



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PosENQ – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química
LABSIN – Laboratório de Simulação Numérica de Sistemas Químicos
LABMASSA – Laboratório de Transferência de Massa

LAB MASSA
SIN



LABORATÓRIO DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA
LABORATÓRIO DE SIMULAÇÃO NUMÉRICA DE SISTEMAS QUÍMICOS

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES FÚNGICOS POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO UTILIZANDO SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aluno: Luís Antonio Lourenço
Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadores: Profa. Dra. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza e Prof. Dr. José Alexandre Borges

Florianópolis
2017

Luís Antonio Lourenço

**PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTES FÚNGICOS POR CULTIVO
EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO UTILIZANDO SUBSTRATOS
HIDROFÓBICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Coorientadores: Profa. Dra. Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza e Prof. Dr. José Alexandre Borges Valle

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Lourenço, Luis Antonio

Produção de biossurfactantes fúngicos por cultivo em estado sólido e submerso utilizando substratos hidrofóbicos / Luis Antonio Lourenço ; orientador, Antônio Augusto Ulson Souza; coorientadora, Selene Maria Arruda Guelli Ulson Souza, coorientador, José Alexandre Borges Valle. - SC, 2017.

139 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Enzimas oxidativas. 3. Lipopeptídeo. 4. Biodegradação. 5. Glicolipídeo. I. Souza, Antônio Augusto Ulson. II. Souza, Selene Maria Arruda Guelli Ulson. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Luís Antonio Lourenço

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES FÚNGICOS POR
CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO E SUBMERSO UTILIZANDO
SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 16 de março de 2017.

Prof.a Cintia Soares, Dr.^a
Coordenadora do Curso

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.
Orientador

Prof.^a Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza, Dr.^a
Coorientadora

Prof. José Alexandre Borges Valle, Dr.
Coorientador

Banca Examinadora:

Prof.^a Lorena Benathar Ballod Tavares, Dr.^a
Universidade Regional de Blumenau

Prof.^a Mariane Bonatti Chaves, Dr.^a
Universidade da Região de Joinville

Prof. José Antonio Ribeiro de Souza, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Alexandra Valério, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Danielle Maass, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais, Olindino e Marlene, que são os maiores exemplos e fonte de inspiração da minha vida.

À minha noiva Jéssica, por acreditar que seria possível e sempre estar ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina e ao PosENQ – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, pelo suporte físico e acadêmico para a realização deste trabalho.

Ao LABSIN/LABMASSA, pela infraestrutura laboratorial disponibilizada.

À Agência Nacional de Petróleo, à PETROBRAS e ao Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP, através do projeto PRH-09/MECPETRO e à CAPES pela bolsa e recursos financeiros concedidos para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio concedido através da bolsa de doutorado sanduíche vinculado ao Projeto de Cooperação Internacional Convênio CAPES/DGU, projeto nº 301/13.

Aos professores orientadores Antônio Augusto Ulson de Souza, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza e José Alexandre Borges Valle, pelo aprendizado e por acreditarem em meu potencial, estando sempre dispostos a compartilhar seus conhecimentos.

Aos professores Miguel García Román e Deisi Altmajer Vaz, da Universidade de Granada, Espanha, por todas as contribuições na realização deste trabalho, pela hospitalidade, dedicação e confiança.

À Prof.^a Lorena Benathar Balod Tavares, por todo o apoio e suporte oferecido durante o desenvolvimento das atividades na Universidade de Granada e por sempre acreditar em meu potencial.

Aos professores participantes do Projeto CAPES/DGU, Encarnación Jurado Almeida, Rita de Cássia Siqueira Curto Valle, Elisabeth Wisbeck e Manuela Lechuga Villena, por tornar este trabalho possível, pela oportunidade e contribuições.

À Michele Debiasi Alberton, pela amizade, companheirismo, apoio e aprendizado durante a realização das atividades de doutorado sanduíche.

Aos colegas do grupo LABSIN/LABMASSA, em especial à Bruna L. M. F. Xavier, Bruna Porto, Carlos R. S. de Oliveira, Cecília Lenzi, Danielle Maass, Édipo Almeida, Márcia Michele F. F. Salim, Priscila S. Shiki, Tamires C. Costa, Tarcísio W. Leal e Vódice A. Feisther, pela amizade, companheirismo e apoio mútuo.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

“O céu é o limite apenas se você quiser que ele seja”

(Flávia Melissa)

RESUMO

Visando a conservação dos recursos naturais, o estudo da produção de biomoléculas, como exemplo os biossurfactantes, tem crescido nos últimos anos. A maioria dos biossurfactantes conhecidos é de origem bacteriana, sendo pouco investigada a capacidade de produção utilizando fungos. Neste trabalho, foi avaliada a produção de biossurfactantes por fungos em diferentes sistemas de cultivo. O fungo *Trametes versicolor* CECT 20817 foi cultivado em sistema sólido utilizando como fonte de carbono um resíduo da produção bifásica do azeite de oliva. Foi verificada a produção de metabólitos com atividade de superfície e enzimas oxidativas durante 14 dias de cultivo a 25 °C, obtendo-se valores de tensão superficial (TS) da ordem de 30 mN.m⁻¹. O biossurfactante produzido foi classificado como um derivado de lipopeptídeo, sendo capaz de reduzir a TS do meio aquoso para 26,4 ± 0,2 mN.m⁻¹, exibindo propriedades interfaciais satisfatórias. Além disso, o biossurfactante produzido se mostrou particularmente estável quanto a variação de pH e temperatura e apresentou atividade antibacteriana moderada contra *Escherichia coli*. Também foi investigada a produção de biossurfactantes por um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo em sistema submerso, utilizando hidrocarbonetos derivados de petróleo como fonte de carbono. A estirpe apresentou uma velocidade específica máxima de crescimento igual a 0,0184 h⁻¹, obtendo-se um fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) igual a 0,5412 g.g⁻¹. A produção de biossurfactantes foi detectada a partir de 6 dias de cultivo, confirmada pela redução da TS do meio (valores inferiores a 35 mN.m⁻¹). Foi verificado que a produção de biossurfactantes auxilia o processo de biodegradação de óleo diesel, sendo observada uma eficiência de degradação igual a 78,30 ± 0,76 %, nas condições ótimas estabelecidas. Ainda, a presença do tensoativo no sistema interfere na transferência de oxigênio do meio líquido, sendo observada uma diminuição nos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ($K_L a$). De acordo com as análises de caracterização, o biossurfactante foi classificado como um derivado de glicolipídeo, apresentando estabilidade em relação a variações de temperatura e pH. Estes resultados corroboram para a viabilidade da utilização de microrganismos produtores de biossurfactantes em processos de biorremediação.

Palavras-chave: Azeite de oliva. Enzimas oxidativas. Lipopeptídeo. Óleo diesel. Biodegradação. Glicolipídeo.

ABSTRACT

Concerning over the natural resources preservation, the study of the biomolecules production, such as biosurfactants, has increased in recent years. Most of the known biosurfactants are from bacterial origin, with insufficient investigation of production capacity using fungi. In this study, the biosurfactants production by fungi in different cultivate systems were evaluated. The fungus *Trametes versicolor* CECT 20817 was cultivated in a solid system, using the two-phase olive mill waste as a substrate. The surface active metabolites and oxidative enzymes production during 14 days of cultivation at 25 °C was verified, obtaining surface tension (ST) in the order of 30 mN.m⁻¹. The biosurfactant produced was classified as a lipopeptide derivative, being able to reduce the ST of the aqueous medium to 26.4 ± 0.2 mN.m⁻¹, exhibiting satisfactory interfacial properties. In addition, the biosurfactant produced by *T. versicolor* proved to be particularly stable in pH and temperature and exhibited moderate antibacterial activity against *Escherichia coli*. We also investigated the biosurfactant production by fungus isolated from oil refinery residue in submerged system using petroleum-derived hydrocarbon as a carbon source. The strain showed a specific growth rate of 0.0197 ± 0.0184 h⁻¹ and it was obtained a cell yield coefficient ($Y_{X/S}$) equal to 0.5412 g.g⁻¹. The expressive biosurfactant production was detected from 6 days of cultivation, confirmed by the reduction of the ST values. It was verified that the biosurfactant production enhanced the diesel oil biodegradation process, where a degradation efficiency equal to 78.30 ± 0.76 % was observed under the optimal conditions established. Furthermore, the presence of surfactant in the system influence the oxygen transfer in the liquid medium and it was observed a decrease in the volumetric oxygen transfer coefficients ($K_{L,a}$). According to the characterization analyzes, the biosurfactant was classified as a glycolipid derivative, presenting good stability in relation to temperature and pH variations. These results corroborate the viability of the use of biosurfactant producer microorganisms in bioremediation processes.

