis de minha vida, sem Ele não chegaria até onde cheguei;

A meus pais Maria das Graças Nunes e Arlindo Ladislau dos Santos *“in memoriam”*, pela dedicação e carinho que sempre tiveram comigo;

A meus irmãos Cristiane Nunes dos Santos, Luiz Carlos Nunes dos Santos e Leonardo Nunes dos Santos pelo carinho e companheirismo em todos os momentos, meus sobrinhos Thaísa Sophia Nunes Pessoa e Lucas Gabriel Alves Nunes dos Santos por alegrarem minha vida com suas energias e carinhos;

A meu esposo, Eder Lopes Campos Júnior pelo apoio e compreensão;

A Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki, minha Orientadora, pela grande oportunidade que me concedeu, abrindo as portas para a realização deste trabalho, por seus ensinamentos e extrema dedicação, credibilidade no meu trabalho e dando-me forças para seguir em frente;

Aos Doutores Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Roberto Albuquerque de Lima e Thayse Alves de Lima e Silva, pela grande colaboração neste trabalho, pela paciência e dedicação, as quais serei eternamente grata;

A Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, contribuindo fortemente para minha formação;

Aos meus amigos Giuliana Silva, Flávia Carmelita, Carlos Alberto, Danyelle Costa e Alessandra Brito pelo apoio fornecido durante todo o curso.

Aos meus colegas do mestrado, Ana Carla Carvalho, Hamilton Felix, Keissy Wanderley, Hugo Giovanni e Maria Aparecida, por todas as experiências trocadas durante todo o curso.

A todos os professores do curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, que passaram através de suas aulas, os ensinamentos necessários para minha formação profissional e que serão levados por toda minha vida.

A todos os colegas do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, especialmente, Daylin Rubio Rubeaux, Dayana Montero-Rodríguez, Adriana Ferreira de Souza, pela colaboração, atenção e apoio que me deram.

Aos funcionários do Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, especialmente, Sr. Humberto Almeida, André Felipe e Sonia Maria de Souza, pela atenção e presteza em todos os momentos;

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco, pela presteza e atenção durante todo o curso;

Aos meus amigos da Unidade de Laboratório do Hospital das Clínicas, Geórgia Cruz, Aliny Almeida, Raphael Douglas, Daniele Braz, Rosana Beatriz e Cristiane Ramos, pela amizade e pela força que sempre me deram, me apoiando e incentivando a seguir sempre em frente.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco-FACEPE, pela bolsa concedida para a realização deste trabalho, como também ao fomento à pesquisa concedido pelo CNPq, FACEPE e CAPES.

A todos que diretamente ou indiretamente, colaboraram de alguma forma na construção deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
1.3 Revisão da Literatura	17
1.4 Referências Bibliográficas	36
CAPÍTULO II – Artigo científico	43
CAPÍTULO III	
Conclusões Gerais	62
ANEXOS	63

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** – Molécula de tensoativo (Surfactante). 17
- Figura 2** – Organização das moléculas de tensoativos. 18
- Figura 3** – A relação entre a concentração do biossurfactante, a tensão superficial e a formação de micelas. 19
- Figura 4** – Metabolismo intermediário relacionado à produção de biossurfactante, utilizando carboidratos como substratos. 24
- Figura 5** – Metabolismo intermediário relacionado à produção de biossurfactante, utilizando hidrocarbonetos como substratos. 25
- Figura 6** – Tipos de ácidos graxos. 28
- Figura 7** – *Penicillium spinulosum*, colônias em CYA e MEA a 28°C, após 7 dias. Microscópia do *P. spinulosum*. 31

CAPÍTULO II

- Figura 1 – 1A.** Efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* com 96 horas de cultivo. 51
- 1.B** Curvas de contorno na produção de biossurfactante produzido por *P. spinulosum* (UCP1347) formulado por diferentes concentrações de milhocina e óleo de soja pós fritura determinado pela tensão superficial. Molécula de tensoativo (Surfactante).
- Figura 2** – Espectrometria ao raio Infravermelho (IV) do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* UCP1347 extraído por etanol. 52
- Figura 3** – Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* em diferentes pH, salinidade e temperatura. 53
- Figura 4** – Índice de emulsificação e Atividade emulsificante após 96 horas do processo de fermentação por *P. spinulosum* UCP1347. 54
- Figura 5** – Percentual do Crescimento da raiz e Índice de germinação do repolho (*Brassica oleracea*) e da alface (*Lactuca sativa*) frente ao biossurfactante por *P. spinulosum*. 55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos.	20
Tabela 2 – Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes.	26
Tabela 3 – Composição química em Aminoácidos, Vitaminas e Minerais encontrados em uma solução concentrada de milhocina.	35

CAPÍTULO II

Tabela 1 – 1.A Planejamento fatorial 2^2	49
Tabela 1 – 1.B Resultado das tensões superficiais, pH e biomassa do <i>P. spinulosum</i> , após fermentação submersa a 28°C, 150 rpm, depois de 96 horas.	50
Tabela 2 – Composição dos ácidos graxos do biossurfactante produzido por <i>P. spinulosom</i> , após 96 horas de fermentação.	52
Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos da biomassa lipídica do <i>P. spinulosom</i> , após 96 horas de fermentação.	56

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas de origem microbiana que apresentam atividade em diferentes tipos de superfícies, elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, sendo produzidos a partir de fontes renováveis, e apresentando aplicações sob condições extremas de pH e temperatura. Os micro-organismos oleaginosos apresentam como principal característica a habilidade de acumular lipídeos acima de 20% do seu peso seco, sendo quimicamente descritos como triacilgliceróis, apresentando uma constituição comparável aos óleos vegetais e animais, sendo sua composição química semelhante ao biodiesel. Ensaio foram realizados visando à produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum* UCP1347, utilizando como substratos milhocina (5%) e óleo de soja pós-fritura (3%), aplicando um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR 2². A fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyers contendo 100mL do meio de acordo com o DCCR, 5% de inóculo da suspensão de 10⁷ esporos/mL, incubados à temperatura de 28^oC, agitação orbital de 150rpm e 96h. Ao final da fermentação, o líquido metabólico livre de células apresentou a produção de um biossurfactante que reduziu a tensão superficial da água de 72 para 32,7 mN/m, tensão interfacial de 1,7 mN/m, CMC de 1,25%(p/v), atividade de emulsificação de 3,73 UEA/mL utilizando óleo de soja pós-fritura, como também estabilidade frente a variações de pH, temperatura e salinidade. O biossurfactante de caráter aniônico apresentou uma composição polimérica (39,56% de carboidratos, 33,78% de lipídeos e 10,4% de proteínas). No mesmo ensaio (pontos centrais) foi observado uma biomassa com acumulação de 57% de lipídeos, em relação ao peso seco, com uma composição química de ácidos graxos insaturados (ácido palmitoléico, oléico e linoléico) e saturados (ácido palmítico e esteárico). Os resultados obtidos demonstram que o *P. spinulosum* é um fungo filamentosos oleaginoso, promissor, com elevado potencial biotecnológico na produção de biossurfactante e lipídeos de constituição comparável ao biodiesel, além da habilidade de utilizar como fontes alternativas e renováveis os resíduos agroindustriais, reduzindo o custo de produção de ambos os produtos.

Palavras-chave: Biossurfactantes; fungo oleaginoso; resíduos agroindustriais; *Penicillium spinulosum*

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules of microbial origin that exhibit activity on different types of surfaces, have high biodegradability, low toxicity, can be produced from renewable sources and have functionality under extreme conditions of pH and temperature. Oleaginous microorganisms present as main characteristic the ability to accumulate lipids over 20% of its dry weight, represented in the form of triacylglycerol, a constitution comparable to vegetable and animal oils, and their chemical composition similar to biodiesel. Assays were carried out for the simultaneous production of lipids and biosurfactant by *Penicillium spinulosum* UCP1347 using as substrates corn steep liquor (5%) and post-frying soybean oil (3%), using an Experimental Design - Central Composite Design – CCD 2². The fermentation was performed in Erlenmyers flaks containing 100 mL of medium, in according to the CCD, 5% of the suspension inoculum of 10⁷ spores/mL, incubated at temperature of 28°C, orbital shaking of 150 rpm and 96 hours. At the end of fermentation, the cell free broth showed the production of a biosurfactant, which reduced the water surface tension from 72 to 32.7 mN/m, interfacial tension of 1.7 mN/m, CMC 1.25% (w/v), emulsifying activity 3.73 UEA /mL using post-frying soybean oil, as well as stability against pH, temperature and salinity. The anionic character of biosurfactant showed a polymeric composition (39.56% carbohydrates, 33.78% lipids and 10.4% protein). In the same assay (central points) was observed accumulation of a biomass with 57% of lipids in the dry weight, with a chemical composition of unsaturated fatty acids (palmitoleic, oleic and linoleic acids) and saturated (palmitic and stearic acids). The results show that *P. spinulosum* is an oleaginous filamentous fungus, promising with high biotechnological potential in the production of biosurfactant and lipids to the biodiesel formation and the ability to use agro-industrial waste as alternative and renewable sources, reducing the production costs of both products.

Key-words: Biosurfactants; oleaginous fungus; agro-industrial residues; *Penicillium spinulosum*

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Surfactante é a denominação dada a moléculas anfipáticas, de superfície ativa, consistindo de uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, onde a parte hidrofóbica incide em um hidrocarboneto, enquanto que a hidrofílica pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfotérica. E por essa natureza, os surfactantes podem atuar entre duas interfaces de fluidos de diferentes polaridades tais como água/óleo ou água/ar (BANAT et al., 2010; RODRIGUES et al., 2015).

Os biossurfactantes são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos e principalmente por bactérias, apresentando diferentes estruturas químicas com diferentes funções e aplicações (BEZERRA, 2010). Sua produção justifica-se pelas inúmeras aplicações em diferentes setores industriais, tais como, de cosméticos, alimentos, detergentes, agricultura e medicina. Contudo, a maior área de aplicação dos biossurfactantes é a indústria do petróleo, tanto na produção deste como na incorporação das formulações de óleo, na remoção de lodo dos tanques de estocagem, dispersão no derramamento de óleo no mar e no solo, na recuperação melhorada de petróleo (MEOR) e na biorremediação de contaminantes hidrofóbicos (DECESARO et al., 2013; GUDINÃ et al., 2015).

Os biossurfactantes são aceitos ecologicamente por sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e eficiência em uma ampla gama de condições extremas, incluindo temperatura, pH e salinidade (SOBRINHO et al., 2013).

Óleos microbianos, ou seja, Single Cell Oil (SCO), são lipídios produzidos por micro-organismos oleaginosos, sendo de grande interesse nas últimas décadas, devido a suas funções significativas e características específicas. Os micro-organismos, considerados oleaginosos (bactérias, leveduras, fungos e microalgas) podem acumular lipídios acima de 20% do seu peso seco. Os óleos microbianos são similares em tipo e composição aos óleos e gorduras obtidos de plantas e animais (HUANG et al., 2013; BONTURI et al., 2015).

As vantagens do uso de micro-organismos para a produção de óleo quando comparado com óleo vegetal são: curto ciclo de vida, matérias-primas de baixo custo e em grande quantidade, não depende da sazonalidade, além de facilidade de expandir sua produção. Sua aplicação vai depender do perfil de ácidos graxos característicos do óleo que, por sua vez, depende do micro-organismo, assim como as condições de cultivo. Leveduras tendem a produzir uma quantidade limitada de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), diferentemente de alguns fungos filamentosos (ENSHAEIEH, 2015).

Desta forma, os estudos sobre o metabolismo microbiano são uma alternativa para favorecer a produção de óleo para a fabricação de combustíveis parece ser o caminho para a

3ª geração de biocombustíveis. Assim, os óleos podem ser produzidos a partir de materiais mais apropriados como celulose, glicerol residual ou, até mesmo resíduo de óleo (POLI, 2013).

Milhões de toneladas de resíduos industriais e residenciais são gerados e rejeitados no meio ambiente todos os dias, podendo na grande maioria das vezes serem reutilizados minimizando assim, o impacto negativo provocado por esses resíduos no meio ambiente (GALLERT; WINTER, 2002; COLLA et al., 2015).

Como estratégia para a redução dos elevados custos da produção industrial de biossurfactante, como também para produção de óleo microbiano (Single Cell Oil), os subprodutos agroindustriais vêm sendo avaliados como fonte nutricional alternativa, favorecendo, também, a minimização do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses rejeitos no ambiente (MORAIS; ABUD, 2012; ORTENZIO et al., 2015).

As espécies do gênero *Penicillium* são consideradas de extrema importância na natureza, pois atuam na decomposição de matéria orgânica, podendo ser encontrados no habitat natural em todos os ecossistemas. Devido à sua elevada competência metabólica, não são muito exigentes nutricionalmente, tolerando uma grande variedade de condições físicas e químicas, como temperatura, atividade da água e pH. É exatamente esta elevada tolerância às condições extremas que lhes conferem a capacidade de crescer em quaisquer ambientes que lhes proporcionem as fontes nutricionais, inclusive as mais complexas fontes de carbono (SAMSON, 2011; CARDOSO, 2015).

