UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALEXSANDRA NASCIMENTO FERREIRA

ESTUDOS DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE E BIOSSURFACTANTE POR *PENICILLIUM* SP.

JEQUIÉ - BA

SETEMBRO / 2015

ALEXSANDRA NASCIMENTO FERREIRA

ESTUDOS DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE E BIOSSURFACTANTE POR *PENICILLIUM* SP.

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 Junior
Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

JEQUIÉ – BA
SETEMBRO / 2015

Ferreira, Alexsandra Nascimento .

F439 Estudos da produção e caracterização de lipase e biossurfactante por penicillium SP/Alexandra Nascimento Ferreira.- Jequié, UESB, 2015.

106 f: il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química,)- Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2015. Orientador: Profº. Drº. Baraquizio B. do Nascimento Júnior.

1. Biossurfactante produzido por um fungo filamentoso - Produção dos biompostos 2. Lipase – Produção por uma espécie de fungo filamentoso 3. Resíduos oleosos – Produção dos biocompostos 4. Fontes de carbono – Prdoução dos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUIMICA-PGQUI

Alexsandra Nascimento Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia com requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **18/09/2015.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior (UFRJ, Rio de Janeiro, 2008)
(orientador)

Prof. Dr. Marcelo Franco (UFRJ, Rio de Janeiro, 2008)

Julieta Rangel de Oliveira

Profa. Dra. Julieta Rangel de Oliveira (Instituto de Química de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2012)

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior (UEFS, Feira de Santana/BA, 2014)

A Deus meu Senhor e salvador.

A meu avô Bernardino (in memorian).

A minha mãe Tereza

AGRADECIMENTOS

A Deus que me capacitou e conduziu para realizar mais esta etapa.

A minha mãe Tereza e meu avô Bernardino (*in memorian*) pelo amor, apoio e incentivo durante essa caminhada.

A meu namorado Alessandro pelo apoio e companheirismo.

Ao professor Baraquizio pela orientação, oportunidade, confiança, incentivo e paciência durante a realização desse trabalho.

Ao professor Marcelo Franco pela co-orientação e pela participação significativa na realização desse trabalho.

Aos professores Janaína Freitas, Gildomar Valasques, Paulo Bonomo, Carlos Bernard e as amigas Tamires Carvalho e Graziela Marques por contribuírem com o conhecimento científico.

Aos professores que permitiram a utilização dos laboratórios que coordenam: Katia Iro, Rafael Fontam e Fábio Welliton (UESB - Itapetinga); Gildomar Valasques (UESB - Jequié), Denise Freitas e Antônio C. Machado (UFRJ) e Marcelo Franco (UESC).

A Dhiéssica Ribeiro por sua amizade, companhia, dedicação, ajuda e disponibilização de tempo na realização das análises.

Aos companheiros e amigos de laboratório Tatielle, Samila, Antônio, Eliane, Romário, Érica, Daniel, Deja, Lívia, Nátilla, Gleydison, George, Sabrina, Juliana e Adriana por todos os momentos de alegria e resenhas proporcionados e por ajudarem na realização das análises.

Aos meus colegas e amigos Thiago José e Clissiane pela companhia e amizade.

Aos professores de pós-graduação pelo conhecimento compartilhado.

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

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite.

E a todos que não tiveram seus nomes citados, mas contribuíram com a realização desse trabalho.

Tudo quanto vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque no além, para onde tu vais, não há obra, nem projetos, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.

Eclesiastes 9:10

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. 1. Representação esquemática de um surfactante. 7
Figura 1. 2. Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade do composto orgânico em função da concentração de surfactante. 8
Figura 1. 3. Estrutura de ramnolipídio. 10
Figura 1. 4. Estrutura de trealolipídio. 11
Figura 1. 5. Estrutura de soforolipídio, forma ácido. 12
Figura 1. 6. Estrutura de surfactina. 12
Figura 1. 7. *Nopalea Cochenillifera (L.) Lyons - Cactaceae* [75]. 20
Figura 1. 8. *Penicillium* [92]. 23
Figura 1. 9. Fermentação em estado sólido. 24
Figura 1. 10. Reação da hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipases [101]. 28
Figura 1. 11. Reações catalisadas por lipases [129]. 29
Figura 1. 12. Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase [134]. 30
Figura 1. 13. Mecanismo da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por lipases e esterases. A tríade catalítica e a água são mostradas em preto, os resíduos do buraco do oxiânion em azul e o substrato em vermelho [135, 136]. 32

Capítulo 2

Figura 2. 1. Placas contendo meio de cultura, fontes de carbono estudadas (Glicerina - G, Óleo de Fritura - OF, Óleo de Soja Puro - OSP, Hexano- H, Tolueno - T, Lubrificante Residual – LR) e os micro-organismos (*Penicillium e Acytostelium*). 56

Capítulo 3

Figura 3. 1. Diagrama de pareto com os valores dos efeitos padronizados (t calculado) para o modelo e o valor tabelado. 71
Figura 3. 2. Superfície de resposta e gráfico de contorno da atividade específica em função do tipo de indutor e tempo de fermentação. 72
Figura 3. 3. Termoestabilidade da lipase de *Penicillium*. 74
Figura 3. 4. Curva de Lineweaver-Burk para a lipase de *Penicillium.* 74

Capítulo 4

Figura 4. 1. Diagrama de pareto com os valores dos efeitos padronizados (t calculado) para o modelo e o valor tabelado.....88

Figura 4. 2. Superfícies de resposta e gráficos de contorno da AE em função de: a, b) fonte de carbono e tempo; c, d) fonte de carbono e temperatura; e, f) tempo e temperatura.....89

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. 1. Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes [46]. 15

Capítulo 2

Tabela 2. 1. Valores do pH antes do inóculo, médias do pH e do diâmetro das colonias após o crescimento de cada espécie para cada meio de cultura com suas respectivas fontes de carbono.....56

Tabela 2. 2. Teste de Tukey a 5% de probabilidade. 57

Capítulo 3

Tabela 3. 1. Variáveis independentes e níveis com valores codificados e reais. 68

Tabela 3. 2. Matriz do planejamento experimental, valores codificados e reais para cada variável independente e níveis, resposta encontrada para cada ensaio. 69

Tabela 3. 3. ANOVA para os dados de atividade enzimática.....70

Tabela 3. 4. Pré-purificação da lipase de *Penicillium*.....73

Capítulo 4

Tabela 4. 1. Variáveis independentes e níveis com valores codificados e reais. 84

Tabela 4. 2. Composição químico-bromatológica da palma forrageira. 85

Tabela 4. 3. Matriz do planejamento experimental, valores codificados e reais para as variáveis independentes e níveis, resposta encontrada para cada ensaio. 86

Tabela 4. 4. ANOVA para os dados de atividade emulsificante. 87

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABNT:	Associação brasileira de normas técnicas
ANOVA:	Análise de variância
ANP:	Agência nacional do petróleo
aw:	Atividade de água
BSA:	Albumina
CMC:	Concentração micelar crítica
DBB:	Delineamento de box e behnken
DBO:	Demanda bioquímica de oxigênio
FC:	Fonte de carbono
FDA:	Fibra em detergente ácido
FDN:	Fibra em detergente neutro
FES:	Fermentação em estado sólido
G:	Glicerina
H:	Hexano
LR:	Lubrificante residual
MEOR:	Recuperação melhorada de petróleo
Ms:	Matéria seca
MSR:	Metodologia de superfície de resposta
NT:	Nitrogênio total
OF:	Óleo de fritura
OLR:	Óleo lubrificante residual
OLUC:	Óleo lubrificante usado ou contaminado
OSP:	Óleo de soja puro
PB:	Proteína bruta
PDA:	Potato Dextrose Agar
PET:	Poli(tereftalato de etileno)
SO:	Sem óleo
p-NP:	*p*-nitrofenol
p-NPP:	*p*-nitrofenil palmitato
T:	Tolueno

Estudos da produção e caracterização de lipase e biossurfactante por *Penicillium*.

Autora: Alexsandra Nascimento Ferreira

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

RESUMO: A produção de biossurfactante e lipase microbiana só é vantajosa se o custo do bioprocesso for reduzido. Uma alternativa é aplicação de resíduos como indutores e substratos viáveis na fermentação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade de uma espécie de fungo filamentoso em produzir biossurfactante e lipase a partir de insumos de baixo custo e alta disponibilidade através da fermentação em estado sólido (FES). Neste trabalho foi avaliado o crescimento de espécies fúngicas em seis fontes de carbono (FC), (glicerina, óleo de fritura - OF, óleo de soja puro, hexano, tolueno e lubrificante residual - LR) para aplicar na produção dos biocompostos. As variáveis consideradas foram: crescimento dos fungos e variação do pH do meio de cultivo. Foram avaliados os componentes químico-bromatológicos da palma forrageira, para aplicá-la como substrato na FES. Para otimizar a produção de biossurfactante por *Penicillium*, foi aplicado o Delineamento de Box-Behnken e metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Foi avaliada a influência das variáveis: temperatura, tempo e quantidade de FC. A variável resposta foi a Atividade Emulsificante óleo/água (O/A). Para otimizar a produção de lipase por *Penicillium* foi aplicado o Delineamento Doehlert e MSR. Foi avaliada a influência das variáveis: tipo de indutor e tempo; a variável resposta foi a atividade específica da lipase. A lipase foi parcialmente purificada, foi calculado as constantes cinéticas (K_m e V_{max}) e foi submetida a tratamento térmico. As FC selecionadas foram óleo LR e OF. As condições ótimas para a produção do biossurfactante foram: 0,54 dias; 2,11 mL de FC e 31,70 ºC. A atividade emulsificante foi 15,57 UE. As condições ótimas para a lipase foram: 96h e óleo LR como indutor. A atividade específica foi 0,22 U/mg. O fator da purificação foi 5,88. A lipase foi mais estável a 60 °C por 30 min e 70 °C por 10 min. Os valores de K_m e V_{max} foram 9,93 mM e 2,51 U/min. O óleo LR e a palma forrageira demonstraram ser matéria prima viáveis, podendo ser utilizadas como alternativa para reduzir o custo da produção de biossurfactante e lipase a partir do *Penicillium,* utilizando a FES.

Palavras-chave: fonte de carbono, resíduos oleosos, *Penicillium*, biossurfactante, lipase.

Studies of production and characterization of lipase and biosurfactant from *Penicillium*.

Author: Alexsandra Nascimento Ferreira

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

Co-Advisor: Prof. Dr. Marcelo Franco

ABSTRACT: Biosurfactant and microbial lipase production is only advantageous if the cost of bioprocess is reduced. One way is the application of residues as inductor together with viable substrates in fermentation process. The aim of this study was to assess the potential of a species of filamentous fungus to produce biosurfactant and lipase from low-cost and easily availableraw materials, using solid state fermentation (SSF). Six carbon sources (CS) (glycerine, frying oil - FO, pure soybean oil, hexane, toluene, residual lubricant - RL), were taken as starting materials to check fungi growth in the prospective production of biocompounds. The variables considered here were: fungi growth and change in the pH of the culture medium. Were evaluated the chemo-bromatological components of Palma Forrageira, as substrate for SSF. To improve the biosurfactant production by *Penicillium*, it was used the Design of Box-Behnken and Response Surface Methodology (RSM). There was evaluated the influence of variables such as temperature, time and amount of CS; the dependent variable was the Emulsifier Activity oil/water (O/W). To optimize the production of the lipase by *Penicillium* there was used the Design Doehlert and RSM. The influence of the variables such as - inductor type and time, the response variable was the Specific Lipase Activity. It was calculated the kinetic constants (K_m and V_{max}) and assessed the thermostability. The selected CS were the residual lubricating oil (RL) and spent frying oil (FO). The optimal conditions for the production of the biosurfactant were: 0.54 days; 2.11 mL of SC and 31.70 °C. The emulsifying activity was 15.57 UE. The optimal conditions for lipase were: 96h and RL oil as inductor. The specific activity was 0.22 U/mg. The pre-purification factor was 5.88. Lipase was stable at 60 °C for 30 min and 70 °C for 10 min. The K_m and V_{max} values were 9.93 mM and 2.51 U/min. The RL oil and Palma Forrageira showed up to be advantageous raw materials as alternative to reduce the cost of production of a biosurfactant and lipase from *Penicillium* using the SSF.

Keywords: Carbon source, oily residues, *Penicillium*, Biosurfactant, Lipase.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1
1.1 INTRODUÇÃO 1
1.2 OBJETIVOS 6
1.2.1 Objetivo Geral 6
1.2.2 Objetivos Específicos 6
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
1.3.1 Surfactantes 7
1.3.2 Biossurfactantes 9
1.3.3 Óleo lubrificante automotivo residual 16
1.3.4 Óleo de fritura 17
1.3.5 Palma Forrageira (*Nopalea cochenillifera (L.) Lyons - Cactus)* 19
1.3.6 *Penicillium* sp. 21
1.3.7 Fermentação em Estado Sólido 23
1.3.8 Lipase 28
1.3.9 Otimização experimental 33
REFERÊNCIAS 35
CAPÍTULO 2 51
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS *PENICILLIUM* SP. E *ACYTOSTELIUM* SP. EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO 51
CAPÍTULO 3 63
PRODUÇÃO E CARACTERISAÇÃO DE LIPASE POR *PENICILIUM* SP. UTILIZANDO FES 63
CAPÍTULO 4 79
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PENICILIUM* SP. EM BIOPROCESSO SÓLIDO UTILIZANDO ÓLEO LUBRIFICANTE RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO 79

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de surfactante ultrapassa 3 milhões de toneladas por ano, a maioria desses surfactantes são quimicamente derivados do petróleo e nos países industrializados o consumo desses compostos é na ordem de 70 a 75% [1].

Os surfactantes são utilizados em recuperação terciária de óleo de reservatórios e em tratamentos de ambientes contaminados por derrames de petróleo. No entanto, esse processo pode ser tóxico ao ecossistema, pois surfactantes sintéticos não são biodegradáveis. A ingestão acidental de pequenas quantidades de surfactantes, presentes em produtos de uso pessoal como cremes dentais e cosméticos, com uso frequente pode causar absorção. Com isso, surfactantes usados para fins comerciais estão sendo substituídos gradativamente em função do possível efeito tóxico em seres humanos [2]. Além disso, há uma necessidade de substituição de moléculas não biodegradáveis, poluentes a natureza, por moléculas biodegradáveis mais compatíveis com o meio ambiente.

Com o custo do petróleo e a possibilidade do seu esgotamento, há também a busca por tecnologias alternativas que possibilitem a produção comercial de agentes tensoativos biodegradáveis e de baixo custo [2]. Uma alternativa é a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, obtidos por via microbiana com matéria prima renovável.

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana com propriedades surfactantes (tensoativas), os quais são subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras [3, 4].

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, tais como: biodegrabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução da tensão superficial, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH e força iônica, poder de produção a partir de substratos renováveis, solubilidade em água, capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas [5, 4].

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais tais como: emulsificação, separação, umedecimento,

solubilização, de-mulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em diversas áreas da agricultura, construção, nas indústrias alimentícias, de bebidas, de papel, de metal, têxtil, farmacêuticas, de cosméticos e petrolífera [5, 6, 7, 8].

Além de outras aplicações potenciais como: limpeza de locais marítimos e terrestres contaminados por derramamento de petróleo, remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos e córregos contaminados, assim como um aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios, além da biorremediação e recuperação terciária do petróleo [6, 9, 10].

Porém, ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos, principalmente devido ao seu alto custo [5,4]. Uma possível solução para este obstáculo seria o uso de matérias-primas de baixo custo [11], por exemplo resíduos oleosos, além disso, o desenvolvimento de bioprocessos eficientes e otimizados [12].

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, o restante é queimado nos motores [13, 14].

Anualmente no Brasil o consumo de óleo lubrificante é aproximadamente 900.000 m^3. Esse consumo produz entorno de 250 a 300.000 m^3 de resíduo, mais da metade desse lixo é descartado na natureza ou queimado, sem um tratamento prévio [13,14].

O número desses resíduos lançados no ambiente é preocupante, devido às propriedades dos óleos lubrificantes e os danos que podem causar. Os hidrocarbonetos poliaromáticos estão entre os componentes desses óleos, esses compostos foram identificados como carcinogênicos pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (1983) [15, 16]. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), em sua NBR n.º 10.004/2004 classificou-os como resíduo perigoso por apresentar dentre outras características, a toxicidade [17,18].

São considerados de alto potencial contaminante, quando jogados nos solos, pois podem comprometer as atividades agrícolas e contaminar as águas subterrâneas [19, 18]. Apenas um litro desta substância é capaz de esgotar o

oxigênio de um milhão de litros de água [20, 14]. Além disso, a queima indiscriminada do óleo lubrificante usado, sem tratamento prévio, gera significativas emissões de óxidos metálicos, além de outros gases tóxicos, como as dioxinas e óxidos de enxofre [20, 16].

Os óleos vegetais usados em fritura são também exemplos de resíduos que geram riscos ambientais, atingindo níveis alarmantes. A maior parte desses óleos vegetais usados nas grandes indústrias alimentícias acaba sendo descartado na rede de esgoto ou diretamente no solo [21, 22].

Mundialmente é produzido de 2,5 a 3 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, aproximadamente 75% dessa produção são derivadas de plantas [23]. Muitos óleos e gorduras são utilizados na indústria de alimentos gerando grande quantidade de resíduos [24].

Na produção nacional do ano de 2008, 6 milhões de toneladas são referentes aos óleos vegetais, um dos mais importantes derivados das plantas. Dois terços desta produção são utilizados em produtos alimentícios, sobretudo fritura de alimentos [25].

Da mesma forma acontece com o descarte doméstico, no ralo da pia da cozinha, provocando a incrustação nas paredes da tubulação e a consequente obstrução das redes, causando sérios prejuízos. Este óleo descartado acaba chegando aos rios e até mesmo ao oceano, através das tubulações [26, 27].

Óleos vegetais são poucos solúveis em água, isso complica sua degradação nas unidades de tratamentos de despejos por processos biológicos e, causam problemas no tratamento da água, em mananciais utilizados para abastecimento público [28, 29].

A disposição dos resíduos de óleos de fritura é um problema crescente, que desperta o interesse da utilização deles para transformação microbiana [24]. Após o aquecimento dos óleos, são gerados inúmeros compostos de degradação, que tornam os óleos excelentes fontes de carbono para crescimento microbiano e produção de biossurfactantes [30, 31] entre outros biocompostos.

Além dos resíduos oleosos, outra alternativa para redução de custo dos processos fermentativos em meio sólido é a utilização de substratos alternativos

como por exemplo espécies vegetais abundantes na caatinga; destacando-se assim a Palma forrageira (*Nopalea cochenillifera Cactus)*.

A área de plantação de palma forrageira na região do Nordeste brasileiro fica em torno de 550.000 ha, destacando-se Pernambuco e Alagoas, estados com a maior área de cultivo [32]. A palma é uma das plantas mais adaptadas às condições ecológicas das zonas áridas e semiáridas do mundo, devido ao seu mecanismo fisiológico. Por isso, se adaptou com facilidade ao semiárido Nordestino [33, 34]. O grande motivo é seu baixo conteúdo de matéria seca, quando comparada à maioria das forrageiras, e elevada umidade [35, 36].

A palma forrageira é rica em minerais como cálcio, magnésio, sódio, potássio; em vitaminas A, C e do complexo B [37, 38]; em carboidratos não fibrosos e alto teor de cinzas; embora possua baixos teores de proteína bruta e fibra em detergente neutro [39, 40]. Com isso, pode ser usada como substrato de bioprocessos, pois é um vegetal que apresenta características favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) [32].

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é um processo que ocorre em baixa quantidade ou na ausência de água livre entre as partículas. Utiliza-se um material natural ou sintético como substrato sólido, ou apenas como suporte inerte embebido em nutrientes [41, 42, 43]. Os materiais naturais usados como substratos são: substratos sólidos provenientes de grãos de cereais, outros vegetais e resíduos agroindustriais, com ou sem suplementação de nutrientes [44].

Os fungos são apresentados como os micro-organismos mais promissores na FES [45, 46]. Pois possuem capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água. Produz enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido, favorecendo assim o seu uso em FES [47, 48].

A aplicação comercial dos processos de FES pode ser: aplicações socioeconômicas, tais como; compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustriais e aplicações lucrativas economicamente; como produção de enzimas, biossurfactantes, ácidos orgânicos e alimentos fermentativos entre outros produtos [44, 49].

Pesquisas com fermentação em estado sólido têm apresentado maiores produções de lipases, quando comparada com a fermentação submersa; esta vantagem é atribuída à alta taxa de crescimento da biomassa e à baixa atividade proteolítica [50, 51].

Os fungos são os preferidos como produtores industriais de lipases porque suas enzimas normalmente são extracelulares, o que facilita a extração do meio fermentado [50].

As lipases provenientes de micro-organismos são valiosas para a aplicação biotecnológica [52, 53]. Em segmentos como em indústrias de alimentos [54], de detergentes [53], na biotransformação de óleos e gorduras [55], obtenção de fármacos [56], tratamento biológico de águas residuárias [57], aceleração da biodegradação de polímeros [58].

Neste sentido, esse trabalho de pesquisa visa avaliar a produção de biossurfactantes e lipase utilizando a fermentação em meio sólido a partir de resíduos industriais e insumos de baixo custo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencialidade do fungo *Penicillium* sp. em produzir biossurfactante e lipase a partir de insumos de baixo custo e alta disponibilidade através da fermentação em estado sólido (FES).

1.2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o crescimento do fungo filamentoso *Penicicillium* sp. em diferentes fontes de carbono, dentre elas resíduos oleosos como óleo lubrificante residual e óleo de fritura.

Estudar o emprego de resíduos oleosos, óleo lubrificante residual e óleo de fritura como fonte de carbono em FES.