Keywords: Olive oil. Enzymes oxidative. Lipopeptide. Diesel oil. Biodegradation. Glycolipid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular de um surfactante e sua orientação na interface entre duas fases imiscíveis.....	34
Figura 2 – Variação da tensão superficial (TS) e formação de micelas em função da concentração de surfactante.	37
Figura 3 – Estrutura química de um ramnolípídeo.....	41
Figura 4 – Estrutura química da surfactina.	42
Figura 5 – Mecanismo de síntese dos precursores da produção de biossurfactantes utilizando carboidratos como substrato.	46
Figura 6 – Mecanismo de síntese dos precursores da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos como substratos.....	47
Figura 7 – Representação gráfica do delineamento experimental de mistura.	58
Figura 8 – Gráficos de contorno para as respostas TS (a) e TS^{-1} (b) obtidos a partir dos modelos de regressão linear.	78
Figura 9 – Gráficos de contorno para as respostas de atividade enzimática de Lac (a) e MnP (b) obtidos a partir dos modelos de regressão quadrático.	83
Figura 10 – Correlação entre o percentual de redução dos compostos FT e a atividade enzimática de Lac e MnP.	87
Figura 11 – Correlação entre os dados de TS dos extratos e de atividade enzimática de Lac e MnP.	88
Figura 12 – Evolução do crescimento do fungo <i>Trametes versicolor</i> sobre o substrato sólido composto por 35 % de RSEBAO, 10 % de farelo de trigo e 55 % de caroço de azeitonas, nos tempos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias de cultivo à 25 °C e 80 % de umidade relativa.	89
Figura 13 – Evolução da medida da tensão superficial (TS) dos extratos e de suas diluições (TS^{-1}) durante 28 dias de cultivo <i>T. versicolor</i> sobre o substrato sólido composto por 35 % de RSEBAO, 10 % de farelo de trigo e 55 % de caroço de azeitonas.	91
Figura 14 – Visualização da formação de halo positivo contra os padrões catiônico (a) e aniônico (b) no ensaio de determinação da característica iônica do biossurfactante.	93
Figura 15 – Variação da TS versus o logaritmo da concentração do biossurfactante produzido por <i>Trametes versicolor</i> extraído por precipitação ácida (a) e extração com solventes (b).	94
Figura 16 – Efeito da temperatura (a) e do pH (b) na estabilidade do biossurfactante produzido por <i>Trametes versicolor</i> em cultivo em estado sólido.	95
Figura 17 – Gráfico de contorno para a resposta concentração celular (X , $g.L^{-1}$) em função da variação dos fatores de temperatura e pH, fixando a concentração inicial de óleo diesel em $10 g.L^{-1}$	105
Figura 18 – Gráfico de contorno para a resposta eficiência de remoção (η , %) em função da variação dos fatores temperatura e concentração inicial de óleo diesel à pH 7,0.	105

Figura 19 – Gráfico de contorno para a resposta TS ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) em função da variação dos fatores pH e concentração inicial de óleo diesel a 27 °C.	106
Figura 20 – Cinética da biodegradação do óleo diesel (concentração inicial de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a 27 °C e pH 7,0.	108
Figura 21 – Cinética da biodegradação do óleo diesel (concentração inicial de $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) a 27 °C e pH 7,0.	109
Figura 22 – Curvas de crescimento do fungo isolado em diferentes concentrações de óleo diesel.	110
Figura 23 – Diagrama esquemático do mecanismo sinérgico de adsorção-biodegradação de óleo diesel pela biomassa fúngica.	113
Figura 24 – Isoterma de adsorção de óleo diesel por biomassa fúngica não viável.	114
Figura 25 – Cinética do processo de biodegradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes em biorreator de bancada (marcadores vazados) em comparação com os dados obtidos em frascos agitados (marcadores preenchidos).	117
Figura 26 – Concentração de oxigênio dissolvido durante a aplicação do método dinâmico para a determinação do $K_L a$ após 2 dias de cultivo.	118
Figura 27 – Variação da TS versus o logaritmo da concentração do biossurfactante produzido pelo fungo isolado em cultivo submerso.	120
Figura 28 – Efeito da temperatura (a) e do pH (b) na estabilidade do biossurfactante produzido pelo fungo isolado em cultivo submerso.	121
Figura 29 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos alifáticos presentes na amostra controle de óleo diesel.	122
Figura 30 – Cromatograma da amostra de óleo diesel residual após 8 dias de cultivo.	123
Figura 31 – Cromatograma da amostra de óleo diesel residual após 14 dias de cultivo.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e análise elementar do RSEBAO.....	56
Tabela 2 – Delineamento experimental de mistura com restrições para a avaliação da influência da composição do substrato sólido na produção de biossurfactantes.	57
Tabela 3 – Composição do meio líquido para a produção de biossurfactantes por cultivo submerso do fungo isolado.	65
Tabela 4 – Parâmetros e níveis experimentais avaliados no processo de biodegradação de hidrocarbonetos e na produção de biossurfactantes.	66
Tabela 5 – Composição do meio líquido para obtenção de biomassa.	67
Tabela 6 – Matriz experimental e resultados referentes à produção de biossurfactantes e enzimas oxidativas por <i>Trametes versicolor</i> CECT 20817 em cultivo em estado sólido.	74
Tabela 7 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de TS ao modelo de regressão linear.	77
Tabela 8 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de TS^{-1} ao modelo de regressão linear.	77
Tabela 9 – Teste de significância dos coeficientes do modelo linear ajustado aos dados experimentais de TS.	79
Tabela 10 – Teste de significância dos coeficientes do modelo linear ajustado aos dados experimentais de TS^{-1}	79
Tabela 11 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de atividade de Lac ao modelo de regressão quadrático.	82
Tabela 12 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de atividade de MnP ao modelo de regressão quadrático.	82
Tabela 13 – Teste de significância dos coeficientes do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais de atividade de Lac.	84
Tabela 14 – Teste de significância dos coeficientes do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais de atividade de MnP.	84
Tabela 15 – Percentuais de redução dos compostos fenólicos totais (FT) presentes no substrato sólido.	86
Tabela 16 – Caracterização química do biossurfactante obtido por precipitação ácida e extração com solventes.	92
Tabela 17 – Dados de concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do biossurfactante produzido por <i>T. versicolor</i> , da amostra controle e do padrão positivo contra as bactérias selecionadas.	97
Tabela 18 – Dados experimentais de tensão superficial (TS) do meio de cultivo suplementados com diferentes fontes de carbono.	97
Tabela 19 – Matriz experimental e resultados referentes ao crescimento celular (X), remoção de óleo diesel (η) e produção de biossurfactantes (TS) no processo de biodegradação do óleo diesel pelo fungo isolado.	100
Tabela 20 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ao modelo de regressão quadrático.	102