Portanto, neste trabalho foi investigada a obtenção de bioprodutos, gerando novos conhecimentos, com vista à solução de problemas regionais com resíduos industriais e conhecimento do potencial da biodiversidade microbiana na produção de biotenssoativos e biocombustíveis.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum*, utilizando resíduos agroindustriais (milhocina e óleo de soja pós-fritura), como substratos alternativos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a maior produção de biossurfactante por *Penicillium spinulosum* utilizando milhocina e óleo de soja pós-fritura, através de um planejamento com Delineamento Central Composto Rotacional – DCCR;
- Isolar e purificar o biossurfactante produzido por *P. spinulosum*;
- Realizar a extração dos lipídeos acumulados na biomassa de *P. spinulosum*;
- Caracterizar o biossurfactante e lipídeos através de métodos físicos, químicos e biológicos;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Biossurfactantes

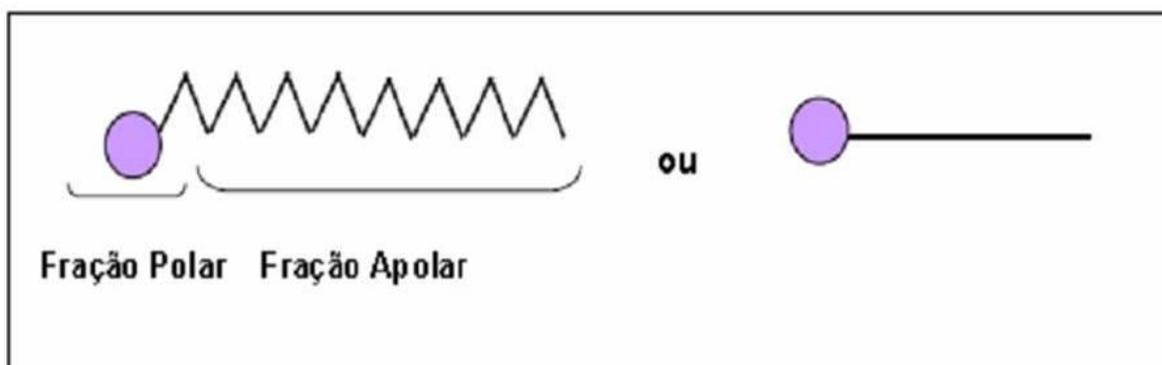
Surfactantes

Os surfactantes são agentes ativos de superfície que diminuem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface reduzindo a tensão interfacial e superficial dos líquidos. Eles possuem uma porção hidrofílica que é fortemente atraído pelo meio aquoso e um grupo hidrofóbico com pequena afinidade ao meio aquoso (MULLIGAN, 2005; GUDIÑA, 2015).

Os surfactantes ou tensoativos, por possuírem uma parte apolar e outra polar (Figura 1), são também conhecidos como substâncias anfifílicas. Os tensoativos são classificados em aniônicos, não iônicos ou anfóteros e catiônicos, conforme a carga exibida pela porção polar da molécula. A composição da parte hidrofóbica é geralmente composta por um hidrocarboneto ramificado ou linear, possuindo ou não duplas ligações e/ou grupos aromáticos. Devido às atrações eletrostáticas entre a carga do íon e os dipolos da água, os íons têm uma forte afinidade pela água. Além disso, têm capacidade de carregar cadeias carbônicas longas (parte apolar) para dentro da solução (BUENO, 2010; THAVASI, 2014; BARRO et al., 2015).

Em função da presença de grupos anfifílicos, os tensoativos tendem a se distribuir nas interfaces fluídas com diferentes graus de polaridade (água/óleo e óleo/água). A redução da tensão superficial e interfacial se dá pela formação de um filme molecular, ordenando nas interfaces, com isso os surfactantes são responsáveis por propriedades únicas, como: detergência, emulsificação (micro e macro), lubrificação, ação espumante e antiespumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002; THAVASI, 2014)

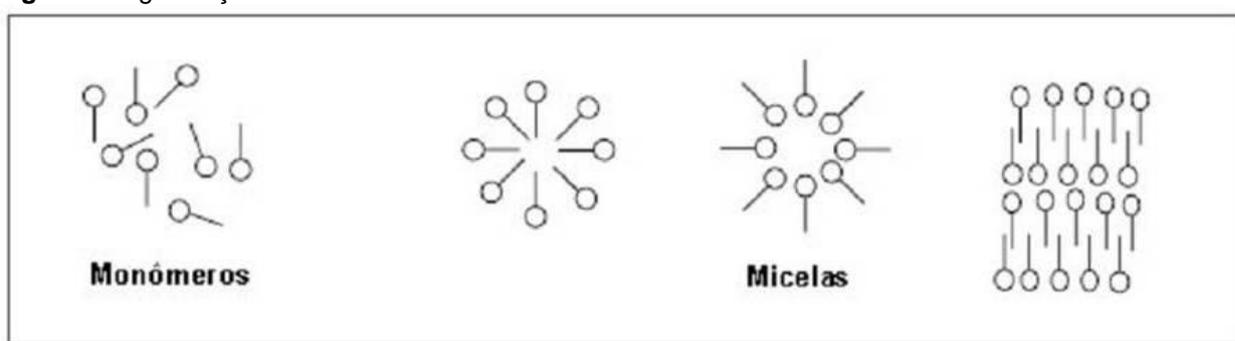
Figura 1 Molécula de tensoativo (Surfactante).



Fonte: Bueno (2010).

As moléculas de surfactantes existem na forma de monômeros, quando numa solução a concentração de tensoativo é baixa, com o aumento da concentração, os monômeros vão saturando a interface. Cada vez que uma nova molécula é adicionada à solução, vai aumentando a interação desfavorável entre as moléculas de água e a fração apolar até o ponto em que os monômeros vão se agregando formando micelas. Nestas, a fração polar está orientada para o solvente e a fração apolar para o centro da estrutura. A natureza da parte apolar do tensoativo irá definir o tamanho da micela (Figura 2) (MESQUITA, 2004; CLIN, 2012; CORRÊA et al., 2015).

Figura 2 Organização das moléculas de tensoativos.



Fonte: Bueno (2008).

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração de surfactantes, na qual a termodinâmica do sistema tensoativo-solvente favorece a formação de micelas. Em concentrações acima da CMC, o surfactante consegue aumentar a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa, uma vez que o composto orgânico é incorporado no interior da micela (MESQUITA, 2004; MULLIGAN, 2005; MARINHO, 2015).

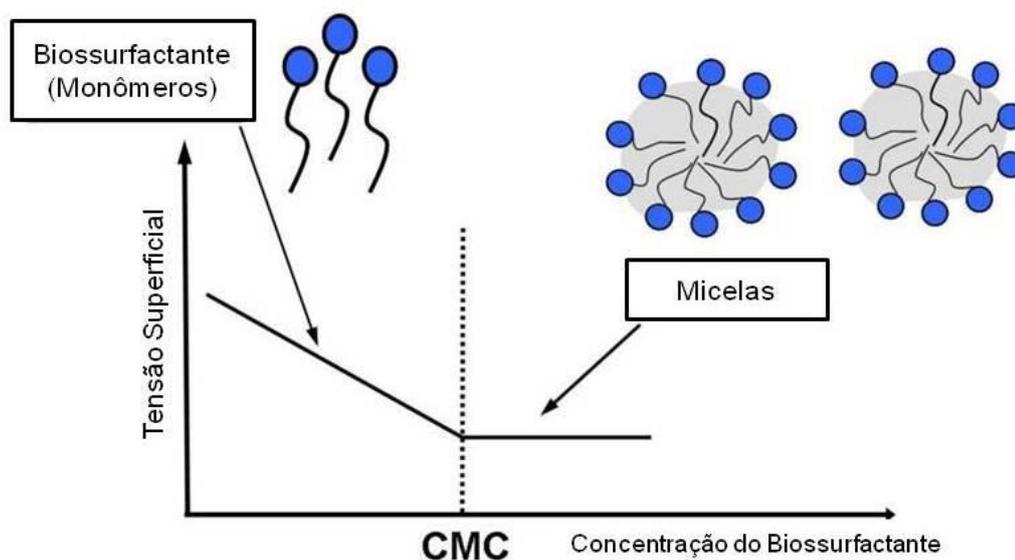
Um surfactante é eficiente devido a sua capacidade de diminuir a tensão superficial, que é uma medida da energia superficial livre (entalpia da superfície livre) por unidade de área requerida para trazer a molécula para a superfície, ou seja, a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; MESQUITA, 2004; SALAGER et al., 2013).

A tensão superficial está correlacionada com a CMC. Baixa CMC torna o surfactante eficiente, por ser necessária uma menor quantidade de tensoativo para reduzir a tensão superficial (BUENO, 2010; CORRÊA et al., 2015).

A redução da tensão superficial da água é de 72 mN/m para valores na faixa entre 47 e 27 mN/m com adição de surfactantes sintéticos ou biossurfactantes, e a tensão interfacial (tensão entre líquido polar e não polar) como água em n-hexadecano é de 40 mN/m para 1mN/m (MESQUITA, 2004; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011; MARINHO, 2015).

A CMC varia na solução aquosa em função da estrutura do surfactante, pH, temperatura presença de eletrólitos e compostos orgânicos. O tamanho da fração apolar da molécula de surfactante é um fator importante. A CMC diminui com o aumento da hidrofobicidade da molécula, isto é, quanto maior a cadeia carbônica da fração apolar do tensoativo, maior a tendência das moléculas de se adsorverem entre a interfase ar-água diminuindo a tensão superficial da solução (MESQUITA, 2004; FONTES et al., 2015).

Figura 3 A relação entre a concentração do biossurfactante, a tensão superficial e a formação de micelas.



Fonte: Pacwa-Plociniczak et al. (2011).

A CMC do surfactante é maior na água pura que na água intersticial, pois a presença de sais dissolvidos na água aumenta a força iônica da solução. Com isso, há um aumento da adsorção do tensoativo na superfície, sendo adicionada uma quantidade maior de tensoativo para atingir a CMC (MESQUITA, 2004; MARINHO, 2015).

Os impactos ambientais gerados pelas atividades industriais são a grande preocupação dos dias atuais. Por essa razão, muitas técnicas de descontaminação foram desenvolvidas ao longo dos anos. Mais ultimamente, os surfactantes têm sido empregados nos processos de lavagem de solo para remoção de substâncias hidrofóbicas. Muitos fatores podem influenciar na eficiência desta lavagem com tensoativos. Entre elas estão: a adsorção em argilas, dureza da água subterrânea e biodegradabilidade muito elevada (LUNA, 2011).

A maioria dos surfactantes são sintetizados de derivados de petróleo. Por isso, tem aumentado o interesse por surfactantes de origem microbiana, por serem naturalmente biodegradáveis, diminuindo os impactos ambientais, além de possuírem aplicações em

diferentes setores industriais, como petroquímica, produtos alimentícios, formulações farmacêuticas e cosméticas e nas áreas de biorremediação (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; BARROS et al., 2015).

Biossurfactantes

Vários seres vivos produzem biossurfactantes, tais como os animais, as plantas e os micro-organismos. Os biossurfactantes de origem microbiana são considerados mais promissores devido ao curto tempo de geração quando comparados ao crescimento de plantas e animais. O tipo de biossurfactante é muito específico podendo variar de espécie para espécie (Tabela 1) (LIMA et al., 2012; AGUIAR et al., 2015).

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos

MICRO-ORGANISMOS	CLASSE DE BIOSSURFACTANTES
<i>Candida lipolytica</i>	Liposan
<i>Candida petrophilium</i>	Peptícolipídeo
<i>Candida tropicalis</i>	Complexo ácido graxo-polissacarídeo
<i>Candida glabrata</i>	Soforolipídeo
<i>Trolulopsis petrophilium</i>	Glicolipídeo e/ou proteína
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Lipoheteropolissacarídeo (emulsan)
<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N	Ácidos graxos, mono e diglicerídeos
<i>Arthobacter</i>	Glicolipídeo
<i>Arthobacter paraffineus</i>	Glicolipídeos sacarose e frutose
<i>Bacillus licheniformes</i>	Lipoproteína (lichenysin)
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	Lipídeos neutros
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lipídeos neutros
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeos
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Fosfolipídeo
<i>Aspergillus sp.</i>	Fosfolipídeo
<i>Streptomyces tendae</i>	Streptofactina
<i>Flavobacterium sp.</i>	Flavolipídeos

Fonte: Andrade (2010).

Na década de 60, foram descobertos os biossurfactantes, compostos extracelulares anfipáticos. Os biossurfactantes possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. Os biotensoativos se acumulam na interface ar-água e óleo-água e superfície (MUTHUSAMY et al., 2008).

De acordo com Lima (2012), os biossurfactantes podem possuir baixo ou alto peso molecular. Os que apresentam baixo peso molecular possuem maior eficiência na redução da tensão superficial, e os de alto peso molecular são mais eficientes em estabilizar emulsões entre líquidos com diferentes graus de polaridade.

Os biossurfactantes têm características importantes frente aos surfactantes sintéticos, tais como baixa toxicidade, maior redução de tensão superficial, solubilidade em água alcalina, alta biodegradabilidade, estabilidade térmica, resistência a altas concentrações salinas e estabilidade quanto a variações de pH. Devido a sua resistência à degradação, toxicidade e o acúmulo em ecossistemas naturais, muitos surfactantes sintéticos causam danos ecológicos (CERQUEIRA; COSTA, 2009; GUDIÑA et al., 2015;).

A produção de biossurfactantes é limitada devido ao alto custo para obtenção destes compostos. Os biotensoativos têm despertado interesse em sua produção biotecnológica, devido sua diversidade estrutural com grande potencial para aplicação. Porém, o uso de fontes renováveis ou resíduos industriais e de baixo custo surge como alternativa promissora para a obtenção deste biopolímero; desta forma, há uma redução dos custos e melhorias no meio ambiente pela diminuição da carga de material poluente (LIMA, 2012; FARIA, 2015).

Os biossurfactantes ou biotensoativos são classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana, podendo ser produzidos por diversos micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (MUTHUSAMY et al., 2008).

A comercialização dos biossurfactantes depende do máximo rendimento e produtividade do processo, bem como redução dos custos relativos à sua produção e recuperação (ALMEIDA, 2001; CORRÊA et al., 2015).

Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Há uma grande variedade de micro-organismos produtores de biossurfactantes, sendo que a natureza do substrato, concentração de íons no meio de cultura, além das condições de cultivo influenciam no tipo, quantidade e qualidade do biossurfactante (BUENO, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

São incluídas no grupo de bactérias produtoras de surfactantes: *Pseudomonas aeruginosa* (mono-di-ramnolipídeos), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos, glicolipídeos, etc.) *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis*

(lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem as leveduras *Torulopsis sp* (soforolipídeos) e *Candida sp* (liposan e fosfolipídios) (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; CORRÊA et al., 2015).

Biossurfactantes eficientes para a descontaminação de solo poluído com substâncias hidrofóbicas podem ser obtidos por vários micro-organismos como: *Acinetobacter calcoeticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus erythropolis*. Este último pode produzir material biofloculante que causa floculação eficiente de suspensões sólidas (BUENO, 2010).

