UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ELIANE DE JESUS SERAFIM

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE E LIPASE POR *Aspergillus niger* ATCC 1004 UTILIZANDO SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

JEQUIÉ – BA

OUTUBRO / 2017

ELIANE DE JESUS SERAFIM

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE E LIPASE POR *Aspergillus niger* ATCC 1004 UTILIZANDO SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre (a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Júnior
Co-orientador: Prof. Dr. Gildomar Valasques Júnior

JEQUIÉ – BA
OUTUBRO / 2017

S481 Serafim, Eliane de Jesus.

Estudo da produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizando substrato de baixo custo / Eliane de Jesus Serafim.- Jequié, 2017.

83f.: il.; 30cm.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Júnior.)

1. Biofsurfactante 2.Lipase 3.Aspergillus niger ATCC 1004 4.Óleo lubrificante residual 5.Cereus jamacaru DC I.Valasquez Júnior, Gildomar Lima II.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia IV.Título

Jandira de Souza Leal Rangel - CRB 5/1056. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

A Deus por ser a minha base

A minha vó Elza

A minha mãe Lúcia

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a graça de estar realizando mais esta etapa.

Ao professor Baraquizio pela oportunidade, pela confiança e pelo incentivo de que sempre podemos ir mais além.

A minha mãe que Lúcia sempre acreditou em mim.

A Vó Elza pelas suas orações.

A minha irmã Edilene e Mirela Santos pelo incentivo.

A Juan pela sua companhia, exemplo e incentivo.

Ao professor Gildomar pela co-orientação, pelos ensinamentos e apoio.

Ao professor Lizandro pelos ensinamentos e colaboração.

Aos professores e coordenadores que nos concederam os laboratórios, principalmente o professor Gildomar e professora Maíra (laboratório de Farmacotécnica - UESB).

A Alexsandra e Dhiéssica por contribuído na confecção deste trabalho, partilhando seus conhecimentos.

A equipe de laboratório, Antonio, Samila, Romario, Mateus e Maísla pela amizade, pelos momentos de alegria, pela colaboração e pela disposição de sempre ajudar um ao outro.

Aos professores do programa de pós – graduação.

A todos aqueles que durante este percurso contribuiu de alguma forma.

A UESB e ao programa de pós-graduação em Química.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas;

Glória, pois, a ele eternamente. Amém.

Romanos 11: 36

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. 1. Estrutura do ramnolípidos.....07
Figura 1. 2. Estrutura de trealolipídios.....08
Figura 1. 3. Estrutura de soforolipídios.....09
Figura 1. 4. Estrutura de surfactinas.....09
Figura 2. 0. Aplicação de biossurfactantes na indústria.....11
Figura 3. 0. A hidrólise do triglicerídio por lipase.....19

Capítulo 3

Figuras 1. Diagrama de Pareto da Atividade Emulsificante do biossurfactante produzido por *A. niger* em tempo e diferentes temperaturas.....48
Figura 2. Valores observados versos valores preditos para atividade emulsificante do biossurfactante e função da temperatura e do tempo.....49
Figuras 3. a e **b.** Rendimento da atividade emulsificante produzido pelo *Aspergilus niger* em função da temperatura e do tempo.....50

Figura 4. Índice de emulsificação ($E_{24\%}$) do BS obtido a partir de diferentes fontes de carbono.....50
Figura 5. Distorção ótica decorrente à presença do BS na amostra.....52

Figura 6. Efeito da temperatura na atividade enzimática. 54

Figura 7. Curva de Lineweaver-Burk para a lípase. 55

Figura 8. Diagrama de Pareto considerando os efeitos da temperatura e pH na atividade de lipase.....60

Figura 9. Superfície de resposta da temperatura e pH em função da atividade de lipase.....55

Figura 10. Efeito dos íons Ca^{2+}, Na^{+} e K na atividade enzimática.....57

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Representação de alguns dos principais tipos de substratos comumente utilizados para produção de biossurfactante.....11
Tabela 2. Principais fungos filamentosos e seus respectivos tipos de biossurfactantes produzidos.....16
Tabela 3. Fungos produtores de lípase e substratos na FES.....19

Capítulo 3

Tabela 1. Análise químico-bromotólogica do Cereus jamacaru em porcentagem de matéria seca.....44
Tabela 2. Matriz Doehlert, valores codificados e reais das vaiáveis independentes em função da variável dependente. 47
Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante..... 47
Tabela 4. Resultados dos extratos enzimáticos brutos e purificados.....53
Tabela 5. Matriz do planejamento experimental, valores reais e codificados para cada variável independente e atividade enzimática encontrada para os respectivos ensaios.....69

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BS:	Biossurfactante
GRAS:	Geralmente reconhecido como seguro
FES:	Fermentação em estado sólido
NT:	Nitrogênio total
FDN:	Fibra em detergente ácido
PB:	Proteína bruta
OLR:	Óleo lubrificante residual
RMS:	Metodologia da superfície de resposta
PDA:	Potato Dextrose Agar
AE:	Atividade emulsificante
O/A:	Óleo em águia
UA:	Unidade da atividade enzimática
ABS	Absorbância
ANOVA:	Análise de variância
SQ:	Soma dos Quadrados
GL:	Graus de Liberdade
QM:	Quadrado Médio
DOE:	Design do composto central
BSA:	Albumina
p-NPP:	*p-nitrofenil palmitato*
ORF:	Óleo residual de fritura
G:	Gasolina

Estudo da produção de biossurfactante e lipase por A*spergillus niger* ATCC 1004 utilizando substratos de baixo custo

Autora: Elaine de Jesus Serafim

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior

Resumo: Nos últimos anos os setores industriais têm demonstrado maiores interesses pelos biossurfactantes e as enzimas, especialmente as lípases. Todavia, produzi-los em escala superior como a nível laboratorial gera um custo financeiro relativamente alto. Para contribuir com estudos que buscam a viabilidade técnica e financeira, uma das alternativas adotada pelos pesquisadores é a escolha por substratos alternativos de baixo custo. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a potencialidade do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 em produzir biossurfactante e lipase a partir de insumos de baixo custo por fermentação no estado sólido (FES). Para isso, foi avaliado o óleo lubrificante residual – OLR como fonte de carbono e a planta mandacaru (*Cereus jamacaru* DC) como suporte para compor o meio fermentativo. Utilizou-se o delineamento Dhoelert e a metodologia da superfície de resposta (MSR) para otimizar as condições da produção do biossurfactante. A temperatura e tempo foram as variáveis consideradas no processo da fermentação, sendo as condições ótimas para a produção do biossurfactante o tempo de 120h, a temperatura de 37 ºC e 70% de umidade. A Atividade Emulsificante encontrada no ponto ótimo experimental da produção de biossurfactante foi de 11,8 UE. A lípase foi produzida utilizando as mesmas condições do ótimo previsto para a síntese do biossurfactante. O fator de purificação da lipase foi de 1,48, o pH 6.0, os valores de K_m *e* V_{max} foram 0,22 mM e 0,84 UA/min^{-1}, respectivamente. A temperatura considerada estável para a atividade de lipase foi de 40 ºC. O óleo lubrificante residual e o farelo do mandacaru demonstraram serem eficientes na formação simultaneamente biossurfactante e lipase.

Palavras-chave: Biossurfactante; lipase*; Aspergillus niger* ATCC 1004; óleo lubrificante residual, *Cereus jamacaru* DC.

STUDY OF PRODUCTION OF BIOSSURFACTANTE AND LIPASE BY *Aspergillus niger* ATCC 1004 THROUGT LOW COST SUBSTRATES

Author: Eliane de Jesus Serafim

Advisor: Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Júnior

Co-Advisor: Gildomar Lima Valasques Júnior

Abstract: The last years the biosurfactants and enzymes, especially the lipases have gained interest in the industrial sectors, however, produce it at a higher magnitude than the laboratorial level generates a relatively high financial cost. To contribute studies that seek technical and financial viability, one of the options adopted by researchers is the choice for alternatives low cost substrates. Thus, the aim of this search was to evaluate the potentiality of the filamentous Aspergillus Niger ATCC 1004 in producing Biossurfactante and lipase from low cost raw material for biosurfactant production by fermentation in solid state (SSB). For this, was evaluated the residual lubricant oil – OLR as a source of carbon and the plant Mandacaru (*Cereus Jamacaru* DC) as support for composing the fermentation medium. The Dhoelert and Response Surface Methods (RSM) was used to evaluate the production of the biosurfactant. The variables temperature and time were considered in the fermentation process, being the optimal conditions for the production of biosurfactant 120 hours, temperature 37 º C and 70% humidity. The emulsifying activity found at optimal experimental point of biosurfactant production was 11.8 UE. The lipase was produced using the same conditions as expected for synthesis of biosurfactant. The purification factor of lipase was 1.48, pH 6.0, K_m and V_{max} values were 0.22 mM and 0.84 au/min^{-1}, respectively. The temperature considered stable for lipase activity was 40 ºC. The residual lubricant oil and Mandacaru plant demonstrated to be efficient in producing biocomposites.

Keywords: biosurfactant; filamentous fungi; *Aspergillus niger**;*** low cost

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.0. INTRODUÇÃO.....01

1.2. OBJETIVOS.....03

Objetivo Geral 03

Objetivos Específicos.....03

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Biossurfactantes 04

2. 1. Fatores que afetam a produção de biossurfactante.....05

2.2. Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.....07

2.3. Aplicação comercial dos biossurfactantes 09

2.4. Substratos de baixo custo para produção de biossurfactante.....11

2.5. Óleo lubrificante residual.....13

2.6. A planta mandacaru *(Cereus jamacaru* DC*)*.....14

2.7. Fermentação em Estado Sólido . Fermentação em estado sólido (FES): Aspectos gerais 15

2.8. Microrganismo utilizado na utilizado na fermentação.....15

2.9. Lipase: Produção e aspectos gerais.....18

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....21

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSSURFACTANTE E LIPASE POR *Aspergillus niger* ATCC 1004 USANDO ÓLEO LUBRIFICANTE RESIDUAL E *Cereus Jamacaru* DC

3.0. INTRODUÇÃO.....36

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....38

3.1.1 Microrganismo e manutenção do inóculo.....38

3.1.2. Estudo da influência da fonte de nitrogênio e de carbono no crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 1004.....38

3.2.Tratamento da planta mandacaru e composição químico-bromatológica.....38

3.2.1. Óleo lubrificante residual (OLR).....39

3.3. Preparo do inóculo.....39

3.3.1. Fermentação no estado sólido.....39

3.3.2. Extração do biossurfactante.....39

3.3.3. Determinação da atividade emulsificante.....39

3.4. Índice de emulsificação.....40

3.5. Análise qualitativa com microplacas.....40

3.6. Planejamento experimental.....41

3.7. Extração da lipase.....41

3.7.1. Purificação por precipitação com $(NH_4)_2SO_4$.....41

3.7.2. Determinação da atividade enzimática.....42

3.7.3. Determinação de proteína total e atividade específica.....42

3.7.4. Determinação da termoestabilidade enzimática.....43

3.7.5. Determinação dos parâmetros cinéticos.....43

3.7.6. Influência de Sais (Cátions metálicos).....43

3.8. RESULTADO E DISCUSSÃO.....43

Estudo da influência da fonte de nitrogênio e de carbono no crescimento de *Aspergillus niger* ATCC 1004.....44

Efeito de diferentes fontes de Nitrogênio na produção do biossurfactante.....45

Efeito de diferentes fontes de carbono na produção do biossurfactante.....46

Planejamento experimental para otimização da produção do biossurfactante.....46

Análise de variância (ANOVA).....47

Metodologia de superfície de resposta.....49
Índice de emulsificação.....51
Análise qualitativa com microplacas.....52

Estudo e caracterização da lipase.....52
Termoestabilidade.....53

Parâmetros cinéticos.....54

Influência da temperatura e pH.....55

Influência de sais.....57

3.9. CONCLUSÃO.....58

REFERÊNCIAS.....60

ANEXOS.....70

CAPÍTULO 1

1.0. INTRODUÇÃO

A atenção dada aos biossurfactantes (BS) produzido a partir de microrganismo se deve à suas importantes contribuições tais como, biodegradabilidade, alta atividade superficial e baixa toxicidade, podendo substituir os surfactantes químicos caracterizados pela sua alta toxidade e baixa degradabilidade [1]. Os biossurfactantes possuem caráter antiadesiva contra patógenos que são relevantes para aplicações relacionadas à saúde humana [2] e amplamente utilizado nas indústrias de alimentos, cosméticos e na agricultura [3].

Apesar das vantagens comparativas do BS em relação aos surfactantes sintéticos, produzir BS em larga escala ainda é um fator limitante, isso porque sintetizar o bioproduto em escala industrial gera um custo bastante elevado resultante de baixos rendimentos nos processos de produção e elevados custos de recuperação e purificação [4]. Além disso, seu preço varia entre 20 - 30% mais caro que os surfactantes [5]. Para reverter esse quadro, pesquisadores vêm realizando estudos em busca de alternativas a fim de aumentar a produção de BS e reduzir os custos da produção. Uma das alternativas reside na escolha de substratos de baixo custo (resíduos ricos em hidrocarbonetos, fonte de nitrogênio, etc). Isso é importante porque em geral o processo tem uma economia representativa de 50% do custo final do produto [6].

A capacidade das lipases para catalisar reações em uma ampla gama de substratos sem a adição de cofatores caros, e sua estabilidade em solventes orgânicos, resultou em uma enzima de destaque como sendo o terceiro maior grupo de comercializados, após as proteases e carboidrases [7]. As lipases são consideradas uma ferramenta versátil na biotecnologia, pois conduzem a múltiplas aplicações industriais que icluem as indústrias farmacêuticas, agroquímicas, produtos lácteos, têxteis, cosméticos, detergentes etc. [8]. São produzidas geralmente na presença de um lípidio como óleo ou qualquer outro indutor, especialmente os triacilgliceróis, ácidos, ésteres hidrolisáveis e glicerol [9]. As lipases e BS são compostos produzidos por microrganismos geralmente envolvidos na metabolização de substratos de petróleo [10].

Os fungos filamentosos são microrganismos amplamente conhecidos por sua diversas características bioquimicas, têm a capacidade de produzir bioprodutos

de interesse (enzimas, ácidos orgânicos, compostos aromáticos, corantes e outros) em uma variedade de substratos [11]. Além disso, são adaptáveis, podendo crescer em condições ambientais extremas como em áreas contamindas por compostos químicos potencialmente tóxicos [12].

Entre os diversos tipos de fungos filamentosos, pode se destacar o *Aspergillus niger* pela sua importância relevante na biotecnologia, uma vez que o *A. niger* é uma das espécies mais reconhecidas por possuir status GRAS (geralmente reconhecido como seguro). Esta classificação é segura e garante que os bioprodutos obtidos pelo o mesmo não contém componente tóxico nocivo aos seres humanos [13]. O gênero Aspergillus possui resultados favoráveis na produção de lipases, sendo microrganismos produtores simultâneos de lipases e BS. A síntese simultânea ocorre pelos microrganismos mediante a necessidade de metabolizar os compostos presentes nos meios aos quais estão submetidos [14].

Entretanto, a produção de enzimas de baixo custo passa também, pela utilização de resíduos agroindustriais, como suporte e substrato para o meio fermentativo [15]. No cenário do petróleo, os óleos lubrificantes são produzidos em maior quantidade e considerados os mais agressivos ao meio ambiente e nocivo à saúde humana [16]. Milhares de litros dessa substância são gerados anualmente a partir de oficinas mecânicas e descarregados descuidadamente no ambiente tornando este inapropriado e constitui uma ameaça potencial a todos que nele vivem [17]. O consumo anual de óleo refinado no mundo é de 42 milhões de toneladas, gerando 22 milhões de toneladas de óleo usado, das quais apenas um milhão de toneladas é novamente refinado, e o restante é queimado nos motores [18].

Tendo com base esses aspectos, este trabalho objetiva-se à produção de BS e lipase pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da fermentação no estado sólido (FES) usando óleo lubrificante residual e C*ereus Jamacaru* DC como substratos alternativos.

1.2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial do fungo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 1004 em produzir simultaneamente biossurfactante e lipase a partir de substratos de baixos custos por fermentação em estado sólido.

Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* em diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de sódio);
- Avaliar a viabilidade do uso do óleo lubrificante residual como fonte de carbono e a planta mandacaru (*Cereus jamacaru* DC) como suporte na fermentação em estado sólido (FES);
- Avaliar a produção do biossurfactante considerando os efeitos da temperatura e do tempo da FES;
- Avaliar a produção simultânea do biossurfactante e lipase nas mesmas condições (temperatura e tempo).

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.0. Biossurfactantes

Os biossurfactantes (BS) foram descobertos pela primeira vez como compostos extracelulares de fermentação por bactérias [19]. Diferentes dos surfactantes de origem sintética, os BS ocorrem na natureza oriundo da ação metabólica das bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Esses compostos são conhecidos pela sua natureza anfifílica, isto é, apresentam na mesma molécula grupos polares (hidrófilos) que possuem afinidade por água, e grupos apolares (hidrófobos), afinidade por óleo [20, 19, 21].

Os surfactantes devido à natureza anfifílica podem reduzir a tensão superficial de um líquido e a tensão interfacial entre dois líquidos ou entre um líquido e um sólido, aumentando a solubilidade, graças à acumulação desse composto na interface entre as fases imiscíveis [22, 23, 24, 25, 26]. Os BS são uma classe de substâncias promissoras e interessantes, porque são baseados em recursos renováveis, sustentáveis e biodegradáveis [27]. Os surfactantes sintéticos são derivados de fontes petroquímica não renovável. Assim, eles são apenas parcialmente biodegradáveis, tóxicos e contribuem para poluição ambiental [28].

Dentre as vantagens que os BS oferecem em relação aos surfactantes químicos, pode-se destacar a biodegradabilidade, compatibilidade ambiental e baixa toxidade, sendo possível entre outras aplicações, a biorremediação de vazamentos de petróleo [22, 4, 29]. A biorremediação é técnica que utiliza BS, bioemulsificantes e/ou microorganismos produtores de BS para o tratamento do solo e água residual, a fim de minimizar ou remover esses poluentes [30]. Além das vantagens mencionadas, podemos citar a estabilidade dos BS que podem ser utilizados em ambientes com condições mais extremas como pH, temperatura e salinidade [31, 32] e ainda, a viabilidade de produção fermentativa utilizando recursos renováveis, efetividade em pequenas quantidades (ppm), mesmo sob condições extremas, potencial seletivo e específico para diversas aplicações [5].

Em termos de toxidade os BS têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos

químicos, a sua baixa toxidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos [21].

A produção de BS ocorre especialmente durante seu crescimento em substratos imiscíveis em água, onde a maioria desse composto é liberado no meio de cultura na fase exponencial de crescimento dos microrganismos. Em síntese, o máximo do acúmulo do agente ativo ocorre na metade da fase exponencial e subsequentemente decrescerá rapidamente, provavelmente porque é convertido em um metabólito sem atividade surfactante [33].