Tabela 21 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de η (%) ao modelo de regressão quadrático.	102
Tabela 22 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de TS ($mN.m^{-1}$) ao modelo de regressão quadrático.....	103
Tabela 23 – Parâmetros obtidos das isotermas de adsorção para a biomassa fúngica não viável a 27 °C e pH 7,0 para os modelos e Langmuir e Freundlich.	115
Tabela 24 – Valores de K_L obtidos em diferentes tempos de cultivo.....	118
Tabela 25 – Percentuais de biodegradação individuais dos hidrocarbonetos alifáticos presentes no óleo diesel após 8 e 14 dias de cultivo.....	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Trabalhos realizados sobre a produção de biossurfactantes utilizando diferentes microrganismos e substratos.	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido bicinchonínico
BDA	Batata dextrose ágar
BHL	Balanço hidrofílico-lipofílico
CMC	Concentração micelar crítica
FT	Fenólicos totais
Lac	Lacase
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
RSEBAO	Resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva
SDS	Dodecil sulfato de sódio
U	Unidade de atividade enzimática
A	Amplitude da curva de crescimento microbiano
C^*	Concentração de óleo diesel no equilíbrio (mg.L^{-1})
C_0	Concentração inicial de óleo diesel (mg.L^{-1})
CIM	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
K_F	Constante de Freundlich relacionada com a capacidade de adsorção
K_L	Constante de equilíbrio de Langmuir (L.mg^{-1})
K_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio (s^{-1})
n	Constante de Freundlich relacionada com a intensidade de adsorção
q_e	Capacidade de adsorção no equilíbrio (mg.g^{-1})
TS	Tensão superficial (mN.m^{-1})
V	Volume do sistema (L)
W	Massa de adsorvente (g)
X	Concentração celular (g.L^{-1})
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células (g.g^{-1})
μ_m	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
η	Eficiência de remoção de óleo diesel (%)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	29
1.1 OBJETIVOS.....	30
1.1.1 Objetivo Geral.....	30
1.1.2 Objetivos Específicos.....	30
1.2 ESTRUTURA DA TESE.....	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 SURFACTANTES.....	33
2.1.1 Propriedades interfaciais.....	36
2.1.2 Perspectivas no uso de surfactantes.....	38
2.2 BIOSSURFACTANTES.....	38
2.2.1 Classificação dos biossurfactantes.....	40
2.2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes.....	42
2.2.3 Mecanismos de síntese de biossurfactantes.....	44
2.2.4 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes.....	48
2.2.5 Desafios e perspectivas na produção de biossurfactantes.....	49
2.3 RESÍDUOS OLEOSOS.....	51
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR <i>Trametes versicolor</i> EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO.....	55
3.1.1 Microrganismo.....	55
3.1.2 Substrato sólido.....	56
3.1.3 Cultivo em estado sólido.....	56
3.1.4 Delineamento experimental.....	56
3.1.5 Avaliação da produção de biossurfactantes.....	58
3.1.6 Avaliação da produção de enzimas oxidativas.....	59

3.1.7	Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	60
3.1.8	Extração do biossurfactante.....	60
3.1.9	Caracterização do biossurfactante.....	61
3.1.10	Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	62
3.1.11	Estabilidade do biossurfactante.....	62
3.1.12	Atividade antibacteriana do biossurfactante.....	63
3.2	PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR UM FUNGO ISOLADO DE UM RESÍDUO DE REFINARIA DE PETRÓLEO.....	64
3.2.1	Microrganismo.....	64
3.2.2	Meio de cultivo.....	65
3.2.3	Influência das condições de processo na biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo e na produção de biossurfactantes.....	65
3.2.4	Estudo cinético.....	66
3.2.5	Ensaio de adsorção de óleo diesel.....	67
3.2.6	Estudo realizado em biorreator de bancada.....	68
3.2.7	Determinação da concentração celular.....	69
3.2.8	Determinação da concentração de óleo diesel.....	69
3.2.9	Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa.....	70
3.2.10	Extração e caracterização do biossurfactante.....	70
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	70
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1	PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E ENZIMAS por <i>Trametes versicolor</i> em cultivo em estado sólido.....	73
4.1.1	Avaliação da produção de biossurfactantes.....	76

4.1.2 Avaliação da produção de enzimas oxidativas.....	81
4.1.3 Análise da produção concomitante de biossurfactantes e enzimas oxidativas.....	87
4.1.4 Cinética da produção de biossurfactantes.....	89
4.1.4 Extração e caracterização do biossurfactante.....	91
4.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR UM FUNGO ISOLADO DE UM RESÍDUO DE REFINARIA DE PETRÓLEO UTILIZANDO SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS COMO FONTE DE CARBONO.....	97
4.2.1 Influência das condições ambientais no crescimento do fungo, no processo de biodegradação e na produção de biossurfactantes..	99
4.2.3 Estudo cinético da biodegradação do óleo diesel e produção de biossurfactantes.....	107
4.2.4 Biossorção de óleo diesel.....	112
4.2.5 Estudo em biorreator de bancada.....	115
4.2.6 Caracterização do biossurfactante produzido.....	118
4.2.7 Análise da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel.....	121
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	127
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	128
REFERÊNCIAS.....	131

1 INTRODUÇÃO

A investigação de processos e produtos biotecnológicos desempenha um papel importante para o desenvolvimento sustentável. Diferentes organismos são conhecidos quanto à sua capacidade de produzir biomoléculas que possuem aplicações práticas na medicina, agricultura e no setor industrial. Os avanços obtidos nas últimas décadas em relação ao entendimento da natureza e do metabolismo de diferentes microrganismos, possibilitou à comunidade científica e tecnológica identificar, descrever e sintetizar produtos de elevado valor econômico.

Biossurfactantes são compostos biológicos anfífilos produzidos intra ou extracelularmente por uma grande variedade de microrganismos. Devido às suas propriedades de superfície, os biossurfactantes são capazes de se acumular na interface entre duas fases imiscíveis, reduzindo a tensão interfacial. Baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e estabilidade, são algumas das propriedades conhecidas dos biossurfactantes, que possibilita sua aplicação em diversos setores, em substituição aos surfactantes sintéticos.

Atualmente, a maior parte dos biossurfactantes conhecidos é produzida por bactérias em sistemas de cultivo em meio líquido, ao mesmo tempo que fungos e leveduras são pouco explorados para esta finalidade. Apesar de pouco reportada na literatura, a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos já foi anteriormente relatada. Ainda, os biossurfactantes de origem bacteriana podem apresentar limitações quanto a sua aplicação nas indústrias farmacêutica e de alimentos, devido à possível natureza patogênica destes microrganismos.

Os elevados custos das matérias-primas, aliado a necessidade da utilização de processos subsequentes de extração e purificação, são questões principais que devem ser abordadas para que a produção em larga escala de biossurfactantes se torne economicamente viável. Vários estudos com enfoque na redução dos custos de produção, utilizando substratos de baixo custo, são reportados na literatura. Resíduos oleosos, tais como ácidos graxos, resíduos de óleo de fritura, resíduos da produção de azeite de oliva e subprodutos do refino de petróleo, constituem-se em exemplos de substratos que podem ser utilizados como precursores da biossíntese de surfactantes.

Diferentes estratégias de cultivo têm sido relatadas para a produção de biossurfactantes, sendo o cultivo submerso o mais explorado pelos pesquisadores. Os bioprocessos realizados por meio de

cultivo em meio líquido apresentam uma maior homogeneidade, o que favorece o controle de parâmetros como pH e temperatura. Por outro lado, o cultivo em sistema sólido tem como vantagem a simplicidade do meio, podendo ser utilizados substratos de baixo custo. Destaca-se ainda, a possibilidade de se obter maiores rendimentos em comparação ao cultivo submerso, além da ausência da formação de espuma e a menor demanda por energia.