Propriedades dos biossurfactantes

Os biossurfactantes possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular, e também apresentam vantagens por poderem ser obtidos a partir de substratos renováveis. Além disso, suas propriedades físicas e características estruturais distintas, os torna comparáveis ou superiores aos surfactantes químicos em relação à eficiência (DESAI; BANAT, 1997; SALAGER, 2013).

Segundo Lima (2012), os surfactantes produzidos por micro-organismos são caracterizados como compostos tensoativos devido as suas propriedades. Dentre elas, pode-se citar:

- Alguns biossurfactantes apresentam propriedades antimicrobianas, resultando na destruição de micro-organismos pela lise de suas membranas celulares. No microambiente, esta propriedade é importante para evitar competição com outros micro-organismos por nutrientes.
- Apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial devido à formação de um filme molecular;
- Formam macro e micro emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou água em hidrocarbonetos. Para tanto, a emulsificação consiste na formação de emulsões entre duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade ocorrendo a dispersão de um líquido em outro;
- Os surfactantes podem ser iônicos ou não-iônicos. Dentre os surfactantes iônicos utilizados comercialmente destacam-se os ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônicos);
- Proporcionam formação de micelas onde, em solução as moléculas de surfactantes tendem a se agregar umas com as outras, implicando na redução da tensão superficial até atingir a Concentração Micelar Crítica (CMC);

Produção dos biossurfactantes

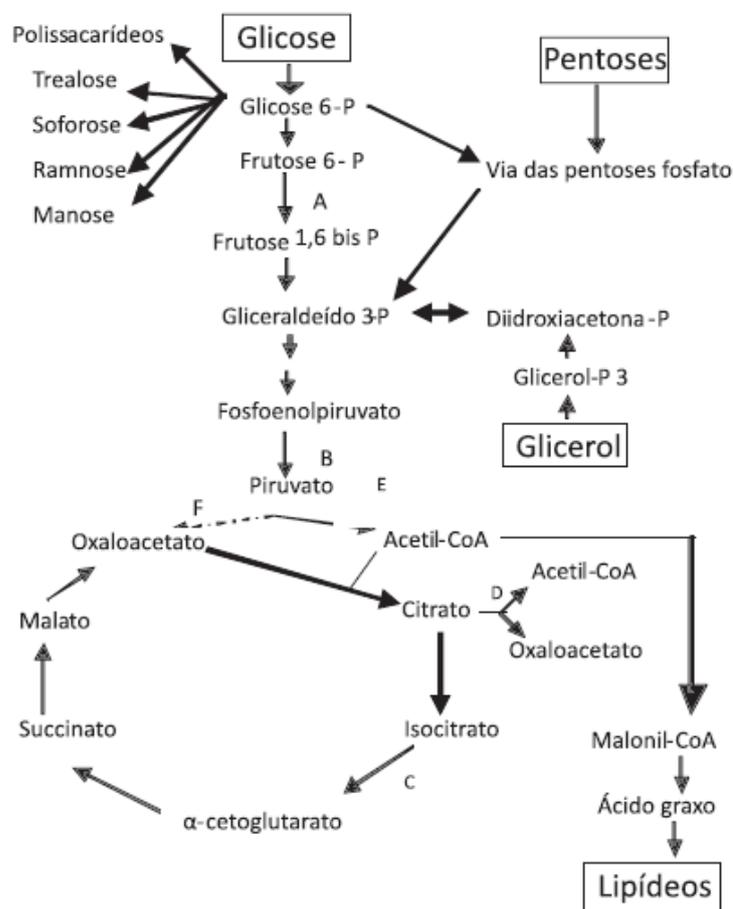
As fontes de carbono e nitrogênio são o que irá influenciar na composição e nas características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como agitação, temperatura e pH e forma de condução do processo são de grande importância na qualidade e quantidade do biossurfactante produzido. Para obtenção de uma elevada quantidade de biossurfactante é de fundamental importância o estudo das condições do processo e dos requerimentos nutricionais (DECESARO et al., 2013; AGUIAR et al., 20015).

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de temperatura, pH, velocidade de agitação e aeração, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DECESARO et al., 2013).

As fontes de carbono que influenciam na produção de biossurfactante por diferentes cepas de micro-organismos tem sido alvo de vários estudos. Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (DECESARO et al., 2013; KALYANI et al., 2014).

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolípídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas e glicolíticas (formação de lipídeos e formação da porção hidrofílica, respectivamente) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano (Figura 4) (SYLDATK; WAGNER, 1987; FONTES et al., 2008).

Figura 4 Metabolismo intermediário relacionado à produção de biossurfactante, utilizando carboidratos como substratos.



Fonte: Fontes et al. (2008).

Os substratos hidrofílicos utilizados são transformados em intermediários da via glicolítica, como a glicose-6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante (Figura 4). Na produção de lipídeos a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (YOUSSEF et al, 2004; FONTES et al., 2008; KALYANI et al., 2014).

Quando se utiliza um hidrocarboneto como fonte de carbono o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de precursores diferentes das hexoses) que poderá ser utilizado na produção de ácidos graxos ou sacarídeos. Na produção de sacarídeos, a via da gliconeogênese é ativada. Consistindo na oxidação dos ácidos graxos via β -oxidação a acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação do acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores do polissacarídeo, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. Entretanto, as reações catalisadas pela piruvato quinase e

Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes dividem a interface entre fluídos com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio tais como ar/água ou óleo/água interfacial. Devido a estas propriedades, os biotensoativos são capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial e formar microemulsões, nas quais os hidrocarbonetos podem solubilizar-se em água ou vice-versa. Com isso, estas moléculas podem ser usadas em vários setores industriais que envolvam o uso de surfactantes químicos como: a indústria de petróleo, farmacêutica, médica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, detergentes, tratamento e processamento de metais, indústria de tintas, emulsões, floculação, processamento de polpas de papel, na produção de produtos de higiene pessoal e processamento de alimentos (textura) (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; DECESARO, 2013; CORRÊA et al., 2015).

Tabela 2: Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes

Funções	Campos de aplicações
Emulsificação e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistema de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

Fonte: Nitschke (2002).

1.3.2 Biomassa lipídica (Single Cell Oil)

Os lipídeos microbianos (ou Single Cell Oil, SCO) podem ser definidos como óleos e/ou gorduras produzidos por algas, fungos filamentosos, e principalmente leveduras. São similares em tipo e composição aos óleos e gorduras obtidos de animais e plantas (RATLEDGE, 2005; ENSHAEIEH, 2015). Os triglicerídeos são os principais componentes lipídicos produzidos pelos microrganismos, compostos de cadeias de ácidos graxos com tamanhos entre 14 e 20 carbonos (ZHAO, 2008).

Os lipídeos microbianos são considerados fontes alternativas de óleos e principalmente de ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poliinsaturados (PUFAs) e podem vir a contribuir para a produção de óleos, visto que em geral sua estrutura é similar aos óleos vegetais comuns. Os principais ácidos graxos dos lipídeos produzidos por micro-organismo são o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) que são os principais compostos do biodiesel (FEI et al., 2011; ROSA, 2015).

Ultimamente, tem sido dada muita atenção para os óleos produzidos por micro-organismos, como fungos, microalgas e bactérias, que são capazes de acumular óleos sob condições de cultivo especial. Em comparação com outros óleos vegetais, os óleos microbianos têm muitas vantagens, tais como ciclo de vida curto, menos trabalho requerido, são menos afetados pelo local, estação e clima, e de crescimento mais rápido. Com a expansão do biodiesel, futuramente os óleos microbianos podem se tornar uma das matérias-primas lipídicas com potencial para a produção do biodiesel, mesmo que ainda muitos trabalhos associados a micro-organismos produzindo óleos necessitam serem realizados (CASTANHA et al., 2014; CARVALHO et al., 2015).

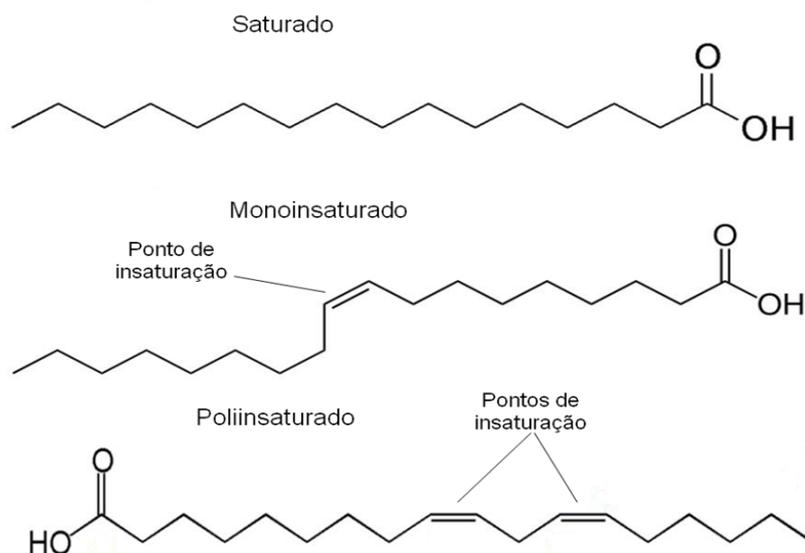
O custo com a produção do biodiesel de micro-organismos oleaginosos deve-se principalmente ao alto custo da glicose, o qual é estimado em aproximadamente 80% do custo total do meio. Assim, consideráveis esforços têm sido direcionados para minimizar os custos da fonte de carbono e encontrar novas fontes alternativas (TSIGIE et al., 2011).

Para reduzir os custos dos óleos microbianos têm sido estudadas outras fontes de carbono para substituir a glicose, especialmente para óleos utilizados na produção de biodiesel. Foram encontrados relatos que xilose, arabinose, manose, glicerol, e outros resíduos agrícolas e industriais vêm sendo usados como fonte de carbono para o acúmulo de óleos em leveduras (CASTANHA et al., 2014; ROSA, 2015).

Ácidos graxos

Os ácidos graxos são formados por cadeias de átomos de carbono que se ligam a átomos de hidrogênio com um radical ácido em uma de suas extremidades (Figura 6). Podendo se apresentar na forma saturada (ligações simples) ou insaturada (com uma ou mais ligações duplas). No caso de apenas uma dupla ligação na cadeia, o ácido graxo é denominado monoinsaturado, no caso de duas ou mais ligações, chama-se poli-insaturado. Geralmente as gorduras apresentam ácidos graxos saturados em sua composição, já, os óleos, apresentam ácidos graxos insaturados. Essas diferenças são percebidas nos estados físicos desses compostos em temperatura ambiente. Vale ressaltar que quanto mais elevada a concentração de ácidos graxos saturados no lipídeo, mais sólido ele se apresentará (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1996; MELO et al., 2015).

Figura 6 Tipos de ácidos graxos



Fonte: Próprio autor

Os ácidos graxos essenciais compõem uma classe de moléculas que não podem ser produzidas pelo organismo, devido à carência de enzimas dessaturases e hidrogenases. Tradicionalmente, são obtidos na dieta humana através de vegetais e animais, como óleos e gorduras; porém possuem alguns problemas como mau sabor e odor e ainda, fornecimento de colesterol em excesso. A produção microbiana desses ácidos graxos essenciais biologicamente ativos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, pois são mais desejáveis para serem utilizados como aditivos alimentares. Os ácidos graxos essenciais como o linoléico (LA, 18:2 ω -6) e alfa-linolênico (ALA, ω -3) são sintetizados, exclusivamente pelo

reino vegetal. (VAZ et al., 2006; BATISTA et al., 2015).

Síntese de ácidos graxos e fatores que afetam a produção

Os lipídeos intracelulares podem ser acumulados através de duas vias diferentes: a) síntese de *novo*, que em condições definidas, envolve a produção de ácidos graxos percussores, como a acetil-coenzima A (acetil CoA) e malonil-CoA, a partir de carboidratos não oleaginosos e sua integração via biossintética de armazenamento de lipídeos (via Kennedy) e b) via de acumulação *ex novo*, envolvendo a captação de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis (TAG) do meio de cultura e seu acúmulo em forma não-modificada ou modificada no interior da célula. Esta última via, requer hidrólise do substrato não hidrofóbico, transporte dos ácidos graxos liberados para dentro da célula, sua remontagem nas frações de TAG e esterol éster (ES) e seu acúmulo dentro dos corpos lipídicos (BEOPOULOS et al., 2009; POLI, 2013; GOMES et al., 2015).

Um dos fatores determinantes para o acúmulo de lipídeos em micro-organismos é a razão carbono/nitrogênio (C/N), sendo que o excesso de carbono e condições limitantes de nitrogênio favorecem o processo. Os micro-organismos esgotam de forma mais rápida a fonte de nitrogênio, mas continuam a assimilar a fonte de carbono, levando ao acúmulo de triglicédeos. Para que ocorra a síntese de lipídeos, é necessário um grande suprimento intracelular de Acetil-CoA e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (POLI, 2013).

Micro-organismos produtores de lipídeos

Micro-organismos oleaginosos são os que acumulam intracelularmente lipídeos na forma de glóbulos discretos, estando estes em teores acima de 20%. Os principais microrganismos conhecidos como produtores de lipídeos são leveduras, fungos filamentosos, algas e não mais de três gêneros de bactéria (*Rhodococcus*, *Acinetobacter* e *Nocardia*). Segundo o tipo de lipídeo desejado deve ser feita a escolha do micro-organismo. As leveduras são as mais utilizadas na produção de lipídeos de seis cadeias saturadas e algas e fungos filamentosos foram reconhecidos como produtores de ácidos graxos poliinsaturados (CAZETTA; CELLIGOI, 2005; REIS et al., 2015).

A quantidade de lipídeos produzida e sua composição diferem de acordo com as cepas e as condições de cultivo. As leveduras oleaginosas têm sido as mais estudadas devido a sua capacidade de acumular grandes quantidades de lipídeos e suas elevadas taxas de crescimento (DELABIO et al., 2012; REIS et al., 2015).