Analisar a composição químico-bromatológica da palma forrageira e em seguida sua aplicação como substrato em FES.

Verificar a produção de lipase em FES empregando palma forrageira como substrato e avaliando óleo lubrificante residual e óleo de fritura como fonte adicional de carbono.

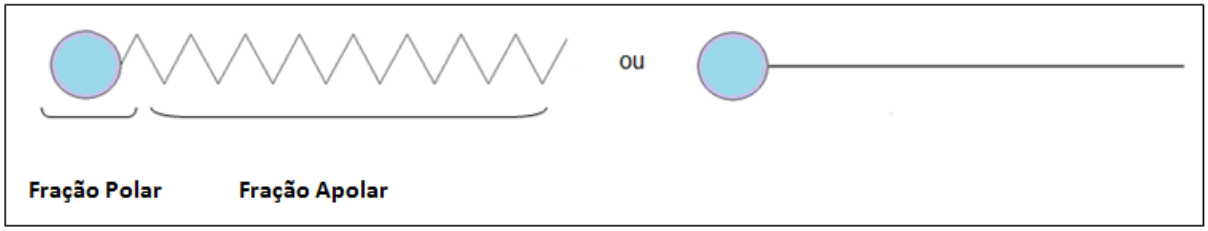
Avaliar a produção de biossurfactante em FES empregando palma forrageira como substrato e óleo lubrificante residual como fonte adicional de carbono.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Surfactantes

Os surfactantes são uma classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. São moléculas anfipáticas (figura 1. 1) que são formadas por uma camada hidrofóbica (apolar), na maioria das vezes é uma cadeia hidrocarbonada, e outra camada hidrofílica (polar), a qual pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica [59].

Figura 1. 1. Representação esquemática de um surfactante.



Devido à presença de grupos com diferentes polaridades em uma mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Um filme molecular ordenado é formado nas interfaces, com isso a tensão superficial e interfacial é reduzida. Esse fenômeno é responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes [25].

Determina-se a eficiência de um surfactante pela sua capacidade de diminuir a tensão superficial, a qual é uma medida da energia superficial livre (entalpia da superfície livre) por unidade de área requerida para trazer uma molécula até a superfície, ou seja, a força que age na superfície de um líquido promovendo a minimização da área superficial [60, 61, 62].

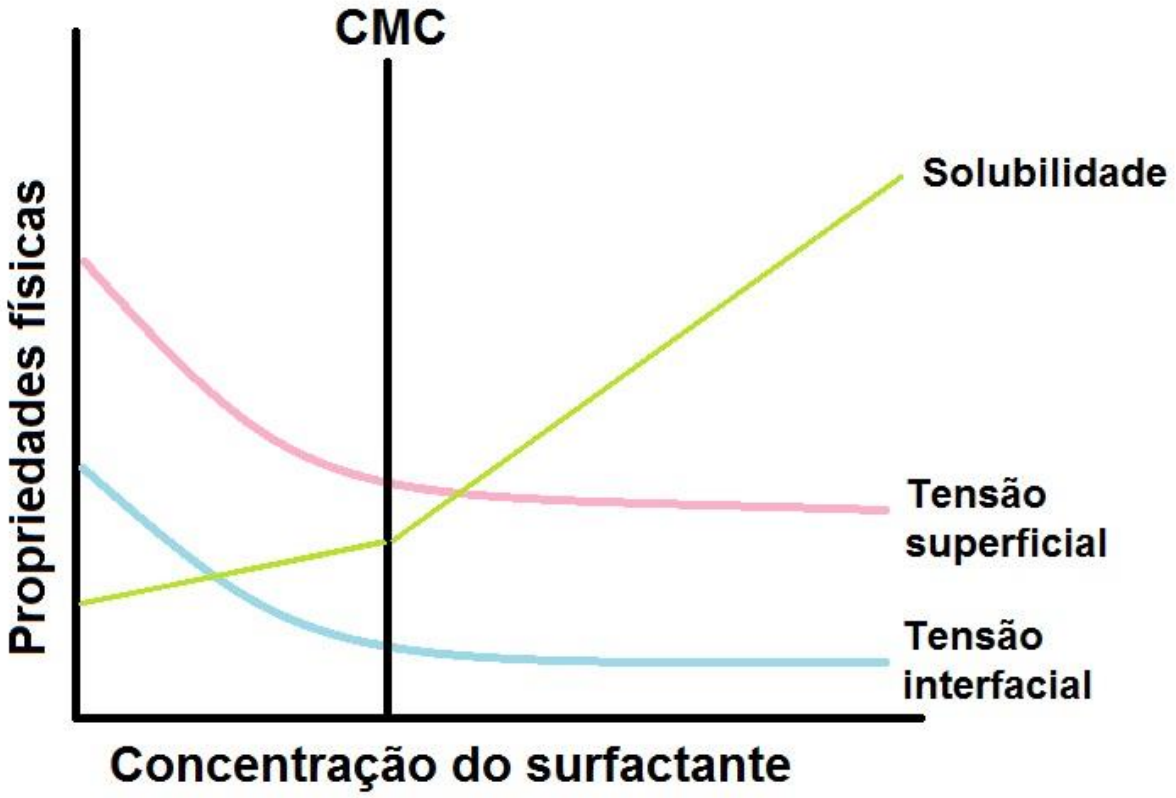
Com a presença de surfactante no meio, a tensão superficial é reduzida, pois pouco trabalho é necessário para trazer uma molécula até a superfície [60, 62]. Ocorrendo assim a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna [24]. Com isso, ocorre um aumento da concentração de compostos hidrofóbicos na fase aquosa, devido à formação de uma

emulsão e solubilização óleo/água acima da concentração micelar crítica (CMC) [60, 62].

A CMC é formada a partir da concentração das micelas. Corresponde a mínima concentração de surfactante necessário para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas [24]. Surfactantes eficientes possuem uma baixa CMC, isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial [60, 63].

Na figura 1. 2, mostra o comportamento da tensão superficial e interfacial e da solubilidade com o aumento da concentração de surfactante no meio.

Figura 1. 2. Tensão superficial, tensão interfacial e solubilidade do composto orgânico em função da concentração de surfactante.



As propriedades dos surfactantes proporcionam que sejam adequados para aplicação em diversas áreas industriais dentre elas: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Em destaque estão a indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), a indústria de petróleo e a indústria de cosméticos e produtos de higiene, sendo as que mais utilizam os surfactantes [59].

Para atender à necessidade industrial a produção mundial de surfactante ultrapassa 3 milhões de toneladas por ano. A maioria desses surfactantes são quimicamente derivados do petróleo, nos países industrializados o consumo desses compostos é de 70 a 75%. Apesar dessa grande demanda na produção e utilização dos surfactantes sintéticos, o interesse por surfactantes biológicos está aumentando, por possuírem diversidades e potenciais aplicações nas indústrias de processamento de alimentos, áreas de proteção ambiental, médica, recuperação de resíduos oleosos, entre outras [1].

Surfactantes são utilizados em recuperação terciária de óleo de reservatórios e em tratamentos de ambientes contaminados por derrames de petróleo. No entanto, esse processo pode ser tóxico ao ecossistema, pois surfactantes sintéticos não são biodegradáveis. A ingestão acidental de pequenas quantidades de surfactantes, presentes em produtos de uso pessoal como cremes dentais e cosméticos, com uso frequente pode causar absorção. Com isso, surfactantes usados para fins comerciais estão sendo substituídos gradativamente em função do possível efeito tóxico em seres humanos [2]. Além disso, há uma necessidade de substituição de moléculas não biodegradáveis, poluentes a natureza, por moléculas biodegradáveis mais compatíveis com o meio ambiente.

Com o custo do petróleo e a possibilidade do seu esgotamento, há também a busca por tecnologias alternativas que possibilitem a produção comercial de agentes tensoativos biodegradáveis e de baixo custo [2]. Uma alternativa é a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, obtidos por via microbiana com matéria prima renovável.

1.3.2 Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana com propriedades surfactantes (tensoativas), os quais são subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras. De acordo sua composição química e sua origem microbiana são classificados em glicolipídios, lipopeptídios, lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos [3, 4].

A maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros. A molécula de um biossurfactante é

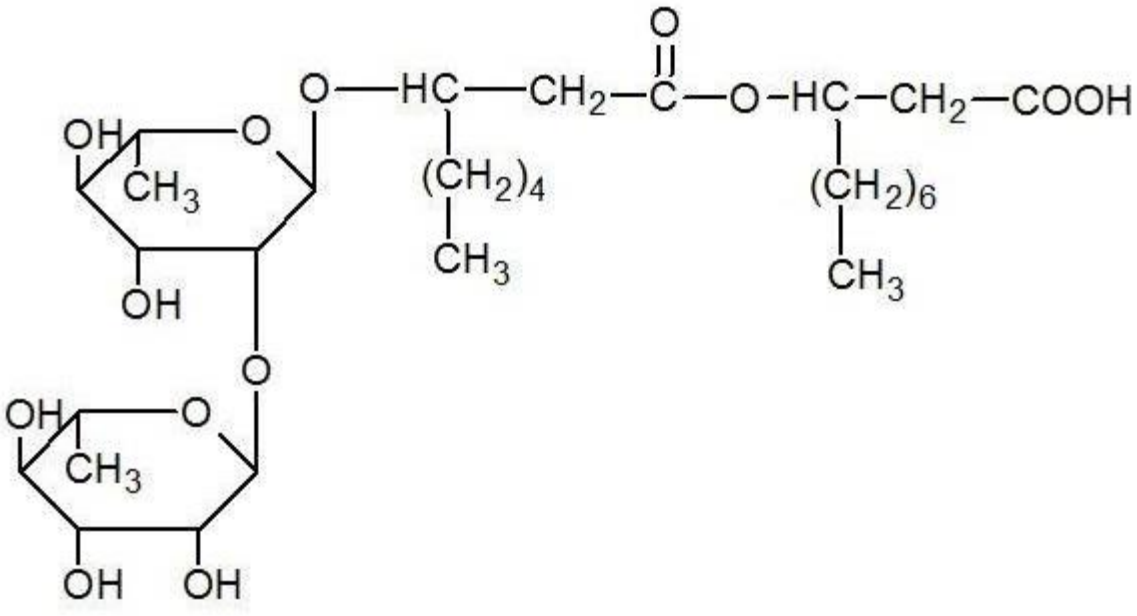
dividia em duas partes (hidrofóbica e hidrofílica). A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa, esta porção pode ser saturada, insaturada ou de ácidos graxos hidroxilados [64], enquanto que a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, um fosfato, um ácido carboxílico ou um álcool [3].

Natureza química de alguns biossurfactantes [65]:

Glicolipídio - são carboidratos ligados a ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroxi-alifático por um grupo éster. Entre os glicolipídios, os mais conhecidos são ramnolipídios, trealolipídios e soforolipídios [66].

Ramnolipídios - são os mais estudados, nessas estruturas uma ou duas moléculas de ramnose estão ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β-hidroxidecanóico. Enquanto o grupo OH de um dos ácidos está envolvido na ligação glicosídica com a extremidade redutora do dissacarídeo ramnose, o grupo OH do segundo ácido está envolvido na formação do éster (figura 1. 3) [65].

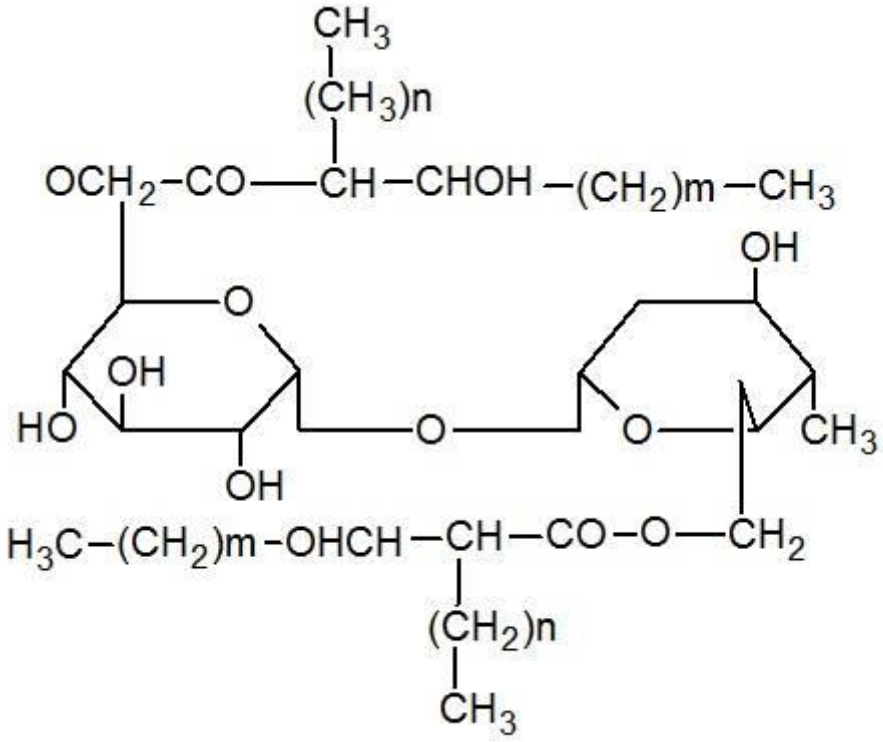
Figura 1. 3. Estrutura de ramnolipídio.



Trealolipídio - vários tipos estruturais de biossurfactante trealolipídio microbiano têm sido relatados (Figura 1. 4). Ácidos micólicos são de cadeia longa, ácidos graxos α-ramificada-β-hidroxila. Trealolipídios de diferentes organismos

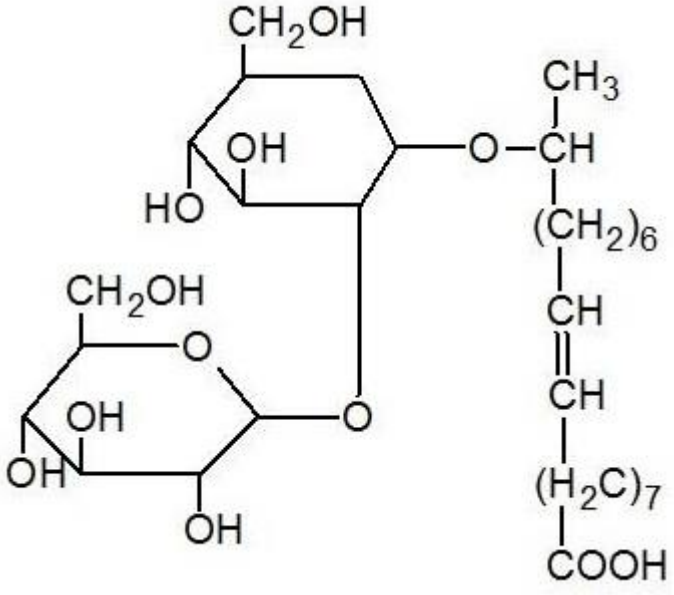
diferem no tamanho e estrutura dos ácidos micólicos, o número de átomos de carbono e o grau de instauração [67].

Figura 1. 4. Estrutura de trealolipídio.



Soforolipídios - geralmente uma mistura de seis a nove soforolipídios hidrofóbicos diferentes (figura 1. 5) [68], tem sido demonstrado que a forma lactona do soforolipídio é necessária ou preferível para muitas aplicações [69].

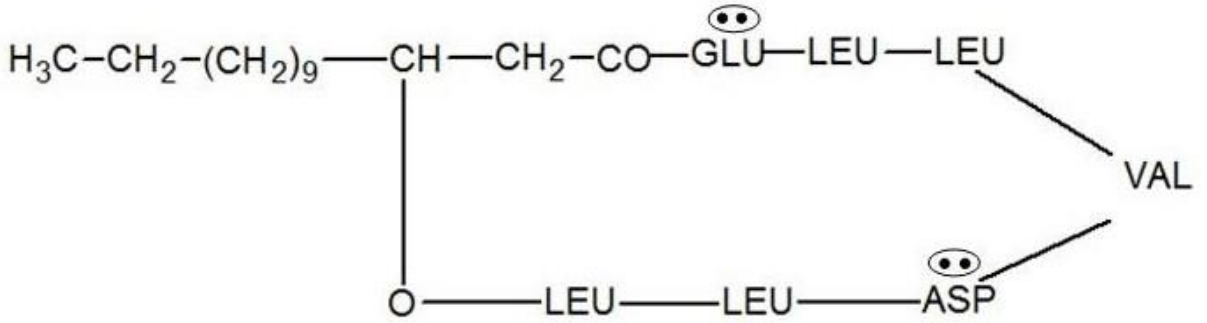
Figura 1. 5. Estrutura de soforolipídio, forma ácido.



Lipopeptídios e lipoproteínas - um grande número de cíclicos de lipopeptídios, incluindo antibióticos decapeptídio (gramicidinas) e antibióticos lipopeptídio (polimixinas) são produzidos. Estes consistem de um lipídio ligado a uma cadeia polipeptídica [70].

Surfactina - lipopéptido cíclico (Figura 1. 6) é um dos mais poderosos biossurfactantes. É composto por uma estrutura em anel de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo por meio de ligação de lactona. Reduz a tensão superficial de 72 para 27,9 mN/m em baixas concentrações como 0,005% [71].

Figura 1. 6. Estrutura de surfactina.



Biossurfactantes poliméricos – os mais estudados são emulsan, liposan, alasan, lipomanan e outros complexos de polissacarídeo-proteína. Emulsan é um

agente eficaz para emulsionar hidrocarbonetos em água [72], mesmo a baixas concentrações como 0,001-0,01%. Liposan é um emulsionante extracelular solúvel em água, composto por 83% de carboidratos e 17% de proteína [73].

Biossurfactantes de partículas – são vesículas de membrana extracelular de hidrocarbonetos de partição para uma microemulsão, que desempenha um papel importante na absorção de alcano por células microbianas [65].

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, tais como [4, 5]:

Biodegradabilidade – diferente dos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são facilmente degradados [74] e adequados para aplicações ambientais, como biorremediação [63, 75].

Baixa toxicidade – não existe muitos relatos na literatura sobre a toxicidade dos biossurfactantes, entretanto são geralmente considerados produtos de baixa toxicidade ou não tóxicos, adequados para usos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios [76].

Maior taxa de redução da tensão superficial - a CMC (concentração micelar crítica) é de cerca de 10 e 40 vezes menor do que a de surfactantes sintéticos, ou seja, menos surfactante é necessário para obter uma redução máxima na tensão superficial [76, 77].

Estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH e força iônica - muitos biossurfactantes e sua tensão superficial não são afetadas pelas condições ambientais, tais como temperatura, pH e força iônica. Por isso, esses compostos ganharam atenção nos últimos anos, pois os processos industriais frequentemente envolvem exposição a condições extremas de temperatura, pressão, pH e força iónica. Portanto, há uma necessidade contínua de produtos capazes de funcionar sob estas condições [76, 78].

Poder de produção a partir de substratos renováveis, pois são compostos não derivados do petróleo - uma das estratégias usadas na produção de biossurfactantes é 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 [12].

Solubilidade em água – os biossurfactantes são solúveis em água devido a sua estrutura que possui uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Além disso, têm como propriedade a formação de microemulsões e formação de micelas nas quais os hidrocarbonetos podem se solubilizar em água ou água pode se solubilizar em hidrocarbonetos [10, 79].

Capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas [4,5]. Porém, ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos, principalmente devido ao seu alto custo [4, 5]. Uma possível solução para este obstáculo seria o uso de matérias-primas de baixo custo [11] e, além disso, o desenvolvimento de bioprocessos eficientes e otimizados com sucesso, incluindo a otimização das condições de cultura e processos de recuperação de custo-benefício para a produção e recuperação máxima do biossurfactante [12].

A composição química e atividade emulsificante dos biossurfactantes não depende apenas do micro-organismo produtor, também são influenciadas pelas condições de cultivo. Assim, a fonte de carbono e nitrogênio são limitações nutricionais e, parâmetros físicos como temperatura, aeração e pH influenciam no tipo de polímero produzido [80]. Essa característica é extremamente importante porque abre caminhos para futuras descobertas de novos compostos e para potencializar a produção destes [3].

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais tais como: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, de-mulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em diversas áreas da agricultura, construção, nas indústrias alimentícias, de bebidas, de papel, de metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos [5, 6, 7, 8]. A Tabela 1. 1 mostra as funções e principais aplicações dos biossurfactantes.

Tabela 1. 1. Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes [59].

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

A área de maior aplicação para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou em formulações de óleos lubrificantes. A maioria dos biossurfactantes produzido, 400 a 500 toneladas por ano, é utilizado nas aplicações relacionadas ao petróleo. Outras aplicações na área petrolífera incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagens e a recuperação terciária do petróleo [6]. Porém, atualmente, as aplicações dos biossurfactantes se distribuem entre os mais diversos setores industriais [81].

A biorremediação é o uso de atividade biológica para eliminação de poluentes ambientais e melhoramento do processo de biodegradação dos contaminantes [82]. Essa nova tecnologia consiste no uso de agentes biológicos, capazes de modificar ou decompor poluentes alvos, para tratar locais contaminados. É baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por micro-organismos [3].

Assim, estimulam-se os micro-organismos de um reservatório de petróleo a produzir polímeros e biossurfactantes para melhorar a recuperação do óleo pela redução da tensão interfacial na interface óleo-rocha, proporcionando a movimentação do mesmo através dos poros das rochas, esse processo é chamado de recuperação melhorada de petróleo (MEOR) [5, 83].

Nos reservatórios de petróleo, resíduos e frações pesadas de petróleo, altamente viscosos, sedimentam no fundo dos tanques de estocagem, podendo tornar-se depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. No processo de limpeza usando biossurfactante ocorrerá a redução da viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do petróleo após a quebra da emulsão. Os sólidos resultantes carregam uma quantidade limitada de óleo residual devido à ação detergente do biossurfactante, tornando o descarte destes resíduos menos problemáticos [6, 81].