Em virtude da pouca informação encontrada a respeito da produção de biossurfactantes fúngicos, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de biossíntese de surfactantes por fungos filamentosos em diferentes estratégias de cultivo. Num primeiro estudo, a produção de metabólitos pelo fungo *Trametes versicolor* CECT 20817 em cultivo em estado sólido foi avaliada, utilizando um resíduo da indústria de azeite de oliva como fonte de carbono. Para alcançar este objetivo, foi utilizado um planejamento experimental de mistura para avaliar o efeito da composição do substrato sólido na produção de biossurfactantes e enzimas oxidativas. Concomitante, foi investigada a produção de biossurfactantes em cultivo submerso por um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo, utilizando óleo diesel como precursor. Este estudo teve como proposta avaliar o efeito das condições ambientais no crescimento celular, no consumo de óleo diesel e na produção de biossurfactantes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencialidade de fungos filamentosos na produção de biossurfactantes em diferentes sistemas de cultivo, utilizando substratos oleosos como principal fonte de carbono.

1.1.2 Objetivos Específicos

Determinar as variáveis que interferem significativamente no processo de produção de biossurfactante fúngico;

Otimizar a produção de biossurfactantes em cultivo em meio sólido e submerso, utilizando planejamento experimental;

Estudar a produção concomitante de biossurfactantes e enzimas oxidativas pelo fungo *Trametes versicolor* CECT 20817 em cultivo em estado sólido, utilizando um resíduo da extração bifásica do azeite de oliva como principal fonte de carbono;

Avaliar a cinética da produção de biossurfactantes em cultivo em estado sólido nas condições ótimas estabelecidas;

Investigar a produção de biossurfactantes por um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo em cultivo submerso;

Avaliar a capacidade do fungo em crescer em sistema líquido suplementado com óleo diesel como fonte de carbono;

Verificar a influência da síntese de biossurfactantes no processo de biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo pelo fungo selecionado;

Estudar a transferência de oxigênio durante o cultivo em meio líquido em biorreator de bancada, verificando a reprodutibilidade dos dados obtidos em frascos agitados;

Caracterizar os biossurfactantes produzidos por *Trametes versicolor* em cultivo em estado sólido e pelo fungo isolado em cultivo submerso.

1.2 ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho é composto por cinco capítulos, organizados de forma a fornecer uma melhor compreensão das atividades desenvolvidas.

O Capítulo 1 contextualiza o trabalho e apresenta a motivação para o desenvolvimento da proposta, elencando os objetivos geral e específicos da pesquisa.

No Capítulo 2 é apresentado o referencial teórico, apresentando os principais conceitos e aspectos referentes às características dos tensoativos e à potencialidade da produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos.

A descrição dos procedimentos metodológicos adotados para a avaliação da produção de biossurfactantes por fungos filamentosos são apresentados no Capítulo 3.

Os principais resultados obtidos nos estudos da produção de biossurfactantes em cultivo em estado sólido e submerso são apresentados e discutidos no Capítulo 4, elencando as principais contribuições concernentes a obtenção de biossurfactantes fúngicos.

No Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões deste trabalho, bem como são apresentados sugestões e perspectivas para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

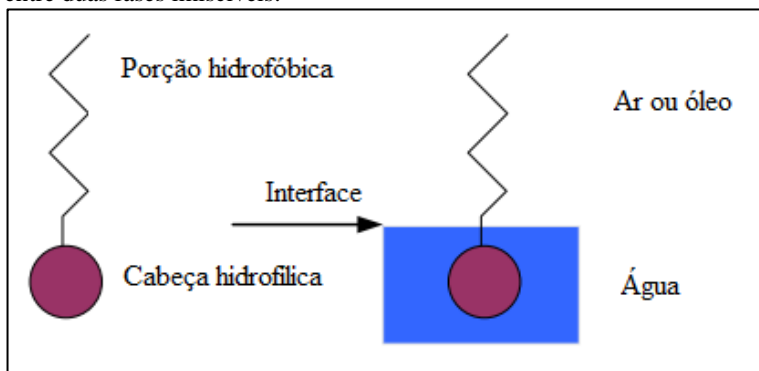
Neste capítulo é realizada uma abordagem teórica dos aspectos gerais relativos às características principais dos surfactantes sintéticos e dos biossurfactantes, elencando a classificação destes compostos e suas aplicações nos mais diversos setores. Além disso, é apresentado um levantamento bibliográfico sobre a produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos, bem como os mecanismos de biossíntese e os fatores que interferem na obtenção destas biomoléculas. Ainda, são elencados os desafios e perspectivas futuras sobre a produção e aplicação viável de biossurfactantes como substituintes dos surfactantes sintéticos, com enfoque na otimização dos processos e utilização de substratos de baixo custo.

2.1 SURFACTANTES

Agentes de superfície, usualmente referidos como surfactantes, são moléculas anfífilas ou anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica, normalmente um hidrocarboneto alifático linear ou ramificado, que está ligada a uma porção hidrofílica. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir na interface entre fases com diferentes graus de polaridade (Figura 1). Em meio aquoso por exemplo, a porção polar interage fortemente com as moléculas de água, através de interações do tipo ligações de hidrogênio e íon-dipolo, tornando o surfactante solúvel. Ao mesmo tempo, as moléculas de surfactante se orientam para a interface de modo a minimizar tanto quanto possível, o contato entre a porção hidrofóbica e a água (MULLIGAN; SHARMA; MUDHOO, 2014; TADROS, 2014).

O equilíbrio entre as partes hidrofílicas e hidrofóbicas da molécula, denominado balanço hidrofílico-lipofílico (BHL) confere a estes compostos propriedades especiais tais como a capacidade de adsorção numa superfície ou interface, alterando a energia livre do sistema. A energia livre é comumente referida como tensão superficial ou interfacial, sendo ambos os termos referentes à fronteira entre duas fases: se uma delas é uma fase gasosa, então o termo tensão superficial é usado, enquanto que o termo tensão interfacial é utilizado para limites entre duas fases não gasosas (FARN, 2006).

Figura 1 – Estrutura molecular de um surfactante e sua orientação na interface entre duas fases imiscíveis.



Fonte: Adaptado de Coca-Prados e Gutiérrez-Cervelló (2009).

A tensão superficial ou interfacial de um líquido é uma propriedade física relacionada ao trabalho reversível necessário para aumentar a área de uma superfície isotérmica. Desta forma, a força motriz para a adsorção de um surfactante é a diminuição da energia livre de uma superfície ou interface, relacionada com a sua capacidade de se distribuir ordenadamente na interface, diminuindo a tensão superficial ou interfacial de um líquido. O grau de adsorção depende tanto da estrutura do surfactante, como da natureza da interface, sendo que a estrutura molecular determina também as propriedades físico-químicas do tensoativo quando em solução (COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, 2009; TADROS, 2014; KOSARIK; VARDAR-SUKAN, 2015). Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade de formação de espuma, umectabilidade, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização destes produtos se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene. (KULKARNI et al., 2016)

De acordo com a natureza do grupo hidrofílico, os surfactantes são classificados em aniônicos, catiônicos, anfotéricos (ou zwitteriônicos) ou não iônicos. Os surfactantes aniônicos possuem a porção hidrofílica de carga negativa, devido a presença dos grupos carboxilato (COO^-), sulfato (OSO_3^-), sulfonato (SO_3^-) ou fosfato ($\text{OPO}(\text{OH})\text{O}^-$), sendo amplamente utilizados no setor industrial devido, principalmente, aos baixos custos de produção. A cadeia hidrofóbica é

um hidrocarboneto linear contendo de 12 a 16 átomos de carbono que confere ótimas propriedades de detergência. O dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) é o surfactante aniônico mais comumente utilizado (FARN, 2006; COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, 2009).

Os surfactantes catiônicos possuem a porção hidrofílica de carga positiva, sendo geralmente compostos derivados de amônio quaternário ($[\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$) ou baseados em agrupamentos fosfônio ($[\text{P}(\text{CH}_3)_3]^+$). Devido ao caráter positivo do grupo hidrofílico, os surfactantes catiônicos adsorvem-se fortemente sobre superfícies carregadas negativamente, tais como tecidos, cabelo e membrana celular de bactérias. Portanto, esta classe de surfactantes é usada em formulações de amaciantes e condicionadores de cabelo, bem como agentes antibacterianos. Um surfactante catiônico amplamente utilizado é o cloreto de alquil dimetil benzil amônio, conhecido por suas propriedades biológicas (COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, 2009; MULLIGAN; SHARMA; MUDHOO, 2014; TADROS, 2014).