Desde o primeiro quarto do século XX, é conhecida a capacidade dos micro-organismos de sintetizarem lipídeos, mas o interesse pelo aproveitamento dessa capacidade de síntese

data dos últimos 25 anos daquele século e do século XXI (REIS et al., 2015).

Nem todos os micro-organismos são capazes de acumular gordura de forma substancial. Estudos realizados por Papanikolaou et al. (2008), demonstrou a ação do fungo *Mortierella isabellina*, que apresentou um rendimento de 0,08 g/g na produção de lipídeo por glicerol consumido, à temperatura de 33°C e pH 7,0 ± 0,1 e utilizando como fonte de carbono, glicerol puro e bruto. Ressaltando que todos os experimentos obtiveram o mesmo rendimento em relação à utilização de glicerol puro e do proveniente da indústria do biodiesel o que evidencia o potencial de aproveitamento do glicerol bruto para fins industriais.

Analisando quinze espécies de fungos, os mesmos pesquisadores, observaram acúmulo de lipídeos em meio com limitação de nitrogênio e concentração de 30g/L de glicerol bruto. As leveduras apresentaram um acúmulo aproximado de 22% (m/m), sendo a espécie *Rhodotorula sp.* a mais eficiente. Com relação aos fungos o acúmulo foi de aproximadamente 42,6% (m/m), ocorrendo predominância de ácido linoleico. Nas mesmas condições a levedura *Yarrowia lipolytica* produziu 29,2g/L de ácido acético e 19,4g/L de manitol, enquanto a levedura *Pichia membranifaciens* sintetizou 28,4g/L de biomassa em presença de 90g/L de glicerol bruto. Os fungos filamentosos pluricelulares e leveduras são os organismos mais promissores oferecendo possibilidade de produção econômica produzindo ácidos graxos simples.

1.3.3 Fungos

Os fungos são encontrados praticamente em qualquer local do ambiente que nos cerca, inclusive no ar, onde estruturas reprodutivas, na forma de esporos ou conídios, estão prontas para, ao cair em um substrato adequado, desenvolver novas estruturas vegetativas e reprodutivas. São importantes, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Ecologicamente, são considerados os lixeiros do mundo, pois degradam todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas. Já, economicamente, têm implicações em várias áreas: Medicina humana e veterinária, Farmácia, Nutrição, Fitopatologia, Agricultura, Biotecnologia entre outras (MELO et al., 2015).

Os fungos são organismos de extrema importância para o funcionamento dos ecossistemas. Mesmo sendo os organismos mais importantes do mundo, são limitadas ou incompletas as informações para a maioria das espécies. Estima-se um número de fungos de aproximadamente 1,5 milhão de espécies no planeta; porém apenas cerca de 70.000 espécies foram descritas, ficando assim 1.430.000 espécies não descritas. Os habitats inexplorados podem ser uma fonte de muitas espécies desconhecidas, incluindo o solo (MULLER; SCHMIT,

2007; ALVES et al., 2013; ANDRADE et al., 2015).

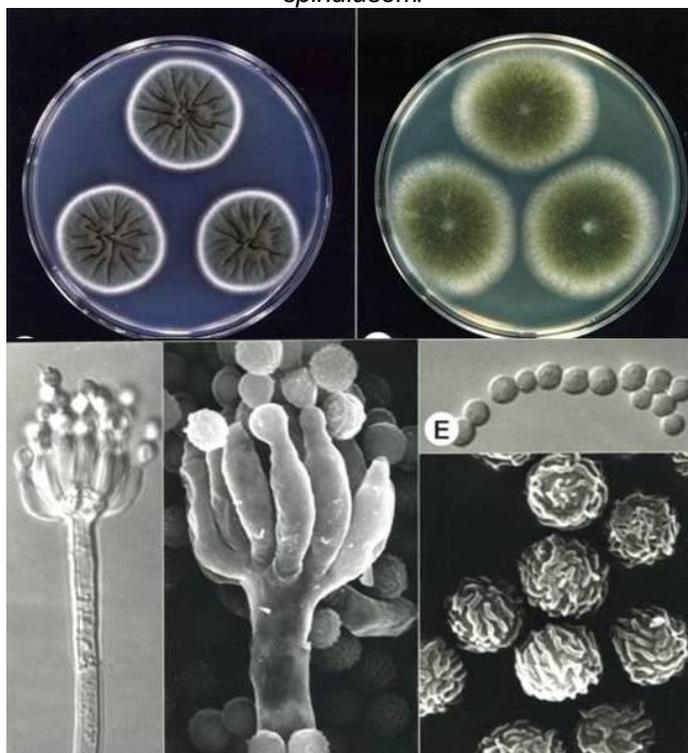
Os processos de agregação do solo, mineralização de nutrientes, decomposição de resíduos orgânicos, estabelecimentos de relações simbióticas e o controle de pragas e doenças são realizados com a participação efetiva dos fungos. Vários fungos habitantes do solo são sapróbios, participando da decomposição de matéria orgânica e contribuindo para a ciclagem dos nutrientes, outros formam micorrizas com diversas espécies de plantas (PFENNING; ABREU, 2006; ANDRADE et al., 2015).

Os gêneros de fungos filamentosos mais encontrados no solo são representantes de *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pythium*, *Trichoderma*, *Verticillium* e *Alternaria* (GAMS, 2007; MOTTA et al., 2015).

Penicillium

O gênero *Penicillium* pertence ao filo Ascomycota, ao subfilo Pezizomycota, à classe Eurotiomycetes, e à ordem Eurotiales, mitospórico Trichocomaceae, sendo a fase teleomórfica pertencente ao gênero *Eupenicillium* ou *Talaromyces* (FRISVAD e SAMSON, 2004; LI e ZONG, 2010).

Figura 7 *Penicillium spinulosum*, colônias em CYA e MEA a 28°C, após 7 dias. Microscopia do *P. spinulosom*.



Fonte: <http://www.bcrc.firdi.org.tw/>

Ecologicamente, as espécies do gênero *Penicillium* são de extrema importância na natureza, pois participam ativamente em ciclos biogeoquímicos, atuando na decomposição de matéria orgânica. Embora o solo seja o habitat natural dessas espécies, elas podem ser encontradas em todos os ecossistemas. Devido à sua elevada competência metabólica, não são muito exigentes nutricionalmente, tolerando uma imensa variedade de condições físicas e químicas, como temperatura, atividade da água e pH. É exatamente esta alta tolerância às condições extremas que lhes conferem a capacidade de crescerem em quaisquer ambientes que lhes proporcionem desde o mínimo de sais minerais até às mais complexas fontes de carbono (SAMSON, 2011).

Além da importância ambiental na degradação de matéria orgânica, espécies de *Penicillium* possuem largo potencial biotecnológico, sendo amplamente utilizadas para a produção de enzimas de interesse industrial, ambiental, farmacêutico, alimentício, entre outros. As espécies pertencente ao gênero *Penicillium* são utilizadas como modelo em estudos básicos, porém muitas pesquisas têm apresentado o seu enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser utilizadas no biocontrole, micoparasitismo, utilização de seus metabólitos secundários para diversas indústrias, são fontes de enzimas de interesse industrial, principalmente na indústria farmacêutica (LACERDA; PINOTTI, 2015).

Numerosas espécies do gênero *Penicillium* apresentam um valor particular, como na indústria alimentar, destacam-se o *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti*, que estão associados na produção de determinados tipos de queijos. Outra espécie muito conhecida é o *Penicillium notatum*, produtor de antibiótico – penicilina (CHAVEZ et al., 2006; SPECIAN et al., 2015).

1.3.4 Resíduos agroindustriais

O termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente sólidos como também os efluentes e os materiais presentes nas emissões atmosféricas. Depois de gerado, o resíduo necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A destinação dos resíduos no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (SALVADOR et al., 2013). Com o crescimento populacional e o aumento das atividades industriais, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais frequentes e críticos. São milhões de toneladas de resíduos residenciais e industriais lançados no meio ambiente diariamente, refletindo na poluição do solo e águas superficiais e subterrâneas (PELIZER et al., 2007; DESEZARO et al., 2013).

Os resíduos podem conter muitas substâncias de grande valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários (WOICIECHOWSKI et al., 2013).

Os resíduos agroindustriais vêm sendo utilizados em processos biotecnológicos como substratos de baixo custo. Os metabolitos produzidos a partir de substratos baratos, renováveis e através de processos economicamente viáveis com alto rendimento, permitem diminuir os custos de produção comparados aos similares obtidos por via petroquímica e ao mesmo tempo reduzir os problemas ambientais relativos ao descarte e aos custos de tratamento (AGUIAR et al., 2015).

Metade da produção de vegetais destinados aos processos industriais e agrícolas não são aproveitados pelo homem, desta forma grandes quantidades de resíduos como palhas, madeiras, folhas, corantes, óleos, polpas, sementes, cascas e outros materiais são gerados no final do processo produtivo. Com isso, surge o problema do que se fazer com este resíduo, uma vez que descartado de forma inadequada causa danos ao meio ambiente. Estes resíduos de origem agroindustrial apresentam grandes quantidades de matéria orgânica, a qual é mensurada através da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é a quantidade de oxigênio necessária para que haja a estabilização da matéria orgânica (CARIOCA; ARORA, 1984; WOICIECHOWSKI et al., 2014).

Os resíduos podem apresentar substâncias de elevado valor. Empregando uma tecnologia adequada, estes resíduos podem ser convertidos em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários. Normalmente esses resíduos são descartados no solo, dando origem a problemas ambientais (LAUFENBERG et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2015)

Os avanços biotecnológicos, principalmente relacionados à tecnologia das fermentações, criaram novas oportunidades para o aproveitamento desses resíduos, como subprodutos, pois os mesmos fornecem uma ampla gama de substratos alternativos para o desenvolvimento de micro-organismos em diferentes processos biotecnológicos, conseqüentemente favorecendo o meio ambiente, uma vez que se podem evitar possíveis impactos ambientais e implantação de indústrias secundárias. Para a síntese de produtos desejáveis, é importante a escolha adequada da fonte de carbono, sendo os resíduos agroindustriais os mais pesquisados, porque são geralmente de baixo custo, abundantes e apresentam composição rica em material orgânico (PANDEY et al., 2001; CRAVO et al., 2015).

Milhocina

A milhocina, gerada durante o processo de maceração por via úmida do milho, é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os micro-organismos por ter uma composição formada por aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A fonte de nitrogênio utilizada para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos microrganismos (SILVEIRA, 2001; NASCIMENTO et al., 2015).

A água de maceração do milho, milhocina ou “corn steep liquor” (CSL) vem sendo utilizada como fonte alternativa para obtenção de produtos como: antibióticos, ração animal, alcoóis, biomassa, enzimas, iscas para insetos, biossurfactantes e quitina/quitosana (NASCIMENTO et al., 2015; RAGA; VIEIRA, 2015).

Segundo Silveira (2001), a água de maceração do milho pode substituir o extrato de levedura, com excelentes resultados. A milhocina, entretanto, é de difícil conservação e seu uso é dependente do valor do produto a ser obtido.

As características físico-químicas da milhocina correspondem a uma variação de pH de 3,5 a 4,1, concentração de nitrogênio está entre 3,8 % a 40,5 % no efluente bruto, açúcares não ultrapassam 5 % e ácido láctico entre 5 – 15 %, devido a já estarem em processo de fermentação nessa faixa de pH. A quantidade de matéria orgânica presente pode ser elevada, tornando-se um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias (LIGGET; KOFFLER, 1948; RAGA; VIEIRA, 2015). Em seus estudos, Akhtar (1998), analisou a composição da milhocina estudada em base seca, o pH apresentava-se em 3,9, 40,8% de proteínas; ácido láctico correspondendo a 16%; açúcares redutores 12,8%; compostos variados a 30,4% (Tabela 3).

Tabela 3: Composição de Aminoácidos, Vitaminas e Minerais encontrados em uma Solução Concentrada de Milhocina

Aminoácidos (%)	Vitaminas (mg/Kg)	Minerais (mg/ Kg) (%)
Alanina	9,83	Biotina 0,3
Argniina	3,68	Cholina 3.500,0
Á aspártico	5,82	Inositol 6000,0
Cisteína	2,20	Niacina 80,0
Ac gutâmico	18,07	Piridoxina 9,0
Triptófano		Riboflavina 6,0
Glicina	5,27	Tiamina 3,0
Histidina	3,72	Ácido Pantotêmico 15
Isoleucina	3,07	Selênio 0,3
Leucina	8,28	Zinco 60,0
Lisina	4,75	Enxofre 0,60

Fonte: Silveira (2001).

Óleo de soja pós-fritura

Óleos comestíveis, quando usados em frituras, principalmente quando descartado via esgoto, geram um passivo ambiental capaz de causar grandes problemas de poluição. Diariamente são geradas grandes quantidades de óleo de cozinha nos lares, indústrias e estabelecimentos produtores de refeições no país. Por falta de informação da população, o óleo residual muitas vezes é descartado de forma inadequada, ou seja, despejado diretamente em águas, como rios e riachos, pias e vasos sanitários, causando danos pelo entupimento de canos e aumentando o custo dos processos de tratamento do esgoto, além de poluição do meio aquático devido à formação de filmes oleosos na superfície da água dificultando a troca de gases com a atmosfera (SILVA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013).

Durante o processo de fritura, os óleos são continuamente expostos a vários fatores que levam a uma grande diversidade de reações químicas, tais como: oxidação, hidrólise, e polimerização da molécula do triacilglicerol (SANIBAL; MANCINI-FILHO, 2002).

O óleo pós-fritura pode ser usado na fabricação de sabão em pedra, detergentes, tintas, biodiesel, produção de biossurfactante, entre outros, transformando-o assim em produtos com maior valor agregado, reduzindo o impacto no meio ambiente. Dessa forma, o ciclo reverso do produto pode trazer vantagens competitivas e evitar a degradação ambiental e os problemas que surgem nos sistemas de água e esgotos (GAIO et al., 2010).