Diante das vantagens mencionadas comparando os surfactantes sintéticos e os microbianos, espera-se um crescimento do mercado destes para os últimos anos [4]. Isso porque os estudos consideram que atualmente com o aumento da consciência ambiental, houve um crescente interesse na utilização de fontes renováveis à base biodegradável tanto que o mercado de BS globais foi 344, 068.40 toneladas em 2013 e é esperado para chegar 461, 991.67 toneladas em 2020, crescendo a uma taxa anual média de 4,3% 2014 - 2020 [34, 35].

2.1 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

Existem vários fatores que podem influenciar na produção do BS, esses fatores são apontados principalmente como o meio, e as condições de crescimento. O crescimento celular e o acúmulo de produtos metabólicos são influenciados pelas fontes nutricionais tais como: a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio, entre outras. Os fatores ambientais e as condições de crescimento como o pH, a temperatura, a agitação e a disponibilidade de oxigênio é de fundamental importância na produção de biossurfactante [20, 36].

a) Influência da fonte de carbono na produção de biossurfactantes

A fonte de carbono é um fator que influencia bastante a qualidade e quantidade da produção de BS [36]. Geralmente alguns microrganismos produzem BS somente utilizando fontes de carbono hidrofóbicas, hidrocarbonetos ou óleos vegetais, outros somente usam carboidratos, e outros ainda usam diversas fontes de carbono, em combinação ou individualmente [3].

Das fontes de carbono, as mais citadas na literatura para a produção de BS são a sacarose [22], glucose, glicerol [37, 2] e óleo diesel [38, 39]. Incluem ainda, os óleos vegetais a partir da canola, milho, girassol, cártamo, oliva, semente de uva,

palma, coco e óleo de soja [40]. Resíduos de refinaria de petróleo, óleo de girassol, subproduto do amido, xarope de beterraba e de cana-de-açúcar têm sido citados como fonte potencial de carbono para produzir substâncias extracelulares como antibióticos, polissacarídeos, etc [41].

A avaliação de diferentes substratos de carbono pode ajudar a superar o problema do alto custo de produção [41]. A glucose, o glicerol, os acetatos, além dos ácidos orgânicos entre outros, são substratos considerados caros, inviabilizando assim, a redução dos custos [4]. Portanto, sugere-se a substituição parcial ou completa de reagentes puros com misturas industriais/agrícolas.

b) Influência da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactantes

A fonte adicional de nitrogênio é um fator que desempenha papel significativo na regulação da síntese de BS garantindo ao meio fermentativo a nutrição dos microrganismos devido à composição rica em proteínas necessárias para o crescimento destes e na produção do bioproduto no processo envolvido [4]. A produção de BS aumenta durante a limitação da fonte de nitrogênio no meio de cultura, com a redução do nível de nitrogênio, o crescimento do microrganismo se torna limitado, favorecendo a produção de metabólitos, enquanto que com o excesso de fonte de nitrogênio, o substrato vai ser dirigido para o crescimento celular, o que limita a acumulação do produto [42].

Alguns autores citam o extrato de levedura como sendo a fonte de nitrogênio bem mais empregada para a produção de BS, levando em consideração a sua concentração que é exigida de acordo com a natureza do microrganismo e do meio de cultura a ser utilizado [20, 43]. Entre outras fontes de nitrogênio destacam-se, a uréia, cloreto de sódio, nitrato de sódio [33, 44] peptona [39], o sulfato de amônio [38], e ainda, o nitrato de amônio, o extrato de carne e extrato de malte [36].

c) Influência dos fatores ambientais na produção de biossurfactantes

Fatores ambientais e as condições de crescimento, também conhecidos como operacionais, tais como o pH, a temperatura, a agitação e a disponibilidade do oxigênio afetam a produção de BS com seus efeitos no crescimento celular ou na atividade. A fim de obter maior produção de BS é necessário otimizar as condições desses fatores [20, 4].

Os microrganismos podem crescer em uma ampla faixa de temperatura, sendo que esta variação pode ser maior para alguns do que para outros. A temperatura na qual uma espécie de microrganismo cresce mais rapidamente é conhecida como temperatura ótima de crescimento. Por outro lado, os microrganismos podem crescer em uma faixa de pH que varia de 2 para os denominados acidófilos até pH 11 para os alcalófilos. Embora alguns microrganismos modifiquem o pH do meio de cultura durante seu crescimento [45].

Um aumento na velocidade de agitação pode favorecer a acumulação de BS de culturas, isso quando reduz a tensão superficial. Ao contrário, a agitação pode ter um efeito negativo em relação à redução da tensão superficial, portanto é importante ter o controle desse fator durante a cultivação [46].

2.2. Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores

Os BS são classificados de acordo com sua composição química, através do peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação, ou de acordo com o microrganismo produtor. Os de baixo peso molecular que incluem os fosfolipídios, glicolipídios, lipopeptídios e ácidos graxos são muito efetivos na redução da tensão superficial e interfacial, já os polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídios e lipoproteínas (ou mistura complexas destes bipolímeros) são caracterizados por alto peso molecular e garante a eficácia na estabilização de emulsões de óleo em água [47,36, 2]. Os principais BS são destacados a seguir nas Figuras de 1.1 - 1.4.

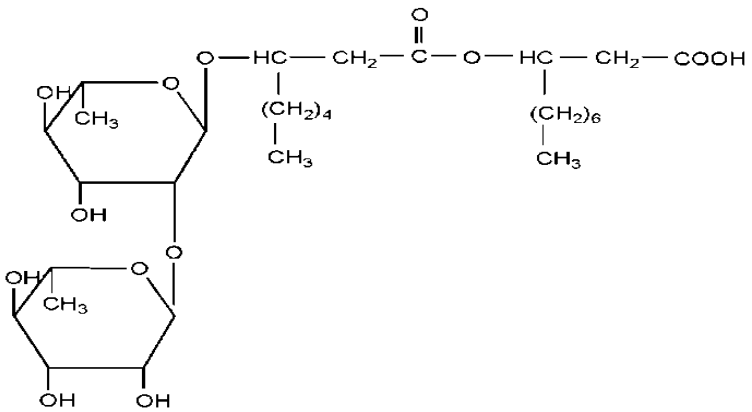


Figura 1.1. Estrutura de ramnolípídios.

Glicolípidios: os glicolípidos são BS marjoritários, são carboidratos de cadeias longas ligados a ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos ligados por um grupo éster. Entre os glicolípidos, os mais conhecidos são ramnolípidos, trealolipídios e soforolípidos. Ramnolípidos são glicolipídios (Figura 1.1), em que uma ou duas moléculas de rhamnose são ligados a uma ou duas moléculas de ácido hidroxidecanóico. São classes de BS bastante estudadas, tendo como principal produtor a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* [48, 21].

Os trealolipídios ou trealose lipídios mostrado na Figura 1.2, são glicolipídios formados pela união entre uma trealose (um dissacarídeo com uma ligação α, α-1,2 glicosídica) e uma ou duas cadeias de ácidos micólicos (ácidos graxo α-ramificados-β-hidroxilado). As cadeias de ácidos micólicos variam em comprimento e insaturação dependendo do microrganismo produtor. São produzidos por vários microrganismos incluindo espécies de Rhodococcus, Nocardia, Mycobacterium e Arthrobacter [49. 50].

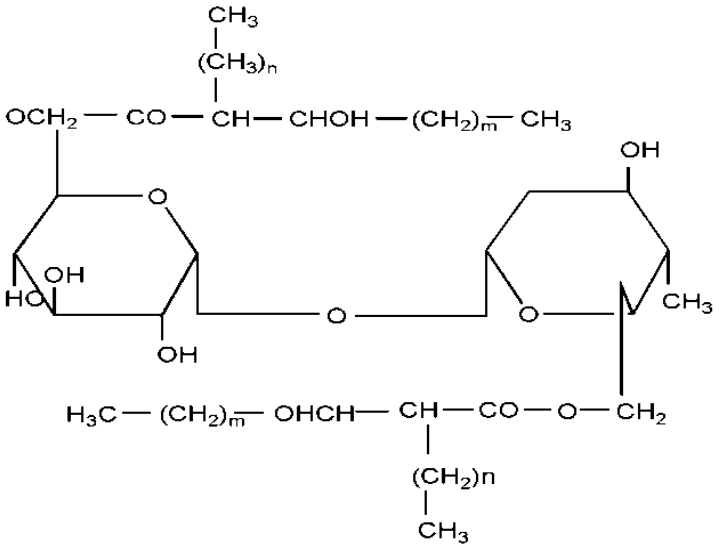


Figura 1.2. Estrutura de trealolipídios.

Os soforolipídios (Figura 1.3) são formados pela união de uma soforose (um dissacarídeo com uma ligação β-1,2 glicosídica e uma longa cadeia de ácido hidroxialifático [51], geralmente são produzidos por cepas não patogênicas e sintetizados como uma mistura de diferentes moléculas, podendo ser dividido em duas formas: os soforolípidos ácidos e os lactónicos que possuem potencial para formação de espuma, solubilidade, e atividade antimicrobianas respectivamente. Além disso, a estrutura da cadeia de ácidos graxos presentes no soforolípidos pode

variar de acordo com o substrato usado como fonte de carbono no processo de fermentação [52].

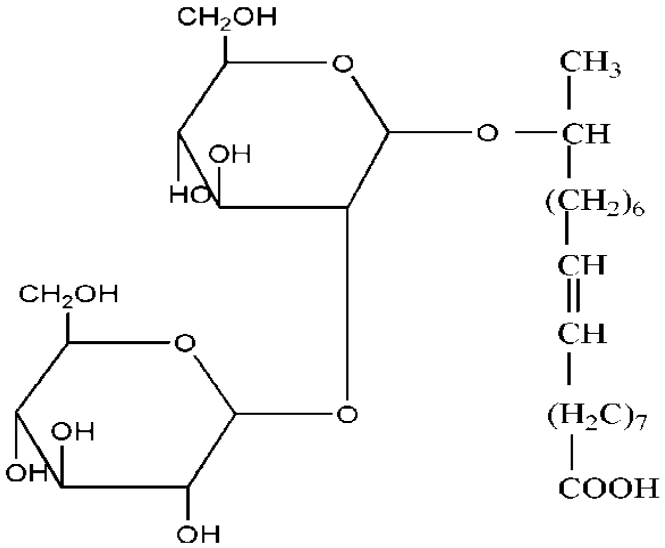


Figura 1.3. Estrutura de soforolipídios.

Surfactina: a surfactina representada pela Figura 1.4 constitui um biotensioativo lipopeptídico cíclico, composto por 7 aminoácidos e uma porção de ácido hidroxidecanóico. Os lipopeptidos têm sido reconhecidos como bioativo microbiano metabólito de categoria secundária. Muitos destes compostos possuem propriedades terapêuticas, por esta e outras razões têm ganhado destaque na área da biotecnológica. A estrutura anfipática da surfactina permite que ela esteja envolvida em interações complexas dentro de sistemas biológicos. A maioria da cepas de *Bacillus* spp. produzem compostos tensioativos como surfactina, e *Bacillus subtilis*, em particular, tem sido considerado o produtor de BS mais eficiente [53].

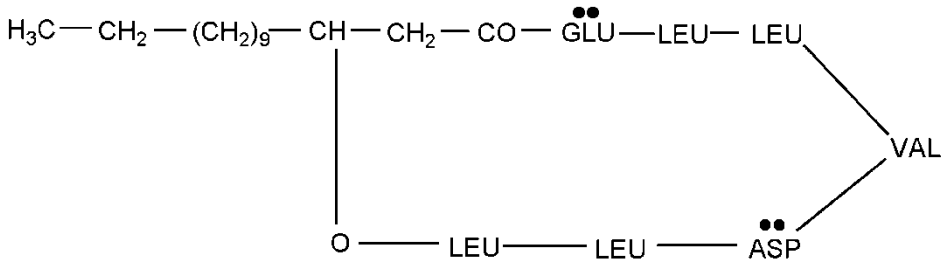


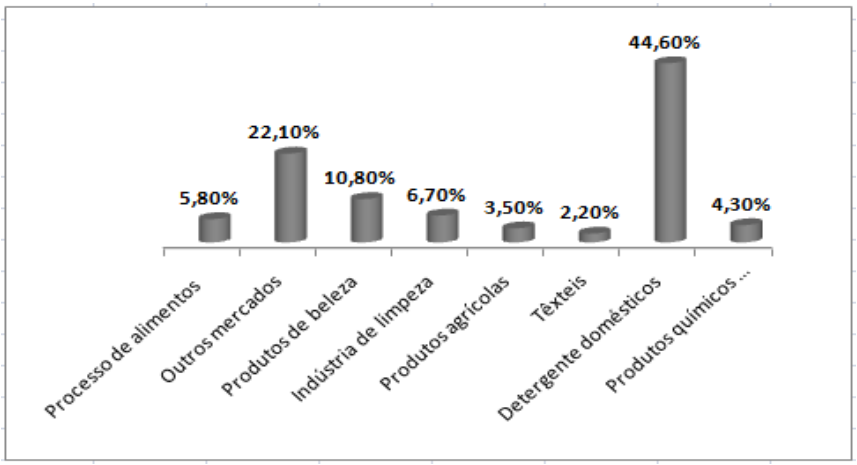
Figura 1.4. Estrutura de surfactinas.

2.3. Aplicação comercial dos biossurfactantes

Os estudos revelam que a pesquisa na área de BS tem se destacando nos últimos anos, sobretudo, em virtude das aplicações na seguites indústrias: alimentícia, agrícola, química, cosmética, farmacêutica e de limpeza; nos processos de derramamento de petróleo no mar, limpeza de reservatórios e na biorremediação de solos contaminados por substâncias hidrofóbicas [47, 3, 31, 35, 43]. No entanto, espera-se que os BS alcancem mais de US$ 2 bilhões até 2020 com aplicações industriais na remoção da contaminação por metais pesados, biomedicina, nanotecnologia, etc [53].

Apesar das vantagens dos Biossurfactante já mencionadas em relação aos surfactantes sintéticos, bem como do conhecimento que se tem sobre as técnicas de produção, a comercialização de BS não foi totalmente alcançada, em grande parte devido aos custos de produção. Esse alto custo pode ser tolerado quando o biossurfactante é usado em pequenos volumes, como em cosméticos e medicamentos. Embora, quando são necessários grandes volumes como no caso da biorremediação, o custo fica incompatível com a sua aplicação [29]. A aplicação comercial de BS nas principais indústrias em 2013 está disposta na Figura 1.0.

Figura 1.0. Aplicação de biossurfactantes na indústria. Grand view research (2015), com adaptações.



Os dados representados da figura 1.0 apontam o consumo global da aplicação de biossurfactantes em 2013, com destaque para algumas aplicações

A consciência entre os consumidores relacionados aos riscos à saúde associados aos surfactantes químicos pode ter contribuído para aumento do consumo de biossurfactantes na Europa, pois em 2013 o consumo de biossurfactantes nesta região representou mais de 50% do consumo mundial,

enquanto a América do Norte foi o segundo maios consumidor de biossurfactantes, com uma participação de mais de um quarto [55].

2.4. Substratos de baixo custo para produção de biossurfactantes

O sucesso de processos biotecnológicos utilizando substratos alternativos de baixo custo de produção é uma estratégia bastante comum por diversos pesquisadores quando se comprometem a estudar compostos de natureza biotensoativas [56, 57, 35, 43].

Para superar os altos custos e a produção de biossurfactante, basicamente são adotadas duas estratégias básicas para uma produção de maior rendimento: primeiro, o uso de substratos de baixo custo e de resíduos para a formulação de meios de fermentação que reduzem os custos das matérias-primas iniciais envolvidas no processo; em segundo, o desenvolvimento de bioprocessos eficientes e otimização com sucesso, incluindo a otimização das condições de cultura e processos de recuperação de custo-benefício para a máxima produção e recuperação de biossurfactante [20].

Nessa perspectiva, pesquisadores defendem que incluir substrato de baixo custo para produção de biossurfactante gera uma economia de aproximadamente 50% do valor do produto final [19, 58, 35]. A tabela 1 ilustra exemplos de matéria-prima desejáveis de baixo valor comercial para a produção de biossurfactante comumente divulgados na literatura.

Tabela 1. Representação de alguns dos principais tipos de substratos comumente utilizados para produção de biossurfactante.

TIPOS DE RESÍDUOS	REFERÊNCIAS
Milhocina e óleo de milho pós-fritura.	[31]
Farelo de arroz e palha de arroz e óleo diesel.	[39]
Farelo de soja e casca de arroz e azeite de oliva.	[10]
Sementes de girassol, uva e óleo de semente de girassol.	[43]
Farinha de folha de azeitona e farinha e bagaço de azeitona.	[57]

Glicose, glicerol, ácido oléico, óleo de bagaço de palma, óleo de soja, óleo lubrificante residual e óleo vegetal residual.	[59]
Licor de milho e de óleo de soja residual.	[19]
Farelo de trigo e de óleo de soja.	[60]
Cascas de banana, cascas de batata, grão de bico, farelo de milho, farinha de soja, farinha de cevada, Farinha de arroz, amido de milho e cascas de laranja.	[61]
óleo residual de refinaria de petróleo e melaço de beterraba.	[62]
Óleo lubrificante residual, palma forrageira.	[63]

2.5. Óleo lubrificante residual

Pesquisas apontam que a América do Sul será a região do planeta com maior crescimento da produção de veículos automotores e o Brasil tem potencial para crescer sua frota em mais de 60% nos próximos anos. Com esse crescimento de veículos rodando no Brasil e no mundo, aumenta também a quantidade de óleo lubrificante automotivo usado que é descartado em vários pontos da cidade ao mesmo tempo. E ainda, juntamente com o descarte do óleo lubrificante automotivo tem a geração da embalagem plástica do óleo lubrificante que é usado na troca de óleo [64]. Apesar de uma queda de 5,6% no volume comercializado em relação a 2014. Estudos recentes indicam que o Brasil é um dos maiores mercados de lubrificantes e, por consequência, um dos maiores geradores do mundo de óleo usado [65].

São substâncias que consistem geralmente numa amostra contendo 90% de petróleo e 10% de aditivos. Sendo os automóveis responsáveis por consumir uma grande parte desses óleos que têm como finalidade proteger os motores da combustão interna. Por outro lado, diferentes marcas de óleos para motores possuem diferentes aditivos de grupos variados, tais como, antioxidantes, detergentes, agentes anti desgaste, dispersantes, inibidores de corrosão, entre outros [66]. No entanto, os óleos lubrificantes após sua vida útil, perdem suas propriedades, tornam-se contaminados ou deteriorados e consequentemente

perdem sua função, se tornando impróprios para o propósito originalmente pretendido [67].

Os impactos ambientais provenientes das atividades da troca de óleos lubrificantes automotivos nas oficinas e postos de combustível, no que diz respeito ao descarte inadequado desses resíduos e de suas embalagens, são diversos. Quando tais resíduos são lançados diretamente no ambiente (em corpos hídricos, nas redes de esgotos e solo) ou quando queimados de forma não controlada provocam graves problemas de poluição do solo, das águas e do ar [64].