Os surfactantes anfotéricos, muitas vezes referidos como tensoativos zwitteriônicos, possuem ambos os grupos catiônico e aniônico. Dependendo do pH do meio, a porção hidrofílica dos surfactantes anfotéricos possuem carga positiva, negativa ou ambas. Desta forma, a principal característica desta classe de tensoativos é a dependência em relação ao pH da solução na qual estão dissolvidos. Em soluções de pH ácido, a molécula adquire uma carga positiva e se comporta como um surfactante catiônico, enquanto que em soluções de pH alcalino, esta classe de surfactantes se torna carregada negativamente, comportando-se como um surfactante aniônico. Ainda, pode ser definido um pH específico no qual ambos os grupos iônicos possuem o mesmo grau de ionização, sendo este ponto referido como ponto isoelétrico da molécula. Os surfactantes anfotéricos mais utilizados são os derivados de betaína, sendo comumente utilizados em produtos de higiene pessoal e detergentes (FARN, 2006; SEN, 2010; KOSARIK; VARDAR-SUKAN, 2015)

Os surfactantes não iônicos, por outro lado, não se dissociam em meio aquoso e a porção hidrofílica possui carga neutra. Estes surfactantes são comumente baseados em óxidos de etileno, referidos como surfactantes etoxilados. O álcool laurílico etoxilado é um exemplo de tensoativo não iônico, utilizado principalmente na formulação de detergentes e emulsionantes (COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, 2009).

2.1.1 Propriedades interfaciais

As propriedades interfaciais de um surfactante estão relacionadas com o tamanho da porção hidrofóbica, e conseqüentemente, com a sua solubilidade. Máximas atividades de superfície são observadas quando a cadeia hidrofóbica possui de 8 a 18 átomos de carbono. Por outro lado, se o número de átomos de carbono for inferior a 8 ou superior a 18, as propriedades do surfactante serão mínimas. Isto é decorrente da solubilidade destas estruturas: abaixo de 8 átomos de carbono, um surfactante é muito solúvel em água e acima de 18 átomos de carbono se torna insolúvel, afetando a sua capacidade de se distribuir ordenadamente numa interface (MULLIGAN; SHARMA; MUDHOO, 2014; TADROS, 2014).

Tensão Superficial

As forças atrativas entre as moléculas no interior da fase líquida são uniformes em todas as direções. No entanto, as moléculas presentes na superfície do líquido apresentam interações intermoleculares não uniformes, uma vez que as moléculas na fase gás são amplamente espaçadas e as interações moleculares principais são entre as moléculas da superfície e as moléculas do interior da fase. Como resultado, as moléculas na superfície do líquido possuem maior energia potencial livre comparadas com as moléculas no interior da fase líquida. Este excesso de energia livre por unidade de área é definido como tensão superficial. A tensão superficial é uma propriedade termodinâmica e pode ser medida sob temperatura e pressão constantes, e seu valor representa a quantidade de trabalho mínimo requerido por unidade de área para criar uma superfície de maior área (FARN, 2006; COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, 2009; SEN, 2010).

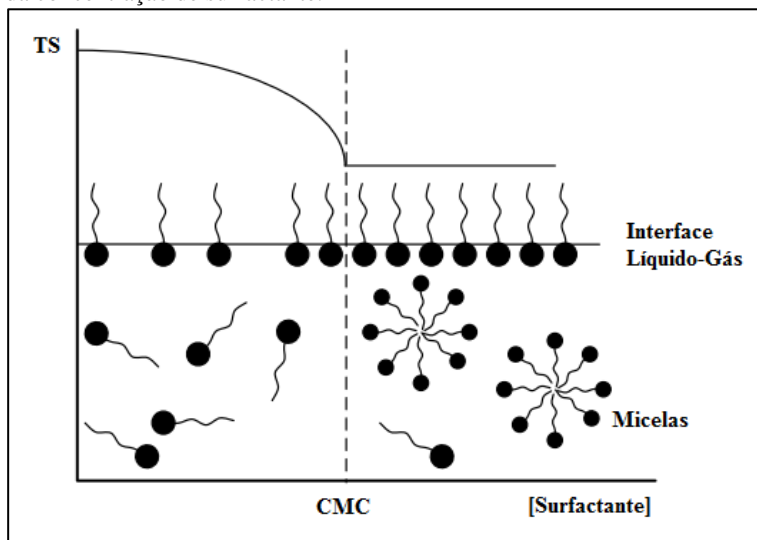
Conforme mencionado anteriormente, um surfactante é caracterizado pela sua atividade de superfície. Isto significa que quando adicionado a um líquido em baixas concentrações, as moléculas do surfactante devem ser capazes de se adsorver na superfície ou interface do sistema e reduzir a energia livre superficial ou interfacial. A redução da tensão superficial está relacionada com às características e a concentração do surfactante. À medida que a concentração é aumentada, as moléculas de surfactante começam a orientar-se na interface de acordo com a natureza do grupo hidrofílico e da interface, reduzindo os valores de tensão superficial (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998).

Concentração micelar crítica

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração na qual o número de moléculas disponíveis do surfactante é suficiente para formar uma camada na interface, não sendo mais observadas variações nos valores de tensão superficial e interfacial. A concentração micelar crítica é uma característica intrínseca dos surfactantes, sendo considerada um indicador da efetividade de um tensoativo (COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLO, 2009).

Se houver um aumento na concentração do surfactante acima da sua CMC, as moléculas adicionais tendem a se agregar e formar estruturas tridimensionais ordenadas, conhecidas como micelas. A Figura 2 apresenta a variação da tensão superficial e a formação de micelas em função da concentração dos surfactantes. O processo de formação de micelas ocorre num intervalo pequeno de concentrações, e pode ser detectado pela variação brusca produzida em determinadas propriedades físico-químicas da solução em função da concentração do tensoativo (TADROS, 2014; SANTOS et al., 2016b).

Figura 2 – Variação da tensão superficial (TS) e formação de micelas em função da concentração de surfactante.



Fonte: Adaptado de Coca-Prados e Gutiérrez-Cervelló (2009).

A principal razão para a formação de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água, podendo assumir diferentes conformidades estruturais. Sua formação resulta na solubilização de substâncias hidrofóbicas em água, formando emulsões. Esta característica vem sendo explorada em aplicações como a extração de proteínas do caldo de fermentação, remoção de íons metálicos e orgânicos a partir de solução aquosa e em aplicações no setor ambiental (OLIVEIRA, 2010).

2.1.2 Perspectivas no uso de surfactantes

Os surfactantes possuem uma ampla gama de aplicações, envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espuma, umectabilidade, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002), com utilização em diversos segmentos industriais, como de cosmético, de alimentos, de produtos de higiene pessoal e de limpeza, entre outros. A produção mundial de surfactantes excede os três milhões de toneladas por ano, sendo a maior parte desta, destinada à produção de produtos de limpeza de uso industrial e doméstico (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Apesar da ampla utilização dos surfactantes, a maioria dos tensoativos comerciais são sintetizados quimicamente a partir de fontes petroquímicas (entre 70 a 75 %), apresentando alguns deles características recalcitrantes (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014). Recentemente, tem sido dada grande ênfase aos impactos ambientais causados pelos surfactantes químicos devido à sua toxicidade e dificuldade em serem degradados uma vez presentes no ambiente (SANTOS et al., 2016b).

Desta forma, o setor industrial tem demonstrado grande interesse na realização de estudos referentes a obtenção de surfactantes de origem biológica, intensificando o interesse na utilização de biosurfactantes em substituição aos surfactantes sintéticos.