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, G. P.; MARTIS, V. G.; MARTIS, P. C.; BOSCHERO, R. A. PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Influência do meio mineral na produção de biossurfactantes. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 7, n. 1, p. 115-122, 2015.

AKHTAR, M. et al. Na overview of biomechanical pulping research. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, p.3, 1998.

ALMEIDA, K.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia Alimentícia**, v. 21, n 2, p.187-192, 2001.

ALVES, Graciéle Cunha et al. Primeiro relato de fungos Agaricales no município de São Gabriel, RS, Brasil. **Caderno de Pesquisa**, v. 24, n. 2, p. 7-20, 2013.

ANDRADE, Marcus Vinicius Ribeiro Fernandes et al. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella* sp. de solo do Sul do Tocantins, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 2, p. 58-64, 2015.

ARAUJO, Pedro Henrique; ALMEIDA, Marcos Danilo; DA SILVA, Cristiany Sally. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE ÓLEO COMESTÍVEL USADO. **Revista de Ciências da Amazônia**, v. 1, n. 1, 2013.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5 p. 495-508, 2000.

BARROS, Márcio et al. Efeitos de surfactantes na atividade catalítica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 52-55, 2015.

BATISTA, C. C. R. et al. Obtenção de Extratos da Polpa de Açaí (*Euterpe Oleracea*) Liofilizada por Extração Supercrítica: Isotermas de Rendimento Global e Composição em Ácidos Graxos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 16162-16168, 2015.

BEOPOULOS, Athanasios et al. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in lipid research**, v. 48, n. 6, p. 375-387, 2009.

BONTURI, Nemailla et al. Single Cell Oil Producing Yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of Extraction Strategies and Biodiesel Property Prediction. **Energies**, v. 8, n. 6, p. 5040-5052, 2015.

BUENO, Silvia Messias; SILVA, Adriana Navarro da; GARCIA-CRUZ, Crispin Humberto. Study on the production of biosurfactant fermentation broth. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

CARIOCA, JOB; ARORA, H. L. Tecnologia da produção de biogás. **Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 333-394, 1984.

CARVALHO, AKF et al. Transesterificação enzimática de Single Cell Oil (SCO) de *Mucor circinelloides* para a produção de biodiesel. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 11987-11992, 2015.

CASTANHA, Rodrigo Fernandes et al. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 379-387, 2014.

CAZETTA, Marcia Luciana; CELLIGOI, Maria Antonia Pedrine Colabone. Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CERQUEIRA, V.S.; COSTA, J.A. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, 2009.

CHÁVEZ, Renato; BULL, Paulina; EYZAGUIRRE, Jaime. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and their use in field studies of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CLINT, J. H. Surfactant aggregation. **Springer Science & Business Media**, 2012.

COLLA, Luciane Maria et al. Biossorção de cromo hexavalente de efluente utilizando resíduos agroindustriais fermentados por cepas de *Aspergillus*. **Ciência & Engenharia**, v. 23, n. 2, p. p. 67-74, 2015.

CORRÊA, P. F. et al. Utilização de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2847-2854, 2015.

COSTA SPERB, João Guilherme et al. Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **ENGEVISTA**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.

CRAVO, Julio Cesar Machado et al. Painel aglomerado de resíduos agroindustriais. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 721-730, 2015.

DECESARO, Andressa et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v.36, p.947-954, 2013.

DELABIO, Aline da S. et al. Seleção de leveduras para a produção de lipídios como matéria-prima para biodiesel. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 2, v. 2, p. 26-38, 2012.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential **Microbiology Molecular Biology**, v.61,p.47-64, 1997.

ENSHAEIEH, M.; ABDOLI, A.; MADANI, M. Single Cell Oil (SCO) Production by *Rhodotorula mucilaginosa* and Its Environmental Benefits. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 387-400, 2015.

FEI, Qiang et al. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 2695-2701, 2011.

FONTES, G. C. et al. Ultrafiltração como processo chave no Downstream da produção de

biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 480-487, 2015.

FONTES, Gizele Cardoso; AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca; COELHO, Maria Alice Zarur. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FRISVAD, Jens Christian; SAMSON, Robert A. *Penicillium* subgenus *Penicillium*-A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in mycology**, 2004.

GAIO, L. M. et al. Conscientização e Execução de Projeto Ambiental-Coleta Seletiva de Óleo Residual a partir de Matéria Prima Recolhida pela Comunidade do Gama. **ECT-Encontro de ciência e tecnologia**, 2010.

GAMS, Walter. Biodiversity of soil-inhabiting fungi. **Biodiversity and conservation**, v. 16, n. 1, p. 69-72, 2007.

GOMES, Anderson Fernandes et al. Síntese e caracterização de biodiesel com material lipídico extraído das vísceras da *Sardinella Brasiliensis*. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 2, p. 2181-2194, 2015.

GUDIÑA, Eduardo J. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

KALYANI, A. L. T. et al. Isolation of bio-surfactant producing actinomycetes from terrestrial and marine soils. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 9, p. 4015, 2014.

LACERDA, J. X.; PINOTTI, L. M. Produção de celulases por *Penicillium* sp. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 1362-1367, 2015.

LAUFENBERG, Günther; KUNZ, Benno; NYSTROEM, Marianne. Transformation of vegetable waste into value added products::(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 2003.

LI, Ning; ZONG, Min-Hua. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1, p. 43-54, 2010.

LIGGETT, R. Winston; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriological reviews**, v. 12, n. 4, p. 297, 1948.

LIMA, R. A. et al. Biosurfactants production by *Candida glabrata* strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources. **Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges**, edited by A. Mendez-Vilas, p. 362-366, 2012.

LUNA, Juliana M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1527-1534, 2011.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Anupdate on the use of unconventional substrates for Biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MELO, A. R. et al. Suscetibilidade de *Culex quinquefasciatus* após Exposição a ácidos graxos e ésteres metílicos. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 90-90, 2015.

MELO, Wyara Ferreira et al. O papel do enfermeiro intensivista na prevenção das infecções na unidade de terapia intensiva: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 5, n. 4, p. 23-29, 2015.

MOTTA, Thiago P. et al. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B. **Pesq. Vet. Bras**, v. 35, n. 1, p. 23-28, 2015.

MULLER, Heloise et al. The sexual yeast *Candida glabrata* maintains distinct α and α haploid mating types. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 5, p. 848-858, 2008.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY, T.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfs: properties, commercial production and application, **Current science**, v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NASCIMENTO, Raphael de Araújo Luz et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **e-Xacta**, v. 8, n. 1, 2015.

NITSCHKE, M; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v.25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OCHSNER, Urs A. et al. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 7, p. 2044-2054, 1994.

OLIVEIRA, JHS; COSTA, M. T.; ABUD, AKS. Uso do planejamento experimental para avaliar a produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 959-966, 2015.

OLIVEIRA, Marcos Roberto et al. Padronização do Inóculo na Produção de Soforolipídeos por *Candida bombicola* ATCC 22214 utilizando Semente de Girassol na Fermentação em Estado Sólido. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 303-306, 2015.

ORTENZIO, Ygor Tadeu et al. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 5, n. 1, 2015.

PACWA-PŁOCINICZAK, Magdalena et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PANDEY, Ashok et al. **“Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications” Reference Book**. Asiatech Publishers, Inc., 2001.

PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass Bioenerg**, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; OLIVEIRA MORAES, I. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007.

PFENNING, Ludwig H.; ABREU, Lucas M. Diversity of microfungi in tropical soils. **Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. Wallingford, Oxfordshire, UK, CABI Publishing, v. 1, p. 184-205, 2006.

POLI, Jandora Severo et al. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

RAGA, Adalton; VIEIRA, Stella Maria Januária. Attractiveness of corn steep liquor plus borax to fruit fly (Diptera: Tephritidae) under field cages. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 00-00, 2015.

RATLEDGE, C. Single cell oils for the 21st century. **Single cell oils**, p. 1-20, 2005.

REIS, Roberta Leite Santos et al. Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus parasiticus* UCP1281 no biotratamento de efluentes da indústria de laticínios e produção de lipídeos. **e-xacta**, v. 8, n. 1, 2015.

RODRIGUES, Ana I. et al. Development of low-cost culture media for effective biosurfactant production. 2015.

ROSA, Priscila; MATTANNA, Paula; VALENTE, Patricia. Avaliação da síntese de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU 33 em meio de cultura com glicose e sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, 2015.

SALAGER, Jean-Louis et al. How to attain an ultralow interfacial tension and a three-phase behavior with a surfactant formulation for enhanced oil recovery: a review. Part 2. Performance improvement trends from Winsor's premise to currently proposed inter-and intra-molecular mixtures. **Journal of surfactants and detergents**, v. 16, n. 5, p. 631-663, 2013.

SALVADOR, C. et al. Culturas de fungos basidiomicetos em resíduos agroindustriais para produção de compostos bioativos. In: **II Workshop (BIO) Energia**, p. 56, 2013.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159-183, 2011.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI-FILHO, J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Caderno de Tecnologia de Alimentos & Bebidas**, p. 48-54, 2002.

SCHMIT, John Paul; MUELLER, Gregory M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 99-111, 2007.

SILVA, Marcondes Viana et al. Reciclagem de óleos residuais para a produção de sabão no município de Itapetinga-BA. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v. 9, n. 13, p. 106-120, 2012.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose

oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied microbiology and biotechnology**, vol. 55, p. 442-445, 2001.

SPECIAN, Vânia et al. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endófitos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde= Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2015.

SYLDATK, C.; WAGNER, F.; **Biosurfactants and Biotechnology**, Marcel Dekker: New York, cap. 3, 1987.

THAVASI, R.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. 15 Biosurfactant Applications in Agriculture. **Biosurfactants: Production and Utilization—Processes, Technologies, and Economics**, v. 159, p. 313, 2014.

TSIGIE, Y. A.; WANG, C. Y.; TRUONG, C. T.; JU, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource technology**, v.102, n.19, p.9216-9222, 2011.

VAZ, J.S; et al. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Rev Nutr**, 19 (4): 498-500, 2006.

VIANNI, Romeu; BRAZ-FILHO, Raimundo. Acmos GRAXOS NATURAIS: IMPORTANCIA E OCORRENCIA EM ALIMENTOS. **Química nova**, v. 19, p. 4, 1996.

WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci et al. Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. **Chapter in Biotecnologia de alimentos, coleção Ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição, editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte**, v. 12, p. 143-172, 2013.

WOICIECHOWSKI, Adenise Lorenci et al. Pretreatment Strategies to Enhance Value Addition of Agro-industrial Wastes. In: **Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals**. Springer New York, 2014. p. 29-49.

YOUSSEF, Noha H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZHAO X., KONG X., HUA Y., FENG B., ZHAO Z.K., “Medium optimization for lipid *Lipomyces starkeyi*”, **European Journal of Lipid Science and Technology**, 2008.

CAPÍTULO II

**Valor adicionado ao uso de resíduos agroindustriais
na produção simultânea de Biossurfactante e
Biodiesel por *Penicillium spinulosum* UCP1347**

**Manuscrito submetido ao periódico Colloides and Surface B:
Interfaces – Qualis A2; Engenharia II**

Valor adicionado no uso de resíduos agroindustriais na produção simultânea de Biossurfactante e Biodiesel por *Penicillium spinulosum* UCP1347

Patrícia Nunes dos Santos ^{a,b}, Ana Carla Rocha de Carvalho ^{a,b}, Hamilton Felix de Nobrega ^{a,b}, Rosileide F. S. Andrade ^b, Galba Maria Campos-Takaki ^{b*}

^a Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50.050-900 Recife, PE, Brasil

^b Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnológica, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brazil;

*Autor correspondente: e-mail: galba_takaki@yahoo.com.br Telefone: +55-81-21194044

Resumo

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas por micro-organismos que tendem a se distribuir e atuar em interfaces entre dois fluidos imiscíveis. São biodegradáveis, com baixa toxicidade, e são produzidos a partir de fontes renováveis, tolerantes a condições extremas de pH e temperatura. Por outro lado, os micro-organismos oleaginosos apresentam como principal característica a habilidade de acumular lipídeos acima de 20% do seu peso seco, representado na forma de triacilglicerol, com constituição comparável aos óleos vegetais e animais, podendo ser utilizados na produção de biodiesel. Neste trabalho, investigações foram realizadas com a produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum* UCP1347, utilizando como substratos milhocina (5%) e óleo de soja pós-fritura (3%), de acordo com o planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central rotacional – DCCR 2². O inóculo foi de 5% de uma suspensão de 10⁷ esporos/mL, à 28^oC e 150rpm por 96h. Ao final da fermentação foi produzido um biossurfactante com habilidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 32,7 mN/m e tensão interfacial para 1,7 mN/m, CMC de 1,25%, atividade emulsificante de 3,73 U/mL utilizando óleo de soja pós fritura e estabilidade frente a diferentes pH e salinidade. O biossurfactante apresentou caráter aniônico, constituído por 39,56% de carboidratos, 33,78% de lipídeos e 10,4% de proteínas. Enquanto que a biomassa fúngica acumulou 57% de lipídeos, em relação ao seu peso seco, apresentando ácidos graxos insaturados e saturados. Os resultados obtidos sugerem que o *P. Spinulosum* é um fungo filamentosamente oleaginoso promissor, considerando o potencial biotecnológico de biotransformação de resíduos agroindustriais de baixo custo na síntese de biossurfactante e biodiesel, possibilitando ampla aplicação na biorremediação.

Palavras-chave: Biossurfactantes; acumulação de lipídeos, resíduos industriais; fungo filamentosamente.

1. Introdução

Os surfactantes de origem microbiana são produzidos na sua maioria por bactérias, leveduras e mais raramente por fungos filamentosos. Na sua maioria são metabólitos secundários, compreendendo um grupo de moléculas anfipáticas, com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, que tendem a se distribuir em interfaces, entre dois fluidos imiscíveis, diminuindo a tensão superficial da água [1]. Estas propriedades fazem destas moléculas uma ampla gama de aplicações industriais, como emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, detergência, solubilização e dispersão de fases. Dentre as principais vantagens dos biossurfactantes, em relação aos surfactantes sintéticos, destacam-se a baixa toxicidade e a elevada biodegradabilidade, estabilidade e funcionalidade a condições extremas de pH, temperatura e concentração de sais [2,3,4].