Paralelamente, as próprias embalagens possuem um fator crítico adicional associado à permanência de fração do produto após abastecimento, sendo em média 20 g de óleo permanecem nas embalagens de 1 litro [68]. Há de considerar que os óleos lubrificantes residuais possuem produtos resultantes da sua utilização, principalmente metais pesados, que podem ser extremamente prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, podendo provocar desde lesões na pele até câncer. Nesse âmbito, uma das possíveis destinações desses resíduos seria a reciclagem do produto, considerado uma saída ambientalmente correta para o destino do mesmo [69].

Diante das considerações firmadas, uma das formas do reaproveitamento dos resíduos é corroborar com as pesquisas em produzir vários compostos, principalmente na área de biotecnologia. Sobretudo, como a produção de BS a partir de lubrificantes resíduais, sendo uma escolha relativamente barata e permite atividade de emulsificação satisfatória [70].

2.6. A planta mandacaru (*Cereus jamacaru* DC)

O *Cereus jamacaru* (nome cientifico), conhecido popularmente como mandacaru, é um cacto característico da região árida nordestina do Brasil [71]. Pertence à família das cactáceas, gênero Cereus, que compreende cerca de 100 gêneros, onde 40 delas estão localizadas no Brasil, representado por aproximadamente 200 espécies e distribuído em vários ecossistemas brasileiros, principalmente no Nordeste do Brasil [72], caracterizando este ecossistema como de grande importância para o desenvolvimento sustentável e conservação da biodiversidade, local de muito valia em termos de fonte de nutrientes na estação seca [73, 74].

O mandacaru é a cactácea colunar mais conhecida da caatinga e apresenta altura que variam entre 3,75 a 6,54m [75]. É uma espécie nativa da vegetação da Caatinga brasileira, cresce em solos pobres em nutrientes e pedregosos, e juntamente com outras espécies de cactáceas formam a paisagem típica da região semi-árida do Nordeste do Brasil. O vegetal é amplamente encontrado nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e norte de Minas Gerais [76].

O caule contém fécula, com o qual se preparam pães, biscoitos, broas e mingaus utilizados na alimentação humana. Em sua composição foram registrados 15,84% de água, 10,72% de proteína bruta, 1,04% de estrato etéreo, 45,52% de extratos não nitrogenados, 16,22% de fibra bruta e 10,66% de resíduos minerais [77]. Nos frutos dos cactáceos geralmente encontram inúmeras sementes. Esses frutos constituem um importante recurso para diferentes grupos de animais como répteis, pássaros, insetos e na alimentação de mamíferos [78].

O mandacaru cresce em solos com baixos níveis de nutrientes, além de sobreviver em condições de precipitação mínima. Devido a sua resistência em longos períodos de seca representa importante opção alimentar na dieta de gados, garantido assim, a sobrevivência destes animais. Sua utilização como planta ornamental e fonte de macromoléculas como hemicelulose e pectina são uns dos seus destaques [74]. Descritores mencionam também esse vegetal ter beneficios medicinais que exibe atividade antimicrobiana [71] e atividade antisquistosomática [79].

Diversos estudos têm sido realizados acerca da utilidade do mandacaru. Entre eles pode ser destacado especificamente como alimentação animal [75], em isolamentos de espécies de microrganismos presentes na planta [80, 73], na germinação e crescimento do mandacaru [72], na avaliação do efeito anti-helmínticos da planta em ovino [79], na caracterização físico-química de seus frutos [81] e como potencial ornamental de espécie do bioma Caatinga [82].

Nos últimos anos, nos quais se buscam fontes alternativas de baixo custo e de alta disponibilidade com potencial de produzir biocompostos, o mandacaru pode ser uma alternativa para produção de BS e lipase. Nessa perspectiva, contribuir no âmbito científico através das pesquisas, bem como valorizar a espécie nativa da região e estimular a economia local e da região. Além disso, para o nosso

conhecimento este é o primeiro estudo realizado utilizando esta planta como suporte para a produção de BS e lípase na fermentação em estado sólido (FES).

2.7. Fermentação em estado sólido (FES): Aspectos gerais

A fermentação em estado sólido recebeu grande atenção devido à sua adequação a diferentes tipos de microrganismos (fungos, leveduras e bactérias), substratos e parâmetros do processo. Porém, os fungos e leveduras são os mais comuns relatados em razão de que a FES pode fornecer um *habitat* natural similar, pela baixa atividade de água [83].

A FES pode ser definida como processo que envolve substrato sólido na ausência de água livre, neste caso, o substrato possui umidade suficiente que promove o crescimento e metabolismo microbiano. A eficiência desse processo está relacionada com a semelhança do *hábitat* natural para muitos microrganismos que apresentam melhor capacidade de crescimento nestas condições [84, 85, 86]. Na fermentação em estado sólido a água está presente em teores que variam de 30% a 70% [29]. O cultivo da FES apresenta uma economia no processo devido ao menor espaço para fermentação, incluindo as possibilidades do uso de substratos simples e de baixo custo (produtos agrícolas e resíduos agroindustriais). O baixo volume de água no FES tem também um grande impacto sobre a economia do processo [84, 87, 88].

Vários fatores importantes devem ser considerados para o desenvolvimento de um bioprocesso bem sucedido sob condições de FES, alguns dos mais importantes incluem a seleção de microrganismo adequado e do suporte sólido para ser usado, em outras palavras, depende também do produto final a que se deseja produzir. Devido a grande potencialidade dos fungos filamentosos em produzirem compostos bioativos por FES, esses microrganismos tornam-se mais comumente utilizados para esta finalidade [84, 56, 89].

2.8. Microrganismo utilizado na fermentação

Os fungos têm um enorme impacto na vida diária das pessoas. São usados na biotecnologia para obter produtos benéficos (medicamentos, alimentos, etc) para a humanidade e desempenham papel importante na manutenção, assim como no

equilíbrio dos ecossistemas. Embora podem representar efeitos devastadores sobre plantas, animais e humanos [90].

Os fungos filamentosos são organismos altamente adaptáveis, crescem em condições ambientais extremas, como em áreas com compostos e elementos químicos potencialmente tóxicos. Esta resistência intrínseca, combinada com a estabilidade permite também que esses organismos sejam úteis para o tratamento da biorremediação [12]. O fungo *Aspergillus niger* é talvez o fungo mais importante usado na biotecnologia, ele é facilmente encontrado em diversos ambientes, tais como, solo e alimentos contaminados. Muitas de suas aplicações industriais têm sido dadas como status GRAS (geralmente considerado seguro) [91]. O Penicillium, por exemplo, o próprio Aspergillus, Cladosporium, Geotrichum, Mucor e Trichoderma são exemplos de fungos filamentosos encontrado no queijo, enquanto o Camembert e Roquefort são adicionados nesse alimento intencionalmente [92].

O *A. niger* é um fungo filamentoso comumente denominado como “mofo negro” apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mais rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios (esporos) são esféricos, medem de 3 a 5 µm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. É uma espécie numerosa, cerca de 200 espécies de Aspergillus, geralmente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar [93]. Na tabela 2 estão descritos alguns fungos filamentosos com potencial para produzir biossurfactante.

Tabela 2. Principais fungos filamentosos e seus respectivos tipos de biossurfactantes produzidos [93].

Microrganismo	Tipos de biossurfactantes	Referências
Aspergillus niger	Glicolipídeo	(KANNAHI; SHERLEY, 2012)
Aspergillus ustus	Glicolipídio	(ALEJANDRO *et al*., 2011)
Cladosporium resinae	Cladosan	(MURIEL *et al*., 1996)
Cunninghamella echinulata	Biossurfactante polimérico	(SILVA *et al*., 2014) Na
Curvularia lunata	Biossurfactante polimérico	(PARASZKIEWICZ; KANWAL, 2002)
Exophiala dermatitidis	Monoglicerídeos	(CHIEWPATTANAKUL *et al*., 2010)

Fusarium SP	Lipopeptídeo	(QAZI *et al*., 2014)
Penicillium chrysogenum	Lipopeptídeo	(GAUTAM *et al*., 2014)
Penicillium citrinum	Glicolipídeo	(CAMARGO-DE-MORAIS *et al*., 2003)
Syncephalastrum racemosum	Lipoproteína	(MATHUR *et al*., 2010)

O uso do fungo *A. niger* em processos fermentativos apresenta algumas vantagens em relação a outros fungos tais como, facilidade de manipulação, habilidade em fermentar em uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produz rendimentos elevados de bioprodutos [94]. O gênero Aspergillus além de ser conhecido pela sua riqueza em espécies, são capazes de produzir metabolitos secundários como, peptídeos/proteínas, bioativos, lectinas e enzimas [95].

2.9.1. Lipase: Produção e aspectos gerais

Processos enzimáticos biológicos têm sido destacados pela substituição inerente aos processos químicos convencionais, visando à minimização de subprodutos indesejáveis durante a reação processo. A utilização de catalisadores, como as enzimas, simplifica o processo de separação e purificação dos produtos, o que reduz os problemas ambientais [96]. Atualmente as enzimas possuem várias aplicações industriais, cujo mercado industrial destas continua a crescer devido ao desenvolvimento de novas tecnologias de produção [97]. O mercado global de enzimas industriais foi estimado em US$ 4,2 bilhões de dólares em 2014 e espera-se uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 7% durante o período de 2015 a 2020 para atingir quase US$ 6,2 bilhões de dólares [98].

Entre as enzimas, as lipases são utilizadas amplamente, as quais suas aplicações resultam na capacidade para catalisar reações, principalmente a hidrólise. Em virtude disso, possuem destaque em vários ramos das indústrias como

de alimentos, farmacêutica, cosméticos, no processamento de aplicações médicas, como biosensores, no desengorduramento do couro, bem como no tratamento de resíduos [99]. Sua versatilidade como uma ferramenta versátil na biotecnologia está relacionada ainda às múltiplas aplicações industriais como produtos agroquímicos, produtos têxteis, detergentes e surfactantes [100].

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (gorduras e óleos) liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol numa interface óleo-água [101, 102]. Visto que a hidrólise ocorre na interface insolúvel na fase aquosa, local onde a enzima se dissolve, Figura 3.0. Essas enzimas podem atuar tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico, com teor de água restrito, e são consideradas carboxilesterases que atuam em substratos emulsificados [15].

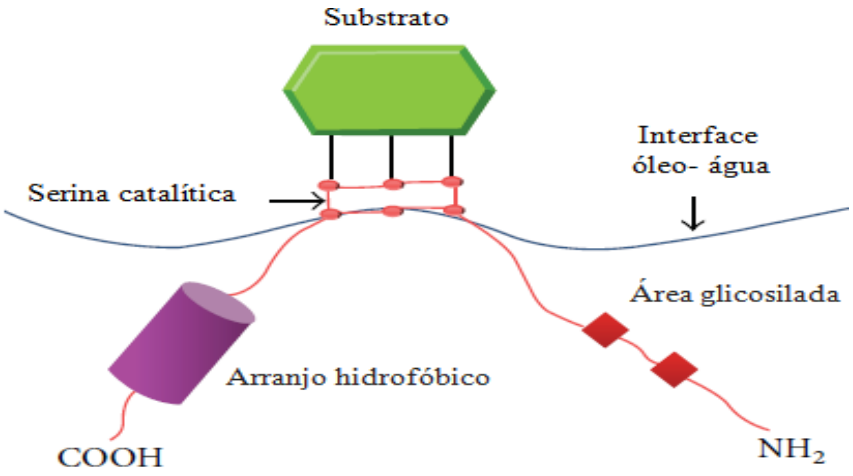


Figura 3.0. A hidrólise do triglicerídio por lipase [7].

A maioria das lipases comerciais produzidas são utilizadas para a melhoria do sabor para produtos lácteos e processamento de outros alimentos, como carne, vegetais, frutas, carnes defumadas, leite, alimentos cozidos e cerveja. Na indústria farmacêutica, a enzima oferece várias vantagens em relação à síntese química, isso se justifica pelas crescentes demandas das lipase. Estas vantagens incluem condições moderadas que evitam reações de isomerização, epimerização, racemização e rearranjo [103].

As lipases microbianas são principalmente extracelulares e sua produção é muito influenciado pela composição do meio, bem com fatores físico-químico como

temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O principal fator expressivo para a produção de lipase é a fonte de carbono, uma vez que as lipases são enzimas induzíveis, e geralmente produzidas na presença de um lipídio como óleo ou qualquer outro indutor (triacilgliceróis, ésteres hidrolisáveis, tweens). As fontes de nitrogênio e micronutrientes essenciais também devem ser considerados para o crescimento e otimização da produção [9]. O uso de resíduos agroindustriais como substrato pode resultar em uma redução no custo da produção de enzimas, considerando que o meio de cultura geralmente representa 25-50% do custo total de produção [102].

Dos diferentes organismos produtores de lipases, as de origem microbianas são as mais preferíveis, devidos sua ampla gama de substrato e maior estabilidade com menores custos, comparado às enzimas sintetizadas pelas plantas e animais [7]. E ainda, as lipases fungicas possuem a capacidade de catalisar uma variedade de reações, são produzidas a baixo custo, possuem estruturas estáveis em solventes orgânicos, além disso, os microrganismos têm a vantagem de facilidade de manipulação [97, 104]. Portanto, quando se trata de microrganismo produtores de lípase, os gêneros mais citados são Aspergillus, Rhizopus, Penicillium, Mucor, Geotrichum e Fusarium [99].

Os fungos filamentosos são fontes interessantes de lipase porque eles produzem enzimas extracelulares e seu modo de crescimento por hifa, e sua tolerância à baixa atividade de água torna tais microrganismo extremamente eficientes na bioconversão do substrato sólido. De modo singular, já mencionado, o *A. niger* é reconhecido como seguro para a aplicação industrial na área de alimentos e medicamento, por isso, é uma das razões pela quais tem sua importante relevância na biotecnologia [13]. Portanto, pode-se afirmar que a maioria das lipases microbianas industriais são derivadas de fungos [103]. A tabela seguinte (Tabela 3) ilustra os princiapis fingos filamentosos produtores de lipase e substratos na FES.

Tabela 3. Fungos produtores de lipase e substratos utilizados na FES.

Fungos	Substratos	Referências
Penicillium sp	Farelo de soja, óleo de soja residual,	melaço de cana [105].
Aspergillus ibericus,	Bagaço de azeitona, farelo de trigo	[102].

Aspergillus niger	Torta de dendê, borra alcalina do refino de óleo de dendê (Borra de dendê) [15].	
Penicillium sp.	Palma forrageira, óleo lubrificante residual e óleo residual de cozinha [106].	
Rhizopus homothallicus	Bagaço de cana e óleo de oliva	[107].
Mucor circinelloides	Óleo de babaçu e meio contendo terc-butanol como solvente [108].	
Aspergillus sp 0-4	Farelo de soja, casca de arroz e azeite de oliva.	[10].
Penicillium chrysogenum	Óleo de soja, de canola, de girassol, de milho e farelo de trigo [109].	
Fusarium oxysporum	Farelo de soja, farelo de milho, torta de mamona, óleo de oliva [110].	
Rhizopus oligosporous	Palha de arroz, farelo de trigo e torta de amêndoa, coco, mostarda e soja [111].	
Fusarium verticillioides	Óleo de semente de macaúba, óleo de gergilim, óleo de pequi, resíduo da indústria diesel [112].	
Geotrichum candidum NRRLY-552	Licor de milho e azeite de oliva.	[113].
Colletotrichum gloeosporioides	Óleo residual de cozinha, óleo de manteiga e óleo de palmiste [114].	

Mais de 4000 enzimas são conhecidas e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana. Pelo menos 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e destas, 90% são produzidas por microrganismos através de processos fermentativos [115].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CHEN, C; TACHEN LIN, T; SHIEH, Y. Emulsification and antioxidation of biosurfactant extracts from Chinese medicinal herbs fermentation in vitro. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.120, p. 387-395, 2015.
2. GUDIÑA, E. J., RANGARAJAN, V., SEN, R., RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, p. 667-675, 2013.
3. BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. **AMB Express,** 3:68, 2013, Doi.org/10.1186/2191-0855-3-68.
4. SHAFIEI, Z. A.; HAMID. A, A.; FOOLADI. T.; YOUSOFF, W. M. W. Surface Active Components: Review. **Curr. Res. J. Biol. Sci**, 2014, v. 6, n. 2, p. 89-95.
5. HAZRA, C.; KUNDU, D.; GHOSH, P.; JOSHI, S.; DANDIA, N.; CHAUDHARIA, A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using lowcost agro-based raw materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2011 v. 86, p. 185-198, Doi.1002/jctb.2480.
6. LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; JARA, A.M.A.T.; BRASILEIRO, P.P.F.; SARUBBO,L.A. Environmental applications of the biosurfactant produced by Candida sphaerica cultivated in low-cost substrates, Colloids and Surfaces A: **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 27, http://dx.Doi.org/10.1016/j.colsurfa.12.014. 2014.
7. LEE, L. P.; KARBUL, H. M.; CITARTAN, N. GOPINATH, S. C.B.; LAKSHMIPRIYA, T.; TANG, T-H. Lipase-Secreting *Bacillus* Species in an Oil- Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. **Bio Med Research International**, V. 2015 (2015), Article ID 820575, 9 p, Doi.org/10.1155/2015/820575.
8. PANDEY N.; DHAKAR, K.; JAIN, R.; PANDEY, A. Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of *Penicillium.* **My cosphere**, 7(10), 1533–1545, 2016, doi 10.5943/mycosphere/si/3b/5.
9. VEERAPAGU M, NARAYANAN, DR, A. S.; PONMURUGAN K.; JEYA, K. R. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. **Asian J Pharm Clin Res**, Vol 6, Suppl 3, 62-67 013, 2013.

10. COLLA, L, M.; RIZZARD, J.; PINTO, M. H.; REINEHR.;BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V COLLA, L, M.; RIZZARD, J.; PINTO, M. H.; REINEHR.;BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses**. Bioresource Technology**, 101 (2010) 8308–8314, Doi:10.1016/j.biortech.2010.05.086.
11. LONDOÑO-HERNANDEZ, L.; RAMIRES. C. T.; RUIZ, H. A.; ASCACIO, J. A.; AGUILAR-GONZALEZ, M. A.; CRIS Raúl Rodríguez, Cristóbal.; AGUILAR, C. N. *Rhizopus oryzae* – Ancient microbial resource with importance in modern food industry, **International Journal of Food Microbiology**, v .257, p. 110-127, Doi: 10.1016/ j.ijfoodmicro.2017.06.012.
12. CHOE, SE-IN.; GRAVELAT, F. N.; Al ABDALLAH, Q. AL.; LEE, M. J.; GIBBS, B. F.; SHEPPARDA, D. C. Role of *Aspergillus niger acrA* in Arsenic Resistance and Its Use as the. Basis for an Arsenic Biosensor. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 78, n. 11, p. 3855–3863, 2012, Doi: 10.1128/AEM.07771-11.
13. OLIVEIRA, F.; MOREIRA, C.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; and BELO, I. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state Fermentation. **J Sci Food Agric**, v. 96, ed. 10, p. 3586-3589, Doi. 10.1002/jsfa.7544, 2015.
14. SPERB, J. G. C.; COSTA, T. M.; VAZ, D. A.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos*.* **ENGEVISTA**, V. 17, n. 3, p. 385-397, 2015, Doi. Org/10.22409.
15. PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S, C.; SOUZA, E. F.; FREITAS, S. C.; SANTOS, J. O.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger.* **Ciência Rural**,v. 46, n. 4, p. 755-761, 2013, Doi.org/10.1590/0103-8478cr20131673..
16. MUNIZ, I. I.; BRAGA, R. M. Q. L. Gerenciamento de óleos lubrificantes usados ou contaminados e suas embalagens: estudo de caso de uma empresa de logística na Região Norte do Brasil. **Sistemas & Gestão**, v.10, n.a8, 2015 Doi: 10.7177.
17. BEZZA, F. A.; CHIRWA, E, M.N.; Production and Applications of Lipopeptide Biosurfactant for Bioremediation and Oil Recovery by Bacillus subtilis CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 168-178, 2015, doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007.