2.2 BIOSSURFACTANTES

A crescente preocupação com os recursos naturais aliada à busca pela sustentabilidade industrial, tem impulsionado o setor a desenvolver produtos e processos de elevada performance e ambientalmente seguros. Neste contexto, a industrialização globalizada tem redirecionado a atenção às tecnologias emergentes, abrindo oportunidades para diversos estudos, principalmente na área de biotecnologia, onde a produção

comercial de biomoléculas é crescente (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Dentre estes compostos figuram os biossurfactantes, estruturas anfílicas produzidas por uma variedade de microrganismos. Estudos envolvendo biossurfactantes começaram em 1960 e o uso desses compostos tem se expandido nas últimas décadas (SANTOS et al., 2016b). Baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e estabilidade em condições extremas de pH e temperatura, são algumas das propriedades comprovadas dos biossurfactantes. Estas características possibilitam sua aplicação em diversos setores industriais, bem como em processos de biorremediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014).

Os biossurfactantes são um grupo heterogêneo de moléculas com atividades superficiais, produzidos extracelularmente ou como parte de membranas celular de uma variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (RAHMAN; GAKPE, 2008). Nas últimas décadas, tem havido um aumento do interesse científico no que se refere ao isolamento de microrganismos que produzem moléculas com propriedades interfaciais, tais como baixos valores de CMC e elevada atividade emulsionante. A literatura descreve bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* como grandes produtores de biossurfactantes. No entanto, a maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana é inadequada para uso na indústria de alimentos e nas áreas clínica e farmacêutica devido à sua possível natureza patogênica (SHEPHERD et al., 1995). Desta forma, a importância da avaliação da produção de biossurfactantes por fungos filamentosos e leveduras reside no seu estado geralmente considerado como seguro, não oferecendo riscos de toxicidade ou patogenicidade, o que amplia as possibilidades de aplicação (SANTOS et al., 2016b).

A produção de diferentes classes de biossurfactantes, em sua maioria, depende do tipo de microrganismo utilizado, sendo que a porção hidrofílica tem relação com o tipo de substrato e condições de processo utilizados (FIECHTER, 1992). A maioria dos biossurfactantes são de característica iônica e a porção hidrofóbica é constituída geralmente por um ácido graxo de cadeia longa, enquanto que a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um peptídeo cíclico, um aminoácido, um ácido carboxílico ou um álcool (JIRKU et al., 2015).

2.2.1 Classificação dos biossurfactantes

Biossurfactantes podem ser classificados de acordo com diferentes critérios. Podem ser classificados quanto à sua massa molar (biossurfactantes de elevada massa molar e de baixa massa molar), carga iônica (aniônicos, catiônicos, não iônicos e neutros) e tipo de secreção (intracelular, extracelular e aderido a células microbianas). No entanto, a caracterização bioquímica apresenta um dos principais critérios para a classificação destes compostos (INÊS; DHOUHA, 2015a).

Microorganismos sintetizam uma ampla variedade de biossurfactantes de alta e baixa massa molecular. Os biossurfactantes de alta massa molecular são geralmente polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros. Por sua vez, os biossurfactantes de baixa massa molecular são compostos derivados de glicolipídeos e lipopeptídeos. Os biossurfactantes de alta massa molecular são mais efetivos como estabilizantes de emulsões água/óleo, enquanto que os de baixa massa molecular apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos (ROSENBERG; RON, 1999).

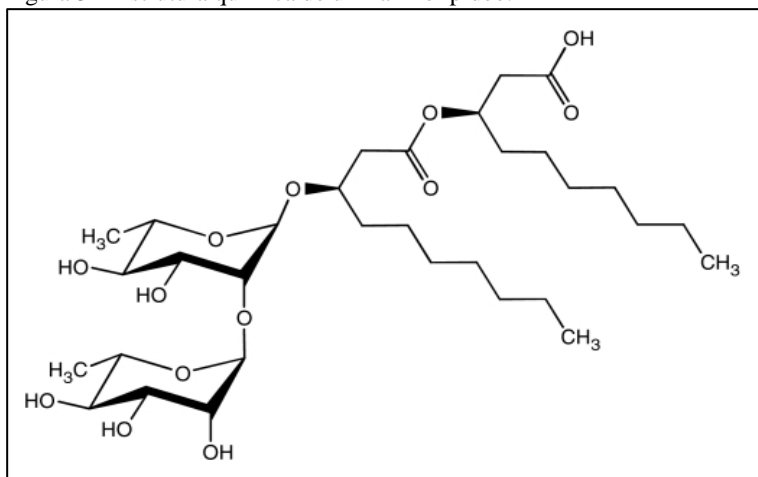
Kosaric (1992) e Banat (1997) classificam os biossurfactantes com base nas estruturas, a saber: glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos, lipopolissacarídeos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados. Dentre estes, apenas duas classes de biossurfactantes são atualmente consideradas de relevância industrial e econômica: glicolipídeos e lipopeptídeos (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014).

Estruturalmente, os glicolipídeos são constituídos por um ácido graxo em combinação com uma porção de carboidrato e correspondem a um grupo de compostos que diferem pela natureza da porção hidrofóbica (lipídeo) e da porção hidrofílica (carboidrato). Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais estudados, sendo a sua produção largamente atribuída à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (MOYA-RAMÍREZ et al., 2015; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015; LEITE et al., 2016; VARJANI; UPASANI, 2016). Estruturalmente, correspondem a uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido p-hidroxidecanóico (Figura 3), apresentando propriedades funcionais como capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial, capacidade de estabilizar emulsões e de formação de espuma, solubilização e umectabilidade. Além disso, apresentam atividades biológicas como atividade antimicrobiana, hemolítica, antiviral, anticarcinogênica e imunológica, o que os tornam

interessantes para aplicações nas áreas médica e terapêutica. Além disso, os glicolipídeos podem ser produzidos a partir de matérias-primas não dispendiosas que estão disponíveis em grandes quantidades, tais como resíduos industriais e subprodutos oleosos, incluindo hidrocarbonetos, resíduos de óleo de fritura e resíduos de óleos e azeites vegetais (INÈS; DHOUHA, 2015a).

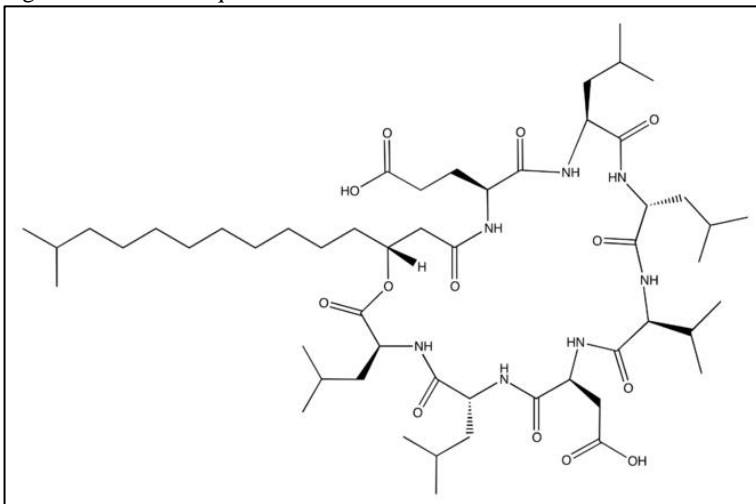
Os lipopeptídeos são, provavelmente, a classe de biossurfactantes mais estudada. Estruturalmente, são constituídos por um ácido graxo em combinação com uma porção peptídica e correspondem a um grupo de isoformas que difere pela composição da porção peptídica, pelo comprimento da cadeia do ácido graxo e pela ligação entre as duas partes (INÈS; DHOUHA, 2015b). Surfactina (Figura 4), iturina, fengicina e liquenisina estão entre os lipopeptídeos mais documentados, sendo o gênero *Bacillus* reconhecido como produtor expressivo destas biomoléculas (SLIVINSKI et al., 2012; BEN AYED et al., 2015; GURJAR; SENGUPTA, 2015; MAASS et al., 2015). Geralmente, os lipopeptídeos são caracterizados por sua baixa CMC e por diversas propriedades funcionais envolvendo emulsificação, dispersão e solubilização de fases e umectabilidade, permitindo sua utilização em diferentes áreas. Além disso, são estáveis em relação às condições extremas de temperaturas, pH e salinidade, além de serem biodegradáveis, oferecendo grandes oportunidades como substituinte dos surfactantes sintéticos (INÈS; DHOUHA, 2015b).