Os biossurfactantes também podem ser utilizados na remoção de metais, substituindo a ação geralmente realizada com ácidos, álcalis, complexantes, solventes solúveis em água. Estudos mostram que a surfactina, os ramnolipídios e os soforolipídios são capazes de remover cobre e zinco de solos contaminados com hidrocarbonetos, devido ao caráter aniônico desses surfactantes. A surfactina apresentou uma remoção de cobre de 70% e de hidrocarbonetos de 50%, comparados com valores de 20 e 30% de remoção de cobre e hidrocarbonetos por um surfactante químico [5, 8].

1.3.3 Óleo lubrificante automotivo residual

Os óleos lubrificantes para automóveis têm a função de lubrificar, refrigerar e manter limpo o motor, protegendo-o contra corrosão, desgaste e formação de ácidos no seu interior, é importante na vedação da câmara de combustão, proporcionando o prolongamento da vida útil do motor [18].

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, o restante é queimado nos motores [13, 14].

O Brasil é o quinto maior mercado de lubrificante no mundo e, consequentemente, é o quinto maior gerador de óleo lubrificante usado ou contaminado (OLUC), mas as metas de coletas ainda não são suficientes para essa demanda [84]. Segundo AMBIENTEBRASIL, 2001 o Brasil consumia anualmente cerca de 900.000 m^3 de óleo lubrificante e gerava 250 a 300.000 m^3 de óleo usado, sendo novamente refinado em torno de 110.000 m^3 deste óleo usado. O restante era geralmente queimado ou despejado diretamente na natureza [13, 14].

A Agência Nacional do Petroleo (ANP) mostrou que no Estado do Rio de Janeiro em 2013, foram coletados 41.202.893 litros de OLUC, o que correspondeu a 8,7% do volume total coletado no País [84, 85].

O número desses resíduos lançados no ambiente é preocupante, devido às propriedades dos óleos lubrificantes e os danos que podem causar. Os hidrocarbonetos poliaromáticos estão entre os componentes desses óleos, esses compostos foram identificados como carcinogênicos pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (1983) [15,16]. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), em sua NBR n.º 10.004/2004, também se pronunciou a respeito desses óleos, classificando o OLUC como resíduo perigoso por apresentar dentre outras características, a toxicidade [17, 18].

São considerados de alto potencial contaminante, quando jogados nos solos, pois podem comprometer as atividades agrícolas e contaminar as águas subterrâneas [18, 19]. A poluição gerada pelo descarte em solo ou cursos d'água de uma tonelada por dia de óleo usado equivale ao esgoto doméstico de 40 mil habitantes, além do que apenas um litro desta substância é capaz de esgotar o oxigênio de um milhão de litros de água [14, 20]. Além disso, a queima indiscriminada do óleo lubrificante usado, sem tratamento prévio, gera significativas emissões de óxidos metálicos, além de outros gases tóxicos, como as dioxinas e óxidos de enxofre [20, 16].

1.3.4 Óleo de fritura

Mundialmente é produzido de 2,5 a 3 milhões de toneladas de óleos e gorduras por ano, aproximadamente 75% dessa produção são derivadas de plantas

[23]. Muitos óleos e gorduras são utilizados na indústria de alimentos gerando grande quantidade de resíduos [24].

Na produção nacional do ano de 2008, 6 milhões de toneladas são referentes aos óleos vegetais, um dos mais importantes derivados das plantas. Dois terços desta produção são utilizados em produtos alimentícios, sobretudo fritura de alimentos [25].

Razões sociais, econômicas e técnicas, têm influenciado o consumo de alimentos fritos e pré-fritos, os quais tende sempre a aumentar. O tempo da população para preparar seus alimentos tem reduzido e com isso o processo de fritura fornece uma alternativa de preparação rápida, além de conferir aos alimentos fritos características organolépticas agradáveis. Essa situação acarreta no aumento da quantidade de resíduos de óleo de fritura gerados [86, 87].

Vários projetos de reciclagem existem no Brasil, destinados a papel, plásticos, metais e bagaço de cana. Mas ainda é necessário melhorar o aproveitamento das várias matérias primas residuais do país. A maioria desses resíduos é descartada de forma incorreta, poluindo lenções freáticos, solo e ar. Os óleos vegetais usados em fritura são exemplos de resíduos que geram riscos ambientais, atingindo níveis alarmantes [21, 22].

As grandes indústrias alimentícias vendem seus óleos vegetais usados, para produção de sabão, massa de vidraceiro e fabricação de ração animal. Entretanto, grande parte desse óleo que não é coletado, acaba sendo descartado na rede de esgoto ou diretamente no solo [21, 22].

A maior parte deste descarte industrial vai para a rede de esgoto. Da mesma forma acontece com o descarte doméstico, no ralo da pia da cozinha, provocando a incrustação nas paredes da tubulação e a consequente obstrução das redes, causando sérios prejuízos. Este óleo descartado acaba chegando aos rios e até mesmo ao oceano, através das tubulações [26, 27].

Óleos vegetais são poucos solúveis em água, isso complica sua degradação nas unidades de tratamentos de despejos por processos biológicos e, causam problemas no tratamento da água, em mananciais utilizados para abastecimento público. Além desses prejuízos, o descarte inadequado de óleo de fritura eleva a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), causando alterações no ecossistema

aquático, pois diminui a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico impedindo a transferência do oxigênio da atmosfera para a água, os óleos e graxas em seu processo de decomposição, reduzem o oxigênio dissolvido [28, 29].

Já o descarte do óleo no solo, pode causar a sua impermeabilização, deixando-o poluído e impróprio para uso [26]. Também não é recomendável separar o óleo em frascos ou garrafas PET, descartando-o na lixeira, pois ocorrerá a infiltração e contaminação do lençol freático [27].

A disposição dos resíduos de óleos de fritura é um problema crescente, que desperta o interesse da utilização deles para transformação microbiana [24]. Após o aquecimento dos óleos, são gerados inúmeros compostos de degradação, que tornam os óleos excelentes fontes de carbono para crescimento microbiano e produção de biossurfactantes [30, 31] entre outros biocompostos.

1.3.5 Palma Forrageira (*Nopalea cochenillifera (L.) Lyons - Cactus)*

Palma forrageira de nome científico *Nopalea cochenillifera (L.) Lyons - Cactus*, é uma cactácea forrageira e comestível, de origem mexicana, largamente difundida no Nordeste brasileiro, recebendo o nome genérico de palma (figura 1. 7). São plantas de pequeno porte com caule bastante ramificado. Sua raquete tem em torno de 25 cm de comprimento e 350g, possui a ápice mais larga que a base e coloração verde intenso brilhante. As flores são vermelhas e sua corola permanece meio fechada durante o ciclo. O fruto é uma baga de coloração roxa [36].

Figura 1. 7. *Nopalea Cochenillifera (L.) Lyons - Cactaceae* [45].

Foi introduzida no Brasil em 1880, no Estado de Pernambuco, através de raquetes provenientes do Texas, EUA. Sendo que, desde o início do século a palma forrageira já era cultivada com sucesso no semiárido nordestino e nas regiões áridas e semiáridas dos Estados Unidos, México, África do Sul e Austrália [32, 88]. A área de plantação de palma forrageira na região do Nordeste brasileiro fica em torno de 550.000 ha, destacando-se Pernambuco e Alagoas, estados com a maior área de cultivo [32].

A palma é uma das plantas mais adaptadas às condições ecológicas das zonas áridas e semiáridas do mundo, devido ao seu mecanismo fisiológico. Por isso, foi adaptada com facilidade ao semiárido Nordestino [33, 34]. O grande motivo é seu baixo conteúdo de matéria seca, quando comparada à maioria das forrageiras, e elevada umidade independente do cultivar. Com isso, no período seco do ano, atende grande parte da necessidade de água dos animais [35, 36].

A palma miúda ou doce apresenta um melhor valor nutritivo e uma multiplicação mais rápida quando comparada com as cultivares Redonda e Gigante.

A cada ano a palma miúda é capaz de produzir 68 t ha^{-1} de matéria verde, com densidade de 20 mil plantas por hectare [33]. Com isso, é possível realizar colheitas com intervalos de 1 ano, o que não é recomendado para as demais cultivares [89].

A palma forrageira é rica em minerais como cálcio, magnésio, sódio, potássio; em vitaminas A, C e do complexo B [37, 38]; em carboidratos não fibrosos e alto teor de cinzas; embora possua baixos teores de proteína bruta e fibra em detergente neutro [39, 40].

Possui uma elevada umidade, a qual é uma característica importante no atendimento das necessidades de água dos animais, principalmente na época de seca [35,40]. Além disso, é uma fonte energética de baixo custo disponível nas regiões áridas e semiáridas [40, 90].

Assim, no período de secas prolongadas, a palma forrageira tem sido um recurso utilizado para amenizar as dificuldades na alimentação de animais como [91, 92]: bovinos leiteiros [93, 94], gado leiteiro, ruminantes [36, 95] e animais da bacia leiteira do agreste pernambucano [96].

A palma forrageira também pode ser usada como substrato de bioprocessos, pois é um vegetal que apresenta características favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras). Os quais são considerados uma fonte protéica de elevado teor protéico, sendo uma alternativa para aumentar o teor de proteína da palma forrageira [32].

1.3.6 *Penicillium*

Os fungos são micro-organismos de importância comercial. Estão distribuídos na natureza de forma ampla de modo que podem ser encontrados em diversos substratos, desde solos a animais, agem na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem dos nutrientes [97].

O gênero Penicillium (figura 1. 8) é destaque em contaminação alimentar. Estão bem distribuídos em todo o mundo, e presentes em solos, no ar e na vegetação em deterioração [97]. A maioria é de ambientes terrestres, mas também podem ser encontrados em ambientes aquáticos [98].

Espécies do gênero Penicillium são poucos exigentes nutricionalmente, capazes de crescer em qualquer ambiente com uma fonte de sais minerais e qualquer fonte de carbono exceto as mais complexas, em várias condições físico-químicas. Muitas espécies são capazes de crescer a temperaturas abaixo de 0º C, algumas são capazes de crescer até 40º C [99, 100].

Os fungos do gênero Penicillium pertencem à família dos Trochomaceae, ordem dos Eurotiales, classe dos Eurotiomycetos, filo Ascomycota dentro do reino Fungi. São fungos filamentosos e de crescimento rápido [98].

Suas colônias podem ter aspecto algodonoso ou pulverulento [101, 102]. Seus esporos assexuados produzem uma estrutura típica do gênero designada de penicillus (pl. penicilli, que em latim significa pincel) [100]. São constituídos por estruturas multicelulares, em forma de tubo, denominadas hifas. As hifas são septadas, o conjunto de hifas é chamado de micélio. O micélio do interior do substrato, que funciona como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes é chamado micélio vegetativo. O micélio que cresce acima do meio de cultivo, micélio da superfície, recebe o nome de aéreo [101]. Durante a reprodução, o micélio aéreo se diferencia formando os conídios. As cores do conídio especialmente as verdes são um importante critério na identificação das espécies. Sua cor depende do meio de cultivo, tempo de incubação, iluminação da colônia e fatores ambientais [102, 103].

Figura 1. 8. *Penicillium* [104].

Estes fungos são amplamente estudados em vários ramos da ciência tendo ênfase na área toxicológica, alimentícia e farmacêutica [98]. Além disso, muitas pesquisas realizadas têm demonstrado o seu enorme potencial biotecnológico. Algumas espécies podem ser aplicadas no biocontrole, no micoparasitismo, na utilização de seus metabólicos secundários para diversas indústrias como fonte de novos fármacos para a indústria farmacêutica e de enzimas de interesse industrial [97, 105]. O gênero Penicillium contém muitos produtores de lipase [106, 107], por isso são amplamente utilizados como fonte dessas enzimas [108, 109].

Com isso, a utilização destes micro-organismos na busca de soluções nas áreas de saúde, alimentos, meio ambiente e indústria vêm crescendo de forma acelerada. Sua extraordinária atividade está notavelmente baseada na diversidade metabólica e capacidade genética [97].

1.3.7 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação para a biotecnologia consiste na transformação de um substrato em um determinado produto pela ação de micro-organismos e pode ser desenvolvida por processo submerso ou sólido [110, 111].

O processo sólido é denominado Fermentação em Estado Sólido (FES), o qual ocorre em baixa quantidade de água livre entre as partículas (figura 1. 9). Utiliza-se um material natural ou sintético como substrato sólido, ou apenas como suporte inerte embebido em nutrientes [41, 42, 43]. O conteúdo de sólidos varia de 20 a 70% da massa total, onde a quantidade de água é próxima à capacidade máxima absorvida pelo material sólido, sendo o suficiente para permitir o crescimento do micro-organismo [47, 112]. Os materiais naturais usados como substratos são: substratos sólidos provenientes de grãos de cereais, outros vegetais e resíduos agroindustriais, com ou sem suplementação de nutrientes [44].

Figura 1. 9. Fermentação em estado sólido.

Fonte: A autora.

A FES tornou-se uma alternativa muito atraente em comparação com a fermentação submersa, para aplicações específicas e devido à recente melhora nos modelos dos reatores [44, 113].

Os fungos apresentam-se como os micro-organismos mais promissores na FES [45, 46]. Pois possuem capacidade de crescer em meios com baixa atividade de água (a_w) e baixo pH [47, 48]. Atua através do desenvolvimento das hifas por meio das quais ocorre a penetração no substrato e na região porosa entre as

partículas do substrato [45, 46] e produz enzimas extracelulares hidrolíticas para degradar as macromoléculas presentes no substrato sólido, favorecendo assim o seu uso em FES [47, 48].

A água na FES tem grande interação com as substâncias que compõem a fase sólida, por isso é o parâmetro que apresenta papel de destaque no processo fermentativo. Nesse processo, a água está relacionada com a umidade e a atividade de água. A umidade, diz respeito à porcentagem de água na massa total de meio [114, 115], sendo um parâmetro de mais fácil determinação [47, 112]. Já a atividade de água, está relacionada a quantidade de moléculas de água disponíveis nas vizinhanças imediatas das partículas do substrato para o micro-organismo, a qual afeta diretamente o crescimento microbiano e a síntese de metabólitos [114, 115].

Uma das mais importantes propriedades físicas do substrato para a eficiência do processo de FES é o tamanho de suas partículas ou faixa de granulometria. Pois as partículas pequenas favorecem a compactação do sólido e, consequentemente impede a difusão de gases no meio. O inverso acontece com as partículas grandes, que favorecem maior aeração, mas limitam a superfície de contato do substrato para o micro-organismo. Logo, o tamanho ou faixa de granulometria a ser empregada deve levar em consideração a acessibilidade do micro-organismo aos nutrientes e a disponibilidade de oxigênio e fluxo de ar [116, 117, 118].

Todos os processos fermentativos são considerados exotérmicos. Durante a FES grandes quantidades de calor são liberadas, proporcional à atividade metabólica do micro-organismo. Esse fenômeno faz da temperatura um fator crítico do processo, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator. Porém, para os fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos [114, 115]. Com isso, o calor produzido deverá ser dissipado para evitar danos à fermentação. Essa dissipação de calor pode ser feita através da circulação forçada de ar ou por outro sistema que impeça o aquecimento [111, 119].

O controle do pH durante a FES é considerado um dos pontos mais críticos, pois dificilmente é conseguido, devido à heterogeneidade e a consistência do material [111, 119]. No entanto, o pH é uma variável importante em qualquer

processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada micro-organismo. Geralmente os fungos preferem pH baixo (4,5 – 5,0), afetando o metabolismo dos micro-organismos por alterar seu conjunto enzimático. O pH de um cultivo varia devido às reações que ocorrem durante as atividades metabólicas do micro-organismo. Quando ácidos orgânicos são secretados, como ácidos acético ou láctico, causam o decréscimo do pH. Entretanto, o consumo destes ácidos quando presente no meio causa o aumento do pH [115, 120]. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato [118, 121].

Os meios de fermentação devem conter os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo e formação de produto. Esses nutrientes são: carbono, nitrogênio, minerais e água. Os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio são requeridos em grande quantidade porque participam de quase todas as substâncias celulares [118].

Portanto, o substrato ideal é aquele que fornece todos os nutrientes necessários, mas, alguns nutrientes podem estar em baixa concentração ou não estarem presentes no substrato, sendo necessário acrescentá-lo [41, 122]. Carbono, hidrogênio e oxigênio são fornecidos na forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular e de água e o nitrogênio sob a forma adequada (orgânica ou inorgânica) [118].

A maioria dos micro-organismos satisfaz a maior parte de suas necessidades de carbono pela incorporação de metabólitos obtidos pela degradação de substratos orgânicos [122, 123].

A maioria dos fungos pode assimilar nitrogênio inorgânico sob a forma de nitrato ou amônia, além da grande diversidade de compostos orgânicos nitrogenados. A amônia é o maior regulador da assimilação de nitrogênio e, na sua presença, é reprimida a utilização de outras fontes nitrogenadas como nitrato, aminoácido e proteína [118, 124].

O processo de FES apresenta várias vantagens como:

- Vegetais ou resíduos agroindustriais de baixo custo podem ser usados como substratos [43, 125, 126].

- Precisa de pequenas quantidades de água, com isso é possível a obtenção de mistura mais concentrada dos metabólitos e uma redução da formação de resíduos. Além disso, diminui o custo de investimento e de energia consumida na recuperação do produto [43, 125, 126].
- Condições de crescimento próximo ao habitat natural dos fungos filamentosos, proporcionando maior rendimento do produto final [43, 125, 126].
- Possuir baixos teores de umidade e alta concentração de inóculo, reduzindo problemas de contaminação [44, 127].
- Aeração natural forçada é facilitada pela porosidade do suporte, o que permite uma alta transferência de ar e, por conseguinte, de oxigênio [44, 127].

Apesar de atrativa e vantajosa, a FES apresenta desvantagens como:

- Apresenta baixa homogeneidade e necessita de volumes relativamente grandes de inóculo [128, 129].
- Ampliação de escala, onde o principal problema é a remoção do calor gerado pelas atividades metabólicas dos micro-organismos, devido à heterogeneidade do substrato [128, 129].
- As altas temperaturas nos processos fermentativos podem comprometer o metabolismo microbiano e desnaturar enzimas, de modo que o controle desta variável é chave para ter um processo estável e de produtividade elevada [128, 129].
- Geralmente, restringe apenas ao uso de fungos filamentosos, devido aos baixos teores de umidade [42, 43, 117].

Os processos fermentativos são ferramentas importantes na obtenção de diversos produtos, tais como biomassa microbiana, vitaminas, hormônios, pigmentos, enzimas, biossurfactantes, biopesticidas e etc [43, 117, 130].

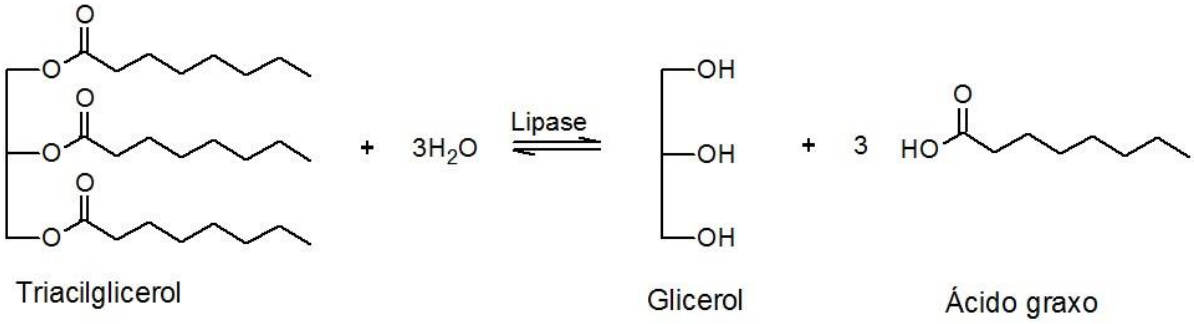
De forma geral, a aplicação comercial dos processos de FES pode ser dividida em dois tipos. Aplicações socioeconômicas, como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustriais. Aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas, biossurfactantes, ácidos orgânicos e alimentos fermentativos entre outros produtos [44, 49].

1.3.8 Lipase

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 (figura 1. 10) [131, 52]. Sua atividade é aumentada quando situada na interface polar-apolar. Seu modo de ação é semelhante ao das esterases [132, 133].