18. LOPES, P. R. M.; DOMINGUES, R. F.; BIDÓIA, E. D. Descarte de embalagens e quantificação do volume de óleo lubrificante residual no município de Rio Claro-SP. **Holos Environment**, 2008, v.8, n.2, p.166-178, Doi.org/10.14295/holos.v8i2.303.
19. SILVA, N. R. A.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO, L. O.; SILVA, G. K S.; SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SILVA, C. A. A.; e CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **Int. J. Mol. Sci**. 2014, 15(9):15377-95. doi: 10.3390/ijms150915377.
20. SAHARAN, BS.; SAHU, RK.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives.Genetic. **Engineering and Biotechnology Journal**, V. 2011.
21. VIJAYAKUMAR, S SARAVANAN,V. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**,v. 10, p. 181-192, 2015, Doi, 10.3923/jm.2015.181.192.
22. KHOPADE, A.; REN,B.; LIU, XIANG-YANG.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine Streptomyces species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, ed. 1, p. 311-318, 2012, Doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.009.
23. LI, S.; PI, Y.; BAO, M .; ZHANG, C .; ZHAO, D.; LI, Y.; SUN, P.; LU, J. Effect of rhamnolipid biosurfactant on solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, ed. 1, p. 219-225, 2015, Doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.059.
24. PEELE, K. A.; CH. TEJA, V. R.; P. KODALI, V. P. Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. **Biotech**, 2016, 3 Biotech. 2016 Dec; 6(2): 177, Doi: 10.1007/s13205-016-0494-7.
25. BALANA, S. S.; KUMAR, C. G.; JAYALAKSHMI, S. Aneurinifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine Aneurinibacillus aneurinilyticus SBP-11 isolated from Gulf of Mannar: Purification, characterization and its biological evaluation. **Microbiological Research**, 2017, v.194, p. 1-9, Doi:10.1016/j.micres.2016.10.005.
26. IKHWANI, A. Z. N.; NURLAILA, H. S.; FERDINAND,F. D. K.; FACHRIA, R.; HASAN, A. E. Z.; YANI, M.; SETYAWATI, I.; SURYANI. Preliminary study : optimization of pH and salinity for biosurfactant production from Pseudomonas

aeruginosa in diesel fuel and crude oil médium. **Earth and Environmental Science**, e 58 (2017) 012056, 2017, Doi.10.1088/1755-1315/58/1/012056.

27. HENKEL, M.; MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J. B.; SYLDATKA, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v.47, ed.8 p.1207-1219, 2012, Doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.018.
28. EBADIPOUR, N. T.; BAGHERI LOTFABAD, S. YAGHMAEI & R. ROOSTAAZAD. Optimization of Low-Cost Biosurfactant Production From Agricultural Residues through the Response Surface Methodology, **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, ed. 1, p. 30-38, 2015 Doi: 10.1080/10826068.2014.979204.
29. DECESARO, A; BERTICELLI, R; MAGRO, F, G.; COLLA, L, M. Biossurfactantes em Processos de Biorremediação. Revista Ciências Exatas e Naturais, v. 17, n. 1, 2015. Doi: 10.5935/RECEN.2015.01.06
30. BUSTAMANTE, M; DURÁN, N; DIEZ, M.C. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, J. Soil Sci. Plant Nutr. v.12, n. 4, p. 667-687, 2012, doi.org/10.4067/S0718-95162012005000024.
31. ANTUNES, A. A.; ARAUJO, H. W. C.; SILVA, C. A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por Chromobacterium violaceum ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes**. Arq. Inst. Biol**, v.80, n.3, p. 334-341, 2013.
32. BLYTH, W.; SHAHSAVARI, E.; MORRISON, P. D.; BALL, A. S. Biosurfactant from red ash trees enhances the bioremediation of PAH contaminated soil at a former gasworks site. **Journal of Environmental Management**, v. 162, p. 30-36, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.041.
33. KANNAHI, M.; SHERLEY, M. Biosurfactant production by pseudomonas putida and *Aspergillus niger* from oil contaminated site. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**. 2012, Dec., Vol. 3 (4).
34. PEREIRA, J.F.B.; GUDIÑA, E.J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINO,J.A.P.; RODRIGUES, L.R. Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications**. Fuel**, v. 11, p. 259-268, 2013, tps://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.040.

35. GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ELIANA, A, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation**. Bioresource Technology**, 2015, v. 177, p. 87–93. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.069.
36. FAKRUDDIN MD. Biosurfactant: Production and Application*.* Review Article, Biosurfactant: Production and Application. **J Pet Environ Biotechnol**, v. 3, ed. 4, 2012, Doi:10.4172/2157-7463.1000124.
37. ZHANG. L.; PEMBERTON. J, E.; MAIER. R, M. Effect of fatty acid substrate chain length on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 monorhamnolipid yield and congener distribution. **Process Biochemistry**, v. 49, Ed. 6, p. 989- 995, 2014, doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.003.
38. DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOME, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. Quim. Nova, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013, doi.org/10.1590/S0100-40422013000700005.
39. CASTIGLIONI, G. L.; STANESCU, G.; ROCHA, L. A. O.; COSTA. J, A, V. Analytical modeling and numerical optimization of the biosurfactants production in solid-state fermentation by *Aspergillus fumigates.* **Acta Scientiarum Technology**, 2014, v. 36, n. 1, p. 61-67. Doi: 10.3020/actascitechnol.
40. MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production**. AMB Expres**s, 2011, v. 1, p. 5, Doi: 10.1186/2191-0855-1-5.
41. JAIN, R. M.; MODY, K.; JOSHI, N.; MISHRA, A.; JHA, B. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant productionand its application in bioremediation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 52-58, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.030.
42. VANAVIL, B.; PERUMALSAMY, M.; SESHAGIRI, A. R. Biosurfactant Production from Novel Air Isolate NITT6L: Screening, Characterization and Optimization of Media. **J. Microbiol. Biotechnol**, 2013, v. 23, n. 9, p. 1229-1243.
43. VELIOGLU, Z.; UREK, O.R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2015, v. 120, n. 5, 526-531, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.007.
44. SAIKIA, R. R; DEKA, H; GOSWAMI, D; LAHKAR, J; BORAH, S. N; PATOWARY, K; BARUAH, P; DEKA, S. Achieving the Best Yield in Glycolipid Biosurfactant

Preparation by Selecting the Proper Carbon/Nitrogen Ratio. **J Surfact Deterg**, 2014, v. 17, Ed. 3, p. 563-571, doi:10.1007/s11743-013-1520-y.

45. BEZERRA, M. S. ***Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por Pseudomonas aeruginosa AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono***. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012, 123 f.
46. SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A.; Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. ***Int. J. Mol. Sci***, 2016, v. 17, n. 3, doi:10.3390/ijms17030401.
47. PLOCINICZAK-PACWA, M.; PLAZA, G. A.; SEGET-PIOTROWSKA, Z.; and CAMEOTRA, S.S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. Int. **J. Mol. Sci**, 2011, v. 12, n. 1, p. 633-54. doi: 10.3390/ijms12010633.
48. BANAT, IM.; FRANZETTI,A.; BESTETTI,G.; FRACCHIA,L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT,R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, v. 87, n. 2, p. 427-44, doi: 10.1007/s00253-010-2589-0.
49. FRANZETTI, A.; ISABELLA, G.; GIUSEPPINA, B.; THOMAS, S.; IBRAHIM, B. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology,** 2010, v. 112, n. 6. P. 617-627, Doi: 10.1002/ejlt.200900162.
50. FOLEY, P.; POUR, A. K.; BEACH, E. S.; ZIMMERMAN. Derivation and synthesis of renewable surfactants. Chemical Society Reviews, 2012, v. 41, n. 4. P. 1499-518, doi: 10.1039/c1cs15217c.
51. BOGAERT, I. N. A. V.; ZHANG, J.; SOERTAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. Process Biochemistry, 2011, v. 46, n. 4, p. 821-833. Doi:10.1016/j.
52. PAULINO, B. N; PESSÔA, M. G,; MANO, M. C. R,; MOLINA, G.; NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2016, v. 100. N. 24, p. 10265-10293, DOI: 10.1007/s00253-016-7980-z
53. POROB, S.; NAYAK, S.; FERNANDES, A.; PADMANABHAN, P.; PATIL, B. A.; MEENA, R. M.; RAMAIAH. N. PCR screening for the surfactin (sfp) gene in marine Bacillus strains and its molecular characterization from Bacillus tequilensis NIOS11. **Turkish Journal of Biology**, 2013, v. 37, n. 2, p. 212-221, doi: 10.3906/biy-1206-40.

54. SARUBBO, L.A; LUNA, J. M; RUFINO, R. D; BRASILEIRO, P. F. Production of a Low-cost Biosurfactant for Application in the Remediation of Sea water Contaminated with Petroleum Derivates. Chemical engineering transactions, 2016, v. 49, p. 523-528, doi: 10.3303/CET1649088.
55. Grand View Research, 2015**. Biosurfactants market by product (rhamnolipids, sophorolipids, MES, APG, sorbitan esters, sucrose esters) And Segment Forecast To 2020.** <http://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/ biosurfactants-industry> (accessado 08.Agost de 2015).
56. MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S e TEIXEIRA, J. A. Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes**. Centre of Biological Engineering**, 2012, doi: 10.5772/36310.
57. ZOUARI, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Optimization of Bacillus subtilis SPB1 Biosurfactant Production Under Solid-state fermentation Using By-products of a Traditional Olive Mill Factory **Achievements in the Life Sciences**, 2014, v.8, n. 2. p. 162-169, https://doi.org/10.1016/j.als.2015.04.007.
58. RUFINO, R.D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M.C.; SARUBBO, L. A. characterization and properties of the biosurfactant produced by Candida lipolytica UCP 0988. **Electron J Biotechnol**, 2014, v. 17, n. 1, p. 34-38, doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006.
59. SAIMMAI, A.; UDOMILP, S.; MANEERAT, S. Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium Inquilinus limosus KB3 grown on low-cost raw materials**. Ann Microbiol**, 2013, v. 63, n. 4, p. 1327-1339, doi. 10.1007/s13213-012-0592-7.
60. RODRIGUES, E. F. *et al*. Produção de compostos com propriedades emulsificantes por *Aspergillus flavus* utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, 2014, v. 16, n. 1, p. 75–93, doi: 10.1039/c1cs15217c.
61. GHRIBI, D.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; MNIF, I.; KAMMOUN,R.; AYADI,I.; SAADAOUI, I.; MAKTOUF, S.; CHAABOUNI-ELLOUZE, S**.** Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of Bacillus subtilis SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, V. 2012, Article ID 373682, 12 p, doi: 10.1155/2012/373682.
62. JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A.; FOTN, X. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing, **Biochemical Engineering. Journal,** 2016, v. 115, p. 93-100, doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.006.

63. FERREIRA, A. n. **Estudos da produção e caracterização de lipase e biossurfactante por *penicillium* SP**. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015, 108 f.
64. SILVA, T. A.; OLIVEIRA, K.M. descarte de óleos lubrificantes e suas embalagens: estudo de caso dos postos de gasolina e oficinas da cidade de ituiutaba, estado de minas gerais. **Revista Eletrônica de Geografia**, v.3, n.7, p. 101-114, out. 2011. Acesso http://www.observatorium.ig.ufu.br/pdfs/3edicao/n7/7.pdf em: 05 de Jul. 2017.
65. CONAMA - **Relatório do Ministério do Meio Ambiente para o Conselho Nacional do Meio Ambiente**, Óleo Lubrificante Usado ou Contaminado Em atendimento ao Artigo 9º da Resolução CONAMA 362/2005, 2016. Disponivel em: ww.mma.gov.br/port/conama/processos. Acessado em maio de 2017.
66. RAMADASS, K.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Ecological implications of motor oil pollution: Earthworm survival and soil health. **Soil Biology & Biochemistry**, 2015, v.85, p. 72-81. doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.026.
67. ABDULSALAM, S.; OMALE, A.B. Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation Techniques for the Remediation of Used Motor Oil Contaminated Soil Braz. Arch. Biol. Technol, 2009 , v.52 n.3: pp. 747-754, doi.org/10.1590/S1516-89132009000300027.
68. MARTINS, H. M.; CAMPOS, J. C.; GUIMARAES, M. J. O. C.; BASSANI, G. Remoção da fração oleosa de embalagens de lubrificantes automotivos os consumo por drenagem gravitacional. **Eng Sanit Ambient**, 2016, v.21 n.3, p. 561-568, doi: 10.1590/S1413-41522016128063.
69. SCHUELTER, L. M.; FERNANDES, C. W. N.; TAGLIALENHA, S. L. S. Óleos lubrificantes automotivos residuais: um estudo de caso em logística reversa. **Colloquium Exactarum**, 2016, v. 8, n. 2, p.69 –84. Doi: 10.5747/ce.2016.v08.n2.e156.
70. THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. BANAT, I. M. Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, 2007, v. 45, n. 6, p. 686-91, doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02256.
71. FARIA-TAVARES, J. S; MARTIN, P. G; MANGOLIN, C. A; OLIVEIRA-COLLET, S. A; MACHADO, M. F. Genetic relationships among accessions of mandacaru (*Cereus* spp.: Cactaceae) using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). **Biochemical Systematics and Ecology**, 2013, v. 48, p. 12-19, https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.11.013.

72. ABUD, F. H.; PEREIRA, S. M.; Nayara Roberto GONÇALVES, R. N; Diego de Sousa PEREIRA, S. D.; BEZERRA, E. M. A. Germination and morphology of fruits, seeds and plants of Cereus jamacaru. **Journal of Seed Science**, 2013, v.35, n.3, p.310-315, doi.org/10.1590/S2317-15372013000300006.
73. BEZERRA, J.D.P.; SANTOS, M.G.S.; BARBOSA, R.N.; SVEDESE, V.M.; LIMA, D.M.M.; FERNANDES, M.J.S.; GOMES, B.S. PAIVA, L.M.; ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; SAOUZA-MOTTA, C.M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, 2013, v. 60, n. 2, p. 53-63, doi 10.1007/s13199-013-0243-1.
74. OLIVEIRA, F. I. C; BORDALLO, P. N; CASTRO, A. C. R; CORREIA , D. Genetic diversity of spineless Cereus jamacaru accessions using morphological and molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, 2013, v. 12, n.4, p. 4586-94. doi: 10.4238/2013.October.17.1.
75. SILVA, J. G. M.; LIMA, G. F. C. L.; RÊGO, M, M, T. Cactáceas Nativas na Alimentação de Ruminantes. **Rev. Cient. Prod. Anim**, 2013, v.15, n.1, p.53-62, doi.org/10.15528/2176-4158/rcpa.
76. SALES, M. S. L.; MARTINS, L. V.; SOUZA, I.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. P. *Cereus jamacaru* de candolle (cactaceae), o mandacaru do nordeste brasileiro. **Biol. Saúde,** v.20, n.2, p. 135-142, 2014. Acessado em 03 de jun. 2017. Disponível em <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologia. doi: 0.5212/Publ. Biologicas.
77. LIMA, J. L. S. Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidades**.** Petrolina: **EMBRAPA-CPATSA**, 1996, PNE, 44 p.
78. GOMES, V. G. N.; QUIRINO, Z. G. M.; ARAUJO, H. F. P. Frugivory and seed dispersal by birds in Cereus jamacaru DC. ssp. jamacaru (Cactaceae) in the Caatinga of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 1, p. 32-40, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.15312.
79. VATTA, A. F.; KANDU-LELO, C.; ADEMOLA, I.O.; ELOFF, J. N. Direct anthelmintic effects of Cereus jamacaru (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: In vivo studies. **Veterinary Parasitology**, 2011, 180(3-4):279-86, doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.025.
80. FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. S.; SANTANA, R. A.; FELIX, A. C. S.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. O.; FREITAS, J. S.; JUNIOR, G. L. V.; FRANCO, M.; JUNIOR, B. B. N. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera* Lipase from *Penicillium* sp. using *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering**

Communications, 2017, v. 204, Ed. 10, p. 1167-1173, doi: 10.1080q00986445.2017.1347567.

81. SILVA, L. R.; ALVES, R. E. Caracterização físico-química de frutos de “mandacaru”. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**, 2009, v. 7, n. 2, p. 199-205.
82. CAVALCANTE, M. Z. B.; DULTRA, D. F. F.; SILVA, H. L. C.; COTTING, J. C.; SILVA, S. D. P.; FILHO, J. A. S. Potencial ornamental de espécies do Bioma Caatinga. **Comunicata Scientiae**, 2017, v. 8, n. 1, p. 43-58, doi: 10.14295/CS.v 8i1.2649.
83. YAZID, N. A.; BARRENA, R.; KOMILIS,D.; SÀNCHEZ,A. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. **Sustainability**, 2017, 9, 224; doi:10.3390/su9020224.
84. MARTINS, S. MUSSATO, S.I; MARTÍNEZ-AVILA, G; MONTAÑEZ-SAENZ, J; AGUILAR, C.N; TEIXEIRA, J.A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, 2011, v. 29, n. 3, p. 365-373, doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008.
85. RODRÍGUEZ‑ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesq. agropec. bras**, 2011, v.46, n.8, p.912-919, doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800018.
86. MAO, Y; LI, J; CHANG, S; ZHAO, G. The mass transfer of sugar in sweet sorghum stalks for solid-state fermentation process. **Fuel**, 2015, v. 144, n. p. 90-95, doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.023.
87. KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E.; ROCHA, M; OLIVEIRA, M, S; SOUZA-SOARES, A. L.; BADIALE-FURLONG, E. Solid-State Fermentation for the Enrichment and Extractionof Proteins and Antioxidant Compounds in Rice Bran by Rhizopus oryzae. **Braz. Arch. Biol**. Technol, 2012, v. 55 n. 6: pp. 937-942, doi.org/10.1590/S1516-89132012000600018.
88. SCHMIDT C,G.; GONC¸ALVES L,M.; PRIETTO L, HACKBART H,S.; FURLONG E,B (2014) Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chem** v.146, p. 371–377, doi.10.1016/j.foodchem.2013.09.101.
89. LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; R. HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. **Biotech,** 2017, 7: 44. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y.

90. RIQUELME, M. Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip to the Apex. Annu. **Rev. Microbiol**, 2013, v. 67, p. 587-609, doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155652.