Figura 3 – Estrutura química de um ramnolipídeo.



Fonte: Geys; Soetaert; Van Bogaert (2014).

Figura 4 – Estrutura química da surfactina.



Fonte: Geys; Soetaert; Van Bogaert (2014).

2.2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes

Biossurfactantes são geralmente produzidos por microrganismos aeróbios em cultivo em meio líquido, utilizando diferentes substratos como carboidratos (EL-SHESHTAWY et al., 2016; MOUAFI; ABO ELSOUD; MOHARAM, 2016; FADHILE ALMANSOORY et al., 2017), hidrocarbonetos (FOOLADI et al., 2016; BEZZA; CHIRWA, 2017) e óleos e gorduras (SANTOS et al., 2016a; BAGHERI LOTFABAD et al., 2017; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017). Diferentes microrganismos têm sido utilizados na busca por biossurfactantes com propriedades diferenciadas que atendam às demandas específicas. Diversos gêneros de bactérias são amplamente explorados para a produção de biossurfactantes, em pequena e grande escala. Os principais tensoativos bacterianos conhecidos (ramnolipídeo e surfactina) já são utilizados em diversos setores industriais. O Quadro 1 apresenta os principais microrganismos e substratos utilizados na produção de biossurfactantes reportados na literatura.

As bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* são conhecidas pela sua capacidade de produzir biossurfactantes utilizando diferentes substratos tais como glicerol, glicose e óleos vegetais, para a síntese de lipopeptídeos e glicolipídeos. Os ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* têm sido largamente estudados, possibilitando

a sua utilização em diversas aplicações (KUMARI; SINGH; SINGH, 2012; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015; DÍAZ DE RIENZO; KAMALANATHAN; MARTIN, 2016). Ao mesmo tempo, *Bacillus subtilis* é comumente reportado quanto a sua capacidade de produzir surfactina (SLIVINSKI et al., 2012; ZHU et al., 2013; EL-SHESHTAWY et al., 2016).

Quadro 1 – Trabalhos realizados sobre a produção de biossurfactantes utilizando diferentes microrganismos e substratos.

Bactérias		
Microrganismo	Substrato	Fonte
<i>Bacillus</i> sp.	Resíduo da extração bifásica do azeite de oliva Resíduos agroindustriais Farinha da casca de batata	Maass et al. (2015), Moya-Ramírez et al. (2015) Nitschke; Ferraz; Pastore (2004) Mnif et al. (2013)
<i>Serratia rubidaea</i>	Resíduos oleosos vegetais	Nalini; Parthasarathi (2014)
<i>Rhodococcus</i> sp.	Óleo cru Glicerol	Kumari; Singh; Singh (2012) Pirog et al. (2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hidrocarbonetos Óleo de soja Resíduo da extração bifásica do azeite de oliva	Sakthipriya; Doble; Sangwai (2015) Abbasi et al. (2012) Moya-Ramírez et al. (2015)
<i>Streptomyces</i> spp.	Hidrocarbonetos derivados de petróleo	Ferradji et al. (2014)
Leveduras		
Microrganismo	Substrato	Fonte
<i>Candida lipolytica</i>	Resíduo de refinarias de óleo vegetal	Rufino et al. (2014)
<i>Candida sphaerica</i>	Resíduo da extração de óleo de amendoim	Luna; Rufino; Sarubbo (2016)
Fungos filamentosos		
Microrganismo	Substrato	Fonte
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Casca de sementes de	Velioğlu, Zulfıye ;

	girassol	Öztürk Ürek (2015)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Óleo de soja e óleo diesel	Castiglioni; Bertolin; Costa (2009)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Óleo de soja	Alves (2015)
<i>Ustilago maydis</i>	Óleo de soja, óleo de girassol e azeite de oliva	Cortes-Sanchez; Jaramillo-Flores; Hernandez-Sanchez (2010)

Entre as leveduras, espécies do gênero *Candida* têm sido largamente empregadas na produção de biossurfactantes a partir de hidrocarbonetos e óleos vegetais. Santos e colaboradores (2016a) avaliaram a produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* em larga escala, obtendo 40 g.L⁻¹ de um derivado de glicolípido, apresentando potencial tecnológico e econômico para ser utilizado em diferentes aplicações.

A produção de biossurfactantes por fungos é ainda incipiente e poucos pesquisadores têm atraído sua atenção para estes microrganismos. No entanto, diferentes estudos têm demonstrado que estes microrganismos são capazes de produzir tensoativos com excelentes propriedades (COLLA et al., 2010; SAJNA et al., 2015; VELİOĞLU, ZULFIYE; ÖZTÜRK ÜREK, 2015). Sabe-se que diferentes fungos possuem capacidade de sintetizar glicolípídeos, entretanto a identificação dos genes responsáveis pela produção de biossurfactantes fúngicos ainda é desconhecida (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008).

2.2.3 Mecanismos de síntese de biossurfactantes

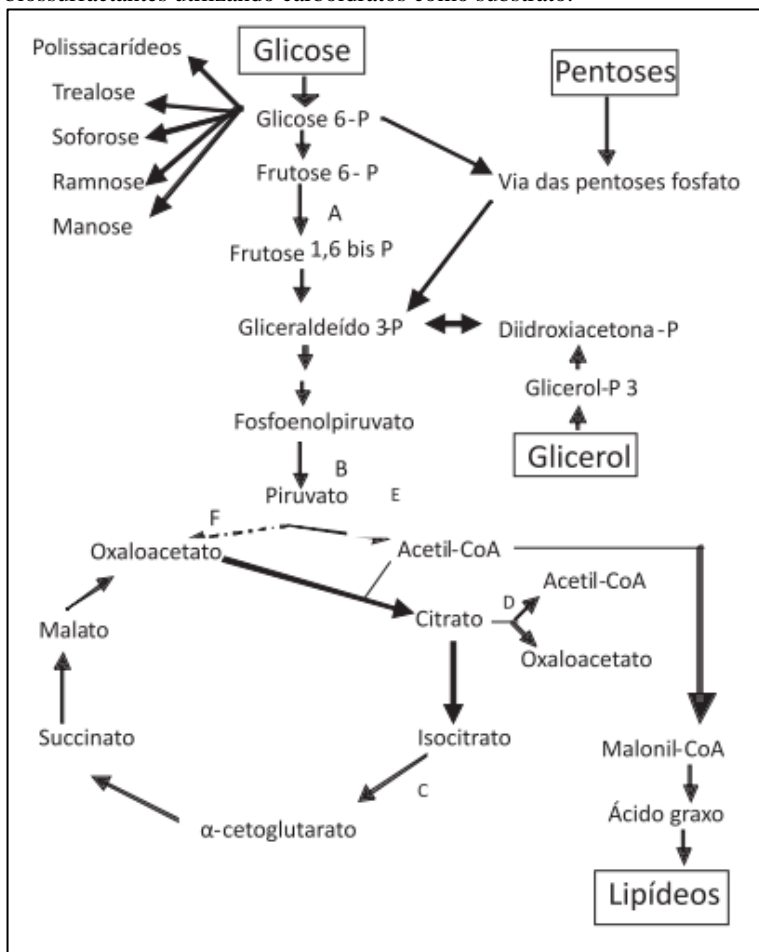
A capacidade de diferentes microrganismos em produzir biomoléculas que apresentem atividade de superfície tem sido amplamente investigada. Vários autores relacionam a produção de biossurfactantes como um mecanismo de sobrevivência da microbiota em diferentes substratos hidrofóbicos, amplamente utilizados como indutores da expressão destas moléculas. No entanto, a produção de biossurfactantes em substratos solúveis em água tem sido reportada na literatura (EL-SHESHTAWY et al., 2016; MOUAFI; ABO ELSOUD; MOHARAM, 2016; FADHILE ALMANSOORY et al., 2017).