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana, incluindo os glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados, no entanto, alguns autores classificam de acordo com seu peso molecular [5].

Contudo, a produção industrial dos biossurfactantes é ainda muito limitada, considerando o elevado custo de produção, onde os substratos convencionais representam 30% da produção [6]. Neste sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas empregando subprodutos e rejeitos agroindustriais como fontes alternativas de carbono e de nitrogênio, possibilitando uma estratégia atraente e de baixo custo. Ao mesmo tempo, a utilização desses resíduos industriais possibilita a minimização dos descartes ambientais, evitando problemas ambientais causados pelo descarte ambiental sem tratamento adequado [7].

Recentemente, os óleos microbianos oriundos de bactérias, fungos e microalgas, são observados em micro-organismos capazes de acumular cerca de 20% de óleos em relação ao seu peso seco. Esses micro-organismos são considerados oleaginosos, de constituição comparável aos óleos vegetais e de animais. Os óleos microbianos apresentam como vantagens: ciclo de vida curto e não é afetado pela sazonalidade, menor espaço para produção, controle na produção em relação à quantidade de substrato, e crescimento mais rápido [8].

Com a expansão do biodiesel, futuramente os óleos microbianos podem se tornar uma das matérias-primas lipídicas alternativas, considerando o seu potencial [9,10].

O uso de subprodutos mais econômicos e facilmente disponíveis em substituição aos meios complexos convencionais mais caros deve acelerar a produção em larga escala destes metabólitos secundários de ampla utilidade [6,11].

O novo perfil da sociedade atual caracteriza-se pelo aumento do custo de vida, dos níveis de produção e conseqüentemente, da quantidade de resíduos gerados pelas diversas indústrias [12]. Em particular, a indústria alimentícia produz grandes volumes de resíduos resultantes da produção, preparação e consumo dos alimentos, que quando descartados geram poluição e representam uma grande perda de nutrientes [13, 14].

Dentre os resíduos agroindustriais utilizados como substratos alternativos, a milhocina, (água de maceração do milho) ou “corn steep liquor” (CSL), subproduto do processo de maceração por via úmida do milho, é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para os

micro-organismos por ter uma composição formada por aminoácidos, vitaminas e sais minerais. A fonte de nitrogênio utilizada para o crescimento microbiano e produção de metabólitos é essencial, pois o nitrogênio está intimamente relacionado ao metabolismo dos micro-organismos [15].

Outro resíduo utilizado na produção de metabólitos microbiano são os óleos comestíveis, que após serem usados em frituras, geram um passivo ambiental capaz de causar grandes problemas de poluição, quando descartado via esgoto. Diariamente são geradas grandes quantidades de óleo de cozinha nos lares, indústrias e estabelecimentos produtores de refeições no país. Por falta de informação da população, o óleo residual muitas vezes é descartado de forma inadequada, ou seja, despejado diretamente em águas, como rios e riachos, pias e vasos sanitários, causando danos pelo entupimento de canos e aumentando o custo dos processos de tratamento do esgoto, além de poluição do meio aquático devido à formação de filmes oleosos na superfície da água dificultando a troca de gases com a atmosfera [16,17]. O óleo pós fritura pode ser usado na fabricação de sabão em pedra, detergentes, tintas, biodiesel, produção de biossurfactante, entre outros, transformando-o assim em produtos com maior valor agregado, reduzindo o impacto no meio ambiente. Dessa forma, o ciclo reverso do produto pode trazer vantagens competitivas e evitar a degradação ambiental e os problemas que surgem nos sistemas de água e esgotos [18].

Estudos foram realizados investigando a produção simultânea de biossurfactante e acumulação de lipídeos por *Penicillium spinulosum* UCP1347, empregando milhocina e óleo de soja pós-fritura, como fontes alternativas de nitrogênio e carbono, respectivamente.

2. Material e métodos

2.1 Micro-organismo

Os estudos foram realizados com o fungo filamentosso *Penicillium spinulosum* UCP1347, isolado de solo da caatinga do Estado de Pernambuco, Brasil, pertencente à Coleção de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP). A cultura foi mantida em meio Sabouraud Dextrose Ágar à 5 °C.

2.2 Substratos

Na formulação do meio de produção foram utilizados os resíduos agroindustriais milhocina, proveniente do beneficiamento do milho (Cabo-PE), além do óleo pós-fritura proveniente de comércio informal da cidade de Recife-PE.

2.3 Meio basal

O meio basal foi constituído por solução salina contendo: KH_2PO_4 (2 g/L), MgSO_4 (1 g/L) e 10 mL de solução traço ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,63 mg/L), MnSO_4 (0,01 mg/L) e ZnSO_4 (0,62 mg/L).

2.4 Produção do biossurfactante

A produção de biossurfactante foi realizada por fermentação submersa em frascos de Erlenmeyers contendo 100 mL do meio constituído por milhocina e óleo de soja pós fritura contendo concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR adicionado do meio basal solução salina (10%). O inóculo correspondeu a 5% de uma suspensão de 10^7 esporos/mL. Os frascos foram incubados a 28°C durante 96 h, sob agitação orbital de 150 rpm. A biomassa foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 8.000 rpm por 10 min a 10°C, com posterior filtração. A biomassa foi lavada, liofilizada e mantida em dessecador até peso constante, para posterior extração de lipídeos. A partir do líquido metabólico livre de células foram realizados: determinação do pH, tensão superficial e interfacial, índice e atividade de emulsificação, extração do biossurfactante.

2.5 Determinação do pH

Foi utilizado o potenciômetro Orion (modelo 310) para a determinação do pH das alíquotas coletadas dos meios de produção livre de células.

2.6 Tensão superficial e interfacial

A tensão superficial foi medida em um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltda, Finland) utilizando-se o anel de DU NUOY, através de sua imersão no líquido metabólico livre de células, registrando-se a força requerida para retirar através da interface ar-líquido, de acordo com a metodologia de Kuyukina [19].

2.7 Índice e atividade de emulsificação

O índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células foi determinado utilizando o método descrito por Cooper e Goldenberg [20]. Foram adicionados 1,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo queimado de motor, n-hexadecano, óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola e óleo de soja pós-fritura, em tubos graduados, e a mistura foi agitada em vórtex por um minuto. Após 24 horas de repouso, as emulsões foram formadas e calculou-se a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicado por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem.

A atividade emulsificação foi determinada segundo a metodologia proposta por Cirigliano e Carman [21] utilizando como substrato hidrofóbico para emulsificação o óleo

queimado de motor, n-hexadecano, óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola e óleo de soja pós fritura em tubos graduados. A mistura foi agitada em vórtex por dois minutos. Após 10 minutos de repouso, as emulsões formadas foram retiradas com o auxílio da pipeta de Pasteur, colocados em uma cubeta e posteriormente lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda à 540nm.

2.8 Estabilidade iônica, térmica e em diferentes pH

A estabilidade do biossurfactante foi determinada através da tensão superficial do líquido metabólico livre de células em diferentes pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12), diferentes concentrações de NaCl (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e diferentes temperaturas (0°C, 5°C, 70°C, 100°C e 120°C), por 10 minutos [22, 23].

2.9 Isolamento do biossurfactante

O isolamento do biossurfactante foi realizado a partir do sobrenadante livre de células utilizando diferentes metodologias de precipitação com solventes orgânicos (acetona e etanol a 70%), precipitação com ácido clorídrico e sulfato de amônio a 70% de saturação [24, 25, 26].

2.10 Composição química

Os grupos funcionais presentes na molécula do biossurfactante foram identificados usando um Espectrômetro infravermelho FT-IR, com transformada de Fourier (FT-IR), registrados em aparelho Bruker IFS 66, utilizando-se pastilhas KBr, sendo os números onda expressos em cm^{-1} na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Por outro lado, a análise quantitativa dos constituintes do biossurfactante foi realizada após a utilização do kit Labtest (Labtest Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brasil) para identificação do teor de proteínas totais. Enquanto que os carboidratos totais foram quantificados utilizando o método do fenol- ácido sulfúrico [27] e os lipídios após a extração com clorofórmio e metanol, de acordo com a metodologia de Manocha [28].

2.11 Carga iônica da região hidrofílica

A carga da região hidrofílica do biossurfactante foi determinada utilizando o potenciômetro Zeta modelo ZM3-D-G, Zeta Meter System 3.0+. A eletrocinética do potencial zeta foi estudada utilizando 100 mg do biossurfactante em 5 mL de uma solução aquosa composta por KCl com força iônica correspondente a 0,001 M.

2.12 Concentração Micelar Crítica (CMC)

O biossurfactante isolado foi solubilizado em água em diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 1; 1,5; 2 e 2,5%) e depois suas tensões superficiais foram medidas. A CMC foi alcançada depois de observar um valor constante da tensão superficial medida em tensiômetro automático [3, 29].

2.13 Identificação dos ácidos graxos(GC)

Os ácidos graxos presentes na região hidrofóbica do biossurfactante foram identificados após processo de metilação [30]. Os ácidos graxos metilados do biossurfactante foram ressuspensos em n-hexano e analisado por cromatografia gasosa (CG) [31].

2.14 Teste de Fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*) e alface (*Lactuca sativa*), de acordo com [32]. Soluções teste de biossurfactante isolado foram preparadas em água destilada nas concentrações de 50, 500 e 1000 mg/L. A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman nº1. As sementes foram previamente tratadas com NaCl, sendo 10 sementes simetricamente adicionadas por placa, que foram inoculadas com 5 mL da solução teste a 28°C. Água destilada foi utilizada como controle. Após cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o crescimento a raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foi calculado de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\%G = \frac{\text{Média de sementes testes germinadas}}{\text{Média de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

$$\%CR = \frac{\text{Média do crescimento da raiz das sementes}}{\text{Média do crescimento da raiz controle}} \times 100$$

$$IG = \frac{(\text{Germinação da semente}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})}{100}$$

2.15 Rendimento da biomassa

A biomassa foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 8000 rpm durante 10 minutos. Depois foi lavada três vezes com água destilada para remoção dos resíduos do meio de cultura e foi centrifugada novamente. Em seguida, foi congelada e submetida a liofilização até peso constante. O Peso seco celular foi determinado por gravimetria.

2.16 Lipídeos totais e perfil dos ácidos graxos da biomassa

Os lipídeos foram extraídos de acordo com a metodologia de Manocha [28], onde a partir da biomassa liofilizada, foram extraídos por sistema de solventes. As respostas para a produção de lipídeos totais foi calculada pela fórmula:

(%) de lipídeos totais = peso seco dos lipídeos em gramas (g)/ peso da amostra (g) x 100

Para a identificação dos ácidos graxos obtidos a partir da biomassa foi realizada por Cromatografia gasosa (GC) e a identificação dos componentes foi realizada pela comparação entre os tempos de retenção.

2.17 Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de 2^2 com 4 pontos fatoriais, 4 pontos centrais e 4 pontos axiais. A análise dos efeitos principais e interações das variadas concentrações de milhocina e óleo de soja pós fritura, sobre a produção de biossurfactante, bem como a acumulação de lipídeos foram realizadas utilizando o software STATISTICA versão 7.0 da StatSoft®.

3. Resultados e discussão

3.1 Produção do biossurfactante por *Penicillium spinulosum* utilizando óleo de soja pós-fritura e milhocina

A produção de biossurfactante por *Penicillium spinulosum* foi confirmada pela redução da tensão superficial da água de 72 para 32,7 mN/m, nos pontos centrais do planejamento experimental DCCR, após 96 horas de cultivo submerso, em meio constituído por milhocina (5%) e óleo de soja pós-fritura (3%) adicionado de solução salina a 10%, como mostra a Tabela 1. A tensão superficial foi usada como parâmetro considerando que Haba *et al.* e Batista *et al.* [33, 34], sugerem esta análise como eficiente na seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes. Adicionalmente, afirmam que micro-organismos produtores de biossurfactante conseguem reduzir a tensão superficial para valores abaixo de 40 mN/m. Resultados encontrados por Sperg [1] para produção de biossurfactante por fungos filamentosos, demonstram a máxima redução da tensão superficial para valores entre 49,0 mN/m e 59,8 mN/m.

Os biossurfactantes possuem propriedade de reduzir a tensão interfacial entre líquidos com diferentes graus de polaridade de 40 mN/m para 1mN/m [35]. Neste contexto o biossurfactante produzido por *P. spinulosum*, nas condições do ponto central estudadas neste trabalho, apresentou significativa redução da tensão interfacial para 1,7 mN/m.

Tabela 1 1.A Planejamento fatorial 2^2

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Milhocina (%)	1,47	2,5	5,0	7,5	8,52
Óleo de soja pós fritura (%)	0,18	1,0	3,0	5,0	5,82

Tabela 1 1.B Resultado das tensões superficiais, pH e biomassa do *P. spinulosum*, após fermentação submersa a 28°C, 150 rpm, depois de 96 horas.