91. FRISVAD, J. C.; LARSEN. T. O. Chemodiversity in the genus Aspergillus. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015, v.99, n. 19, p. 7859-7877, DOI: 10.1007/s00253-015-6839-z.

92. HYMERY, N.; VASSEUR, V.; COTON, M.; MOUNIER, J.; JANY, JEAN-LUC.; BBARBIER, G.; COTON, E. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Comprehensive Reviewsin Food Science and Food Safety**, 2014, Vol. 13, n. 4 p. 437-456, doi: 10.1111/1541-4337.12069.

93. SANCHES, M. A. **Utilização de resíduos vegetais para a produção de biossurfactantes por fungos isolados de amostras de solo da região amazônica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Amazonas, 2016. 65 f.

94. SPIER, M. R. ***Produção de enzimas amilolíticas fúngicas A-amilase e amiloglucosidase por fermentação no Estado sólido***. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba 2005, f 178.

95. FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Chemodiversity in the genus Aspergillus. **Appl Microbiol Biotechnol** (2015), v. 99, n. 19, 7859–7877, doi: 10.1007/s00253-015-6839-z .

96. LERIN, L. A.; LOSS, R.A.; REMONATTO, D.; ZENEVICZ, M. C.; BALEN, M.; NETTO, V. O.; NINOW, J. I.; TRENTIN, C. M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. A review on lipase-catalyzed reactions in ultrasound-assisted systems. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2014, v. 37, n. 12, p. 2381-2394, doi: 10.1007/s00449-014-1222-5.

97. TAN, C. H.; SHOW, P. L.; OOI, C. W.; NG, ENG-POH.; LAN, J. CHI-WEI.; LING, T. C. Novel lipase purification methods –a review of the latest developments. **Biotechnology Journal**, 2015, v. 10, n. 1, p. 31-44, doi: 10.1002/biot.201400301.

98. SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTS, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **Biotech** (2016) 6:174 Doi: 10.1007/s13205-016-0485-8.

99. COLLA, L.M.; FICANHA, A. M.M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. **BioMed Research International**, 2015, v. 2015 (2015), Article ID 725959, 9 p. doi.org/10.1155/2015/725959.

100. PANDEY, N.; DHAKAR,K.; JAIN, R.; PANDEY, A. Temperature dependent lipase production from cold and pH tolerant species of Penicillium. **Mycosphere (special issue)**, 2016, v. 7, n. 10, p. doi 10.5943/mycosphere/si/3b/5.

101. SHU, Z.; WU, J.; XUE, L.; LIN, R.; JIANG, Y.; TANG, L.; LI, X.; HUANG, J. Construction of *Aspergillus niger* lipase mutants with oil–water interface independence. **Enzyme and Microbial** Technology, 2011, v. 48, n. 2, p. 129-33, doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.10.011.

102. OLIVEIRA, F.; MOREIRA, C.; SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; BELO, A. V.; BELO, I. Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state Fermentation. **Sci Food Agric**, 2016, v. 96, n. 10, p. 3583-3589, doi 10.1002/jsfa.7544.

103. SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Appl Biochem Biotechnol**, 2012. Doi: 10.1007/s12010-011-9444-3.

104. MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, 2017.

105. RIGO, E.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. LWT - **Food Science and Technology**, 2010. doi: 0.1016/j.lwt.2010.03.002.

106. FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. S.; SANTANA, R. A.; FELIX, A. C. S.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. O.; FREITAS, J. S.; JUNIOR, G. L. V.; FRANCO, M.; JUNIOR, B. B. N. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera* Lipase from *Penicillium* sp. using *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, 2017, v. 204, Ed. 10, p. 1167-1173, doi: 10.1080q00986445.2017.1347567

107. DIAZ, J. C.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSAHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, v. 166. n. 2, p. 486-520, doi: 10.1016/j.enzmictec. 2006.02.005.

108. ANDRADE, G. S. S.; CARVALHO, A. K. F.; CASTRO, H. F. ***Estabilidade operacional da lipase de Mucor circinelloides imobilizada em poliuretano na etanólise do óleo de babaçu em reator de leito fixo***. XX Congresso Brasileiro de

Engenharia Química (COBEQ) 2014. Disponível: http://www.proceedings.blucher.com.br/article. Acessado em: 18 de jul. 2017.

109. KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S. K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, 2012, v. 120, n. p. 300-304. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.018.

110. CORADI, G. V. **Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de biodiesel**. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012. 83 f.

111. UL-HAQ, I.; IDRESS, S.; RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, 2002, v. 37, n. 6, p. 637-641, /doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00252-7.

112. FACCHINI, F, D. A.; VICI, A. C.; PEREIRA, M.G.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. **J Biochem Tech**, 2016, v. 6, n. 3, p. 996-1002.

113. MALDONADO, R. R.; POZZA,E. L.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; COSTA, F. A. A.; FILHO, F. M.; RODRIGUES, M.I. Characterization of Crude and Partially Purified Lipase from *Geotrichum candidum* Obtained with Different Nitrogen Sources. **J Am Oil Chem** Soc, 2016, v. 93, n. 10, p. 1355-1364, doi: 10.1007/s11746-016-2875-9.

114. SANDE, D.; SOUZA, L. T. A.; OLIVEIRA, J. S.; SANTORO, M. M.; LACERDA, I.C. A.; COLEN, G.; TAKAHASHI, J. A. Colletotrichum gloeosporioides lipase: Characterization and use in hydrolysis and esterifications. **African Journal of Microbiology Research**, 2015, v. 9, n. 19, p. 1322-1330, doi. Org/10.5897/AJMR2015.7393.

115. MESSIAS, M. J.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, 2011, v. 32, n. 2, p. 213-234, doi: 10.5433/1679-0375.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSSURFACTANTE E LIPASE POR *Aspergillus niger* atcc 1004 USANDO ÓLEO LUBRIFICANTE RESIDUAL E *Cereus jamacaru* DC

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSSURFACTANTE E LIPASE POR A*spergillus niger* ATCC 1004 USANDO ÓLEO LUBRIFICANTE RESIDUAL E *Cereus jamacaru* DC

Resumo: O interesse por compostos provenientes de microrganismos tem sido consideravelmente crescente nos últimos anos. Com a utilização de substratos de fontes renováveis e reaproveitamento de materiais residuais para a produção da lipase e biossurfactante (BS), a procura por estes produtos têm se intensificado quando comparados aos de origem sintética. Este trabalho teve por objetivo produzir simultaneamente biossurfactante (BS) e lipase por *Aspergillus niger* ATCC 1004 usando óleo lubrificante residual e *Cereus jamacaru* DC como substrato alternativo de baixo custo. Para determinação das melhores condições de produção do BS foi realizado o delineamento Doehlert e a metodologia da superfície de resposta (RSM), avaliando a temperatura e tempo de fermentação. As condições ótimas para a produção do BS foram 1% do óleo lubrificante residual (OLR), 10 g do mandacaru, 5% do extrato de levedura na temperatura de 35ºC por 120 h de FES. O melhor resultado foi observado no ensaio 2 resultando na atividade emulsificante de 11,8 UE. Para o índice de emulsificação (E_{24}) o OLR mostrou-se 100% emulsificado pelo BS. As condições utilizadas para produção da lipase foram as mesmas consideradas ótimas para produção do BS. O valor de K_m *e* V_{max} foram 0,22 mM e 0,84 UA/min^{-1}, respectivamente. A atividade de lípase quando pré-purificada aumentou em um fator de 1,48 UA, a estabilidade foi em 40 ºC por 30 min e o pH considerado ótimo foi 6,0. Os resultados obtidos demonstraram que o óleo lubrificante residual e a *Cereus Jamacaru* DC têm potencial promissor na produção de BS e lipase. Portanto, devido à capacidade de emulsificação do BS, sugere que este composto possa ser útil na aplicação em processos de biorremediação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

Palavras-chave: *Aspergillus niger* ATCC 1004; biossurfactante; lipase; *Cereus jamacaru* dc; óleo lubrificante residual.

3.0. INTRODUÇÃO

Os resíduos oleosos são considerados um dos tipos de resíduos mais perigosos, tanto para o meio ambiente, quanto para a saúde das pessoas. Os derivados do petróleo além dos seus próprios componentes possuem outros elementos adquiridos durante seu uso, tornando o risco ainda maior, pois aumenta sua toxidade [1,2].

Com o impacto ambiental causado devido á grande quantidade desses materiais, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologia aplicável ao tratamento destes resíduos, a fim de promover um ambiente apropriado e fornecer métodos alternativos para reduzir, reutilizar e reciclar tais compostos [3].

O uso variado de resíduos industriais como substratos para produção de biossurfactante (BS) é uma estratégia interessante porque traz benefícios econômicos, ambiental etc [4]. Da mesma forma, as lipase têm sido produzidas por substratos alternativos e entre eles, os resíduos oleosos [5].

Os BS são compostos produzidos por microrganismo que possuem propriedades de reduzir a tensão superficial e interfacial entre sólidos e líquidos [6]. São utilizados no campo da biorremediação, indústrias de processamento de alimentos, saúde, agrícola e cosmética [7, 8]. As lipases também são enzimas sintetizadas por microrganismos e possuem várias aplicações [9] como em alimentos, farmacêutica entre outras [10].

O cultivo da fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica podendo ser definida como um processo no qual os microrganismos crescem em um material sólido na ausência ou em uma quantidade limitada de água [11]. Essa cultura apresenta uma economia no processo devido ao menor espaço para fermentação, o baixo volume de água, e as possibilidades do uso de substratos simples e de baixo custo [12, 13, 14]. A FES é uma das alternativas que permite a utilização de resíduos oleosos para produzir BS e lipase [15, 16, 17, 18].

O custo da produção do BS e da lipase é algumas vezes inviabilizado por causa do custo envolvido do processo da fabricação [19, 20, 21, 22]. Surge então a necessidade de se testar substratos alternativos tais como o farelo do mandacaru. Essa espécie é nativa da caatinga brasileira [23].

Por se tratar de uma espécie característica da Caatinga, na região deste estudo (Sudeste da Bahia) esse vegetal é popular e bastante disponível. Em sua composição estão presentes proteína bruta, material mineral, celulose e hemicelulose [24] podendo tornar um biomassa importante para processos fermentativos, já que serve tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano [25].

Portanto, esta é a primeira vez que *Cereus jamacaru* DC está sendo empregado como suporte alternativo para FES. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial do ”mandacaru” como matriz na fermentação em estado sólido na produção de BS através do fungo *A. niger* e óleo lubrificante residual. E dessa maneira, poder contribuir para realização de estudos posteriores, além de valorizar a espécie nativa da região semi-árida brasileira e reaproveitar o resíduo oleoso.

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e manutenção do inóculo

Para a realização dos experimentos foram utilizadas a cepas dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* ATCC 1004 cedido pela Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro – RJ - Brasil. Os microrganismos foram armazenados em Placas de Pétri com Potato Dextrose Agar, refrigerado em 4°C e repicado a cada 3 meses.

3.1.2. Estudo da influência da fonte de nitrogênio e de carbono no crescimento de Aspergillus niger ATCC 1004

O extrato de levedura, o sulfato de amônio e o nitrato de sódio foram avaliados em diferentes concentrações (3, 5, 7, 9, 11 g/L). Nas diferentes concentrações da fonte de carbono OLR (1, 5, 9%). O isolado foi inoculado com único ponto central em Placas de Petri contendo o meio de cultivo à temperatura de 30 ºC. As colônias foram mensuradas em diâmetro (cm) após 48 h.

3.2.Tratamento do mandacaru e composição químico-bromatológica

O mandacaru foi coletado em Maio de 2015 na cidade de Jequié-Bahia-Brasil. Após a higienização e corte do caule da planta, foi feita a secagem em estufa (SOLAB SL 102, Piracicaba, Brasil) a 65 ºC durante 24 h e moído em moinho de facas tipo Willey (ACB Labour, São Paulo, Brasil) a uma granulometria próxima de 2 mm. Para a análise químico-bromatológica do mandacaru a concentração de nitrogênio total (NT) foi determinado pelo método de Kjeldahl, posteriormente calculou a estimativa de proteína bruta PB dada pela equação (PB = NT × 6,25). A Concentração de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foi descrito pelo método de SOEST (*et al,.* 1991). Concentração de lignina (método do ácido sulfúrico – QUIMIS), celulose, hemicelulose, material mineral e extrato etéreo (AOAC 1995). Concentração de lipídeos totais [29]. Todos os componentes foram calculados com base na matéria seca.

3.2.1. Óleo lubrificante residual (OLR)

O óleo lubrificante foi fornecido por um posto de coleta do resíduo situado na cidade de Jequié Bahia-Brasil.

3.3. Preparo do inóculo

Inoculou-se o *Aspergillus niger* ATCC 1004 em erlenmeyers de 250 ml, contendo 30 mL de meio contendo óleo lubrificante residual 1% e Potato Dextrose Agar. Os frascos foram incubados em uma incubadora de BOD (TE-317, Tecnal, São Paulo, Brasil) por 5 dias 30º C. Posteriormente a cultura esporulada foi suspensa a 0,01% em solução de Tween 80 (v/v) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). A contagem dos esporos foi realizada em câmara de neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (BIOVAL L 1000, São Paulo, Brasil), a concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/grama de meio sólido [15].

3.3.1. Fermentação no estado sólido

A fermentação em estado sólido foi realizada em erlenmeyers de 250 mL, por 120 h mantidos a temperatura de 35 °C. O meio fermentativo foi preparado em ambiente asséptico, constituído por 10 g do mandacaru, 5% de extrato de levedura e 1% de óleo lubrificante residual. A umidade utilizada foi 70% pela adição de água destilada estéril.

3.3.2. Extração do biossurfactante

Utilizou-se água destilada a 90°C na proporção de 1g de soluto para 5 mL de água destilada. a mistura foi agitada num agitador (Solab, SL 222, 104 Piracicaba, Brasil) a 160 rpm e 50 °C durante 30 min [30]. Logo após, a amostra foi mecanicamente pressionada e o líquido extraído foi filtrado à vácuo (Tecnal, TE-0582, Piracicaba, Brasil) e centrifugado (I 206, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 5000 rpm por 5 min.

3.3.3. Determinação da atividade emulsificante

A atividade emulsificante (AE) óleo em água foi determinada utilizando-se 3,5 mL de extrato e 2 mL de óleo lubrificante residual. A mistura foi agitada em agitador vórtex a 700 rpm por 1 min. Após 60 minutos de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado em espectrofotômetro a 610 nm [31]. Todas as análises espectrofotométricas foram feitas em triplicatas. A leitura foi realizada e a subtração da absorbância do branco pelo da amostra, obtendo-se a atividade emulsificante O/A definida pela equação abaixo. O branco foi preparado utilizando água no lugar da amostra.

Sendo

$$AE_{O/A} = (Abs_{amostra} - Abs_{branco}).\ D \qquad \text{Equação 1.}$$

Em que $AE_{O/A}$ é atividade emulsificante óleo em água (UE); Abs = absorbância da suspensão do óleo em água entre a absorbância da amostra e os brancos; D = fator de diluição da amostra em água.

3.4. Índice de emulsificação

O índice da atividade emulsificante foi determinado pelo método descrito por COOPER e GOLDENBERG (1987). O teste consiste em adicionar 6 mL de óleo lubrificante residual à 4 mL da amostra, em um tubo de ensaio com tampa. Após agitação em vortex por 2 minutos, a emulsão formada foi deixada em repouso por 24 h. O índice de emulsão (E_{24}), um valor percentual, correspondente à altura da camada da emulsão que é dividida pela altura do líquido, multiplicado por 100, conforme a equação 3.

$$E_{24}\,(\%) = H_{EM} / H_t \times 100 \qquad \text{Equação 2.}$$

Onde

E_{24} (%) = índice de emulsão por 24 horas; H_{EM} = altura da camada emulsionada
H_t = altura total do líquido

3.5. Análise qualitativa com microplacas

A presença do biossurfactante foi determinada qualitativamente por 100 µL do extrato livre de células e transferida para uma placa de 96 micropoços (K30-5096P, OLEN, São Paulo, Brasil) sobre a um papel milimetrado. Os resultados foram comparados usando água destilada e uma substância sem a presença do biossurfactante [33].

3.6. Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta útil para avaliar a influência de determinadas variáveis. A matriz Doehlert foi tomada como base para avaliar a temperatura e tempo no processo sobre a produção do biossurfactante. Foi gerado gerando um planejamento com 7 ensaios com três repetições no ponto central. Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA), com um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$), utilizando o programa Statistica (versão 7.0) da Stat Soft, módulo Experimental Desing (DOE).

3.7. Extração da lípase

Para a extração da lípase foi adicionado solução tampão fosfato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (50 mM/pH 7,0), na proporção de 1:5 (p/v) e a mistura foi agitada em um agitador (Solab, SL 222, Piracicaba, Brasil) a 200 rpm e 35 °C por 20 min. Em seguida, a amostra foi mecanicamente prensada e o líquido extraído foi filtrado (Tecnal, TE-0582, Piracicaba, Brasil) e centrifugado (I 206, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido para análises posteriores.

3.7.1. Purificação por precipitação com $(NH_4)_2SO_4$

A purificação parcial da lipase foi determinada pela adição do sulfato de amônio em 70% de saturação (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) ao extrato enzimático bruto. Depois de repousar durante 1 h, a mistura foi agitada durante 10 min. Em seguida, o extrato foi centrifugado (I 206, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 5000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspenso com tampão de fosfato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) (50 mM/pH 7,0) na proporção de 1: 3 (p/v) e armazenado a 4 °C.

3.7.2. Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade de lipase foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Winkler e Stukmann (1979) adaptado. A atividade foi determinada através da quantificação de *p*-nitrofenol (*p*-NPP), a partir da curva padrão. Foram preparadas duas soluções A e B, solução A: 60 mg de *p*-NPP (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em 20 mL de álcool iso-propílico (Synth, São Paulo, Brasil), solução B: 4 g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e 0,4 g de goma arábica (Synth, São Paulo, Brasil) em 200 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 7 (Sigma-Aldrich, Paulo, Brasil). Nos ensaios reacionais foi utilizado 1 mL da solução A, 9 mL da solução B e 1 mL do extrato enzimático. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho maria (SL 150/4A, Solab, São Paulo, Brasil) a 40 °C por 10 min. O branco foi submetido ao mesmo procedimento, porém adicionando tampão em vez do extrato enzimático. Logo após foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 1M (Sigma-Aldrich) para interromper a reação. A análise das amostras foi realizada em espectrofotômetro (GEHAKA UV-340G, São Paulo, Brasil) a 410 nm. A atividade enzimática (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação (µmol/min), nas condições de ensaio. A atividade enzimática foi calculada conforme a equação 3.

UA = concentração enzimática/tempo (µmol/min) Equação 3.

Sendo

UA a unidade de atividade enzimática, a concentração é o valor encontrado na curva padrão e o tempo é o tempo de reação em minutos.

3.7.3. Determinação de proteína total e atividade específica

A concentração de proteína foi realizada no extrato enzimático bruto e no extrato parcialmente purificado de acordo com o método proposto por (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade específica foi calculada a partir da divisão da atividade enzimática pelo valor de

proteína total. A atividade específica foi calculada a partir da divisão da atividade enzimática pelo valor de proteína total.