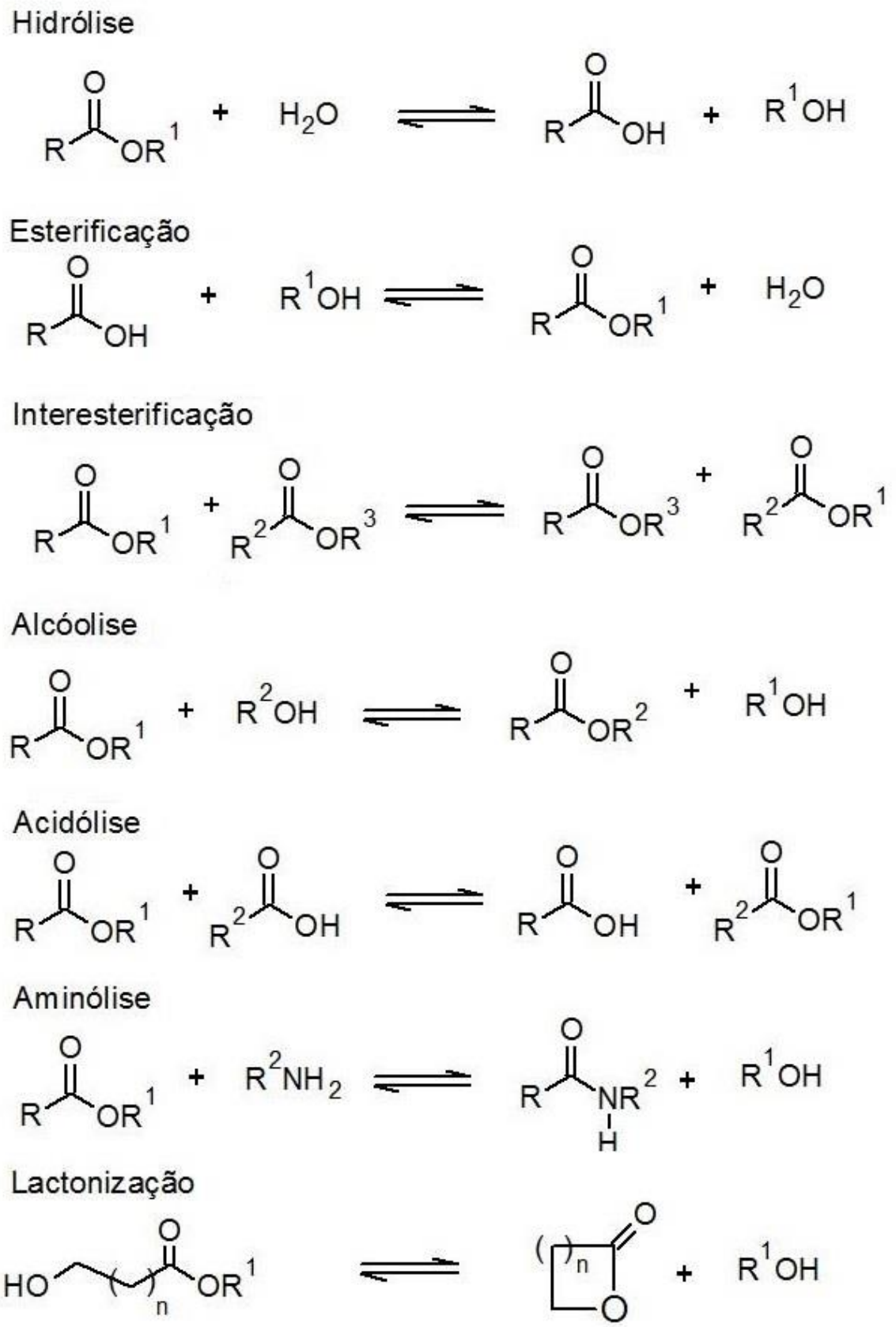
No entanto, lipases são carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enquanto, as esterases apresentam capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos [134, 135, 136]. Vale ressaltar que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro [134, 136].

Figura 1. 10. Reação da hidrólise e síntese do triacilglicerol catalisada por lipases [47].



Em meios com baixas disponibilidades de água as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) (figura 1. 11), sendo que a atividade de água do meio reacional é um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (síntese) [131, 136].

Figura 1. 11. Reações catalisadas por lipases [55].

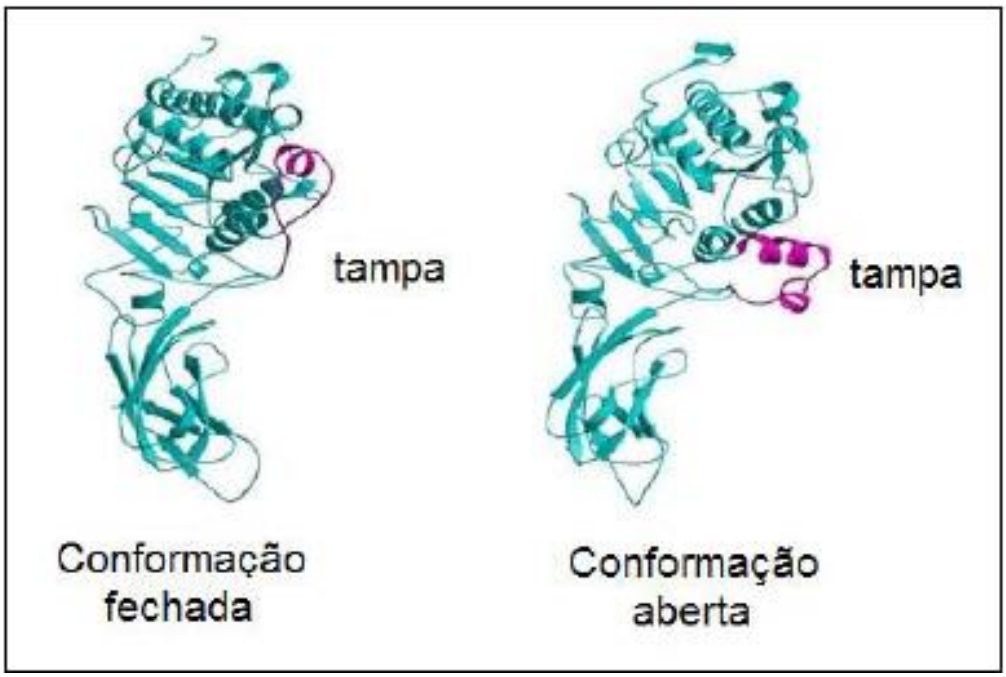


Todas as lipases conhecidas, tanto de eucarióticos quanto de procarióticos, possuem a estrutura tridimensional do tipo α/β hidrolases, mesmo sendo diferentes na sequência de aminoácidos [137]. Essa estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β-paralelas, rodeado por porções em α–hélices. O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina [138, 139].

A determinação da estrutura tridimensional da lipase (obtida por difração de raio-X) fornece uma compreensão para a ativação interfacial. O sítio ativo das lipases é coberto por uma cadeia peptídica denominada tampa, de natureza hidrofóbica. Quando a tampa encontra uma interface lipídeo-água, há interação entre ambas e esta sofre uma alteração conformacional (a tampa se move alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta) expondo o sítio ativo e permitindo a catálise (figura 1. 12) [136, 140].

O sítio ativo fica acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, a lipase expõe uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação à interface [139]. Algumas lipases não apresentam o sítio ativo recoberto pela tampa e não precisam da interface para desempenhar sua atividade hidrolítica [136].

Figura 1. 12. Posicionamento da estrutura secundária que compõe a tampa na ativação da lipase [141].



Acredita-se que o mecanismo cinético das lipases não dependa do tipo de reação catalisada (hidrólise, acidólise, esterificação). A reação inicia-se com o ataque nucleofílico ao carbono da ligação éster do lipídio susceptível pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo serina do sítio ativo, formando um complexo enzimático tetraédrico e havendo a liberação de álcool do lipídio, formando o intermediário acilenzima [120, 134]. Posteriormente, ocorre a hidrólise do complexo enzimático, regenerando a lipase [120].

Etapas do mecanismo da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por lipases e esterases, demonstrado na figura 1. 13:

(a) ataque nucleofílico da hidroxila da serina ao carbono suscetível da ligação éster;

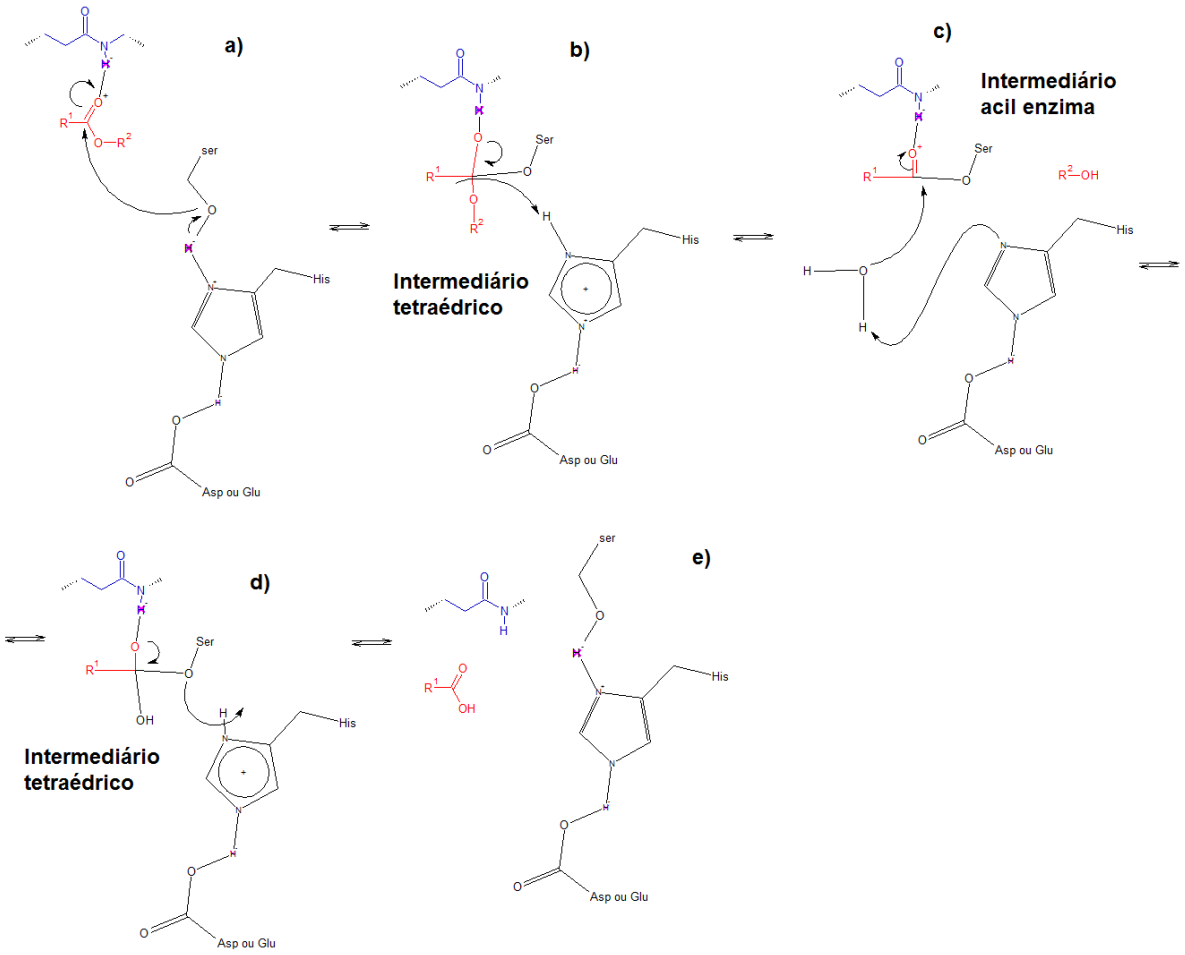
(b) intermediário tetraédrico;

(c) intermediário acil enzima e ataque nucleofílico da água;

(d) intermediário tetraédrico;

(e) enzima livre.

Figura 1. 13. Mecanismo da reação de hidrólise de ligações éster catalisada por lipases e esterases. A tríade catalítica (serina, histidina e ácido aspártico) e a água são mostradas em preto, os resíduos do buraco do oxiânion em azul e o substrato em vermelho [142, 143].



As lipases podem ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal [50]. Tendo suas propriedades variáveis de acordo com sua procedência [131, 52].

As lipases microbianas, em geral, são extracelulares, sendo excretadas através da membrana externa para o meio de cultura. A otimização das condições de fermentação para lipases microbianas é de grande interesse, desde que as condições de cultura não influenciem nas propriedades da enzima [118].

Os fungos são os preferidos como produtores industriais de lipases porque suas enzimas normalmente são extracelulares, o que facilita a extração do meio fermentado. Na produção de lipases a partir de fungos, os substratos lipídicos atuam como indutores em muitas espécies, nos quais as lipases são produzidas constitutivamente [50].

Pesquisas com fermentação em estado sólido têm apresentado maiores produções de lipases, quando comparada com a fermentação submersa; esta vantagem é atribuída à alta taxa de crescimento da biomassa e à baixa atividade proteolítica [50, 51].

Dentre os vários métodos disponíveis para acompanhar a atividade de lipase presente no meio fermentativo, os mais utilizados são os colorimétricos que utilizam substratos sintéticos como ésteres de ácidos graxos de *p*-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato) e o titulométrico (pH STAT) que usa a trioleína como substrato padrão. O óleo de oliva é uma alternativa de baixo custo para ser utilizado como substrato e contém em média 70 % de trioleína [136, 144].

As lipases provenientes de micro-organismos formam um conjunto de enzimas valiosas para a aplicação biotecnológica, o principal motivo é a versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, especificidade pelo substrato e facilidade de produção em grandes quantidades [52, 53].

Devido suas propriedades as lipases têm encontrado aplicações promissoras em vários segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos [54], de detergentes [53], na biotransformação de óleos e gorduras [55], obtenção de fármacos [56], tratamento biológico de águas residuárias [57], aceleração da biodegradação de polímeros [58]. Hidrocarbonetos de petróleo por exemplo têm sido mencionados como substratos potenciais para a produção microbiana de várias enzimas comerciais importantes e metabólitos secundários [50].

1.3.9 Otimização experimental

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi desenvolvida para otimizar processos [12]. Criada por G. E.P. Box na década de 50, é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas, utilizada para análise e modelagem de problemas onde uma resposta de interesse é função de outras variáveis, sendo que o relacionamento entre a variável resposta e as variáveis independentes é desconhecido e o principal objetivo é otimizar a resposta [145].

A análise de uma superfície de resposta é feita em termos de uma superfície ajustada. Se tal superfície é adequada, sua análise será aproximadamente

equivalente a análise da superfície real. Evidentemente, usando-se um arranjo experimental adequado para coletar os dados da variável resposta, os parâmetros do modelo serão estimados eficazmente. Geralmente, quando se está em um ponto da região experimental distante do ponto ótimo, a curvatura do sistema é bem pequena, de onde decorre que um modelo de primeira ordem seja adequado para modelar a resposta. O objetivo experimental é caminhar em direção à região de ótimo. Uma vez encontrada tal região, um modelo quadrático deve ser utilizado [146].

O uso efetivo da superfície de resposta deve considerar os seguintes pressupostos [147]:

- Os fatores que são críticos ao processo são conhecidos.
- A região em que os fatores influem o processo é conhecida.
- Os fatores variam continuamente ao longo da faixa experimental escolhida.
- Existe uma função matemática que relaciona os fatores à resposta medida.
- A resposta que é definida por essa função é uma superfície lisa.

Os desenvolvimentos atuais na área de otimização das condições de fermentação resultaram em um aumento considerável no rendimento da produção, tornando esse processo comercialmente atraente. Otimização através de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta é prática na área de biotecnologia industrial e vários pesquisadores aplicaram esta técnica para otimização das condições de culturas [7].

REFERÊNCIAS

1. CASTIGLIONI, G.L. **Modelagem e simulação da produção de biossurfactante e lipase por fermentação em estado sólido.** 2006. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

2. LIMA, C.J.B. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas Aeruginosa* empregando óleo de soja residual.** 2007. 150f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

3. OLIVEIRA, J.G. **Produção de Biossurfactante por *Bacillus Pumilus* e Avaliação da Biorremediação de Solo e Água Contaminados com Óleo**. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras, e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

4. AQUINO, P. L. M. **Produção de Biossurfactantes a partir de *Bacillus Velezensis* Utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato**. 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

5. COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.

6. BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hidrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.152, n. 1-2, p.41-52, 1999.

7. FIECHTER, A. Biossurfactantes: moving towards industrial application. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 208-217, 1992.

8. MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology***.* v.60, n.1-4, p.371-380, 1999.

9. VAN DYKE, M. I.; LEE, H; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, n. 2, p. 241-252, 1991.

10. MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de Derivados do Petróleo com a Aplicação de Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis***. 2011. 249f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

11. MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, n.4, p.428-434, 2002.

12. SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, p. GEBJ–29, 2011.

13. AMBIENTEBRASIL. Óleos Lubrificantes. **Revista Meio Ambiente Industrial**, ano VI, ed. 31, n.30, 2001.

14. 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**, v.8, n.2, p.166-178, 2008.

15. International Agency for Research on Cancer. Polynuclear aromatic hydrocarbons. 1. Chemical, environmental and experimental data. IARC Monogr. **Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans***,* 32, p.1-16, 1983.

16. LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the biodegradation of diferente types of lubricant oils in liquid medium. **Brazillian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.5, p.1285-1290, 2009.

17. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10.004. Resíduos Sólidos - classificação.** Rio de Janeiro, 2004.

18. SILVA, M. A.; RIBEIRO, S.N.; CRISPIM, D. L.; SOBRINHO, L. G. A.; FARIAS, C. A. S. Avaliação do gerenciamento de resíduos de óleos lubrificantes e suas embalagens em oficinas mecânicas da cidade de Pombal – PB, Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.9, n.4, p.53 -58, 2014.

19. OLIVEIRA, J. M.; CUNHA, C. O. M. **Gerenciamento de Resíduos em Oficinas Automotivas.** Rio Grande do Sul: SENAI, 2007.

20. AmbienteBrasil 2006, **Óleos Lubrificantes**. Available in: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=residuos/index.php3&conteudo=./residuos/oleolubrificante.html>.

21. COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao Óleo diesel através da transesterificação de óleos de soja usado em frituras. **Química Nova**, v.23, n.4, p.531-537, 2000.

22. ALVARENGA, B. M., SOARES, M. A. Potencialidade de produção de biodiesel por óleos e gorduras residuais na cidade de Itabira-MG. **Ceres**, v.57, n.6, p.721-729, 2010.

23. HABA, E., ESPUNY, M. J., BUSQUETES, M., MANRESA, A., Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.3, p.379 – 387, 2000.

24. RUFINO, R. D. **Produção de Biossurfactante por *Candida Lipolytica***. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos) – Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

25. CARA, D. V. C. **Produção de biossurfatante por flavobacterium sp. A partir de óleo de soja residual e fertilizante comercial.** 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

26. PARAÍSO. **Programa de coleta seletiva de óleo de cozinha usado**. Disponível em: <www.paraiso.mg.gov.br>. Acessado em abril de 2008.

27. RABELO, R. A.; FERREIRA, O. M. Coleta seletiva de óleo residual de fritura para aproveitamento industrial. **Ambiente em Foco. Departamento de Engenharia–Engenharia Ambiental, Universidade Católica de Goiás-GO**, 2008.

28. DABDOUB, M. J.; BORTOLETO, D.; SELLANI, V.; RAMPIN, M.; SILVA, C.; Biodiesel em casa e nas Escolas: Programa coleta de óleos de fritura. **Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas–Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto–SP**, 2006.

29. CHRISTOFF, P. **Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial. Estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense**. 2006. 82f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Tecnologias) - Instituto de Engenharia do Paraná (IEP), Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC), Curitiba, 2006.

30. FIRESTONE, D.; STIER, R. F.; BLUMENTHAL, M. M. Regulation of frying fats and oils. **Food Technology**, v. 45, n. 2, p. 90-94, 1991.

31. LIMA, B. M. **Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato**. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2012.

32. ARAÚJO, L. F.; OLIVEIRA, L. S. C.; NETO, A. P.; ALSINA, O. L.S.; SILVA, F. L. H. Equilíbrio higroscópico da palma forrageira: Relação com a umidade ótima para fermentação sólida. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, n.3, p.379-384, 2005.

33. SANTOS, D.C. et al. **Manejo e utilização de Palma Forrageira (Opuntia e Napolea) em Pernambuco**. Recife: IPA, 2006. 48p. (Boletim Técnico, 30), 2006.

34. SILVA, L. M. et al. Produtividade da palma forrageira cultivada em diferentes densidades de plantio. **Ciência Rural**, v.44, n.11, p.2064-2071, 2014.

35. SANTOS, D. C.; SANTOS, M. V. F.; FARIAS, I.; DIAS, F. M.; LIRA, M. de A. Desempenho produtivo de vacas 5/8 Holando/Zebu alimentadas com diferentes cultivares de palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.12-17, 2001.

36. SILVA, C. C. F.; SANTOS, L. C. Palma Forrageira (*Opuntia Fícus- Indica Mill*) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinária – REDVET**, v.7, n.10, p.1-13, 2006.

37. BATISTA FILHO, M. **Consumo de palma atenua carência de vitamina A**. <http://www.barney1.hpg.ig.com.br/palma.html. 07 Fev. 2005>.

38. CAMPOS, A. R. N.; SILVA, F. L. H.; GOMES, J. P.; OLIVEIRA, L. S. C.; OLIVEIRA, M. M. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental,** v.13, n.6, p.734–740, 2009.

39. FERREIRA, M. A. **Palma forrageira na alimentação de bovinos leiteiros**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 68 p.

40. AGUIAR, M. S. M. A. et al. Palma forrageira em dietas de novilhas leiteiras confinadas: desempenho e viabilidade econômica. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 1013-1030, 2015.

41. PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v.35, n.10, p.1153-1169, 2000.

42. RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal,** v.22, n.3, p.211-219, 2005.

43. MARTIN, N. **Purificação e caracterização da poligalacturonase termoestável produzida pela linhagem fúngica thermomucor indicae-seudaticae n31 em fermentação em estado sólido e submersa**. 2010. 85f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2010.

44. FERNANDES, A. P. **Aproveitamento de resíduos de processamento via seca e via úmida do café para obtenção de pectinases.** 2014, 135f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

45. SANTOS, T. C. **Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de enzimas industriais e enriquecimento protéico para utilização na alimentação de ruminantes**. 2013. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste Da Bahia, Itapetinga, 2013.

46. SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.27, n.4, p. 805-811, 2007.

47. SILVA, J. N. **PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO Rhizomucor miehei**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, Rio de Janeiro, 2014.

48. RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, v.24, n.2, p.161-179, 2006.

49. PALMA, MB. **Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

50. MARTINS, 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. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.

51. DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, 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**, v.39, n.5, p.1042-1050, 2006.

52. MENONCIN, S. et al., Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando Penicillium verrucosum em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.440-443, 2009.

53. HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

54. SANTOYO, A. B.; RODRÍGUEZ, J. B.; MARTÍN, M. F. M.; MORTE, M. C. M.; MEMBRILLERA, G. V. G.; REQUENA, S. O.; Biosynthesis of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) with Rhizopus arrhizus lipase. **Journal of Biotechnology**, v.131, n.2, p.S82, 2007.

55. PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, 93-99, 2006.

56. CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESENI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial De Biocatálise Enantiosseletiva De Lipases Microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, p.614-621, 2005.

57. CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease contente. **Bioresource Technology**, v.97, n.17, p.2195-2210, 2006.

58. MARTEN, E.; MULLER, R. J.; DECKWER, W. D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. **Polymer Degradation Stability**, v.80, n.3, p.485-501, 2003.

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

60. BUENO, S. M. **Bactérias Produtoras De Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização E Comportamento Num Sistema Modelo.** 2008. 74f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2008.

61. MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns componentes recalcitrantes.** 2004. 158f. Tese (Doutorado)**,** Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

62. CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field estudies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology,** v. 93, p. 915-929, 2002.

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

64. NGUYEN, T. T.; YOUSSEF, N. H.; MCINERNEY, M. J.; SABATINI, D. A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, n.42, p.1735 – 1743, 2008.

65. KAPADIA, S.; G, YAGNIK, B. N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v.4, n.1, p.1–8, 2013.

66. A JARVIS, F.G.; JOHNSON, M. J. Aglycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, n.71, p.4124-4126,1949.

67. ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J. Trehalose containing glycolipids. **Progress in the Chemistry of Fats end other Lipids**, v.16, p.59-99, 1978.

68. GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p.155–166, 2005.

69. HU, Y.; JU, L. K. Purification of Lactonic Sophorolipids by Crystallization. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 263–272, 2001.

70. ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p.154-162, 1999.

71. ARIMA, K.; KAKNUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.31, p.488-494, 1968.

72. ZOSIM, Z.; GUNTICK, D. L.; ROSENBERG, E. Properties of hydrocarbon in water emulsion. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p.281– 292, 1982.

73. CIRIGLIANO, M.; CARMAN, G. Isolation of a bioemulsifier from Candida lipodytica. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.4, p.747–750, 1984.

74. MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**, v.40, p.533-540, 2006.

75. DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v.7, p.64-646, 2004.

76. NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 252-259, 2007.

77. DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiological Molecular Reviews**, v.61, n.1, p.47-64, 1997.

78. CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.520-529, 1998.

79. GEORGIOU, G.; LIN, S.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnology***,* v.10, n.1, p.60-65, 1992.

80. CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3634 -3640, 2009.

81. PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da Produção de Biossurfactantes Utilizando Hidrocarbonetos**. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológica) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

82. SINGH, A.; HAMME, J. D. V.; WARD, O. P. Possible food and agricultural applications of microbial surfactants: an assessment. Biosurfactants and biotechnology**. Biotechnology Advances**, p. 99-121, 2007.

83. BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Apllied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

84. OLIVEIRA, J. C. P.; SOUZA, R. B. Análise da gestão dos resíduos gerados na troca de óleo lubrificante automotivo: em estudo de caso na cidade de Cabo Frio-RJ. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v.6, p.971-985, 2015.

85. Agência Nacional do Petróleo. Coleta de óleos lubrificantes usados ou contaminados. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em 26 de Abril de 2014.

86. DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Frying process: selection of fats and quality control. In: **International meeting on fats & oils technology symposium and exhibition**. 1991. p. 58-66.

87. DIB, F. H. **Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um moto-gerador**.2010. 118f. Dissertação (mestrado em Engenharia mecânica) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Ilha Solteira, 2010.

88. DOMINGUES, O. **Origem e introdução da palma forrageira no Nordeste**. Recife: Instituto Joaquim Nabuco de Pesquisas Sociais, 1963, 73p.

89. VASCONCELOS, A. G. V. et al. Micropropagação de palma forrageira cv. Miúda (*Nopalea cochenillifera - Salm Dyck*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, n. 1, p. 28-31, 2007.

90. MELO A. A. S. et al. Substituição parcial do farelo de soja por ureia e palma forrageira (*OpuntiafícusindicaMill*) em dietas para vacas em lactação: I. desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 727-736, 2003.

91. FARIAS, I. et al. Manejo de colheita e espaçamento da palma-forrageira em consórcio com sorgo granífero, no agreste pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.341-347, 2000.

92. SILVA, G. S. et al. Desempenho agronômico de algodão orgânico e oleaginosas consorciados com palma forrageira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.9, p.975–981, 2013.

93. MAGALHÃES, M.C.S. et al. Inclusão de cama de frango em dietas à base de Palma Forrageira (*Opuntia ficusindica Mill*) para vacas mestiças em lactação. 1. Consumo e produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1897-1908, 2004.

94. CUNHA, D. N. F. V. et al. Morfometria e acúmulo de biomassa em palma forrageira sob doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.4, p.1156-1165, 2012.

95. MATTOS, L. M. E. et al. Associação da palma forrageira (*Opuntia fícus indica Mill*) com diferentes fontes de fibra na alimentação de vacas 5/8 Holandês-Zebu em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.2128-2134, 2000.

96. SOSA. M. Y. et al. Diferentes formas de fornecimento de dietas à base de palma forrageira e comportamento ingestivo de vacas da raça holandesas em lactação. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 2, p. 261-268, 2005.

97. MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) -Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

98. PIMENTA, E. F. **Investigação das condições de crescimento e produção de metabólitos secundários das linhagens de fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium oxalicum***. 2010. 195f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

99. KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* pecies and their teleomorphs**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988.

100. FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

101. TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

102. OLIVEIRA, C. M. **Estudo químico e biológico dos fungos endofíticos associados com a espécie vegetal *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae).** 2009. 288f. Tese (Doutorado em Química) -Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.

103. CLEMMENSEN, L. H.; HANSEN, M. E.; FRISVAD, J. C.; ERSBØLL, B. K. A method for comparison of growth media in objective identification of *Penicillium* based on multi-spectral imaging. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n.2, p. 249-255, 2007.

104. http://show.wnmu.edu/microfungi/showGallery.php?div=Anamorphic&gen=Penicilliu m&spec=sp&id=1567 , acessado em 14/07/2015.

105. PALLU, A. P. S. Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. 2010. 129f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

106. CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L.-C. Production of Extracellular Lipases by Penicillium cyclopium Purification and Characterization of a Partial Acylglycerol Lipase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.64, n.2, p. 215–222, 2000.

107. BANCERZ, R.; GINALSKA, G.; FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9′. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.6, p. 253–260, 2005.

108. LI, N.; ZONG, M.-H. Lipases from the genus Penicillium: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 66, n. 1-2, p. 43–54, 2010.

109. 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, 2011**.**

110. MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechology**, v.68, p.61-138, 2000.

111. SILVA, D. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicillium viridicatum RFC3* em fermentação em estado sólido e submersa**. 2006, 158f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2006.

112. MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Overview of solid state bioprocessing. **Biotechnology Annual Reviews**, v.8, p.183-225, 2002.

113. COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v.76, n.3, p.291-302, 2006.

114. PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, n.724, p.17-20, 2006.

115. OLIVEIRA, A. C. **Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangífera índica L.*)**. 2013. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) -Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

116. MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. **The bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena**. In: Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. Ed. Springer, p.13-32, Heidelberg, 2006.

117. PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes**. Current Science**, v.77, n.1, p.149-162, 1999.

118. AMORIM, G. M. **Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal.** 2011. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.

119. LONSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, n.6, p.258-265, 1985.

120. SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 151f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

121. DEL BIANCHI, V. L., MORAES, I. O., CAPALBO, D. M. F. **Biotecnologia industrial: Fermentação em Estado Sólido.** São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v.2. 2001.

122. SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - instituto de tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

123. NEI, P.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia**, v.1. Escola de Química - UFRJ, Rio de janeiro, 62p. 2008.

124. CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 460 p. 1997.

125. PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, n.2-3, p. 81-84, 2003.

126. SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.40, n.8, p. 2689–2694, 2005.

127. DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C.E. **Solid substrate cultivation**. Essex: Elsevier Science Publishers, 1992.

128. SINGHANIA, R, R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.44, n.1, p.13-18, 2009.

129. GONÇALVES, A. Z. L. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais**, **visando potencial aplicação na produção animal**. 2010. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2010.

130. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. D. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (a) **Biotecnologia Industrial**. Volume 2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 247-270, 2001.

131. SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, n.1, p.1-18, 2003.

132. BORGSTON, B.; BROCKMAN, H. L. **Lipases**. Elsevier. Amsterdam. 1984.

133. PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.135-140, 2003.

134. JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology***,* v. 53, p.315-351, 1999.

135. GHALY, A. E.; DAVE, D.; BROOKS, M. S.; BUDGE, S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology***,* v. 6, n.2, p. 54-76, 2010.

136. MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.2, p.213-234, 2011.

137. SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods in enzymology**, v.284, p.85-107, 1997.

138. ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J. A.; FERNANDEZ, S.; OOSTERHOUT, D. V.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1761, n.9, p.995-1013, 2006.

139. JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, n.9, p. 396–403, 1998.

140. HOLMQUIST, M. Alpha/beta - hidrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. **Current protein & peptide science**, v.1, n.2, p.209-235, 2000.

141. GOMIDE, F. T. F. **Otimização de produção, purificação e caracterização parcial de lipases produzidas pela levedura Moniliella spathulata R25L270**. 2012. 241f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

142. JAEGER, K.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M. V.; MISSET, O. Bacterial Lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n.1, p.29-63, 1994.

143. ALMEIDA, R. V. **Clonagem, expressão, caracterização e modelagem estrutural de uma esterase termoestável de *Pyrococcus furiosus***. 2005. 109f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia química) - Programa de Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

144. MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, n.6-7, p.426-431, 2009.

145. BEZERRA, M. A. **Aplicação de matriz de Doehlert na otimização de um sistema de pré-concentração em linha para determinação de cobre usando Espectrometria de absorção atômica com chama**. 2003. 95f. Dissertação (mestrado em ciências – química) – Câmara de Pós-graduação e Pesquisa Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

146. PAIVA, A. P. **Metodologia de superfície de resposta e análise de componentes principais em otimização de processos de manufatura com múltiplas respostas correlacionadas**. 2006. 257f. Tese (Doutorado em Engenharia

Mecânica) - Instituto de Engenharia Mecânica, Universidade Federal De Itajubá, Itajubá, 2006.

147. CECON, P. R.; SILVA, A. R. **Introdução à metodologia de superfície de resposta**. Apostila, Departamento de Estatística – Métodos Estatísticos II, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS *PENICILLIUM* SP. E *ACYTOSTELIUM* SP. EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FUNGOS *PENICILLIUM* SP. E *ACYTOSTELIUM* SP. EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

RESUMO: O crescimento de fungos filamentosos em meios de cultura contendo hidrocarbonetos é uma condição importante para produção de biossurfactantes. Para isso é necessário estudar o desenvolvimento desses micro-organismos no meio, otimizando as condições nutricionais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento dos fungos P*enicillium e Acytostelium* em meios com diferentes fontes de carbono, através do diâmetro da colônia e da variação do pH do meio de cultivo. O delineamento experimental foi constituído de seis tratamentos (glicerina, óleo de fritura - OF, óleo de soja puro, hexano, tolueno, lubrificante residual - LR) disponíveis em meio de cultura e 5 repetições. As variáveis consideradas para avaliação da resposta aos tratamentos foram: crescimento do fungo (mensurado pelo diâmetro da colônia) e pH do meio (obtido antes e após cultivo do fungo, 72 horas). Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$), utilizamos o software BioEstat 5.1. Os fungos tiveram maior crescimento e variação de pH nos meios com OF e LR os quais foram considerados substratos adequados para cultivo desses micro-organismos, sendo fontes de baixo custo, podendo dessa forma serem substratos interessantes para estudos de produção de biossurfactantes e lipases.

Palavras-chave: Fontes de carbono, crescimento microbiano, fungos filamentosos.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido crescente o interesse por surfactantes de origem microbiana – biossurfactantes [1]. A diversidade destes compostos e suas propriedades químicas os tornaram relevantes em vários segmentos; proporcionando sua aplicação nas indústrias de alimentos, agrícola, construção, bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêutica e cosmética [2, 3].

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam propriedades tensoativas, podendo difundir-se em interfaces entre fases fluidas, com diferentes graus de polaridade óleo/água, água/óleo [1] exibindo várias propriedades funcionais como: baixa toxidade, biodegradabilidade, tolerância à temperatura, pH e força iônica.

Bactérias, fungos filamentosos e leveduras possuem habilidade de degradar substratos como o petróleo e seus derivados [4] através de agentes surfactantes que auxiliam a disponibilizar esses compostos à célula microbiana por meio de emulsões formadas. Dessa forma, o crescimento desses micro-organismos em meios de cultura que dispõe de hidrocarbonetos consiste em um possível emprego dos mesmos na produção de biossurfactantes, em processos de biorremediação e no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos [5]. A otimização das condições de produção, reforça o interesse em estudar o desenvolvimento de micro-organismos produtores de biossurfactante, ajustando condições nutricionais favoráveis à produção da biomolécula.

Bactérias e fungos também possuem habilidade de produzir lipases. Sendo os fungos os preferidos produtores industriais das lipases [6]. Na produção de lipases a partir de fungos, os substratos lipídicos atuam como indutores em muitas espécies [6, 7]. Além disso, hidrocarbonetos de petróleo têm sido mencionados como substratos potenciais para a produção microbiana de várias enzimas comerciais importantes [6, 8].

As lipases microbianas são valiosas para a aplicação biotecnológica, o principal motivo é a versatilidade de suas propriedades [9, 10]. Essas aplicações são em segmentos como: indústrias de alimentos [11], de detergentes [9], na biotransformação de óleos e gorduras [12], obtenção de fármacos [13], tratamento biológico de águas residuárias [14] e aceleração da biodegradação de polímeros [15].

A composição do meio de cultura com proporções exatas de fontes de Carbono, Nitrogênio, Fósforo, vitaminas e micronutrientes, considerando o tipo e a concentração utilizada são fatores decisivos para o crescimento e esporulação dos micro-organismos [16]. Aliado a isso, fatores como pH, temperatura, aeração e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante [17] e enzimas como lipase produzidos.

O cultivo de fungos *in vitro* tem a finalidade de identificar as condições ótimas de crescimento do micro-organismo em relação a meios de cultura, temperatura e tempo de incubação [18, 19].

O uso de meio de cultura sólido para avaliação do crescimento de fungos é considerado adequado, pois, na natureza, os fungos comumente desenvolvem-se em substratos sólidos, tais como resíduos vegetais e animais ou no solo [19]. Além disso, apesar de existir muitas técnicas atuais disponíveis para estudar eventos celulares, existem metodologias muito simples destinadas a realização desses eventos em meios sólidos, sendo interessantes, pois podem gerar informações útil em curto período de tempo [16, 20, 21].

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o crescimento dos fungos P*enicillium e Acytostelium* em meios com diferentes fontes de carbono, através do diâmetro da colônia e da variação do pH do meio de cultivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos micro-organismos

Os fungos utilizados no presente trabalho foram *Penicillium* e *Acytostelium*. Estes micro-organismos foram isolados a partir do material vegetal coletado no Parque Municipal da Matinha, na cidade de Itapetinga-BA, em seguida foram purificados e estocados em sílica, empregando metodologia de Chapla e colaboradores (2013) [22], com adaptações. Os isolados foram identificados no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, a partir das estruturas morfológicas e reprodutivas das colônias. As análises foram realizadas em Microscópio (BIOVAL), de acordo com Arx (1981), Pitt (1985) e Dugan (2006) [23, 24, 25].

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi constituído de seis tratamentos (distintas fontes de carbono disponíveis no meio de crescimento dos fungos) e 5 repetições. As variáveis consideradas para avaliação da resposta aos tratamentos foram:

crescimento do fungo (mensurado pelo diâmetro da colônia) e pH do meio (obtido antes de autoclavar e após cultivo do fungo, 72 horas).

Os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$), utilizamos o software BioEstat 5.1.

Composição do meio de cultura

Os fungos foram inoculados em seis meios de cultura distintos, variando a fonte de carbono. Os meios foram compostos por Potato Dextrose Agar (HIMEDIA) – PDA e 1% das seguintes fontes de carbono: Glicerina (VETEC) (G), Óleo de Fritura (OF), Óleo de Soja Puro (OSP), Hexano (FMAIA) (H), Tolueno (VETEC) (T) e Lubrificante Residual (LR).

Procedimentos experimentais

Os meios de cultura foram distribuídos em placas de petri, em volumes iguais. O pH inicial dos meios de cultura foi em média 5,85; aferido antes de serem autoclavados e inoculados. Foram inoculadas linhagens de *Penicilium* e *Acytostelium* de maneira equidistantes em cada placa de petri. As placas com os micro-organismos foram incubadas em BOD (TECNAL) a 37 °C, por 72h. Após esse tempo de cultivo, foram feitas as medidas dos diâmetros das colônias que cresceram nas placas. Cada colônia foi recolhida em tubos falcon, em seguida foi adicionado 6 mL de água destilada e autoclavada. Posteriormente as colônias foram maceradas com bastão de vidro e logo após agitados em vortex (PHOENIX – AP 56). Em seguida foi aferido o pH final das colônias em pHmetro (QUIMIS) [16].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que os fungos tiveram melhor crescimento nos meios com OF e LR (Figura 2.1), pois os diâmetros dos dois fungos e a variação do pH do meio, foram maiores para os meios contendo essas duas fontes de carbono (tabela 2.1).

Figura 2. 1. Placas contendo meio de cultura, fontes de carbono estudadas (Glicerina - G, Óleo de Fritura - OF, Óleo de Soja Puro - OSP, Hexano - H, Tolueno - T, Lubrificante Residual - LR) e os micro-organismos (1 – *Penicillium*, 2 - *Acytostelium*).

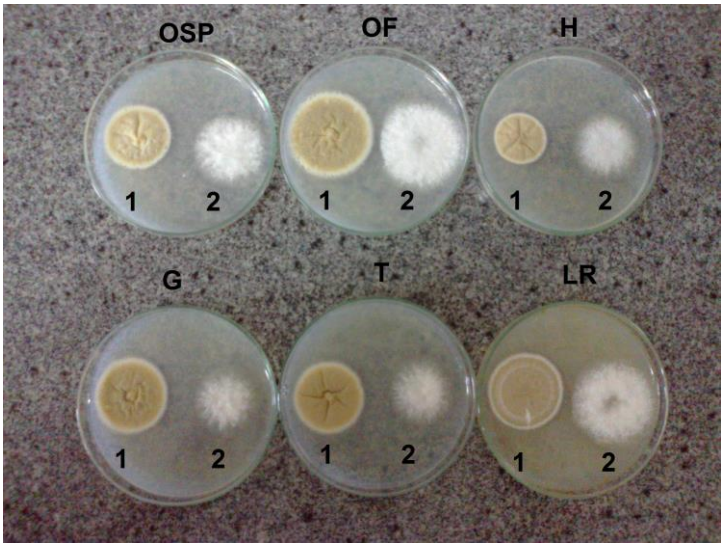


Tabela 2. 1. Valores do pH antes do inóculo, médias do pH e do diâmetro das colônias após o crescimento de cada espécie nos meios de cultura com suas respectivas fontes de carbono.

Fonte de C	pH inicial	pH final		Diâmetro (cm)	
		P	A	P	A
H	5,83	3,66 ± 0,11	4,70 ± 0,08	2,72 ± 0,16	3,45 ± 0,34
OSP	5,75	3,67 ± 0,08	4,48 ± 0,11	3,52 ± 0,08	3,72 ± 0,41
OF	5,94	3,43 ± 0,08	3,96 ± 0,10	4,30 ± 0,12	4,38 ± 0,13
LR	6,10	3,62 ± 0,12	4,18 ± 0,07	3,72 ± 0,18	4,38 ± 0,05
T	5,65	3,70 ± 0,14	4,55 ± 0,38	3,76 ± 0,13	3,60 ± 0,19
G	5,84	3,64 ± 0,05	4,47 ± 0,06	3,74 ± 0,11	3,42 ± 0,31

P - *Penicillium*; A - *Acytostelium*; H – Hexano; OSP – Óleo de soja puro; OF – Óleo de Fritura; LR – Lubrificante residual; T – Tolueno; G – Glicerina.

Posteriormente os resultados foram tratados por análise de variância (ANOVA), a um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Verificou-se que, as medias encontradas para os diâmetros dos dois fungos após o crescimento, e para a variação de pH nos seis meios de cultura estudado, pelo menos uma é estatisticamente diferente das demais. Utilizou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para verificar quais médias são diferentes (Tabela 2.2).

Na tabela 2.2 são apresentadas as diferenças entre as médias do diâmetro das colônias e entre as médias de variação do pH dos dois fungos em cada meio de cultura com suas distintas fonte de carbono.

Tabela 2. 2. Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte de C	Penicillium		Acytostellium	
	Diâmetro	Δ pH	Diâmetro	Δ pH
H	C	C	B	B
OSP	**B**	C	B	B
OF	**A**	**AB**	**A**	**A**
LR	**B**	**A**	**A**	**A**
T	**B**	**B**	B	B
G	**B**	**B**C	B	B

Letra iguais nas colunas tem médias iguais entre si.

As médias encontradas para os diâmetros do *Penicillium* foram de 4,3 (±0,12) e 3,72 (±0,18) para OF e LR, respectivamente. Segundo o teste de Tukey a média do OF é estatisticamente diferente das demais, já a do LR é estatisticamente igual à do T, G e OSP.