Condição	Matriz Codificada		<i>Penicillium spinulosum</i> (UCP1347)			
	Milhocina	Óleo de soja pós fritura	pH Inicial	pH Final	Tensão Superficial (mN/m)	Biomassa (g/L)
1	-	-	5,68	5,28	41,2	8,48
2	+	-	5,62	7,00	44,7	9,66
3	-	+	5,70	4,93	43,1	15,33
4	+	+	5,64	5,87	39,7	14,33
5	1,41	0	5,61	6,36	36,8	13,73
6	-1,41	0	5,66	4,96	41,5	13,55
7	0	1,41	5,64	5,91	37,1	14,12
8	0	-1,41	5,65	7,00	38,7	8,86
9	0	0	5,62	6,18	33,9	15,86
10	0	0	5,64	6,15	32,7	14,58
11	0	0	5,64	5,72	33,3	16,32
12	0	0	5,65	5,94	34,5	12,66

A influencia do óleo de soja pós fritura e da milhocina sobre a variável resposta tensão superficial foi analisada pelo Diagrama de Pareto com os efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, representados pelo valor de p. Os resultados demonstraram que as variáveis independentes a milhocina e o óleo de soja pós fritura, na função quadrática (Q) e sua associação, influenciaram na tensão superficial, sendo a milhocina (Q) a variável independente mais relevante, por estarem acima dos valores de p. O sinal negativo referente a milhocina e ao óleo de soja pós fritura (ambos em função linear), significa que quando esta variável passa de um nível de -1 para +1 a variável resposta tensão superficial é reduzida (Figura 1A). Para definir as condições otimizadas utilizando um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional, o domínio da técnica foi um ponto essencial, uma vez que a região de condições otimizadas está numa faixa estreita de valores das variáveis independentes (Figura 1B). O modelo quadrático obtido está representado pela Equação 1:

Eq. 1

$$Z = 33,6 - 0,81835046789419*X + 3,6875*X^2 - 0,67034271247462*Y + 3,0625*Y^2 - 1,725*X*Y + 0$$

Onde X e Y correspondem os valores codificados das variáveis do processo (Milhocina e óleo de soja pós fritura) e Z a variável resposta (Tensão superficial).

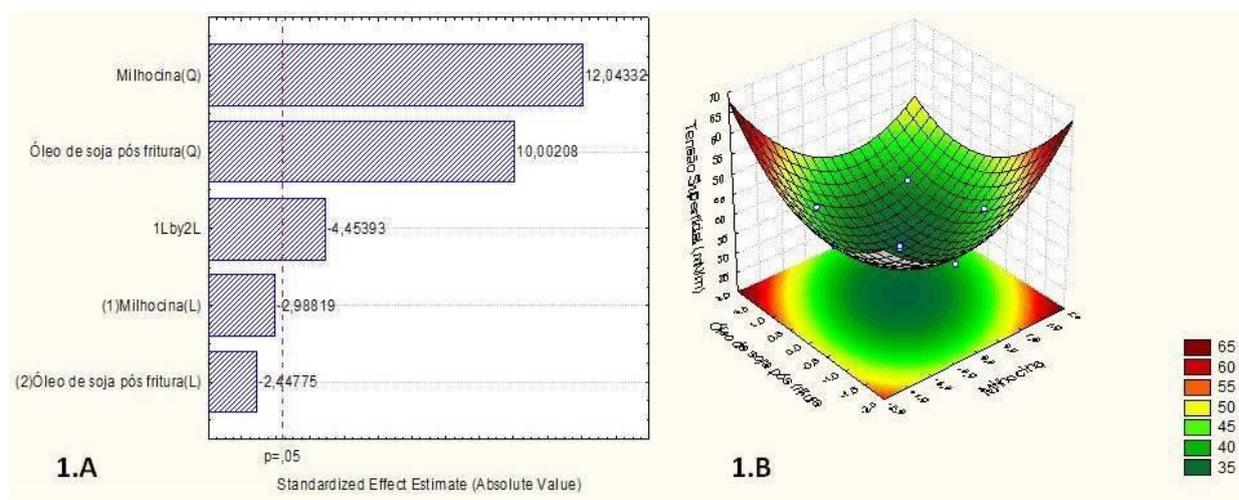


Figura 1 **1.A** Efeitos das variáveis utilizadas sobre a tensão superficial do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* com 96 horas de cultivo. **1.B** Curvas de contorno na produção de biossurfactante produzido por *P. spinulosum* (UCP1347) formulado por diferentes concentrações de milhocina e óleo de soja pós fritura determinado pela tensão superficial.

3.2 Seleção do método de extração do biossurfactante de *P. spinulosum*

O biossurfactante isolado a partir do sobrenadante livre de células obteve melhor rendimento após a extração com etanol (4,9 g/L), seguido da acetona (2,36 g/L). Resultados não significativos foram após a extração com sulfato de amônio. Lima [36] obteve um rendimento de 2,46 g/L utilizando óleo residual como indutor em 168h para na produção de biossurfactante por *Aspergillus ochraceus* e de 2,23 g/L para o *Penicillium expansum* utilizando glicose em 120h de fermentação.

3.4 Caracterização bioquímica do biossurfactante e carga iônica

A análise bioquímica do biossurfactante isolado após o cultivo do *P. spinulosum* em milhocina (3%) e óleo de soja pós fritura (5%) como substrato indicou que o biossurfactante é constituído por carboidratos 39,56%, lipídeos 33,78% e proteínas 10,4% sugerindo ser um biossurfactante pertencente ao grupo dos poliméricos. O biossurfactante apresentou uma carga negativa equivalente a -20,96 mV, caracterizando-se como aniônico. Os surfactantes mais

utilizados comercialmente são aniônicos amplamente utilizados em produtos de limpeza domésticos e industriais [37]. Os espectros de FTIR (Figura 2) confirmam a presença de carboidratos ($1200-850.\text{cm}^{-1}$), além de proteínas ($1650-1550.\text{cm}^{-1}$) e lipídeos nas bandas entre $2996-2800.\text{cm}^{-1}$. Ishaq [38], em seu trabalho com *Aspergillus flavus*, identificou o biossurfactante produzido pelo fungo como sendo um glicolípido.

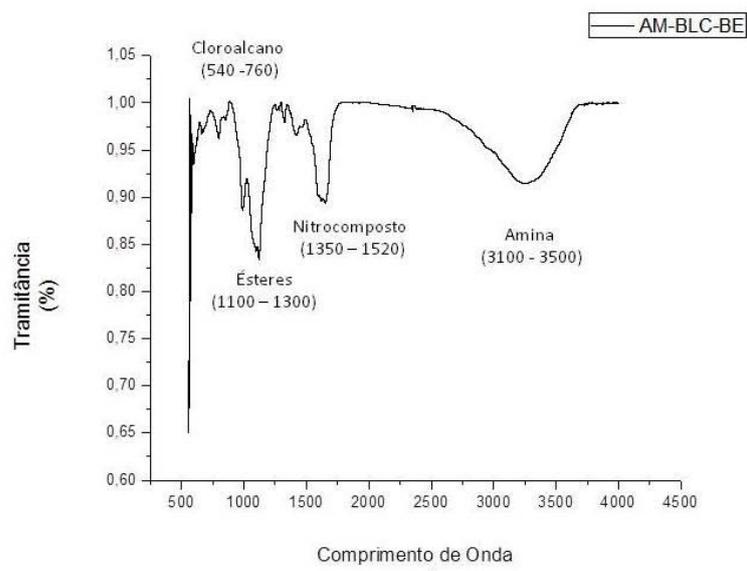


Figura 2 Espectrometria ao raio Infravermelho (IV) do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* UCP1347 extraído por etanol.

A constituição em ácidos graxos da porção hidrofóbica do esta representada na Tabela 2. O ácido oléico foi o ácido graxo encontrado em maior porcentual (71%). Este é um ácido graxo de cadeia longa que possui 18 carbonos em sua estrutura e possui uma dupla ligação entre os carbonos, denominado de mono-insaturado [39]. A presença de ácido esteárico, ácido palmítico, e ácido linoléico também foram identificados conforme demonstra a Tabela 2.

Tabela 2 Composição dos ácidos graxos do biossurfactante produzido por *P. spinulosum*, após 96 horas de fermentação.

Ácidos graxos	Biossurfactante (%)
Ácido palmítico (C16:0)	4,6
Ácido esteárico (C18:0)	17,9
Ácido oléico (C18:1)	71,0
Ácido linoléico (18:2)	5,6

3.6 Concentração Micelar Crítica (CMC) e estabilidade do biossurfactante

Uma das características comuns aos surfactantes é a capacidade de formar agregados (micelas) em solução aquosa a partir de uma determinada concentração. A Concentração Micelar Crítica é o processo onde se inicia a formação das micelas (micelização). O valor encontrado da CMC do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* foi 1,25%. Este resultado foi superior ao encontrado por Luna et al.[22] que obteve a CMC em torno de 2,5%.

O biossurfactante produzido manteve estável os valores da tensão superficial (Figura 3) após ser submetido a variadas concentrações de NaCl (2 a 12%), sugerindo aplicabilidade em ambientes marinhos salinos. A ocorrência de valores estáveis para tensão superficial foi observado também em líquido metabólico contendo pH 8. Com relação à influência da temperatura sobre a estabilidade do biossurfactante (Figura 3), observou-se significativa estabilidade em todas as temperaturas. Resultados semelhantes de estabilidade foram observados por Kim [40] que obteve um biossurfactante estável em pH variando de 4 a 10, temperatura até 90° e variada concentração de NaCl.

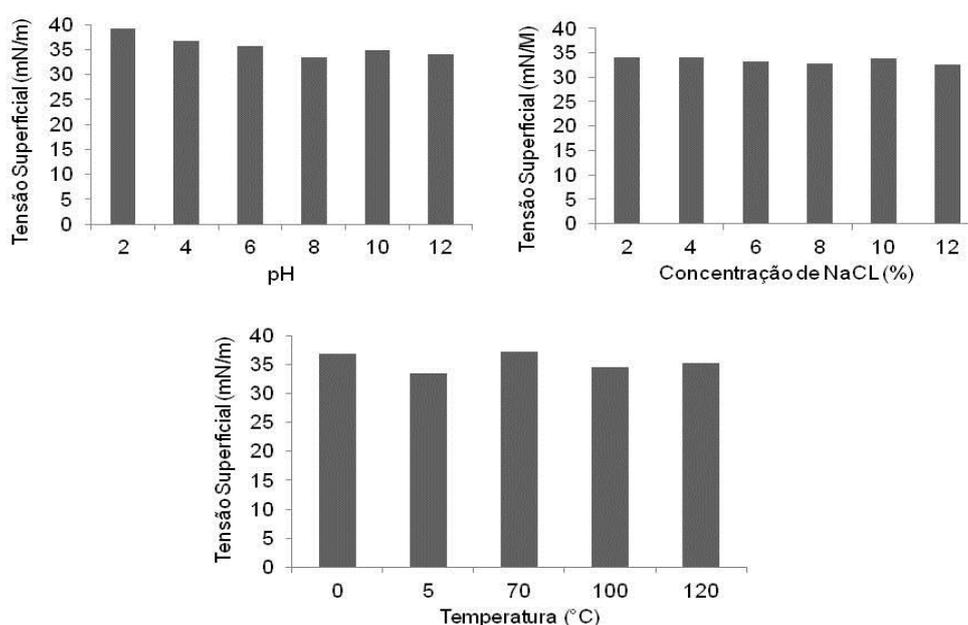


Figura 3 Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* em diferentes pH, salinidade e temperatura.

Propriedade emulsificante

A propriedade emulsificante do biossurfactante produzido por *P. spinulosum* foi realizada com diferentes substratos hidrofóbicos: óleo queimado de motor, óleo de soja pós-fritura, milho, soja, canola e n-hexadecano [41]. Os maiores percentuais emulsificantes avaliados pelo índice de

emulsificação (E_{24}) foram obtidos na melhor condição do planejamento (Milhocina 5% e óleo de soja pós fritura 3%) utilizando n-hexadecano (53,5%) (Figura 4). Nesta mesma condição foi obtido o maior valor de emulsificação avaliado pela análise da atividade de emulsificação resultando em 3,73 unidade de atividade de emulsificação (UAE) utilizando o óleo de soja pós fritura. Resultados semelhantes de emulsificação foram obtidos por Lima *et al.* [42] utilizando n-hexadecano (50%) e por Gasparin *et al.*[43], que obtiveram resultados de índice de emulsificação acima de 40% com óleo de soja.

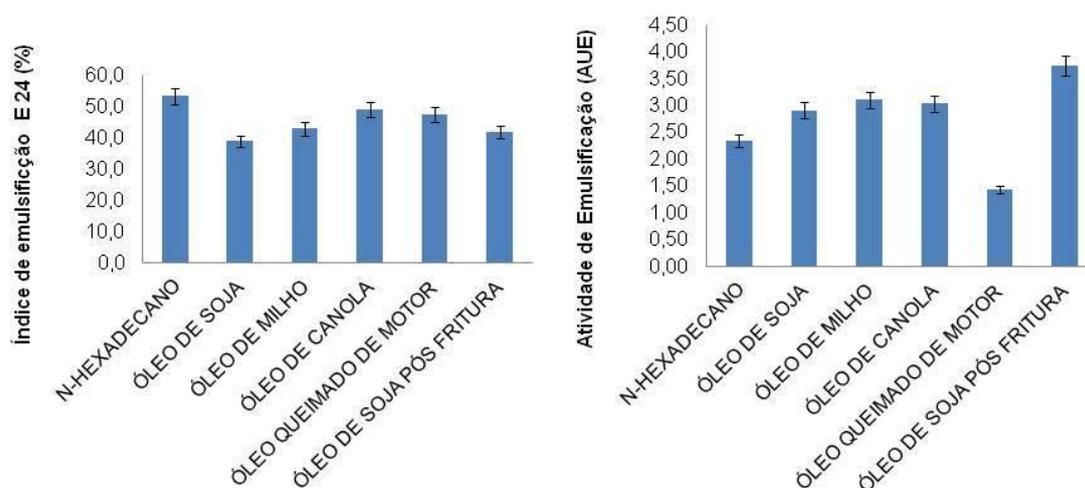


Figura 4 Índice de emulsificação e Atividade emulsificante após 96 horas do processo de fermentação por *P. spinulosum* UCP1347.

3.7 Fitotoxicidade do biossurfactante

A literatura considera que um Índice de Germinação (IG) de 80% é um indicador da ausência de fitotoxicidade [32]. Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que o biossurfactante nas diluições testadas não apresentou qualquer efeito inibitório sobre a germinação para as sementes de repolho e alface, com IG de 92,25% e 81,03%, respectivamente, na maior concentração testada (Figura 5). Resultado similar foi obtido por Santos [44] que demonstrou em seu trabalho que o biossurfactante de *Cunninghamella elegans* resultou em IG acima de 100%, usando sementes de alface e repolho.