3.7.4. Determinação da termoestabilidade enzimática

A estabilidade térmica da enzima foi determinada nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C e em diferentes tempos de incubação (10, 20, 30 min). Após o aquecimento, foi retirada alíquotas das amostras a cada 10 min de incubação e em seguida foram submetidas às análises de atividade enzimática conforme descrito anteriormente na equação (3).

3.7.5. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para determinação dos parâmetros cinéticos da lipase foram utilizados frações de 0,250 ml de extrato enzimático bruto e p-NPP (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) como substrato em diferentes concentrações (15, 30, 45, 60 e 75 mg) por 20 ml de álcool isopropílico. Os valores de K_m e V_{max} foram calculados utilizando análise de regressão da curva (Lineweaver e Burk, 1934).

3.7.6. Influência de Sais (Cátions metálicos)

O estudo do efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima foi conduzido, através da medida da absorbância λ = 410 nm pela liberação do 4-nitrofenol liberado por meio da hidrólise do P-4-palmitato de nitrofenila (p-NPP) após reação de 0,250 mL da solução A e 4,5 mL de solução B durante 10 min a 40°C contendo cálcio, sódio e potássio nas concentrações de 0,05 0,10, 0,15, 0,20 e 0,30 mol L^{-1}. A porcentagem relativa da inibição para cada inibidor foi calculada usando a equação:.

$$[(A_o-A_1)/A_o] \times 100 \qquad \text{Equação 4.}$$

Onde

A_o é a atividade da enzima (controle)

A_1 é a atividade da enzima na presença do inibidor.

3.8. RESULTADO E DISCUSSÃO

A composição centesimal do farelo do mandacaru utilizado como substrato na FES para produção do BS e lipase está apresentada na Tabela 1, tendo o principal componente a fibra (57,75- 41,41), que possui entre outros componentes, boa concentração de proteína bruta (10,72) e material mineral (14,20). A estrutura desses materiais tem como seus principais componentes: celulose, hemicelulose, lignina, proteínas entre outros, que os caracteriza como materiais extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia, quanto de suporte para o crescimento microbiano [25].

Tabela 1. Análise químico-bromatológica do Cereus jamacaru em porcentagem de matéria seca.

Componentes	Valor (%)
Proteína bruta	10,72
Extrato estéreo	0,92
Material mineral	14,20
FDN	57,75
FDA	41,41
Cinzas	0.00
Lignina	4,10
Celulose	37,30
Hemicelulose	16,34

FDN - fibra em detergente neutro; FDA - Fibra em detergente ácido.

Trabalho realizado com uma planta nativa da caatinga, a palma forrogeira no processo para FES com fugo filamentoso *Penicillium*, demonstrou potencial em produzir BS e lipase. A palma forrogeira apresentou as seguintes características na sua composição proteína bruta (7,61%), celulose (13,38%), hemicelulose (5,02%), lignina (3,37%) [37], a composição química-bromatologica da planta mandacaru ainda é superior. Neste sentido, é viável a utilização do mandacaru, pois é uma planta nativa da região, é abundante, caracteriza matéria prima de baixo custo e potencialidade em produzir BS e lipase através do fungo filamentoso A*spergillus niger*.

Estudo da influência da fonte de nitrogênio e de carbono no crescimento de Aspergillus niger ATCC 1004

Testes preliminares foram realizados para estudar a influência da fonte de nitrogênio e da fonte de carbono no crescimento de *A. niger*. A avaliação do crescimento do fungo ocorreu através da realização do delineamento Doehlert com triplicata no ponto central. Diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, sulfato de amônio e nitrato de sódio) foram avaliadas em diferentes concentrações da fonte de carbono (OLR). O extrato de levedura proporcionou melhor crescimento celular (4 cm de diâmetro) em meio contendo1% de OLR e 5 g/L do extrato de levedura, por esta razão foram considerados adequados para produção de BS e lipase.

Efeito de diferentes fontes de Nitrogênio na produção do biossurfactante

A relação carbono e nitrogênio têm uma grande influência sobre a produção de BS, isso confere ao rendimento do biotensoativo ser absolutamente dependente das fontes de nitrogênio e de carbono no meio de cultura [38]. Além disso, produzir BS a partir substratos oleosos diminui o custo de produção envolvido no processo, bem como a importância da seleção de resíduos adequados com o equilíbrio certo de nutrientes que permite o crescimento celular e acumulação de produto [4]. Devido à composição rica em proteínas necessárias para o crescimento de microrganismos e na produção de bioproduto, a fonte de nitrogênio tem uma função muito significativa na regulação da síntese de BS, assim como na garantia de nutrição ao meio fermentativo [20].

O extrato de levedura é uma fonte de nitrogênio orgânica constituída por vitaminas do complexo B, aminoácidos, peptídeos, vitaminas e carboidratos, possivelmente devido à utilização de alguns destes nutrientes ou o seu conjunto pelo fungo pode ser responsável pelo incremento obtido no melhor crescimento de alguns microrganismos [39]. Esta fonte de nitrogênio é bastante utilizada para a produção de BS por diversos microrganismos, cuja sua concentração varia de acordo com o microrganismo e o meio de produção [40]. O extrato de levedura foi incrementado para melhores condições nutricionais e produção máxima de BS pelo *Aspergillus fumigatus* na concentração de 1,0 g/l [30]. Varios pesquisadores têm estudado o uso

dessa fonte nutricional de nitrogênio para a produção de BS, como pelo cultivo do fungo *Vibrio* sp. [41], e bactéria *Pseudozyma hubeiensis* SY62 [42].

Efeito de diferentes fontes de carbono na produção do biossurfactante

A fonte de carbono é um indutor que influencia na qualidade e quantidade da produção de BS, além de produzir baixo valor econômico [43]. A importância da seleção de resíduos adequados com o equilíbrio certo de nutrientes permite o crescimento celular e acumulação de produto [4]. O uso de óleos residuais é bastante citado na literatura para produção de BS, lipase e outros compostos [44, 45].

O estudo de sua concentração nas aplicações envolvida nos processos é de extrema importância, uma vez que durante seu uso os mesmos passam por uma série complexa de reações podendo alterar a indução de produtividade e até mesmo a inibição no crescimento microbiano. Isolados de *Penicillium* sp, *Aspergillus niger* e *Rhizopus* sp, apresentaram bons resultados de crescimento em meio contendo 1% óleo de soja residual como fonte de carbono [46]. Com 3% do óleo mencionado, produziu-se BS oriundo do fungo *Cunninghamella echinulata* [44]. Enquanto uma concentração maior quando empregou 7,5% óleo de milho pós-fritura e o *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 [47].

O óleo OLR ainda é pouco mencionado na literatura como substrato oleoso envolvido na metabolização de compostos provenientes por microrganismos. Porém, sugere-se que esta é uma escolha relativamente barata e permite atividade de emulsificação satisfatória, visto que o isolado *Corynebacterium kutscheri* produziu BS a partir de 2% OLR [48]. Enquanto em maior concentração, 5% foi produzido por *Bacillus subtilis* CN2 [49].

Planejamento experimental para otimização da produção do biossurfactante

O planejamento realizado foi o Doehlert que oferece várias vantagens como seu simples manuseio na aplicção, número de níveis diferenciados entre as variáveis, permitindo atribuir tanto um número grande ou um pequeno de níveis para

as variáveis selecionadas. Neste estudo a matriz Doehlert foi utilizada a fim de otimizar a produção do BS, em função disso, foram estudados dois fatores independentes (temperatura e tempo) na FES. Para a verificação da confiabilidade do ótimo previsto, o experimento 2 foi efetuado em triplicata. A Tabela 2 mostra o comoprtamento da matriz aplicada neste estudo.

Tabela 2. Matriz Doehler, valores codificados e reais das vaiáveis independentes em função da variável dependente.

Experimentos	X1 Temperatura (ºC)	X2 Tempo (h)	AE (UE) Observado	AE (Predito)
1	(+1) 35	(-1) 72	7,30 ± 0,20	10,44
2*	(+1) **35**	(+1) **120**	**11,80 ± 0,03**	10,48
3*	(+1) **35**	(+1) **120**	**11,10 ± 0,03**	10,48
4*	(+1) **35**	(+1) **120**	**11,70 ± 0,04**	10,48
5	(0) 30	(-0,866) 48	7,00 ± 0,01	6,46
6	(0) 30	(0) 96	11,30 ± 0,01	11,30
7	(0) 30	(+0,866) 144	6,00 ± 0,03	6,53
8	(-1) 25	(-1) 72	10,70 ± 0,03	8,63
9	(-1) 25	(+1) 120	6,60 ± 0,09	8,66

X1 e X2 correspondem às variáveis temperaturas e tempos, AE = Atividade Emulsificante; EU = Unidade Emulsificante.

Análise de variância (ANOVA)

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo empregado os resultados foram tratados à análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95%, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado
Regressão	48,1481	5	9,6296	54,7666	9,01
Resíduo	0,5275	3	0,1758		
Falta de ajuste	0,2408	1	0,2408	1,6802	4,16
Erro puro	0,2867	2	0,1433		
SQ total	48,6756	8			
R^2	0,9892				

SQ = Soma dos Quadrados; GL = Graus de Liberdade; QM = Quadrado Médio; F = Teste de Fisher; R^2 = Coeficiente de Determinação.

Conforme a Tabela 3, a partir do teste F de Fisher, verifica-se que o F calculado (54,76) foi superior ao F tabelado (9,01), para um nível de confiança de

95% o que corresponde a um valor de p<0,05. O modelo não apresentou falta de ajuste, visto que o valor de F calculado (1,68) é inferior ao valor de F tabelado (4,16). O coeficiente de correlação (R^2) 0,989 indica um ajuste adequado dos resultados dos experimentos na resposta em porcentagem na produção do emulsificante. Isso quer dizer que 98,9% da variabilidade dos dados foram explicados pelo modelo.

É possível inferir que a tabela ANOVA evidencia o modelo de regressão quadrático significativo. Um modelo considerado estatisticamente significativo deve ter um valor de F calculado maior do que o tabelado para que possa ser usado para fins preditivos. Por outro lado, o teste F calculado para se verificar a falta de ajuste do modelo deve apresentar um valor menor do que o valor tabelado. A partir do momento que essas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado bom [50].

O gráfico de Pareto foi gerado a partir dos resultados da tabela ANOVA (Tabela 3) e apresentado na Figura 1. Este gráfico permite comparar a importância de cada parâmetro (temperatura e tempo) nas respostas (atividade emulsificante).

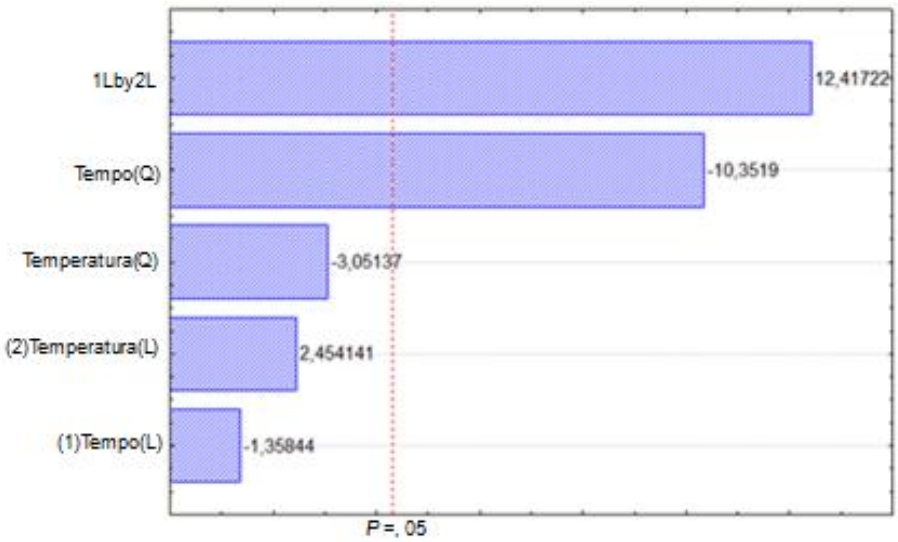


Figura 1. Diagrama de Pareto da Atividade Emulsificante do biossurfactante produzido por *A. niger* em tempo e diferentes temperaturas.

No gráfico de Pareto Figura 1, são apresentados os efeitos estimados em valores absolutos da atividade emulsificante, sendo o comprimento de cada barra proporcional ao valor absoluto de cada efeito estimado e interação, admitindo-se um nível de confiança de 95% e probabilidade da regressão (p < 0,05).

De acordo com o observado, os efeitos de interações tempo/temperatura foi o parâmetro que exerceu maior influência, demonstrando maior potencialidade para

a síntese de BS ao contribuir positivamente. Enquanto o efeito individual tempo demonstrou significativo quando este atinge valor negativamente menor. Neste caso, ao aumentar o tempo haverá um decréscimo no efeito resposta entre o tempo e a temperatura.

A equação 5 mostra os coeficientes obtido do modelo polinomial de segunda ordem dos resultados experimentais da produção do BS.

$$AE = 3{,}88+0{,}86T-0{,}041T^2+0{,}14t-0{,}0020t^2+ 0{,}018Tt+0 \qquad (5)$$

Onde

AE = Atividade Emulsificante durante a produção de BS (UE);

T = Temperatura e t = tempo

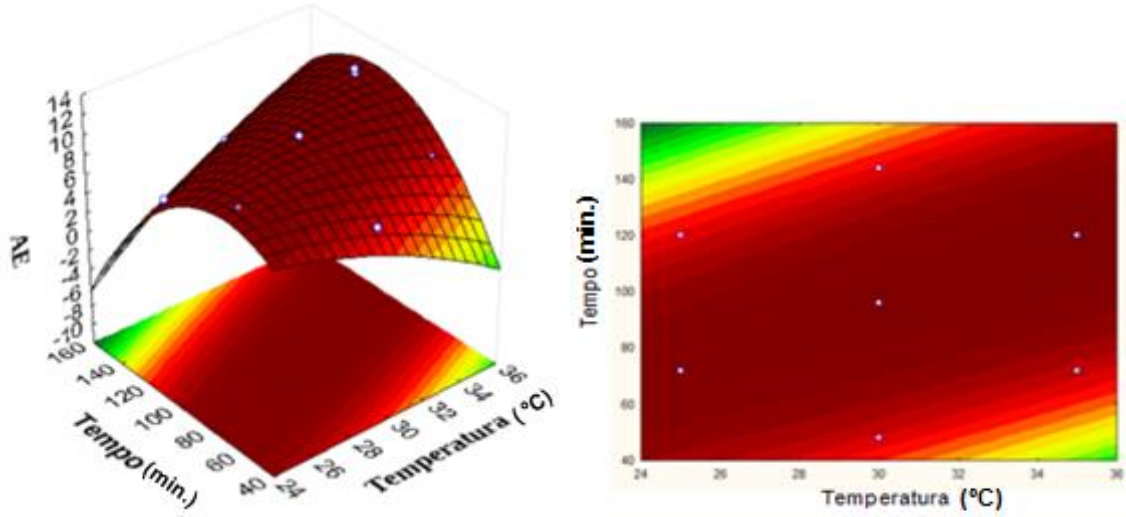
Para avaliar o modelo apresentado, o gráfico dos valores preditos versos valores observados na (Figura 3) também foi utilizado.

Figura 2. Valores observados versos valores preditos para atividade emulsificante do biossurfactante e função da temperatura e do tempo.

Os valores preditos pelo modelo são representados pela reta, enquanto observados são representados pelos pontos. Como se observa, os pontos foram alinhados quando comparado com a linha reta ajustada, portanto, em razão deste comportamento concordante entre estes valores pode-se concluir que neste caso o modelo é preditivo.

Metodologia de superfície de resposta

A superfície de resposta (a) e de contorno (b) do modelo representada pela Figura 3 mostra uma região nas condições mais favoráveis para o máximo da atividade emulsificante.



a. Gráfico de superfície b. gráfico de área

Figuras 3. a e **b.** Atividade emulsificante produzido pelo *Aspergilus niger* em função da temperatura e do tempo.

A atividade emulsificante atingiu uma produção de 11,80 UE, nas condições ótimas de 120 h e temperatura de 35 ºC na FES. Este valor é relativamente superior aos encontrados na literatura em que a produção de BS em fermentação em estado sólido por *Aspergillus fumigatus* apresentou o valor máximo de atividade emulsificante em torno de 6,1 UE [51]. Da mesma forma, quando o óleo diesel foi usado a atividade emulsificante máxima foi de 8,10 UE [30]. Ao utilizar o óleo de soja como fonte de carbono adicional a partir do mesmo microrganismo a atividade emulsificante observada foi em torno de 7,67 UE [52].

Na Tabela 2, Matriz Doehler no experimento 7 verifica-se que após o final do estágio da fermentação houve um decréscimo da atividade emulsificante (6,0 UE) em 144 h de FES. A perda da capacidade do fungo em produzir o BS pode estar relacionada à queda de nutrientes como o nitrogênio, e a queda do crescimento do microrganismo que, no entanto, diminui a produtividade da cultura [53].

É importante salientar que este estudo não incluiu solução salina, ou solução traço para compor o meio fermentativo e fornecer micronutrientes. Mesmo assim, os resultados obtidos foram superiores aos citados acima. Dessa forma, pode-se inferir

que a ausência dessas soluções não comprometeu os resultados dentro das condições estudadas.

Índice de emulsificação

A presença do BS é também evidenciada a partir do índice de emulsificação, uma vez que o BS possui a capacidade de emulsificar compostos oleosos. O índice emulsificação (E_{24}) foi verificado após um período de 24 h. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 4.

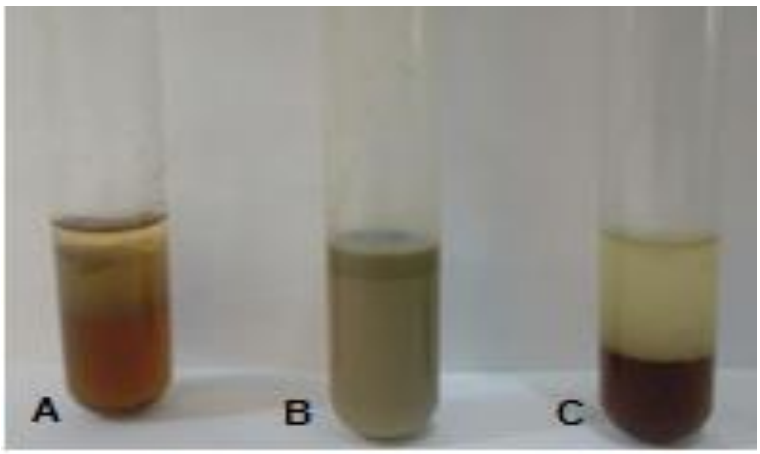


Figura 4. Índice de emulsificação (E24%) do BS obtido a partir de diferentes fontes de carbono. A (G)= gasolina comercial; B (OLR) = óleo lubrificante residual; C (ORF) = óleo residual de fritura.