Por sua vez, a variação do pH desses dois meios (OF e LR com *Penicillium*) foram 2,17 (±0,08) e 2,25 (±0,12), respectivamente, sendo estatisticamente iguais entre si. O LR é diferente dos demais e o OF igual a T e G.

Com isso o OF e o LR serão usados em estudos posteriores como possível fonte de carbono na produção de biossurfactante e lipase utilizando *Penicillium*. Apesar do crescimento desse fungo ser estatisticamente igual em LR, OSP, T e G; é vantagem o uso do LR, o qual é um resíduo muito produzido e que pode causar uma grande demanda de poluição. Logo o LR pode ser reaproveitado para estudos de produção de biossurfactantes e lipase.

As médias encontradas para os raios de *Acytostelium* foram de 4,38 (±0,13) e 4,38 (±0,05) para OF e LR, respectivamente, sendo estatisticamente iguais entre si e diferente das demais. Por sua vez, a variação do pH desses dois meios (OF e LR) foram 1,64 (±0,10) e 1,69 (±0,07), respectivamente, sendo estatisticamente iguais entre si e diferente das demais.

Assim, o OF e o LR também podem ser usados em estudos posteriores como fonte de carbono para produção de biossurfactante e lipase utilizando *Acytostelium*, pois nessas fontes de carbono o micro-organismo apresentou melhor crescimento.

A maior variação do pH e maior crescimento que aconteceu nos meios suplementados por OF e LR para ambos fungos, ocorreu por causa da melhor adaptação desses micro-organismos ao meio de cultivo com essas fontes de

carbono. Além disso, foi possível observar que o crescimento microbiano é diretamente proporcional a mudança do pH do meio de cultivo.

Isso ocorre porque o fungo em seu metabolismo secreta enzimas extracelulares que degradam compostos para obtenção de carbono, nitrogênio, enxofre e outros nutrientes [26, 19] e transportam para o ambiente intracelular [27, 28]. Assim, durante a atividade microbiana há um aumento no nível protéico, consumo de carbono, alterações no pH do meio, entre outros fatores [29].

Portanto, com a presença das enzimas produzidas por esses micro-organismos é demonstrado nas análises uma queda do pH em todos os meios de cultivo testados. Além disso, essas enzimas foram capazes de degradar todas as fontes de carbono utilizadas nos ensaios. No entanto, os micro-organismos tiveram uma melhor adaptação aos meios suplementados por OF e LR. A partir disso infere-se que esse fenômeno está relacionado às estruturas mais simples desses hidrocarbonetos, tornando-os mais acessíveis a ação das enzimas.

Percebe-se ainda que a utilização de determinado composto na nutrição microbiana depende da habilidade genética do micro-organismo para sintetizar a enzima necessária, degradar o composto disponível bem como a habilidade de monitorar o meio externo e encontrar o melhor ambiente para seu desenvolvimento [16, 20, 30, 31].

CONCLUSÕES

De acordo com o estudo realizado os meios de cultivo contendo OF e LR são substratos adequados para cultivo de *Penicillium e Acytostelium*. Esses estudos potencializam ações para possível produção de biossurfactantes e lipases a partir de substratos de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro da FAPESB e a bolsa concedida pela CAPES.

REFERENCIAS

1. MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133 n. 2, p.183-198, 2005.

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

3. SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, p. GEBJ–29, 2011.

4. PERFUMO, A.; BANAT, I.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO2-1. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, n.1, p.132-138, 2006.

5. KARAMALIDIS, A.K.; EVANGELOU, A.C.; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A.I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E.A. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. **Bioresource Technology,** v.101, n. 16, p.6545-6552, 2010.

6. MARTINS, 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. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.

7. LONG, K.; GHAZALI, H. M.; ARIFF, A.; AMPON, K.; BUCKE, C.; Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* link: Pattern and factors involved in its production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.67, n.2, p,157-163, 1996.

8. ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbons - new markets. **Trends in Biotechnology**. v.11, n.10, p.419-424, 1993.

9. HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

10. MENONCIN, S. et al., Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando Penicillium verrucosum em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.440-443, 2009.

11. SANTOYO, A. B.; RODRÍGUEZ, J. B.; MARTÍN, M. F. M.; MORTE, M. C. M.; MEMBRILLERA, G. V. G.; REQUENA, S. O.; Biosynthesis of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) with Rhizopus arrhizus lipase. **Journal of Biotechnology**, v.131, n.2, p.S82, 2007.

12. PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, 93-99, 2006.

13. CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESENI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial De Biocatálise Enantiosseletiva De Lipases Microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, p.614-621, 2005.

14. CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease contente. **Bioresource Technology**, v.97, n.17, p.2195-2210, 2006.

15. MARTEN, E.; MULLER, R. J.; DECKWER, W. D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. **Polymer Degradation Stability**, v.80, n.3, p.485-501, 2003.

16. FREITAS, J. S.; SILVA, E. M.; ROSSI, A.; Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. **Gentics and Molecular Research**, v.6, n.2, p. 721 – 729, 2008.

17. CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3634 -3640, 2009.

18. HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, n.1, p.71-74, 2001.

19. CAMPOS, C. S.; ANDRADE, M.C.N. Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.539-543, 2010.

20. THEDEI JUNIOR, G.; ROSSI, A. Identification of non-specific alkaline phosphatases in hyphal cells of the fungus *Neurospora crassa* by *in situ* histochemistry. **Genetics Molecular and Research**. V.5, n.3, p.483-486, 2006.

21. ANHÊ, A.C.; LIMA-OLIVEIRA, A. P.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. Acid phosphatase activity distribution in salivary glands of triatomines (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Genetics and Molecular Reserch,** V.6, n.1, p.197-205, 2007.

22. CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R.; Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, p. 421-437, 2013.

23. ARX, J. A. VON. **The genera of fungi sporulating in pure culture**, 3rd Ed. J. Cramer, Vaduz, Germany, 1981.

24. PITT, J. I.; **A laboratory guide to common Penicillium species**, Academic Press, Australia, 1985.

25. DUGAN, F.M. **The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction With Keys Glossary and Guide to Literature**. APS. Press, St. Paul. Minnesota, USA. 2006.

26. DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J.S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. ***Arquivos do Instituto Biológico***, v.72, n.3, p.331-338, 2005.

27. BATEMAN, D. F.; BASHAM, H.G. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. **Physiological and molecular plant pathology,** v.4, p.316-355, 1976.

28. SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**. V.20, n.3, p.649-655, 2006.

29. SAVOIE, J-M; BRUNEAU, D.; MAMOUN, M. Resource allocation ability of wild isolates of *Agaricus bisporus* on conventional mushroom compost. **FEMS Microbiology Ecology***.* v.21, p.285-292, 1996.

30. ARST, H. N. JR, BIGNELL, E.; TILBURN, J. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. **Molecular and General Genetics**, v.245, n.6, p.787-790, 1994.

31. MACCHERONI, W. JR.; POMBEIRO, S.R.C; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. pH and acid phosphatase determinations after growth of *Aspergillus nidulans* on solid medium. **Fungal Genetics Newsletter***.* v.38, p.78-79, 1991.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO E CARACTERISAÇÃO DE LIPASE POR *PENICILIUM* SP. UTILIZANDO FES

PRODUÇÃO E CARACTERISAÇÃO DE LIPASE POR *PENICILIUM* SP. UTILIZANDO FES

Resumo: Os fungos são os preferidos como produtores industriais de lipases, comparado com bactérias e leveduras, pois as enzimas produzidas por estes normalmente são extracelulares, o que facilita a extração do meio fermentado. As lipases microbianas são valiosas para a aplicação biotecnológica, devido principalmente a versatilidade de suas propriedades. São aplicadas em segmentos como: indústrias de alimentos, de detergentes, na biotransformação de óleos e gorduras, obtenção de fármacos, tratamento biológico de águas residuárias, aceleração da biodegradação de polímeros, etc. O objetivo desse trabalho foi estudar a produção de lipase por *Penicillium*, utilizando resíduos oleosos como fonte alternativa de carbono e a palma forrageira como substrato de baixo custo na FES, além das condições ótimas de produção, a purificação parcial e a caracterização da enzima. As condições ótimas encontradas para a produção de lipase foram: tempo de 96h de fermentação e óleo lubrificante residual como indutor, com uma atividade específica de 0,22 UA/mg. A purificação parcial aumentou a atividade da lipase produzida, com fator de 5,88. A lipase manteve sua atividade na faixa de (62,39 a 53, 85%) a 60 °C durante 30 min e a 70 °C por 10 min. As constantes cinéticas encontradas foram K_m 9,93mM e V_{max} 2,51 UA/min. Os resultados mostraram que o *Penicilium* pode produzir lipase utilizando óleo de fritura e óleo lubrifcante residual e palma forrageira como fontes alternativas de baixo custo. Além disso, a atividade dessa enzima foi aumentada empregando técnica simples de purificação e também foi possível avaliar a termoestabilidade e os paramentros cinéticos dessa enzima.

Palavras chave: Palma forrageira, óleo lubrificante residual, óleo de fritura, fungos filamentosos.

INTRODUÇÃO

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 [1, 2]. Além disso, catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular) [1, 3, 4].

Essa enzima pode ser de origem animal (pancreática, hepática e gástrica), microbiana (bactérias e fungos) e vegetal [5]. Sendo que os fungos são os preferidos como produtores industriais de lipases porque suas enzimas normalmente são extracelulares, o que facilita a extração do meio fermentado [5, 6].

Pesquisas com Fermentação em Estado Sólido (FES) têm apresentado maiores produções de lipases, quando comparada com a fermentação submersa; esta vantagem é atribuída à alta taxa de crescimento da biomassa e à baixa atividade proteolítica [5, 7].

Além disso, a FES é um processo simples e econômico, onde podem ser utilizados vegetais ou resíduos agroindustriais como substrato e resíduos oleosos como fonte alternativa de carbono. Utilizam baixos volumes de água, equipamentos simples, baixa demanda de energia e maior concentração de produto é obtido [8, 9, 10].

As lipases microbianas são valiosas para a aplicação biotecnológica, o principal motivo é a versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática, especificidade pelo substrato e facilidade de produção em grandes quantidades [2, 11].

Essas aplicações são em segmentos como: indústrias de alimentos [12], de detergentes [11], na biotransformação de óleos e gorduras [13], obtenção de fármacos [14], tratamento biológico de águas residuárias [15] e aceleração da biodegradação de polímeros [16].

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a produção de lipase por *Penicillium*, utilizando resíduos oleosos como fonte alternativa de carbono e a palma forrageira como substrato de baixo custo na FES, além das condições ótimas de produção, a purificação parcial e a caracterização da enzima.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do suporte para FES

A Palma forrageira utilizada como substrato no processo de FES foi coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Campus de Itapetinga. Após coleta a palma foi lavada e cortada, em seguida foi seca em estufa de secagem (SOLAB SL 102) a 65 ºC durante 24h e triturara em moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulometria próxima de 2 mm [17].

Obtenção do micro-organismo

O micro-organismo utilizado nos experimentos foi a cepa do fungo filamentoso *Penicillium*. Isolado a partir do material vegetal coletado no Parque Municipal da Matinha, na cidade de Itapetinga-BA. Cedida pelo Laboratório de Genética Molecular Aplicada da UESB.

Preparo do inóculo para a fermentação

O *Penicillium* foi inoculado a 30 ºC por 7 dias, em PDA (HIMEDIA) com 1% de indutor (óleo lubrificante residual ou óleo de fritura). A cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC) a 0,01%. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (BIOVAL), a concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/grama de meio sólido [18].

Condições de fermentação

O meio de cultivo foi composto por 10g de farelo de palma forrageira a 60% de umidade e 0,980 de atividade de água (a_w), foi utilizado tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0 para umedecer o substrato e 1% de ureia como fonte de nitrogênio. Foi comparada duas fontes adicional de carbono óleo Lubrificante residual e óleo de fritura na concentração de 1% (p/p). As fermentações foram realizadas em BOD (TECNAL) a 30 ºC, foi avaliado o tempo de fermentação de 24h a 120h.

Obtenção do extrato enzimático

Após a fermentação, foi adicionado tampão fosfato de sódio 50mM pH 7, na proporção de 1:5 (5mL de tampão por grama fermentada). Em seguida as amostras foram submetidas à agitação em incubadora Shaker refrigerada (SOLAB) a 200 rpm

e 35 °C por 20 min. Posteriormente passaram por prensagem mecânica para obtenção do extrato enzimático bruto, por fim o extrato foi centrifugado em centrífuga (TECNAL) a 3000 rpm por 5 min.

Purificação parcial do extrato enzimático bruto

No extrato enzimático bruto foi adicionado sulfato de amônio a 70% de saturação. A mistura foi agitada por 10 min e ficou em repouso por 15h sob refrigeração (4 °C). Em seguida o extrato foi centrifugado em centrífuga (TECNAL) a 5000 rpm durante 10 min. O precipitado foi suspenso em tampão fosfato de sódio 50mM pH7, 10% do volume inicial do extrato.

Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade de lipase foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Winkler e Stukmann (1979) [19], com adaptações. A atividade foi determinada através da quantificação de *p*-nitrofenol (*p*-NP), a partir da curva padrão. Foram preparadas duas soluções A e B, solução A: 60 mg de *p*-NPP (Sigma-Aldrich) em 20mL de álcool iso-propílico (BIOTEC), solução B: 4g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 0,4g de goma arábica (SYNTH) em 200mL de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 7. Nos ensaios reacionais foi utilizado 1mL da solução A, 9mL da solução B e 1mL do extrato enzimático. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho maria (SOLAB SL - 150/4A) a 40 °C durante 10 min. O branco foi submetido ao mesmo procedimento, no entanto foi adicionado tampão no lugar do extrato enzimático. Em seguida foi adicionado 1mL de carbonato de sódio 1M (Sigma-Aldrich) para finalizar a reação. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (GEHAKA UV – 340G) a 410nm. A unidade de 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 1.

$$UA = \frac{concentração\ enzimática}{tempo(min)} \qquad (1)$$

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

Determinação de proteína total e atividade específica

A concentração de proteína foi realizada no extrato enzimático bruto e no extrato parcialmente purificado de acordo o método proposto por Bradford (1976) [20], 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.

Determinação da termoestabilidade enzimática

A termoestabilidade foi avaliada incubando o extrato bruto em diferentes temperaturas (60, 70 e 80 °C) por 40 min, foi retirada alíquotas das amostras a cada 10 min de incubação e em seguida foram submetidas às análises de atividade enzimática conforme já descrito.

Determinação dos parâmetros cinéticos

Para a determinação das constantes cinéticas da lipase (K_m *e* V_{max}), as concentrações do substrato *p*-NPP foi variada de 1,32 a 13,24mM para determinação da atividade enzimática conforme já descrito. Os valores de K_m *e* V_{max} foram calculados a partir da equação da curva de Lineweaver-Burk.

Planejamento experimental

Foi realizado um Delineamento Doehlert e aplicada a metodologia de superfície de resposta para obter condições ótimas de produção de lipase pela FES. Para isso foi avaliado a influência de duas variáveis independentes, tipo de fonte de carbono (3 níveis) e tempo (5 níveis) e uma variável dependente a atividade enzimática. Para estimativa do erro puro foi realizado três repetições no ponto central. O planejamento teve um total de nove ensaios. Na tabela 3.1 são apresentados os valores originais e codificados para cada variável e nível estudado.

Tabela 3. 1. Variáveis independentes e níveis com valores codificados e reais.

Variáveis	Níveis				
Tipo de indutor - X_1	0,866 OLR		0 OF	-0,866 SO	
Tempo (h) - X_2	-1	-0,5	0	0,5	1
	24	48	72	96	120

OLR = óleo lubrificante residual; OF = óleo de fritura; SO = sem óleo

Foi realizada análise de variância (ANOVA), para obter o resíduo puro e uma ANOVA de regressão com o teste para a falta de ajustamento da variável atividade específica de acordo com o modelo:

$$y = \beta_0 + \Sigma\beta_i X_i + \Sigma b_{ii} X_i^2 + \Sigma\beta_{ij} X_i X_j + \Sigma\beta_{ij} X_i X_j X_k + \varepsilon \qquad (2)$$

Onde, y é a variável predita, β_0 o intercepto; β_i o coeficiente linear, β_{ii} o coeficiente quadrático; o β_{ij} o coeficiente de interação, X_i, X_j e X_k são os valores codificados para os níveis das variáveis X_i, X_j e X_k e ε é o erro aleatório.

Foi testado os parâmetros da regressão, sendo considerados significativos quando $p < 0,1$. Na ANOVA foi utilizado o teste estatístico de Fisher (teste F). O software utilizado foi o programa *Statistica versão 8.0* (STATSOFT 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para otimização da produção de lipase, foi realizado um delineamento Doehlert, a partir da avaliação da atividade específica em função do tipo de indutor e tempo no processo da FES. A matriz desse delineamento é apresentada na tabela 3.2, com as respectivas respostas de atividade enzimática e específica encontradas.

Tabela 3. 2. Matriz do planejamento experimental, valores codificados e reais para cada variável independente e níveis, resposta encontrada para os respectivos ensaios.

Ensaio	X_1 (Indutor)	X_2 (Tempo - h)	Atividade enzimática (UA)	Atividade específica (UA/mg)
1	0,866 (OLR)	-0,5 (48)	5,65	0,22
2	0,866 (OLR)	0,5 (96)	5,61	0,22
3	0 (OF)	-1 (24)	4,17	0,16
4	0 (OF)	0 (72)	4,61	0,18
5	0 (OF)	0 (72)	4,00	0,16
6	0 (OF)	0 (72)	4,40	0,17
7	0 (OF)	1 (120)	5,09	0,20
8	-0,866 (SO)	-0,5 (48)	1,40	0,05
9	-0,866 (SO)	0,5 (96)	2,02	0,08

OLR = óleo lubrificante residual; OF = óleo de fritura; SO = sem óleo

Os valores de atividade enzimática e específica variaram de 1,40 a 5,65 UA/min e 0,05 a 0,22 UA/mg respectivamente.

Em seguida os resultados foram submetidos à ANOVA e análise de regressão com ($p < 0,1$).

Tabela 3. 3. ANOVA para os dados de atividade enzimática.

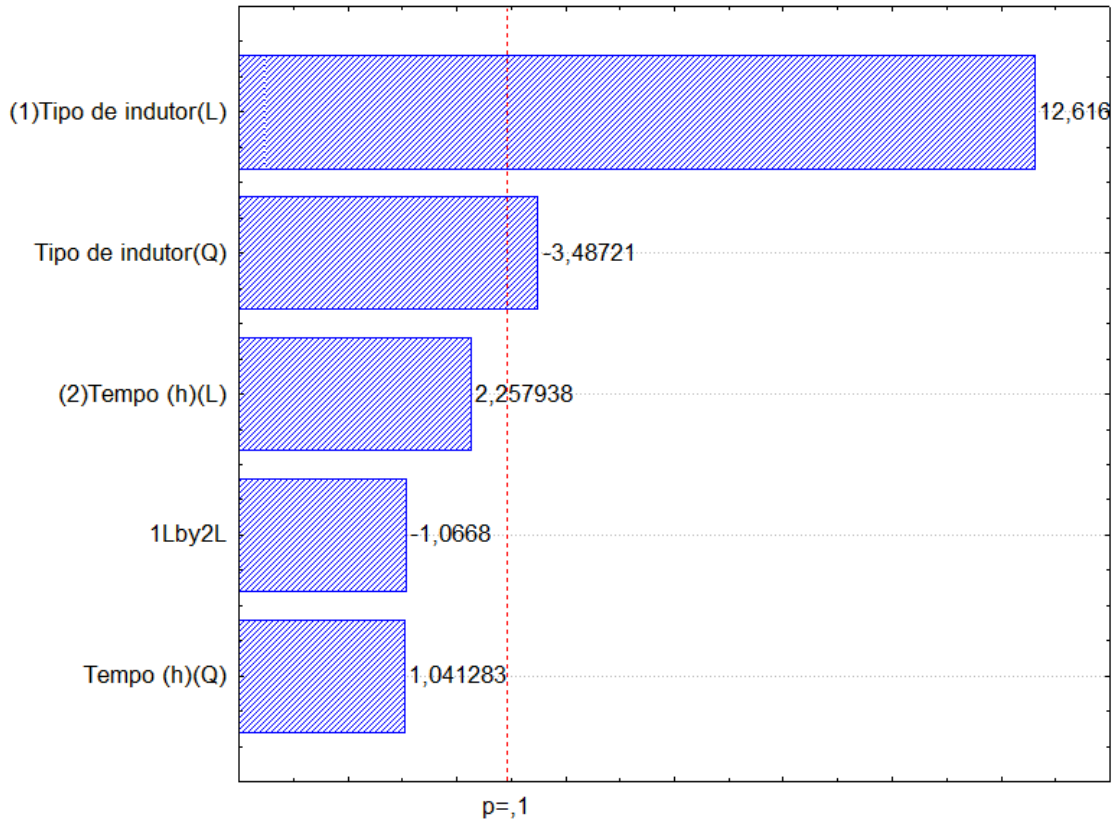
Fonte de variação	SQ	Gl	QM	F calculado	F tabelado	P
Regressão	0,027	5	0,005	49,417	5,309	0,001
Resíduo	0,000	3	0,000			
Falta de ajuste	0,000	1	0,000	0,193	8,526	0,703
Puro erro	0,000	2	0,000			
SQ total	0,027	8				
R^2	0,9880					

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

A variação devido aos parâmetros da regressão do modelo polinomial foi estatisticamente significativa ao nível de significância de 90% ($p < 0,1$). Portanto, o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado e ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,988 (98,88% da variação explicada) confirmando que o modelo é bem ajustado aos valores experimentais. Além disso, não apresentou falta de ajuste, ou seja, F calculado menor que F tabelado e ($p > 0,1$).