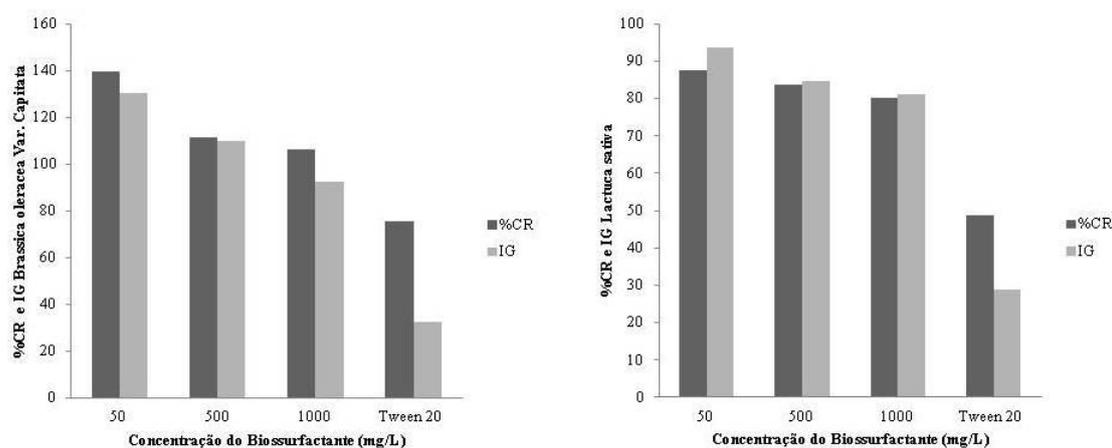


Figura 5 Percentual do Crescimento da raiz e Índice de germinação do repolho (*Brassica oleracea*) e da alface (*Lactuca sativa*) frente ao biossurfactante por *P. spinulosum*.

3.9 Produção de biomassa por *P. spinulosum*

O rendimento de biomassa produzida por *P. spinulosum*, nos pontos centrais do planejamento experimental DCCR, constituído por 5% de milhocina e 3% de óleo de soja pós fritura, adicionado de 10% de solução salina, foi de 15,86 g/L. Estes resultados foram melhores que o encontrado por Maciel [45], que obteve máxima produção de biomassa de 10,21 g/L a partir do fungo *Aspergillus* sp, utilizando solução de Manachini e óleo diesel (1%).

3.10 Eficiente conversão de biomassa em lipídeos por *P. Spinulosum*

Os lipídeos constituem um dos materiais de reserva em micro-organismos e apresentam composição similar e valor energético aos óleos vegetais e animais. De acordo com Ratledge e Wynn [46], micro-organismos que podem acumular lipídeos em mais que 20% de sua biomassa são considerados como oleaginosos. Neste contexto, *P. spinulosum* demonstrou ser um fungo oleaginoso pela produção de 57% de lipídeos totais no meio contendo milhocina (5%) e óleo de soja pós-fritura (3%) correspondente ao ponto central do planejamento experimental DCCR. Esse resultado foi similar ao obtido por Reis [47] et al., que obtiveram 67,81% de lipídeos totais extraídos da biomassa de *Aspergillus paraciticus*.

3.11 Composição dos ácidos graxos obtidos a partir da biomassa

Dentre os variados tipos de lipídeos, estão os ácidos graxos que possuem principalmente função estrutural [48]. Além disso, os lipídeos microbianos possuem potencial para uso como matéria-prima na produção de biodiesel [49]. Neste trabalho, os ácidos graxos identificados e analisados foram extraídos da biomassa da melhor condição do planejamento experimental para

a produção de biossurfactante. O *P. Spinulosum* demonstrou habilidade para produzir predominantemente os ácidos graxos monoinsaturados (Ácido palmitoléico e Ácido oléico) correspondendo ao total de 395,9 mg/g em relação aos ácidos graxos saturados (Ácido palmítico e Ácido esteárico) correspondendo ao total de 343,6 mg/g. Enquanto que o percentual dos ácidos graxos poliinsaturados (Ácido linoléico) foi de 260,5 mg/g (Tabela 3). Os resultados obtidos neste estudo foram significativos considerando que Puhan *et al.* [50], afirmam que altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados e um baixo teor de ácidos saturados e poliinsaturados é um dos critérios adequados para a produção de biodiesel.

Tabela 3 Composição dos ácidos graxos da biomassa lipídica do *P. spinulosum*, após 96 horas de fermentação.

Ácidos graxos	Biomassa lipídica do <i>P. spinulosum</i> (mg/g)
Ácido palmítico (C16:0)	104,2
Ácido palmitoléico (16:1)	145,8
Ácido esteárico (C18:0)	239,4
Ácido oléico (C18:1)	250,1
Ácido linoléico (18:2)	260,5

4. Conclusões

O biossurfactante produzido por *P. spinulosum* demonstrou ser de constituição química polimérico, caráter aniônico, com excelente redução da tensão superficial, além de bioemulsificante apresentando elevado potencial de emulsificação para o N-hexadecano e óleo de soja pós-fritura, além de estáveis emulsões frente a diferentes pH, temperatura e salinidade. Como característica importante ausência de toxicidade, demonstrada nos testes realizados com as sementes de repolho e alface. O *Penicillium spinulosum* demonstrou ser uma estirpe promissora na produção de biodiesel, considerando a natureza química dos ácidos graxos extraídos da biomassa apresentarem compatibilidade com o biodiesel. O isolado de solos da caatinga de Pernambuco (PE, Brasil), *Penicillium spinulosum* (UCP1347), apresentou elevado potencial na produção de biossurfactante e lipídeos utilizando como substrato resíduos industriais.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao órgão de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), à Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), em especial ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), pelo uso das instalações, à Capes e CNPQ pelo SISBIOTA.

6. Referências

- [1] SPERB, João Guilherme Costa et al. Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **ENGEVISTA**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.
- [2] CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO L.A, ALBUQUERQUE C.D. Environmentally friendly biosurfactants produced by yeasts. **Adv Exp Med Biol**. 672: p.250-60, 2010.
- [3] SILVA, N. R. A. et al. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **Int. J. Mol. Sci.** v. 15, p. 15377-15395, 2014b.
- [4] GUDIÑA, Eduardo J. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in microbiology**, v.6, 2015.
- [5] OLIVEIRA, DWF et al. Avaliação da produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de *bacillus sp.* isoladas de solos de manguezal. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 135-142, 2015.
- [6] ARULDASS, Clairá Arul et al. Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1. **Int. Biodeterioration & Biodegrad.**, p. 1-6, 2014.
- [7] RODRIGUES, Ana I. et al. Development of low-cost culture media for effective biosurfactant production. 2015.
- [8] CARVALHO, AKF et al. Transesterificação enzimática de Single Cell Oil (SCO) de *Mucor circinelloides* para a produção de biodiesel. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 11987-11992, 2015.
- [9] ÖZENER, Orkun et al. Effects of soybean biodiesel on a DI diesel engine performance, emission and combustion characteristics. **Fuel**, v. 115, p. 875-883, 2014.
- [10] BONTURI, Nemailla et al. Single Cell Oil Producing Yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of Extraction Strategies and Biodiesel Property Prediction. **Energies**, v. 8, n. 6, p. 5040-5052, 2015.
- [11] MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 1, p. 1–5, 2011.
- [12] BELISÁRIO, Marciela et al. O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes. **InterSciencePlace**, v. 1, n. 10, 2015.
- [13] SINGH, A., VAN HAMME, J. D., WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.
- [14] COLLA, L. M. et al. Biossorção de cromo hexavalente de efluente utilizando resíduos agroindustriais fermentados por cepas de *Aspergillus*. **Ciência & Engenharia**, v. 23, n. 2, p. p. 67-74, 2015.
- [15] NASCIMENTO, Raphael de Araújo Luz et al. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **e-Xacta**, v. 8, n. 1, 2015.
- [16] ALVARENGA, Betânia Mara; SOARES, Marcos Antônio. Potencialidade de produção de biodiesel por óleos e gorduras residuais1 na cidade de Itabira-MG. **Ceres**, v. 57, n. 6, 2015.

- [17] SANTOS, F. Brito; MENDES, An Furlan. Purificação do óleo de fritura utilizando biomassas como adsorventes para posterior produção de biocombustíveis. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 3, p. 326-331, 2015.
- [18] GAIO, L. M. et al. Conscientização e Execução de Projeto Ambiental-Coleta Seletiva de Óleo Residual a partir de Matéria Prima Recolhida pela Comunidade do Gama. **ECT-Encontro de ciência e tecnologia**, 2010.
- [19] KUYUKINA, M.S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **J Microbiol Methods**. v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.
- [20] COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.
- [21] CIRIGLIANO, M. C. E CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology**, v.48: p.747-750, 1984.
- [22] LUNA, J.M; SARUBBO, L.A; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 52, p.785-793, 2009.
- [23] AL-WAHAIBI, Yahya et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p.324-333, 2014.
- [24] NAVON-VENEZIA, S. et al. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 61, p. 3240-3244, 1995.
- [25] PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **J. Biotechnol**, v. 92, p. 287-294, 2002.
- [26] SARAFIN Y. et al. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p.1-9, 2014.
- [27] DUBOIS, M.G.; HAMILTON, J.R. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. **J Anal Chem.** v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- [28] MANOCHA, MS; SAN-BLAS, G; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology** 117, p. 147–154, 1980.
- [29] LUNA, J. M. et al. Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chem. Eng. Trans.**, v. 27, p. 67-72, 2012.
- [30] DUNLAP, KR; PERRY, JJ. Effect of Substrate on the Fatty Acid Composition of Hydrocarbon-utilizing Microorganisms. **J Bacteriol.** v. 94, n. 6, p. 1919–1923, 1967.
- [31] SILVA, E.J. et al. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids Surf. B Biointerfaces** 117, p. 36–41, 2014a.
- [32] TIQUIA, S. M. TAM, N. F. Y., HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity os spent pig-manure sawdust litter. **Environ. Pollut.** 93, 249-256, 1996.
- [33] HABA E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal Applied Microbiology**, v.88, p.379-387, 2000.

- [34] BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TÓTOLA, M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource Technology*, v.97, n.6, p.868-875, 2006.
- [35] MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183-198, 2005.
- [36] LIMA, Bruna Montalvão. Produção de biosurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. 2012.
- [37] KIM, H.S., JEON, J.W., KIM, S.B., OH, H.M., KWON, T.J., YOON, D.B. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24, 1637-1641, 2002.
- [38] ISHAQ, U. et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *Journal of applied microbiology*, v. 119, n. 4, p. 1035-1045, 2015.
- [39] MAIA, Fabio Jose et al. Milk fatty acid profile from cows receiving product base propolis and soybean oil/Composicao em acidos graxos do leite de vacas recebendo produto a base de propolis e oleo de soja. *Veterinaria e Zootecnia*, v. 20, n. 2, p. 434-436, 2013.
- [40] KIM, H.S., JEON, J.W., KIM, S.B., OH, H.M., KWON, T.J., YOON, D.B. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*, 24, 1637-1641, 2002.
- [41] COLLA, L. M. M; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. L. Biossorção de cádmio e produção de biosurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Revista CIATEC-UPF*, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2012.
- [42] LIMA, R. A. et al. Produção de biosurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. *Exacta*, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2010.
- [43] GASPARIN, Fabiana Guillen Moreira et al. Produção de Lipase e Biosurfactante por Isolado de Efluente de Laticínio. *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, n. 1, p. 28-31, 2012.
- [44] SANTOS, Ednaldo Ramos dos. Tratamento de efluente de indústria de curtume com biomassa de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 em sistema de batelada. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, n.1, 2013.
- [45] MACIEL, Carla do Couto Soares et al. Produção de enzimas do sistema lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. *Exacta*, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.
- [46] Ratledge, C; Wynn, J.P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, *Adv. Appl. Microbiol.* 51: 1–51, 2002.
- [47] REIS, R. L. S. et al. Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus parasiticus* UCP 1281 no biotratamento de efluentes da indústria de laticínios e produção de lipídeos. *e-xacta*, v. 8, n. 1, 2015.
- [48] PAPANIKOLAOU, Seraphim et al. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 1, p. 60-71, 2008.

[49] SITEPU, Irnayuli R. et al. Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species. **Bioresource technology**, v. 144, p. 360-369, 2013.

[50] Puhan S., Saravanan N., Nagarajan G., Vedaraman N. Effect of biodiesel unsaturated fatty acid on combustion characteristics of a DI compression ignition engine, **Biomass Bioenerg.** 34, 1079-1088, 2010.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES GERAIS

- O *Penicillium spinulosum* (UCP1347), isolado do solo do semi-árido (PE, Brasil), apresentou elevado potencial na produção de biossurfactante e lipídeos utilizando milhocina e óleo de soja pós-fritura como substratos alternativos;
- O biossurfactante produzido por *P. spinulosum* demonstrou ser um bom surfactante comprovado pela redução da tensão superficial e interfacial, e bons resultados nos percentuais de emulsificação para o N-hexadecano e óleo de soja pós-fritura;
- O biossurfactante produzido por *P. spinulosum* foi caracterizado como complexo polimérico devido à presença de carboidratos, lipídeos e proteínas;
- O *Penicillium spinulosum* (UCP1347) produz, em meio formulado por milhocina e óleo de soja pós-fritura, biossurfactante extracelular do tipo aniônico;
- O biossurfactante do *P. spinulosum* demonstrou efetiva estabilidade frente a variações de pH, temperatura e salinidade, desta forma pode ser aplicado no meio ambiente;
- O planejamento experimental do tipo DCCR apresentou-se como uma ótima ferramenta para determinar o comportamento das variáveis independentes milhocina e óleo de soja pós-fritura sobre a variável resposta tensão superficial, fornecendo condições otimizadas para a produção do biossurfactante;
- Através da fitotoxicidade, o biossurfactante apresentou potencial de aplicação no meio ambiente, pois não é nocivo ao mesmo;
- O *Penicillium spinulosum*, é um micro-organismo oleaginoso, que produziu lipídeos em meio constituído por milhocina e óleo de soja pós-fritura, sendo estes lipídeos compostos por ácidos graxos saturados e insaturados, com concentrações favoráveis para a produção de biodiesel.

ANEXOS