Este método é bastante utilizado para evidenciar a presença do BS por diversos microrganismos. Neste estudo, o índice de emulsificação foi calculado pela divisão da altura da emulsão pela altura total da mistura, cuja três fontes de carbono (G, OLR e ORF) gasolina, óleo lubrificante residual, óleo residual de fritura, respectivamente foram testadas como ilustrado na Figura 4. De acordo com o observado todos os óleos testados acima foram emulsificados pelo biossurfactante, sendo assim, a (G) formou 33,3% da emulsificação, o OLR 100% e o ORF 61,1%.

Um critério obedecido para ser considerado como bom emulsificante é a capacidade de formar emulsão com hidrocarbonetos e se manter emulsificado acima de 50% por 24 horas ou mais [54]. Contudo, devido à característica do produto formado, com índice de emulsificação em100%, pode-se considerar que o BS produzido é um ótimo produto, podendo ser útil na aplicação em processos de biorremediação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos.

Análise qualitativa com microplacas

Outro método que também pode indicar a presença do BS no meio é o teste da distorção ótica, considerado muito eficiente. O resultado deste teste está apresentado na Figura 5.

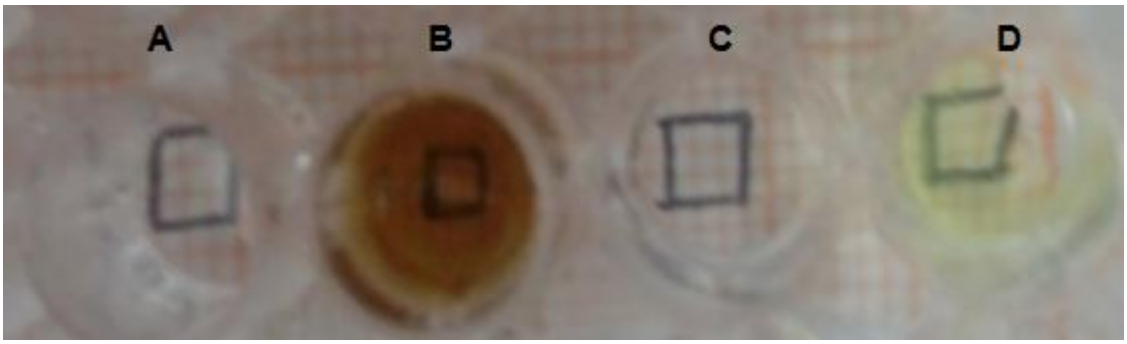


Figura 5. Distorção ótica decorrente à presença do BS na amostra. Da esquerda para a direita. (A) Amostra com indicativo da presença do BS; (B) água destilada; (C) amostra negativa da presença do BS.

O teste consiste na inserção do sobrenadante num poço (A). A presença de surfactante no sobrenadante provoca uma alteração na molhabilidade da superfície ocasionando uma distorção da imagem como mostra a figura acima. Nos poços contendo água (B) e outra substância (C) livres do BS pode ser observado que não houve nenhuma alteração quanto a suas imagens. Isto acontece porque a água num poço hidrofóbico tem uma superfície plana, porém quando o BS está presente esta superficie torna-se côncava [55]. Este teste é considerado sensível, rápido e de fácil execução, podendo ser realizado sem a utilização de equipamentos especializados ou produtos químicos [56].

Estudo e caracterização da lipase

Este estudo teve como objetivo avaliar a produção da lipase nas mesmas condições considerados ótimas para a obtenção do BS, por essa razão não aplicou o planejamento experimental. Para isto, os parâmetros utilizados foram 120 h de FES, temperatura de 35 ºC, 1% da fonte de carbono (OLR) e 5% do extrato de levedura como fonte de nitrogênio através do *Aspegillus niger* ATCC 1004 e do *Cereus jamacaru* DC.

Como pode ser visto, os dados da Tabela 4 apresenta os resultados do extrato enzimático.

Tabela 4. Resultados dos extratos enzimáticos brutos e após pré-purificados.

Extratos Enzimáticos	Atividade Total (UA)	Proteína (mg)	Atividade específica (UA/mg)	Fator de purificação
Bruto	4,42	274,78	0,016	
Purificado	5,90	338,83	0,017	1,48

A purificação ocorreu na presença do sulfato de amônio (70%) por precipitação, cujo aumento no fator de purificação foi de 1,48. Fator igual (1,48) foi encontrado após a avaliação das características de lipase produzida por *penicillium crustosum* na FES [57]. Coerente com os respectivos resultados apresentados, com o fator de purificação de 1,67 e atividade enzimática de 4.29 U/mg produzido pelo *A. niger* [58].

A atividade específica obtida neste estudo foi de 0,017 UA/mg, valor um pouco superior (0,22 UA/mg) foi encontrado quando utilizou resíduos oleosos, a palma forrageira como substrato e o fungo *Penicillium* sp na FES [15]. O resultado baixo da atividade específica nesta pesquisa pode estar relacionado a uma série de fatores como: aos estágios da otimização na produção de lipase, ocasionando a perda da capacidade do fungo em produzir a enzima, ao esgotamento dos recursos de manutenção durante o armazenamento, e ainda, pode haver uma acumulação de certos metabolitos, o que diminui a produtividade da cultura [53]. A solução para o ocorrido, poderia ser uma otimização do processo para a produção da lipase, que provavelmente seu ponto ótimo não coincidiu com o ótimo previsto pelo BS.

Termoestabilidade

A Figura 6 demonstra o comportamento da atividade enzimática nas temperaturas experimentais entre 30 a 60 ºC durante 30 minutos.

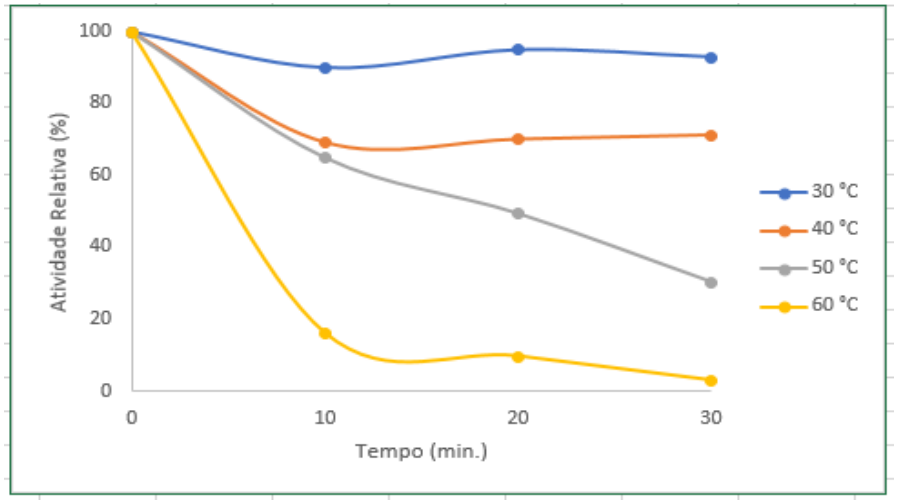


Figura 6. Efeito da temperatura na atividade enzimática

É possível observar que a 30 ºC a lipase manteve sua atividade enzimática em 93% durante 30 minutos. Aos 50 ºC, 65% de sua atividade foi mantida nos 10 primeiros minutos, porém nos minutos finais houve uma queda na atividade de 69,5%. Aos 60 ºC, no decorrer dos 30 minutos houve um declínio na atividade enzimática, tornando-se praticamente inativa (restando apenas 3% de sua atividade) devido à desnaturação sofrida pela mesma. Os resultados obtidos em relação à termoestabilidade de A. niger estão de acordo com a faixa de temperatura encontrada na literatura que relatou a lipase produzida pelo *A. niger* quando alcançou estabilidade máxima a 30 ºC e manteve-se estável até os 40 ºC [59] e na temperatura de 35 ºC [60]. Enquanto em espécies selvagens do *A. niger* analisados, a estabilidade constatada foi aos 40 ºC [61].

Parâmetros cinéticos

No estudo da determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max} da lipase o extrato enzimático foi obtido de acordo com a medição da atividade enzimática em concentração constante e concentrações diferentes do substrato (*p*-NPP). A Figura 7 ilustra a curva de Lineweaver-Burk, a qual determina os parâmetros cinéticos da lipase.

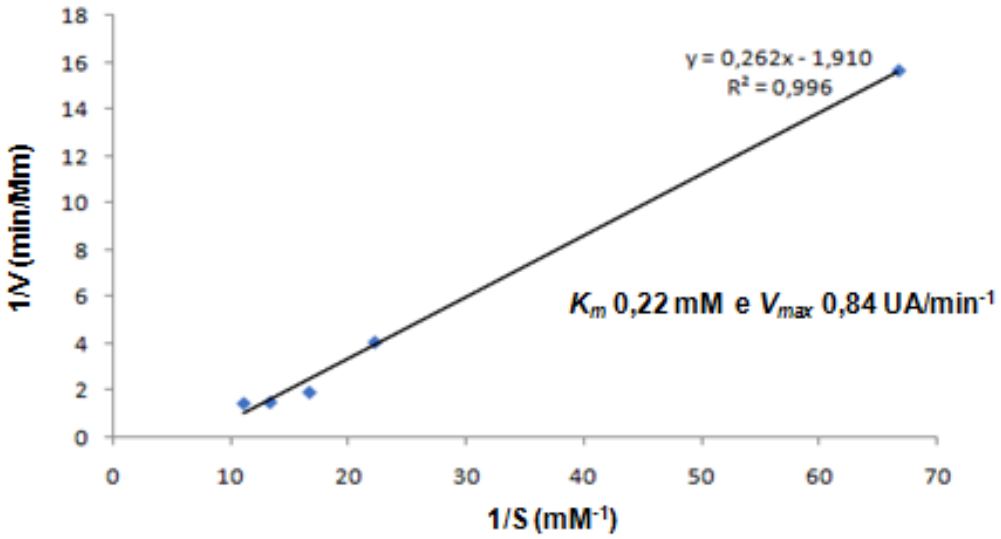


Figura 7. Curva de Lineweaver-Burk para a lípase.

O K_m e V_{max} foram calculados a partir da equação da reta e resultaram em 0,22 mM e 0,84 UA/min^{-1}, respectivamente. Resultados superiores são citados na literatura como os valores de K_m e V_{max} da lipase produzida por *A. niger,* obtendo-se 7,37 mmol/L e 25,91 µmol/(min×mg), respectivamente [62]. Similarmente, o K_m = *3,83 mM e* V_{max} = *32,21* mmol/min/mg [63] e ainda, K_m e V_{max} = 9.93 mM = 2.58 UA/min^{-} ao produzir enzima através do fungo *Penicillium* sp e óleo lubrificante residual [15].

Quanto menor o K_m maior a afinidade da enzima pelo substrato, e ao valor dado de V_{max} que explica que todo o substrato está sendo utilizado pela enzima [64]. Neste sentido, uma reação enzimática envolve a interação do sítio ativo da enzima com seu substrato específico [65].

Influência da temperatura e pH

Alguns parâmetros como temperatura e pH influenciam de forma inibitória e a aumentar a atividade enzimática, por esta razão é relevante definir a caracterização desses parâmetros. Para otimizar esses parâmetros foi utilizado a Matriz Doehlert, onde foi possível verificar o pH e temperatura considerada ótima, como segue a Tabela 5.

Tabela 5. Matriz do planejamento experimental, valores reais e codificados para cada variável independente e atividade enzimática encontrada para os respectivos ensaios.

Experimentos	Temperatura ºC	pH	Atividade (UA) (σ)
01	70 (+1)	5 (1)	0, 044 ± 0, 002
02	70 (+1)	7 (+1)	0, 302 ± 0, 003
03	50 (0)	4 (0,866)	0, 346 ± 0, 004
*04	50 (0)	6 (0)	2, 490 ± 0, 005
*05	50 (0)	6 (0)	2, 685 ± 0, 003
*06	50 (0)	6 (0)	2, 341 ±0, 005
07	50 (0)	8 (+0,866)	2, 094 ± 0, 002
08	30 (-1)	5 (-1)	0, 978 ± 0, 003
09	30 (-1)	7 (+1)	0, 539 ± 0, 004

(*) = Triplicata no ponto central.

O gráfico de Pareto apresentado pela Figura 8, mostra que os efeitos do pH e temperatura foram significativos (p>0,05) quando atingem valores negativos menores, sendo o efeito quadrático de maior significância para a temperatura.

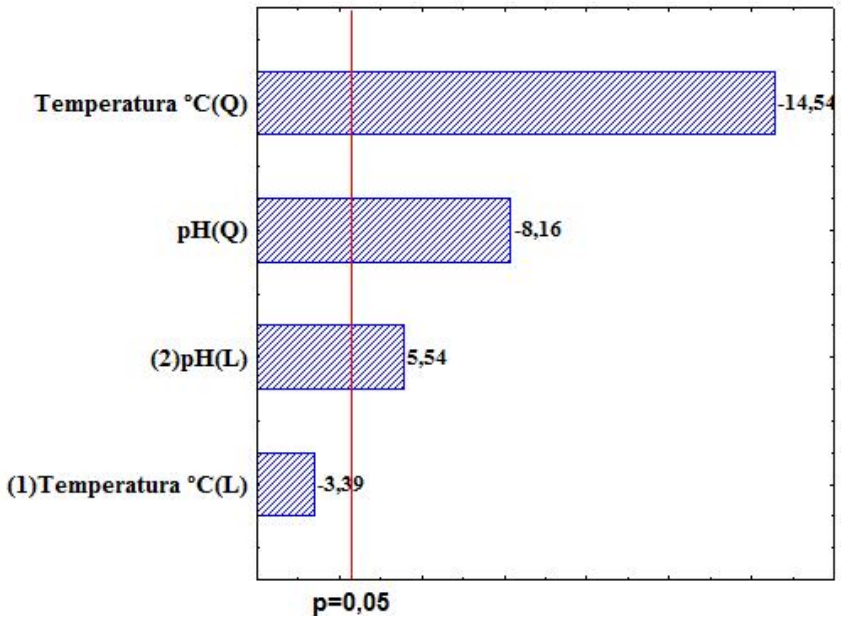


Figura 8. Diagrama de Pareto considerando os efeitos da temperatura e pH na atividade de lipase.

Conforme a Figura 9 a atividade lipolítica máxima ocorreu em pH 6,0 a uma temperatura de 50ºC, podendo ser verificada na Tabela 5 no ponto central , onde os experimentos foram realizados em triplicata.

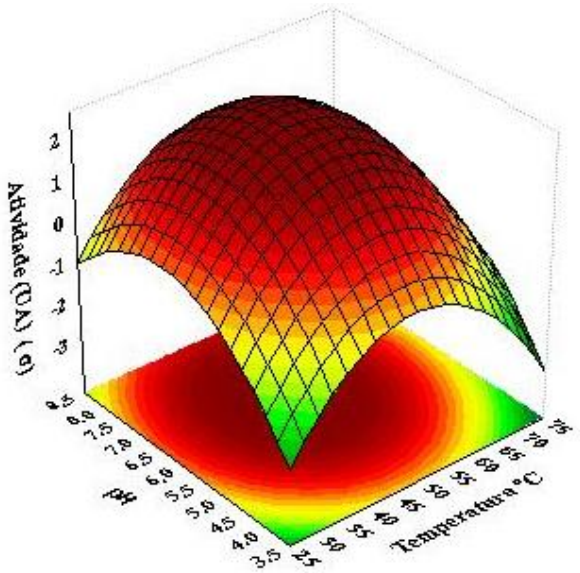


Figura 9. Superfície de resposta da temperatura e pH em função da atividade de lipase.

Lipases com perfis semelhantes envolvendo esses parâmetros (temperatura e pH) foram relatadas na literatura como obtidas na fermentação em estado sólido por espécie de *Aspergillus* também obteve pH 6.0 em temperatura diferente [66]. Os parâmetros ideais para a temperatura e pH foram 45 °C e 5, 5, respectivamente para a enzima quando utilizou o fungo *Fusarium verticillioides* a 1% de óleo de girassol [67]. Comportamentos similares podem ser relatados por diversos descritores [68, 69, 70,] e na temperatura de 60ºC e pH 4,5 pelo A. *fumigato* [71].

Influência de sais

A atividade enzimática pode ser estimulada ou inibida na presença de sais. Os efeitos de alguns sais (sódio, potássio e cálcio) sobre a atividade de lipase é mostrado na Figura 10.

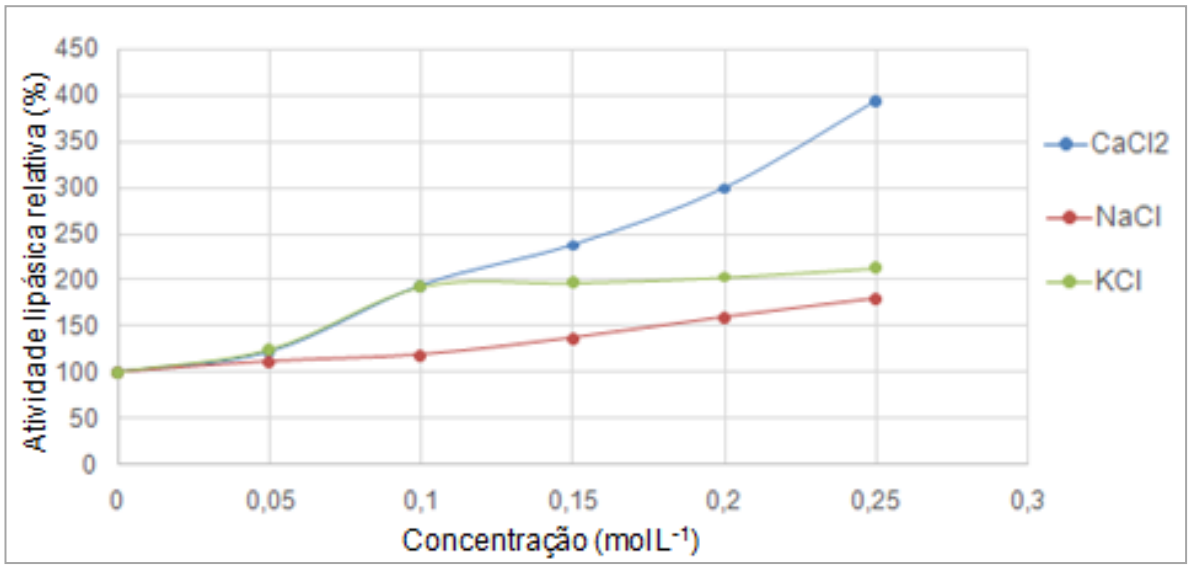


Figura 10 - Efeito dos íons Ca^{2+}, Na^{+} e K na atividade enzimática.