O resultado da ANOVA pode ser descrito no diagrama de pareto (figura 3.1). Onde é traçado em ordem decrescente a significância dos efeitos a 90% de probabilidade.

Figura 3. 1. Diagrama de pareto com os valores dos efeitos padronizados (t calculado) para o modelo e o valor tabelado.



O diagrama de pareto mostra que no processo de fermentação para a produção de lipase o tipo de indutor foi significativo, sendo o efeito linear de maior significância. Enquanto o tempo de fermentação e a interação entre as variáveis não apresentaram efeito significativo.

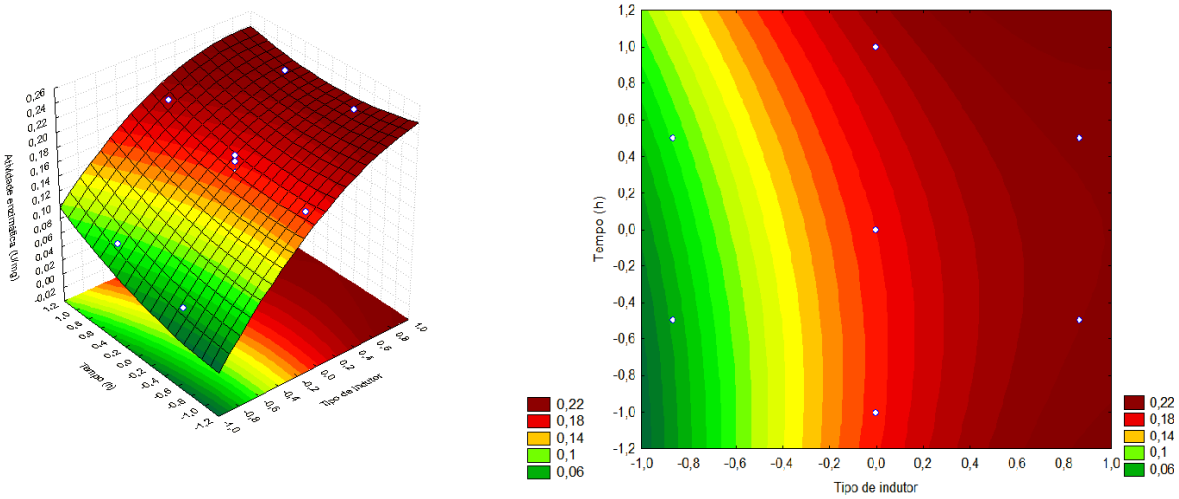
A partir das variáveis estudadas no processo, foi elaborado um modelo polinomial de segunda ordem, considerando apenas os paramentos significativos ($p < 0,1$), esse modelo é apresentado na equação 3, em termos de valores codificados:

$$AE = 0,170 + 0,089In - 0,039In^2 \qquad (3)$$

Onde, AE é a atividade enzimática e In o indutor.

Através do modelo matemático foi gerado o gráfico de superfície de resposta em função das variáveis independentes, tipo de indutor e tempo de fermentação (figura 3.2).

Figura 3. 2. Superfície de resposta e gráfico de contorno da atividade específica em função do tipo de indutor e tempo de fermentação.



As condições ótimas encontradas para produção de lipase na FES foi utilizando o OLR como indutor no tempo de 96h de fermentação. A atividade específica apresentada pelo modelo nessas condições é de 0,22 UA/mg, valor igual ao encontrado nessas condições de experimento.

Na produção de lipases a partir de fungos, os substratos lipídicos atuam como indutores em muitas espécies [5, 6]. Além disso, hidrocarbonetos de petróleo têm sido mencionados como substratos potenciais para a produção microbiana de várias enzimas comerciais importantes [5, 21].

Nesse trabalho, a produção de lipase por *Penicillium* na FES obteve um maior resultado nos meios contendo OLR como indutor. Esse comportamento pode estar relacionado com a estrutura química do OLR, a qual deve ser de mais fácil acesso para o ataque das ligações ésteres pela ação da lipase do que a estrutura do OF.

O tempo encontrado para a maior produção de lipase pode estar relacionado com a fase de crescimento que houve a maior absorção de nutrientes pelo micro-organismo, presentes no farelo da palma forrageira, na fonte de carbono e nitrogênio adicionada. Quando se reduz a quantidade de nutrientes disponíveis no meio, consequentemente há uma queda na geração de produtos [22].

O extrato enzimático bruto foi submetido a uma purificação parcial para aumentar a atividade da enzima produzida.

Na tabela 3.4 são apresentados os resultados dos valores de atividade enzimática, proteína total e atividade específica encontrados antes e após a purificação parcial do extrato enzimático bruto e o respectivo fator de purificação.

Com a purificação parcial foi possível aumentar 5,88 vezes a atividade da lipase produzida por P*enicillium*, com isso foram obtidos maiores valores de atividade enzimática e atividade específica. Essa técnica de purificação parcial além de ser simples e acessível mostrou-se útil e satisfatória.

Tabela 3. 4. Pré-purificação da lipase de *Penicillium*.

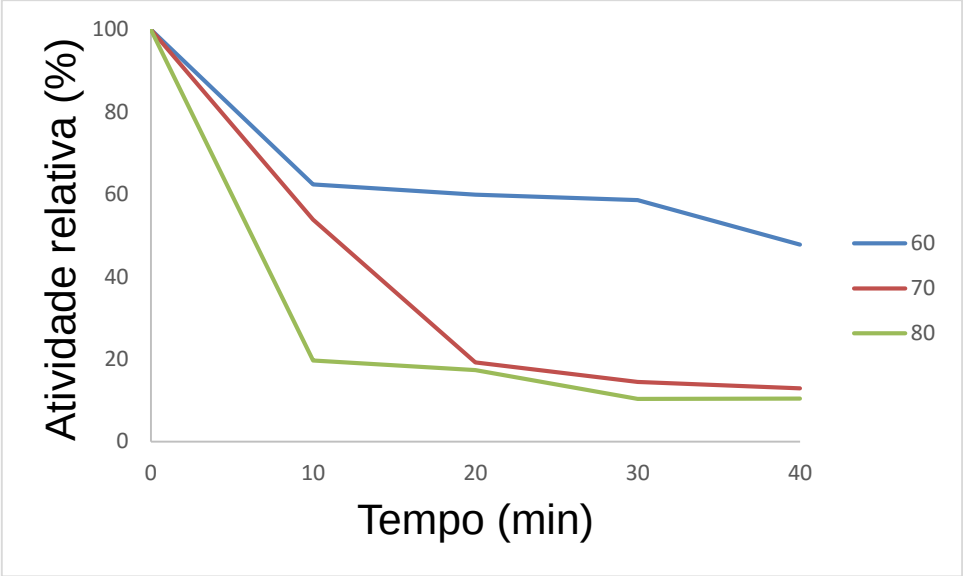
Extratos Enzimáticos	Atividade Total (UA)	Proteína (mg)	Atividade específica (UA/mg)	Fator de purificação
Bruto	2,31	25,44	0,09	
Purificado	3,40	6,36	0,53	5,88

A termoestabilidade da lipase de *Penicillium* foi testada na faixa de 60 a 80 °C durante 40 min.

Na figura 3.3, é apresentado o comportamento da atividade da lipase após tratamento térmico do extrato enzimático em diferentes temperaturas e tempo de incubação.

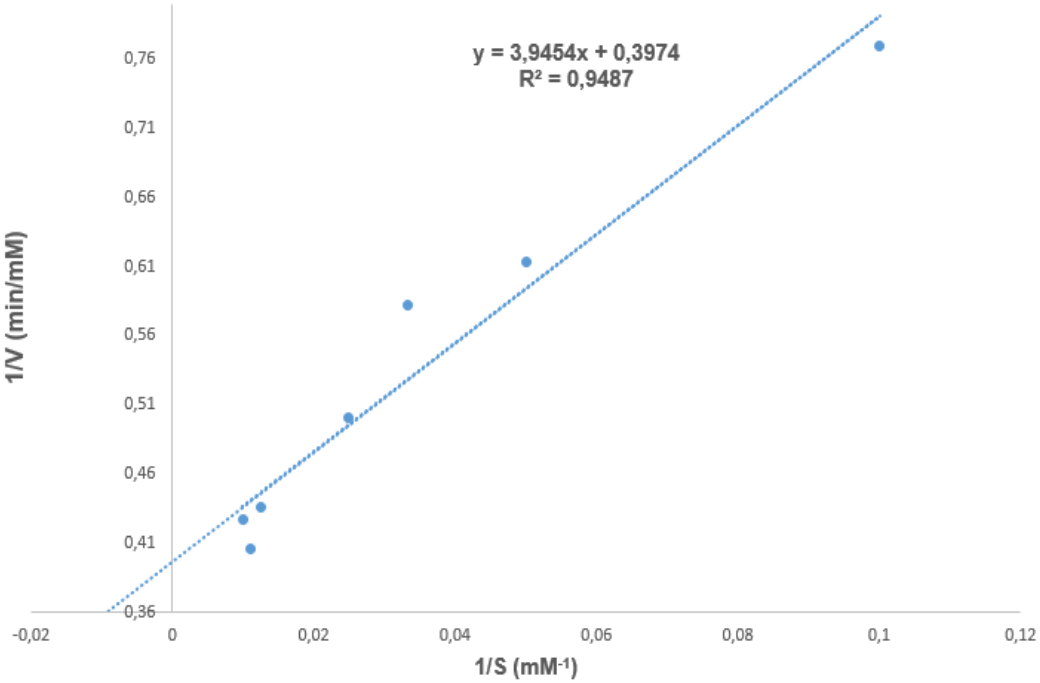
Foi observado que a 60 °C a enzima foi mais estável durante os primeiros 30 min de aquecimento, permaneceu com 62,39 a 58,57% de sua atividade. Em 70 °C e 10 min o percentual de atividade foi de 53,85%, em 20 min nessa mesma temperatura o percentual de atividade dessa enzima caiu para 19,21%. Já aos 80 °C e 10 min de incubação o percentual de atividade foi de 19,66 %. Portanto, a lipase de *Penicillium* pode ser aplicada nas condições de 60 °C por 30 min e a 70 °C por 10 min.

Figura 3. 3. Termoestabilidade da lipase de *Penicillium*.



Na figura 3.4, é apresentada a curva de Lineweaver-Burk. A partir da equação da reta foi calculado os valores de K_m e V_{max} da lipase estudada, sendo 9,93mM e 2,51 UA/min respectivamente.

Figura 3. 4. Curva de Lineweaver-Burk para a lipase de *Penicillium.*



A determinação dos valores de V_{max} e K_m são importantes numa reação enzimática. O valor de K_m indica a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o K_m maior a afinidade da enzima pelo substrato. O valor de V_{max} indica que todo o substrato está sendo utilizado pela enzima [23]. Lipases de diferentes organismos apresentam características distintas entre elas os parâmetros cinéticos. Em outros estudos com lipases foi encontrado valores maiores de K_m do que o encontrado nesse trabalho: Wang e colaboradores (2015) [24] encontraram 21,25mM para lipase de *Thermomyces lanuginosus*, Singh e Banerjee (2007) [25] encontraram 50mM para lipase de *Pseudomonas aeruginosa.* Portanto a lipase de *Penicillium* tem uma maior afinidade pelo substrato que essas lipases apresentadas.

Conclusão

As condições ótimas encontradas para a produção de lipase por *Penicillium* na FES foi no tempo de 96h de fermentação e OLR como indutor. A atividade específica para essas condições é de 0,22 UA/mg.

A purificação parcial contribuiu para aumentar a atividade da lipase, apresentando um fator de 5,88. Essa lipase pode ser aplicada a 60 °C durante 30 min e a 70 °C por 10 min. Os valores encontrados para as constantes cinéticas foram K_m 9,93mM e V_{max} 2,51 UA/min.

A aplicação do farelo de palma forrageira mostrou-se ser um substrato viável, além de ser uma fonte alternativa de baixo custo para produzir lipase a partir do *Penicillium* por meio da FES.

Agradecimentos

Ao suporte financeiro da FAPESB e a bolsa concedida pela CAPES.

Referências

1. SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v.52, n.1, p.1-18, 2003.

2. MENONCIN, S. et al., Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando Penicillium verrucosum em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.2, p.440-443, 2009.

3. REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: **A review. Advances in Colloid and Interface Science**, v.147–148, p.237–250, 2009.

4. MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.2, p.213-234, 2011.

5. MARTINS, 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. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.

6. LONG, K.; GHAZALI, H. M.; ARIFF, A.; AMPON, K.; BUCKE, C.; Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* link: Pattern and factors involved in its production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.67, n.2, p,157-163, 1996.

7. DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, 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**, v.39, n.5, p.1042-1050, 2006.

8. COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.101, n.21, p.8308–8314, 2010.

9. ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC** – UPF, v.6, n.2, p. 40-47, 2014.

10. GUSMÃO, R. O.; FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B.; ASSIS, F. G. V; LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus spp*. Sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v.10, n.11, 2014.

11. HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.235-251, 2006.

12. SANTOYO, A. B.; RODRÍGUEZ, J. B.; MARTÍN, M. F. M.; MORTE, M. C. M.; MEMBRILLERA, G. V. G.; REQUENA, S. O.; Biosynthesis of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) with Rhizopus arrhizus lipase. **Journal of Biotechnology**, v.131, n.2, p.S82, 2007.

13. PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, 93-99, 2006.

14. CARVALHO, P. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M.; CONTESENI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial De Biocatálise Enantiosseletiva De Lipases Microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, p.614-621, 2005.

15. CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease contente. **Bioresource Technology**, v.97, n.17, p.2195-2210, 2006.

16. MARTEN, E.; MULLER, R. J.; DECKWER, W. D. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. **Polymer Degradation Stability**, v.80, n.3, p.485-501, 2003.

17. SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.1, p.87-96, 2011.

18. SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by Aspergillus niger using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v.41, n.12, p.2210-2216, 2011a.

19. WINKLER, U.K. E STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol**., v. 3, p. 663-670, 1979.

20. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

21. ROSENBERG, E. Exploiting microbial growth on hydrocarbons - new markets. **Trends in Biotechnology**. v.11, n.10, p.419-424, 1993.

22. BIAZUS, J. P. M.; SOUZA, R. R.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Otimização da secagem do malte de Zea mays. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.4, p.787-792, 2006.

23. 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**, v.24, n.2, p.243-248, 2004.

24. WANG, X. Y; JIANG, X. P.; LI, Y.; ZENG, S.; ZHANG, Y. W. Preparation Fe3O4@chitosan magnetic particles for covalentimmobilization of lipase from Thermomyces lanuginosus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p.44-50, 2015.

25. SINGH, S.; BANERJEE, U.C. Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from Pseudomonas aeruginosa. **Process Biochemistry**, v.42, n.7, p.1063–1068, 2007.

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PENICILIUM* SP. EM BIOPROCESSO SÓLIDO UTILIZANDO ÓLEO LUBRIFICANTE RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *PENICILIUM* SP. EM BIOPROCESSO SÓLIDO UTILIZANDO ÓLEO LUBRIFICANTE RESIDUAL COMO FONTE DE CARBONO

RESUMO: Biossurfactantes são compostos que possuem aplicações potenciais em muitas áreas, pois são considerados não tóxicos e biodegradáveis. Atualmente, tem aumentado a necessidade de substituição de moléculas não biodegradáveis, poluentes a natureza, por moléculas biodegradáveis mais compatíveis com o meio ambiente. Uma alternativa é a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais, obtidos por via microbiana com matéria prima renovável. A estrutura única dos biossurfactantes proporcionam vantagens sobre os surfactantes sintéticos tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, tolerância a temperatura, pH e força iônica; atividade superficial e interfacial, capacidade de formar e desfazer emulsão. Com isso, o objetivo desse trabalho foi a produção de biossurfactante por *Penicillium*, utilizando óleo lubrificante residual (LR) como fonte alternativa de carbono e palma forrageira como substrato em fermentação em estado sólido. As condições ótimas encontradas para o bioprocesso foram: 0,54 dias; 2,11 mL de fonte de carbono (FC) e 31,70 ºC. A atividade emulsificante (óleo em água) nessas condições foi 15, 57 UE. O óleo LR e a palma forrageira, atenderam às expectativas como FC e substrato respectivamente, no processo de fermentação. Além de ser matéria prima viáveis, usadas como alternativa para reduzir o custo da produção desse biossurfactante.

Palavras-chave: palma forrageira, óleo lubrificante residual, fungos filamentosos.

INTRODUÇÃO

A maioria dos surfactantes sintéticos são derivados do petróleo, os quais são tóxicos e não biodegradáveis, além de ter um alto custo de produção. Com isso, tem aumentado o interesse por surfactantes biológicos, pois estes são biodegradáveis, não tóxicos e podem ser produzidos utilizando matéria prima de baixo custo.

Esses compostos são os biossurfactantes, subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras [1], que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante. Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, contêm partes hidrofílicas e hidrofóbicas que atuam em interfaces com diferentes polaridades, como água-óleo, óleo-água, ar-água, entre outras [2, 3].

Os biossurfactantes possuem vantagens sobre os surfactantes derivados do petróleo. Pois são biodegradáveis [4], possuem baixa toxicidade, tolerância a variação de temperatura, pH e força iônica; atividade superficial e interfacial, capacidade de formar e desfazer emulsão [5].

Devido suas propriedades os biossurfactantes podem ser aplicados no processamento de alimentos, na indústria de cosméticos, fármacos e detergentes, em processos de biorremediação e tratamento de efluentes [6, 7].

Os biossurfactantes são sintetizados por micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos [7, 8]. A produção ocorre quando hidrocarbonetos são fornecidos como substrato. A princípio ocorre à formação das moléculas que irão constituir as porções hidrofóbicas e hidrofílicas dos biossurfactantes, nesse processo estão envolvidos os mecanismos de biossíntese de ácidos graxos, carboidratos e derivados [9].

A composição química e atividade emulsificante dos biossurfactantes não depende apenas do micro-organismo produtor, também são influenciadas pelas condições de cultivo. Assim, a fonte de carbono e nitrogênio são limitações nutricionais e, parâmetros físicos como temperatura, aeração e pH influenciam no tipo de polímero produzido [10].

Os biossurfactantes ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos, principalmente devido ao seu alto custo [9]. Uma

possível solução para este obstáculo seria o uso de matéria prima de baixo custo [6] e desenvolvimento de bioprocessos eficientes e otimizados [11].

Uma alternativa é a aplicação da Fermentação em estado sólido (FES) para a produção desses biocompostos. Sendo um processo simples e econômico, onde podem ser utilizados vegetais ou resíduos agroindustriais como substrato e resíduos oleosos como fonte alternativa de carbono. Além disso, na FES utiliza baixos volumes de água, equipamentos simples, baixa demanda de energia e maior concentração de produto é obtido [12, 13, 14].

O Brasil é o quinto maior mercado de lubrificante no mundo e, consequentemente, é o quinto maior gerador de óleo lubrificante usado ou contaminado (OLUC), no entanto as metas de coletas ainda não são suficientes para essa demanda [15]. Com isso, o lubrificante residual (LR) pode ser reaproveitado na FES, empregado como fonte de carbono (FC) para produção de biossurfactante.

Assim, o objetivo desse trabalho foi a produção de biossurfactante por *Penicillium*, utilizando óleo lubrificante residual como fonte alternativa de carbono e palma forrageira como substrato em FES.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do substrato para a FES

A Palma forrageira foi utilizada como substrato no processo de FES. Coletada no campo Agrostológico da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – Campus de Itapetinga. Após coleta a palma foi lavada e cortada, em seguida foi seca em estufa de secagem (SOLAB SL 102) a 65 ºC durante 24h e triturara em moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) a uma granulometria próxima de 2 mm [16].

Composição químico-bromatológica da palma forrageira

O farelo de palma forrageira foi submetido às seguintes análises: Concentração de nitrogênio total (NT), determinado pelo método Kjeldahl [17], a partir desse resultado calculou-se a estimativa de proteína bruta PB (PB = NT × 6,25). Concentração de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) [18]. Concentração de lignina (método do ácido sulfúrico – QUIMIS),

celulose, hemicelulose, material mineral e extrato etéreo [19]. Concentração de lipídeos totais [20]. Todos os componentes foram calculados com base na matéria seca.

Obtenção do micro-organismo

O micro-organismo utilizado nos experimentos foi a cepa do fungo filamentoso *Penicillium*. Isolado a partir do material vegetal coletado no Parque Municipal da Matinha, na cidade de Itapetinga-BA. Cedida pelo Laboratório de Genética Molecular Aplicada da UESB.

Preparo do inóculo para a fermentação

O *Penicillium* foi inoculado a 30 ºC por 7 dias, em PDA (HIMEDIA) com 1% de óleo Lubrificante residual, como indutor. A cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (VETEC) a 0,01%. A contagem dos esporos foi em câmara de neubauer dupla espelhada e microscópio binocular (BIOVAL), a concentração de esporos utilizada como inóculo foi de 10^7 esporos/grama de meio sólido [21].

Condições de fermentação

O meio de cultivo foi composto por 10g de farelo de palma forrageira a 60% de umidade e 0,980 de atividade de água (a_w), utilizou-se tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 para umedecer o substrato. A partir de estudos anteriores, foi selecionado o óleo lubrificante residual para ser utilizado como fonte adicional de carbono, sendo aqui avaliado nas quantidades de 1,0; 2,0 e 3,0 mL. As fermentações foram realizadas em BOD (TECNAL), durante a incubação foi avaliada a temperatura em 25, 30 e 35 ºC e o tempo em 2, 4 e 6 dias.