Neste estudo verificou-se que a atividade de lipase foi ativada na presença dos três sais envolvidos (Ca^{2+}, Na^{+} e K), sendo o aumento mais pronunciado para o Ca^{2+}, ativando a enzima em até 4 vezes do seu valor inicial. O Ca^{2+} aumentou a enzima produzida através do *Penicillium chrysogenum* SNP5 [72]. Dos íons analisados, a presença do Ca^{2+} ativou a atividade de lipase acima de 100% entre a linhagem selvagem do A. *niger* e em outra mutante do mesmo fungo [61]. Os autores explicam que o maior efeito estimulante do cálcio é porque os íons Ca^{2+} se ligam à enzima e altera sua conformação, assim, a mesma com conformação modificada apresenta maior estabilidade e atividade. O Na^{+} também tem efeito estimulante neste sentido, por outro lado, o ion K^{+} inibiu a atividade de lipase produzida pelo *Aspergillus niger* como mencionados por [73]. Diferente deste estudo, porém, este íon foi o que menos contribuiu para o aumento da enzima.

3.9. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que é possível produzir biossurfactante e lipase na fermentação em estado sólido proveniente do resíduo de óleo de motor automotivo e farelo da planta mandacaru pelo fungo filamentoso *Aspergillus Níger* ATCC 1004. Os resultados obtidos são relevantes, pois mostraram a eficiência de em um único bioprocesso obter os dois compostos. A alta capacidade do biossurfactante emulsificar o óleo lubrificante residual, sugere possíveis aplicações em processos de

biorremediação em ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Portanto, esta é uma estratégia que consiste na produção da lipase e biossurfactante, tendo em vista o baixo valor agregado ao custo de produção, pelos substratos abundantes, facilmente adquiridos, podendo ser otimizados em estudos posteriores para maior produção.

AGRADECIMENTOS

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDULSALAM, S.; OMALE, A.B. Comparison of Biostimulation and Bioaugmentation Techniques for the Remediation of Used Motor Oil Contaminated Soil **Braz. Arch. Biol. Technol**, 2009, v.52 n.3: pp. 747-754,. doi.org/10.1590/S1516-89132009000300027.
2. GUMEROVA, R.; GALISTSKAYA, O.; SELIVANOVSKAYA. S. Eco-toxicity of oily wastes containing TENORM. **Int. J. Environment and Waste Management,** 2014, v. 14, n. 2,. doi.org/10.1504/IJEWM.2014.064086.
3. SILVA, L. J.; ALVES, F. C.; FRANÇA, F. P. A review of the technological solutions for the treatment of oily sludges from petroleum refineries. **Waste Management & Research**, 2012, v. 30, n. 10, p. 1016-30. doi: 10.1177/0734242X12448517.
4. VELIOGLU, Z.; UREK, O.R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2015, v. 120, n. 5, 526-531, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.007.
5. LEE, L. P.; KARBUL, H. M.; CITARTAN, N. GOPINATH, S. C.B.; LAKSHMIPRIYA, T.; TANG, T-H. Lipase-Secreting *Bacillus* Species in an Oil- Contaminated Habitat: Promising Strains to Alleviate Oil Pollution. **Bio Med Research International**, V. 2015 (2015), Article ID 820575, 9 p, Doi.org/10.1155/2015/820575.
6. LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; JARA, A.M.A.T.; BRASILEIRO, P.P.F.; SARUBBO,L.A. Environmental applications of the biosurfactant produced by Candida sphaerica cultivated in low-cost substrates, Colloids and Surfaces A: **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 27, http://dx.Doi.org/10.1016/j.colsurfa.12.014. 2014.
7. SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A.; Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. ***Int. J. Mol. Sci***, 17(3), 401; doi:10.3390/ijms17030401 2016.
8. BLYTH, W.; SHAHSAVARI, E.; MORRISON, P. D.; BALL, A. S. Biosurfactant from red ash trees enhances the bioremediation of PAH contaminated soil at a former gasworks site. **Journal of Environmental Management**, v. 162, p. 30-36, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.041.
9. SALIHU, A.; ALAM, MD. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues.

Resources, **Conservation and Recycling,** , 2012, 58 36– 44. Doi: 10.1016/j. resconrece, 2011.10.007.

10. GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; HILDA, A. Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. **BioMed Research International**, 2013. Doi: org/10.1155/2013/154549.
11. RAMOS-SÁNCHEZ. L, B.; CUJILEMA-QUITIO, M. C.; JULIAN-RICARDO, M.C.; CORDOVA, J.; FICKERS. P. Fungal Lipase Production by Solid-State Fermentation. **Bioprocessing & Biotechniques**, 2014, v. 5, n. 2, p. doi. org/10.4172/2155-9821.1000203.
12. MARTINZ, V. G.; KALIL,S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. Quim. Nova, 2008, v. 31, n. 8, 1942-1947, doi.org/10.1590/S0100-40422008000800005.
13. KUPSKI, L.; CIPOLATTI, E.; ROCHA, M; OLIVEIRA, M, S; SOUZA-SOARES, A. L.; BADIALE-FURLONG, E. Solid-State Fermentation for the Enrichment and Extractionof Proteins and Antioxidant Compounds in Rice Bran by Rhizopus oryzae. Braz. Arch. Biol. Technol, 2012, v. 55 n. 6: pp. 937-942, doi.org/10.1590/S1516-89132012000600018.
14. SCHMIDT C,G.; GONC¸ALVES L,M.; PRIETTO L, HACKBART H,S.; FURLONG E,B (2014) Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. **Food Chem** v.146, p. 371–377, doi.10.1016/j.foodchem.2013.09.101.
15. FERREIRA, A. N.; RIBEIRO, D. S.; SANTANA, R. A.; FELIX, A. C. S.; ALVAREZ, L. D. G.; LIMA, E. O.; FREITAS, J. S.; JUNIOR, G. L. V.; FRANCO, M.; JUNIOR, B. B. N. Production of lipase from *Penicillium* sp. using waste oils and *Nopalea cochenillifera* Lipase from *Penicillium* sp. using *Nopalea cochenillifera*. **Chemical Engineering Communications**, 2017, v. 204, Ed. 10, p. 1167-1173, doi: 10.1080q00986445.2017.1347567.
16. RIGO, E.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. LWT - **Food Science and Technology,** 2010. Doi: 0.1016/j.lwt.2010.03.002.
17. JIMÉNEZ-PEÑALVER, P.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A.; FOTN, X. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization,

monitoring and effect of mixing, **Biochemical Engineering. Journal,** 2016, v. 115, p. 93-100, doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.006.

18. ALVES, E. P.; TAVARES, L. B. B.; GEM, R. M. M.; SILAVA, D. A. K.; FURLAN, A. A. Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja. Revista Matéria, 2017, v. 22, n. 3, ISSN 1517-7076 artigo e11867, 10.1590/S1517-707620170003.0201.
19. HAZRA, C.; KUNDU, D.; GHOSH, P.; JOSHI, S.; DANDIA, N.; CHAUDHARIA, A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using lowcost agro-based raw materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 86, p. 185-198, 2011, doi, 10.1002/jctb.2480.
20. SHAFIEI, Z. A.; HAMID. A, A.; FOOLADI. T.; YOUSOFF, W. M. W. Surface Active Components: Review. **Curr. Res. J. Biol. Sci**, 2014, v. 6, n. 2, p. 89-95,.
21. RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, vol. 2011, Artigo ID 615803, p. 16 , doi:10.4061/2011/615803.
22. EBRAHIMIPOUR, G.; SADEGHI, H.; ZARINVIARSAGH, M. Statistical Methodologies for the Optimization of Lipase and Biosurfactant by Ochrobactrum intermedium Strain MZV101 in an Identical Medium for Detergent Applications. **Molecules,** 2017, v. n. 9, p. 146022, 1460; doi 10.3390/molecules22091460.
23. SALES, M. S. L.; MARTINS, L. V.; SOUZA, I.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. **P. *Cereus jamacaru* de candolle (cactaceae), o mandacaru do nordeste brasileiro.** Saúde, Ponta Grossa, 2014. v.20, n.2, p. 135-142, Doi: 10.5212/Publ.Biologicas.v.20i2.0006. Publ. UEPG Ci. Biol. *Disponível em* <*http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica*> Acessado em 27 de Ago. 2017.
24. LIMA, J. L. S. Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidades**.** Petrolina: **EMBRAPA-CPATSA**, 1996. Recife: PNE, 44 p,
25. PANDEY, A. Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 2003, v.13, n.2/3, p.81-84, doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3.
26. AOAC. **Official Methods of Analysis**, v. 1, (15th ed.), 771p. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

27. VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: carboydrate metodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, 1991, v.74, n.10, p.3583-3597.
28. AOAC. **Official methods of analysis**, (16th ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
29. INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo, 2005.
30. CASTIGLIONI, G.L.; STANESCU, G.; ROCHA, L.A.O.; COSTA. J, A, V. Analytical modeling and numerical optimization of the biosurfactants production in solid-state fermentation by *Aspergillus fumigates,* **Acta Scientiarum Technology,** 2014, v. 36, n. 1, p. 61-67, doi: 10.4025/actascitechnol.v36i1.17818.
31. JOHNSON, V.; SINGH, M.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D. K.; SISTA, V.; YADAV, N. K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, 1992. v. 14, n. 6, p. 487-490.
32. COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.2, p. 224-229, 1987.
33. CHEN, C., BAKER, S. C., DARTON, R. C. 2007. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of microbiological methods**, 2007, v. n. p. 70, 503-510, doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.006.
34. WINKLER UK, STUCKMANN M. GLYCOGEN, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. **J Bacteriol**, 1979, v. 138, n. 3, p. 663-670.
35. BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem**. 1976, v. 7, n. 72, p. 248-54.
36. LINEWAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzime Dissociation Constants. **Journal of American Chemical Society**, (1934). V.56, n. 3, p. 658-666. http://dx.doi.org/10.1021/ja01318a036.
37. FERREIRA, A. n. **Estudos da produção e caracterização de lipase e biossurfactante por *penicillium* SP**. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015, 108 f.
38. SAIKIA, R. R; DEKA, H; GOSWAMI, D; LAHKAR, J; BORAH, S. N; PATOWARY, K; BARUAH, P; DEKA, S. Achieving the Best Yield in Glycolipid Biosurfactant Preparation by Selecting the Proper Carbon/Nitrogen Ratio. **J**

Surfact Deterg (2014), v. 17, n. 3, p. 563–571, doi.org/10.1007/s11743-013-1520-y.

39. WENZEL, I.M.; MONTEIRO, A.C.; PEREIRA, G.T. Desempenho de *Lecanicillium lecanii* em meios de cultura contendo vitaminas e concentrações de extrato de levedura, 2007. Bragantia vol.66 no.3, doi.org/10.1590/S0006-87052007000300007.
40. SAHARAN, BS.; SAHU, RK.; SHARMA, D. *A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives.*Genetic. **Engineering and Biotechnology Journal,** V. 2011: GEBJ-29.
41. HU, X.; WANG, C e WANG, P. Optimization and characterization of biosurfactant production from marine Vibrio sp. strain 3B-2. **Frontiers in Microbiology, 2015**, v. 23, n. 6, p. 976, doi. 10.3389/fmicb.2015.00976.
42. KONISHI. M.; NAGAHAMA, T.; FUKUOKA. T.; MORITA. T.; IMURA. T.; KITAMOTO. D.; HATADA. Y. Yeast extract stimulates production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by Pseudozyma hubeiensis SY62. **Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011.** v. 111, n. 6, p. 702–705, 2011 DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.02.004.
43. FAKRUDDIN MD. Biosurfactant: Production and Application*.* Review Article, Biosurfactant: Production and Application. **J Pet Environ Biotechnol,** 2012 v. 3, n. 4, p. 124, doi.org/10.4172/2157-7463.1000124.
44. SILVA, N. R. A.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO, L. O.; SILVA, G. K S.; SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SILVA, C. A. A.; e CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising Cunninghamella echinulata Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **Int. J. Mol. Sci***,* 2014, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, doi. 10.3390/ijms150915377.
45. PENHA, E. M.; VIANA, L. A. N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; TERZI, S, C.; SOUZA, E. F.; FREITAS, S. C.; SANTOS, J. O.; SALUM, T. F. C. Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus niger.* **Ciência Rural**,v. 46, n. 4, p. 755-761, 2013, Doi.org/10.1590/0103-8478cr20131673..
46. COSTA, T.M.; SPERB, J.G.C.; RONCHETI, A.L.; BOTELHO, T.K.R.; SELL, T.M.; BERTOLI,S.L.; TAVARES, L.B.B. Avaliação da velocidade específica de crescimento radial de fungos em óleo vegetal residual, 2015. **Revista de estudos ambientais**, v. 17, n. 2, p. 29-40, doi: 10.7867/1983-1801.2015v17n2p29-40.

47. ANTUNES, A. A.; ARAUJO, H. W. C.; SILVA, C. A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por Chromobacterium violaceum ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes**. Arq. Inst. Biol**, 2013, v.80, n.3, p. 334-341, doi.org/10.1590/S1808-16572013000300011.
48. THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. BANAT, I. M. Biosurfactant production by Corynebacterium kutscheri from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. **Letters in Applied Microbiology**, 2007, v. 45. n. 6, p.686-691, doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02256.
49. BEZZA, F. A.; CHIRWA, E, M.N.; Production and Applications of Lipopeptide Biosurfactant for Bioremediation and Oil Recovery by Bacillus subtilis CN2. **Biochemical Engineering Journal**, 2015, v. 101, p. 168-178, doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.007.
50. TEXEIRA, R. D. **PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO CEPAS FÚNGICAS**. Dissertação (Mestrado em Energia, na área de concentração Petróleo, Gás e Energias Renováveis). Universidade Federal do Espírito, Santo, 75 f. 2015.
51. RODRIGUES, E; TOCHETTO, L.; MORAIS, V. Q. DE; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; ***Resumos do 18º Simpósio Nacional de Bioprocessos*****,** Caxias do Sul, Brasil, 2010. https://www.ucs.br/site/ucs/noticias/1304337253. Acesso 17 de Jul. 2016.
52. DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOME, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel*.* **Quim. Nova***,* 2013, v. 36, n. 7, p. 947-954, doi.org/10.1590/S0100-40422013000700005.
53. COLLA, L. M. RIZZARDI, J.; PINTO, M. N, REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, 2010, v. 101, n. 21, p. 8308-14, doi: 10.1016/j.biortech.2010.05.086.
54. WILLUMSEN, P. A & KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers**.** **Biodegradatio**, 1997, v. 7, p. 415-123, doi.org/10.1007/BF00056425.
55. FEMI-OLA, T. O., OLUWOLE, O. A., OLOWOMOFE, T. O. AND YAKUBU, H**.** Isolation and screening of biosurfactant- producing bacteria from soil contaminated

with domestic waste water**. British Journal of Environmental Sciences**, 2015, v.3, n.1, p.58-63.

56. SPERB, J. G. C.; COSTA, T. M.; VAZ, D. A.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos, 2015, v. 17, n. 3, p. 385-397.
57. RIGO, E.; ZENI, J.; STEFFENS, J.; POSSEBOM, G.; LUCCIO, M. ***Avaliação da pré-purificação nas características da lipase de penicillium crustosum com potencial de aplicação para hidrólise de óleos vegetais. 4º Simpósio de Segurança Alimentar***, 2012. www.ufrgs.br/sbctars-eventos/ssa4/wp.../12/Avaliação-da-pré-purificação-nas.pdf. Acesso: 02 de Set. 2017.
58. GHAMARI, M.; ALEMZADEH, I.; YAZDI, T. F.; VOSSOUGHI, M.; VARIDI. Purification and Zymography of Lipase from *Aspergillus niger* PTCC5010. **International Journal of Engineering**, 2015, v. 28, n. 8, p. 1117-1123. doi: 10.5829/idosi.ije.2015.28.08b.02.
59. SUNDAR, W.A. and KUMARESAPILLAI, N. Isolation, Purification and Medium Optimization of Lipase Enzyme Producing Strains of *Aspergillus niger* Isolated from Natural Sources. Int. J. Pharm. Pharm. Sci, 2013, v. 5, n. 2, p. 321-324.
60. PERA, L. M;ROMERO, C. M; BAIGORI, M. D; CASTRO, G.R. Catalytic Properties of Lipase Extracts from Aspergillus niger Lipase Extracts from A. niger, Food Technol. Biotechnol, 2006, v. 44, n. 2, p. 247–252.
61. SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J. Characterization of Lipase from Wild (LPF-5) and Mutant (HN1) Strain of *Aspergillus niger.* **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 2016, v.5, n. 11, p. 681-690, doi.org/10.20546/ijcmas.2016.511.079.
62. SHU, Z.; WU, J.; XUE, L.; LIN, R.; JIANG, Y.; TANG, L.; LI, X.; HUANG, J. Construction of *Aspergillus niger* lipase mutants with oil–water interface independence. **Enzyme and Microbial Technology**, 2011, v. 48, n. 2, p. 129-33, doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.10.011.
63. NAKAJIMA-KAMBE, T.; EDWINOLIVER, N. G.; MAEDA, H.; THIRUNAVUKARASU, K.; GOWTHAMAN, M. K.; MASAKI, K.; MAHALINGAM, S.; KAMINI, N. R. Purification, cloning and expression of an *Aspergillus niger* lipase for degradation of poly(lactic acid) and poly(ε-caprolactone). **Polymer**

Degradation and Stability, 2012, v. 97, n. 2, p. 139-144, doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.11.009.

64. TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da glutationa s-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2004, v. 4,n. 2, p.243-248, doi.org/10.1590/S0101-20612004000200014.
65. DAS, A.; SHIVAKUMAR, S.; BHATTACHARYA, S.; SHAKYA, S.; SWATHI, S.S. 2016. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. **Biotech**, v. 6, n. 2, p. 131, doi: 10.1007/s13205-016-0449-z.
66. COLLA, L.M.; FICANHA, A. M.M.; RIZZARDI, J.; BERTOLIN, T. E.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation. **BioMed Research International**, 2015, v. 2015, artigo ID 725959, 9 p. doi.org/10.1155/2015/725959.
67. FACCHINI, F. D.A.; VICI, A. C.; PEREIRA, M. G.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T.M. Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. **J Biochem Tech**, 2015, v. 6, n. 3, p. 996-1002.
68. DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABU, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain Penicillium sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 256–262, doi:10.1016/j.molcatb.2011.06.013.
69. VAQUERO, M.E.; EUGENIO, L. I.; MARTÍNEZ, M. J.; BARRIUSO, J. A Novel CalB-Type Lipase Discovered by Fungal Genomes Mining. **PLoS ONE**, 2015, v. 10, n. 4, doi:10.1371/journal.pone.0124882.
70. SOOCH, B.S.; KAULDHAR, B. S. Influence of Multiple Bioprocess Parameters on Production of Lipase from *Pseudomonas* sp. BWS-5. **Braz. Arch. Biol. Technol**, 2013, v. 56 n.5, p. 711-721, doi.org/10.1590/S1516-89132013000500002.
71. GOMES, A. F. S.; SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. A (2016). Efeito da temperatura e do substrato na produção de xilanase por *aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo. **Biosci. J**, v. 32, n. 4, p. 915-921, doi. Org/10.14393/BJ-v32n4a2016-32935.

72. KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S. K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, September 2012, p. 300-304, doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.018.
73. ADHAM, N.Z. AND AHMED, E.M. Extracellular lipase of *Aspergillus niger* NRRL3; production, partial purification and properties. **Indian J. Microbiol***,* 2009, v. 49, n. 1, doi. 10.1007/s12088-009-0004-2.