Extração do biossurfactante

Após a fermentação, para extração do biossurfactante do meio fermentado foi utilizada água destilada a 90 °C na proporção 1:5 (uma parte de soluto para cinco partes de solvente). Após a adição do solvente, a amostra foi submetida à agitação em shaker (SOLAB SL 222/CFR) a 160 rpm e 50 ºC por 30min. Em seguida as amostras foram prensadas para obtenção do extrato, o qual foi filtrado a vácuo em funil de Büchner. O extrato foi usado para avaliação da atividade emulsificante.

Determinação da atividade emulsificante

O extrato foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min. A determinação da atividade emulsificante (AE) óleo em água (O/A) foi adaptada da metodologia proposta por Colla e colaboradores (2010) [12] calculada através da equação 1. Utilizou-se 3,5 mL de extrato (diluído) e 2 mL de óleo lubrificante residual. No branco foi utilizado água destilada no lugar da amostra. A mistura foi agitada em Vórtex (PHOENIX AP 56) a 700 rpm por 1 min e deixado em repouso por 60 min, posteriormente foi submetido à leitura em espectrofotômetro (QUIMIS UV-VIS) a 610 nm. Os resultados foram expressos em UE (unidades emulsificantes).

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

Onde, AE = atividade emulsificante (UE), O/A = óleo em água, Abs = absorbância da suspensão do óleo em água e D = diluição da amostra em água.

Planejamento experimental

Para avaliação das melhores condições de produção de biossurfactante por FES utilizou o Delineamento de Box-Behnken (DBB), foi avaliado a influência de 3 variáveis independentes (temperatura, tempo e quantidade de FC) em 3 níveis (-1, 0, +1) e uma variável dependente que foi a Atividade Emulsificante (AE) óleo/água (O/A). Foram realizadas 6 repetições no ponto central para estimação do erro puro, o planejamento teve um total de 20 ensaios. Após análise dos resultados foi aplicada a metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para obter um ponto de máxima atividade emulsificante. Os valores originais e codificados para cada variável e nível estudado estão na tabela 4.1.

Tabela 4. 1. Variáveis independentes e níveis com valores codificados e reais.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (dias) - X_1	2	4	6
Volume de OLR (mL) - X_2	1	2	3
Temperatura (º C) - X_3	25	30	35

Inicialmente realizou uma análise de variância (ANOVA), para obter o resíduo puro. Em seguida uma ANOVA da regressão com o teste para a falta de ajustamento da variável atividade emulsificante de acordo com o modelo:

$$y = \beta_0 + \Sigma\beta_i X_i + \Sigma b_{ii} X_i^2 + \Sigma\beta_{ij} X_i X_j + \Sigma\beta_{ij} X_i X_j X_k + \varepsilon \qquad (2)$$

Onde, y é a variável predita, β_0 o intercepto; β_i o coeficiente linear, β_{ii} o coeficiente quadrático; o β_{ij} o coeficiente de interação, X_i, X_j e X_k são os valores codificados para os níveis das variáveis X_i, X_j e X_k e ε é o erro aleatório.

Além disso, testou-se os parâmetros da regressão a partir da ANOVA, sendo considerados significativos quando ($p < 0,1$). Na ANOVA foi utilizado o teste estatístico de Fisher (teste F). O software utilizado foi o programa *Statistica versão 8.0* (STATSOFT 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores encontrados para os componentes químico-bromatológicos do farelo de palma forrageira, utilizado como substrato no processo de FES para produção de biossurfactante, estão apresentados na tabela 4.2.

Tabela 4. 2. Composição químico-bromatológica da palma forrageira.

Componente	% (Base Ms)
Proteína Bruta	7,61
Extrato etéreo	1,02
Lipídios	6,60
Material mineral	17,13
FDN	21,76
FDA	16,75
Cinzas	0,07
Lignina	3,37
Celulose	13,38
Hemicelulose	5,02

Ms = matéria seca, FDN = fibra em detergente neutro, FDA = fibra em detergente ácido.

A palma forrageira utilizada nesse estudo apresenta em sua composição compostos como celulose, hemicelulose, lignina entre outros. Estes polímeros são importantes fontes nutricionais para os fungos filamentosos contribuindo para um adequado desenvolvimento microbiano [22].

É importante a caracterização do substrato utilizado no processo de FES, pois a depender da sua composição ajustes nutricionais posteriormente podem ser feitos.

Sendo que os valores encontrados podem variar, dependendo da época da colheita e práticas de plantio [23].

Foi realizado um delineamento Box-Behnken (DBB) para a otimização da produção de biossurfactante, com base na avaliação da AE em função do tempo, quantidade de FC e temperatura no processo de fermentação. Na tabela 4.3 é apresentada a matriz desse delineamento com as respostas de AE encontrada para cada ensaio.

Tabela 4. 3. Matriz do planejamento experimental, valores codificados e reais para as variáveis independentes e níveis, resposta encontrada para cada ensaio.

Ensaio	X_1 (Tempo - h)	X_2 (FC - mL)	X_3 (Temperatura - °C)	AE o/a (UE)
1	-1 (2)	-1 (1)	-1 (25)	11,63
2	-1 (2)	-1 (1)	1 (35)	11,81
3	1 (6)	-1 (1)	-1 (25)	4,32
4	1 (6)	-1 (1)	1 (35)	5,12
5	-1 (2)	1 (3)	-1 (25)	12,17
6	-1 (2)	1 (3)	1 (35)	12,60
7	1 (6)	1 (3)	-1 (25)	5,73
8	1 (6)	1 (3)	1 (35)	6,63
9	0 (4)	-1 (1)	0 (30)	8,33
10	0 (4)	1 (3)	0 (30)	11,19
11	-1 (4)	0 (2)	0 (30)	12,76
12	1 (6)	0 (2)	0 (30)	11,19
13	0 (4)	0 (2)	-1 (25)	11,56
14	0 (4)	0 (2)	1 (35)	12,93
15	0 (4)	0 (2)	0 (30)	13,47
16	0 (4)	0 (2)	0 (30)	13,81
17	0 (4)	0 (2)	0 (30)	13,28
18	0 (4)	0 (2)	0 (30)	12,63
19	0 (4)	0 (2)	0 (30)	13,21
20	0 (4)	0 (2)	0 (30)	13,00

FC = Fonte de carbono; AE = Atividade Emulsificante, (O/A) = Óleo em água; UE = Unidades emulsificantes.

As atividades emulsificantes encontradas variaram de 4,32 a 13,81 UE, sendo os maiores valores no ponto central. Posteriormente os resultados foram submetidos à ANOVA e análise de regressão com ($p < 0,1$).

Tabela 4. 4. ANOVA para os dados de atividade emulsificante.

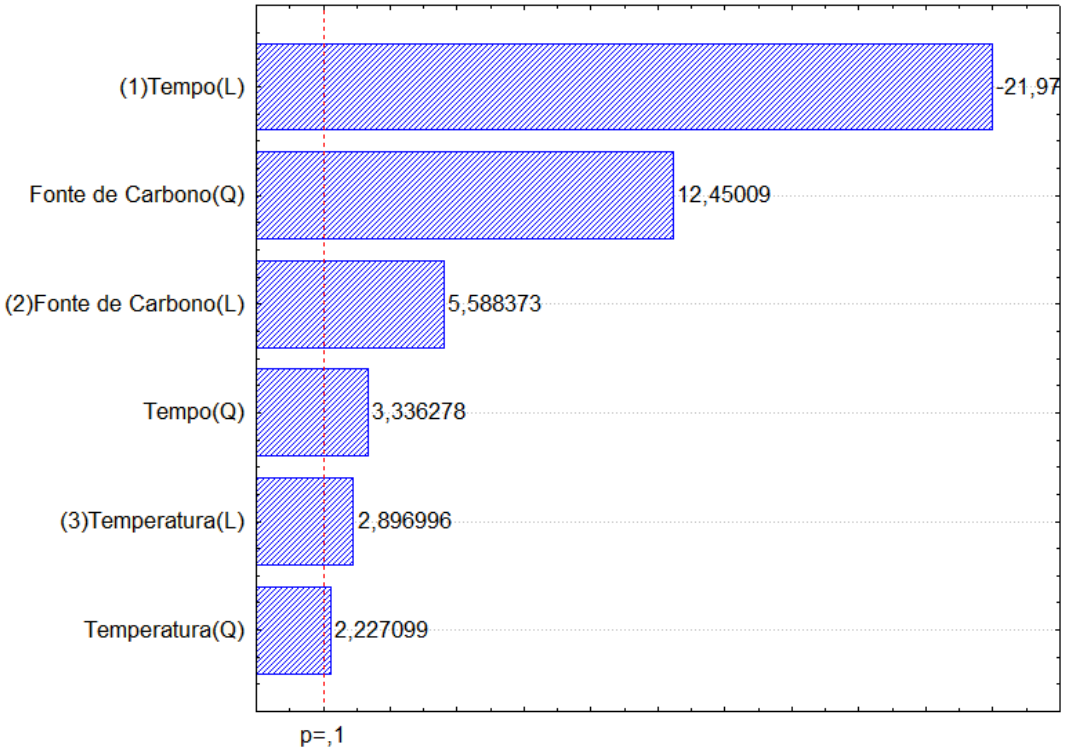
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F Calculado	F Tabelado	P
Regressão	162,118	6	27,019	25,759	2,283	0,000
Resíduo	13,636	13	1,049			
Falta de Ajuste	12,827	8	1,6033	9,895	3,339	0,011
Erro Puro	0,810	5	0,16033			
Total	175,754	19	0,16195			
R2	0,92241					

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

A variação devido aos parâmetros da regressão do modelo polinomial foi estatisticamente significativa no nível de significância de 90% ($p < 0,1$). Portanto o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado e a probabilidade da regressão foi ($p < 0,1$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,92241 (92,241% da variação explicada) confirmando que o modelo é bem ajustado aos valores experimentais. Apresentou falta de ajuste, porém foi irrelevante quando se observa que a SQ da Falta de ajuste representa menos que 10% da SQ da regressão.

O resultado da ANOVA pode ser descrito no diagrama de pareto (figura 4.1). Onde é traçado em ordem decrescente a significância dos efeitos a 90% de probabilidade.

Figura 4. 1. Diagrama de pareto com os valores dos efeitos padronizados (t calculado) para o modelo e o valor tabelado.



O diagrama de pareto (figura 4.1) mostra que o tempo foi a variável mais significativa no processo de fermentação para produção de biossurfactante, em seguida a fonte de carbono utilizada, já a temperatura foi a variável de menor significância no processo.

A partir das variáveis estudas na produção de biossurfactante, foi elaborado um modelo (polinomial de segunda ordem) com os parâmetros significativos ($p < 0,1$), esse modelo é demonstrado pela equação 3, em termos de valores codificados:

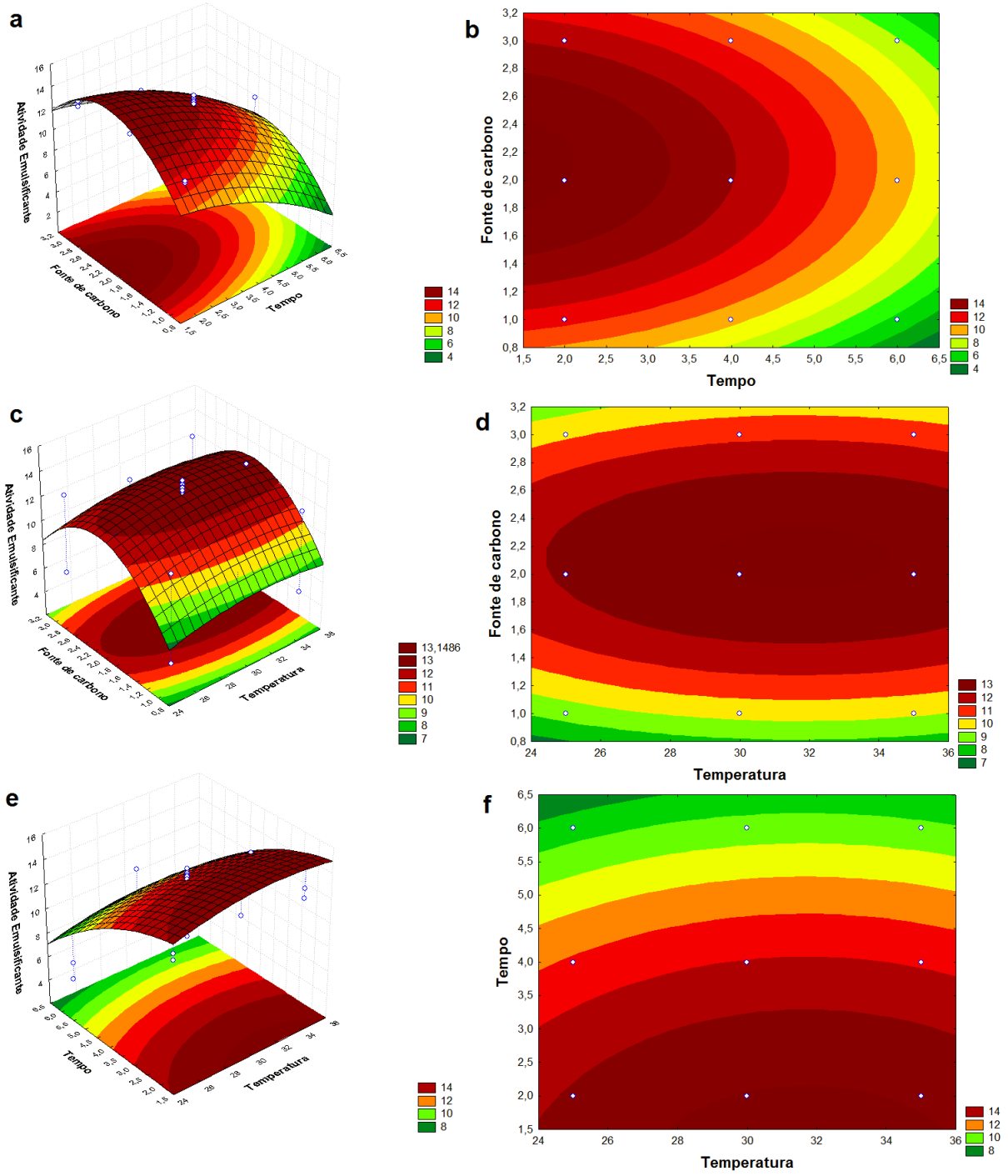
$$AE = -19,768 + 0,221T - 0,202T^2 + 12,796FC - 3,021FC^2 + 1,371Tp - 0,021Tp^2 \quad (3)$$

Sendo AE a atividade emulsificante, T o tempo, FC a fonte de carbono e Tp a temperatura.

A partir do modelo matemático o gráfico de superfície de resposta foi gerado em função das variáveis independentes, tempo, FC e temperatura (figura 4.2).

As condições ótimas encontradas para a produção de biossurfactante foi no tempo de 0,54 dias; quantidade de FC de 2,11 mL e na temperatura de 31,70 ºC. A atividade emulsificante apresentada pelo modelo nessas condições foi 15, 57 UE.

Figura 4. 2. Superfícies de resposta e gráficos de contorno da AE em função de: a, b) fonte de carbono e tempo; c, d) fonte de carbono e temperatura; e, f) tempo e temperatura.



*Fonte de carbono (mL), tempo (dias), temperatura (°C)

A quantidade de FC considerada ótima para o processo foi próxima à quantidade estabelecida para o ponto central do delineamento, sendo que as quantidades de FC para os níveis -1 e +1, podem ser consideradas inferior e

superior às necessidades nutricionais do micro-organismo para a síntese do biossurfactante.

A produção de moléculas de biossurfactantes acontece quando os micro-organismos têm hidrocarbonetos como substratos [7, 8, 9]. Porém, as quantidades de hidrocarboneto (FC) não devem ser fornecidas aleatoriamente no processo fermentativo, apenas o necessário para atender as necessidades nutricionais do micro-organismo.

A concentração de carbono, nitrogênio e fontes de nutrientes específicos para taxa de crescimento celular são os principais fatores que influenciam a biossíntese de biossurfactante [24]. Sendo que a produção de biossurfactante é dependente do tipo, da quantidade e qualidade da fonte de carbono [25], além das condições físico-químicas, como pH e temperatura entre outras [7, 26].

Nesse trabalho, a temperatura considerada ótima para produção de biossurfactante foi 31,70 ºC, temperatura próxima a estabelecida como ponto central do delineamento. Infere-se que essa foi a temperatura ideal para o crescimento celular do micro-organismo e geração de produto. Pois as condições de fermentação precisam se aproximar do habitat natural do micro-organismo, os quais não se desenvolvem em condições extremas de temperatura.

Durante o processo fermentativo e síntese do biossurfactante, acontece uma produção de energia a partir da oxidação biológica do carbono presente nos resíduos orgânicos. Parte dessa energia é utilizada no metabolismo dos micro-organismos e o restante é liberado na forma de calor [7]. Esse fenômeno faz da temperatura um fator crítico do processo de FES, devido ao acúmulo do calor metabólico gerado, pois, além da dificuldade de mistura do meio sólido, a maioria dos substratos utilizados possui baixa condutividade térmica, o que pode gerar gradientes de temperatura no biorreator. Além disso, para os fungos filamentosos, a temperatura influencia diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação de produtos [27].

O tempo de fermentação considerado como ótimo para a produção de biossurfactante não foi próximo ao ponto central do delineamento. Sendo 0,54 dias, aproximadamente 13h de fermentação. Esse valor foi inferior ao período de tempo estudado.

Em relação a maior produção de biossurfactante acontecer em um curto período de tempo, é possível inferir que nesse período o micro-organismo conseguiu produzir quantidade de biossurfactante necessária para absorção dos nutrientes e para a manutenção do seu metabolismo, com isso não há necessidade de continuar a produção. Além disso, concluímos que o substrato usado na fermentação, palma forrageira, forneceu nutrientes suficientes para proporcionar a produção de enzimas pelo micro-organismo. Portanto, essas enzimas auxiliaram a degradação do substrato, com isso não existia mais a necessidade de síntese de biossurfactantes para que haja a absorção de nutrientes.

CONCLUSÃO

O fungo *Penicillium* produziu biossurfactante utilizando óleo LR como fonte de carbono e Palma Forrageira como substrato. A otimização do processo através do delineamento Box-Behnken permitiu assim encontrar as condições ótimas de produção, através da avaliação da atividade emulsificante (O/A).

As condições ótimas encontradas foram 0,54 dias; 2,11 mL de FC e 31,70 ºC. A atividade emulsificante nessas condições foi 15, 57 UE.

O óleo LR e a palma forrageira são matéria prima viáveis, podendo ser usadas como alternativa para reduzir o custo da produção de biossurfactantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Capes e a FAPESB pelo apoio e incentivo a pesquisa científica.

REFERÊNCIAS

1. NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. Química Nova, v. 25, n.5, p.772-776, 2002.

2. SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**, v.22, n.3, p.142-146, 2004.

3. MARTINS, 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. **Química Nova**, v.31, n.8, p.1942-1947, 2008.

4. MOHAN, P. K.; NAKHLA, G.; YANFUL, E. K. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. **Water Research**, v.40, n.3, p.533-540, 2006.

5. NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**. V.18, n.5, p.252-259, 2007.

6. MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.58, n.4, p.428-434, 2002.

7. CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biossurfactante por Aspergillus fumigatus utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v.32, n.2, p.292-295, 2009.

8. HOMMEL, R. K.; HUSE, K.; Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis)* apicola. **Biotechnology Letters**, v.15, n.8, p.853-858, 1993.

9. COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. Vetor, v.13, p.85-103, 2003.

10. CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3634 -3640, 2009.

11. SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, p. GEBJ–29, 2011.

12. COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v.101, n.21, p.8308–8314, 2010.

13. ZEN, C. K.; SILVA, K. P.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Indução da síntese de lipídeos e proteínas por *Aspergillus niger*. **Revista CIATEC** – UPF, v.6, n.2, p. 40-47, 2014.

14. GUSMÃO, R. O.; FERRAZ, L. M.; RÊGO, A. P. B.; ASSIS, F. G. V; LEAL, P. L. Produção de enzimas por *Aspergillus spp*. Sob fermentação em estado sólido em casca de café. **Scientia Plena**, v.10, n.11, 2014.

15. OLIVEIRA, J. C. P.; SOUZA, R. B. Análise da gestão dos resíduos gerados na troca de óleo lubrificante automotivo: em estudo de caso na cidade de Cabo Frio-RJ. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, v.6, p.971-985, 2015.

16. SANTOS, T. C.; ABREU FILHO, G.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Aplicação da fermentação em estado sólido sobre o farelo de cacau (*Theobroma Cacao* L.): Obtenção de ligninases. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.32, n.1, p.87-96, 2011.

17. AOAC. **Official Methods of Analysis**, (15th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1990.

18. VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: carboydrate metodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science,** v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

19. AOAC. **Official methods of analysis**, (16th ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

20. INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo, 2005.

21. SANTOS, T. C.; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by Aspergillus niger using residue of mango a substrate. **Ciência Rural** (UFSM. Impresso), v.41, n.12, p.2210-2216, 2011a.

22. SANTOS, T. C.;GOMES, D. P. P.;BONOMO, R. C. F.;FRANCO, M.Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, n. 15, p. 1299-1304, 2012.

23. ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F.L. H. Emprego do bagaço seco do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.9, n.2, p.137-142, 2007.

24. LEVISAUSKAS, D.; GALVANAUSKAS, V.; ŽUNDA, G.; GRIGIŠKIS, S. Model-based optimization of biosurfactant production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology Letters**, v.26, n.14, p.1141-1146, 2004.

25. GEORGIOU, G.; LIN, S.; SHARMA, M. M.; Surface–Active Compounds from Microorganisms. **Nature Biotechnology**, v.10, p.60-65, 1992.

26. LIN, S. C.; CARSWELL, K. S.; SHARMA, M. M.; GEORGIOU, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, n.3, p.281-285, 1994**.**

27. PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, n.724, p.17-20, 2006.