Um bom conhecimento do mecanismo de biossíntese e da influência do substrato na produção de biossurfactantes fornece informações úteis para a melhoria dos processos. Entretanto, aspectos da biossíntese e regulação genética de poucos biossurfactantes são bem conhecidos (MULLIGAN; SHARMA; MUDHOO, 2014). Diversas reações ocorrem nas vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para a produção de biossurfactantes. De forma geral, os biossurfactantes são sintetizados por duas vias metabólicas, que estão envolvidas na formação das porções hidrofílicas e hidrofóbicas, dependendo da natureza das principais fontes de carbono utilizadas pelo microrganismo (SEN, 2010).

As porções hidrofílica e hidrofóbica dos biossurfactantes são sintetizadas por vias independentes, sendo posteriormente agrupadas para formar uma estrutura anfipática. As duas porções podem ser unidas por uma ligação éster, ligação amida ou ligação glicosídica. A biossíntese de ambas as unidades, hidrofílica e hidrofóbica, pode ser por via *de novo*, onde moléculas complexas são sintetizadas a partir de estruturas simples, como aminoácidos, ou através da indução do substrato (SIÑERIZ; HOMMEL; KLEBER, 2001). O entendimento destes mecanismos para um sistema particular é importante para a concepção do processo, no que diz respeito à escolha dos substratos e a determinação das condições de cultivo.

A fonte de carbono influencia a síntese de biossurfactante por indução ou repressão. Quando se utiliza carboidratos como única fonte de energia, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênica (formação de lipídeos) e glicolítica (responsável pela formação da porção hidrofílica) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano (Figura 5). O substrato hidrofílico utilizado, como por exemplo glicose, frutose, sacarose e glicerol, é degradado até formar intermediários da via glicolítica. A glicose 6-fosfato é um destes intermediários, sendo um dos principais precursores para a síntese dos carboidratos presentes na porção hidrofílica dos biossurfactantes, como por exemplo trealose, sofrose e ramnose. Para a síntese da porção hidrofóbica, a glicose é oxidada a piruvato, sendo posteriormente convertido a acetilcoenzima A (acetil-CoA). Em seguida, a acetil-CoA reage com oxaloacetato, um intermediário do ciclo de Krebs, produzindo malonil-CoA e posteriormente ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; SANTOS et al., 2016b).

Figura 5 – Mecanismo de síntese dos precursores da produção de biossurfactantes utilizando carboidratos como substrato.

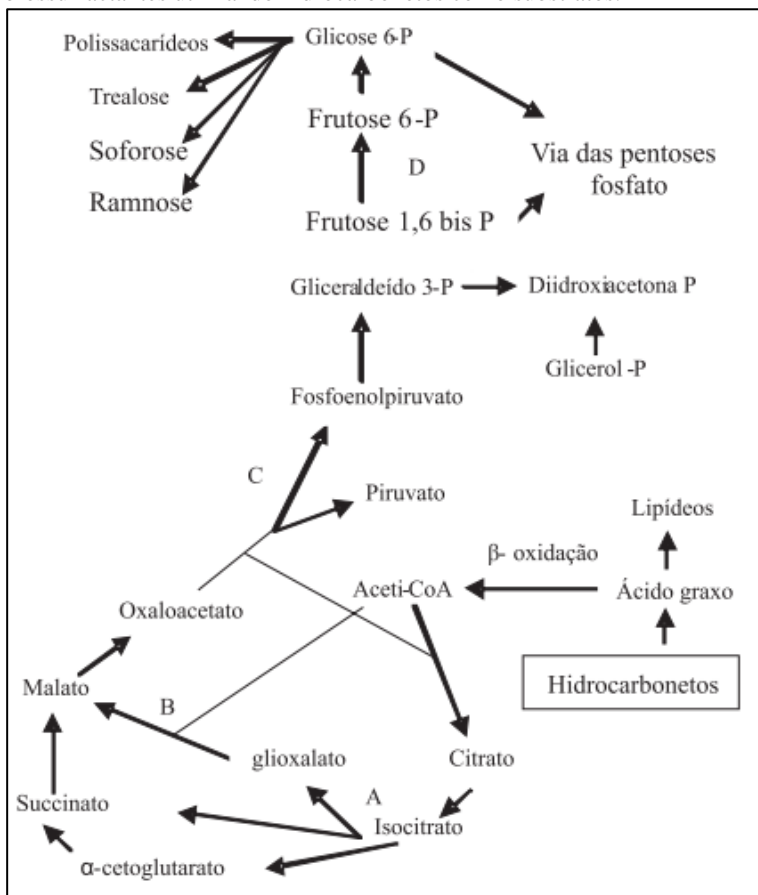


Fonte: Fontes; Amaral; Coelho (2008).

O catabolismo de substratos hidrofóbicos, tais como hidrocarbonetos e triglicerídeos, incluem várias vias metabólicas e diferentes compartimentos celulares. Os triglicerídeos são primeiramente hidrolisados por enzimas lipolíticas em ácidos graxos livres, os quais então entram na célula. Hidrocarbonetos são oxidados no retículo endoplasmático, sendo posteriormente convertidos em seu ácido graxo correspondente. A via da glicogênese é então ativada, ocorrendo a

oxidação dos ácidos graxos via β -oxidação a acetil-CoA. A partir da formação da acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores da porção hidrofílica da molécula de biossurfactante, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; SANTOS et al., 2016b). As principais reações envolvidas na síntese dos precursores da produção de biossurfactantes a partir de hidrocarbonetos são apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Mecanismo de síntese dos precursores da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos como substratos.



Fonte: Fontes; Amaral; Coelho (2008).

2.2.4 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

Estudos têm indicado que fatores nutricionais e condições ambientais podem influenciar o tipo e o rendimento dos biossurfactantes produzidos. O crescimento celular e o acúmulo de metabólitos são fortemente influenciados pelas fontes de carbono e nitrogênio e demais nutrientes requeridos pelos microrganismos. Ainda, fatores operacionais como temperatura, pH, aeração e agitação podem afetar a produção destas biomoléculas. A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de determinados compostos denominados de indutores, ou quando o crescimento é mantido sob condições de estresse (SANTOS et al., 2016b). Desta forma, o entendimento da influência de cada um destes fatores auxilia na maximização da produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos.

A escolha da fonte de carbono tem um importante papel sobre o rendimento dos biossurfactantes, podendo exercer influência por indução ou repressão. Existem microrganismos que somente produzem biossurfactantes na presença de substratos hidrofóbicos, enquanto outros requerem substratos solúveis (DUARTE, 2003). Almansoori e colaboradores (2017) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de biossurfactantes por *Serratia marcescens*. O estudo comparativo revelou que a produção de biossurfactantes foi estimulada na presença de substratos hidrofóbicos, obtendo uma maior produtividade quando utilizado azeite de oliva em comparação com fontes de carbono solúveis (glicose, sacarose e frutose).

Outros componentes do meio de cultivo afetam a produção de biossurfactantes, como a fonte de nitrogênio, desempenhando influência sobre o metabolismo e crescimento celular. As fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e nitratos) são as mais utilizadas em comparação as fontes orgânicas (VARJANI; UPASANI, 2016). Ainda, baixas concentrações de nitrogênio limitam o crescimento celular favorecendo o metabolismo para a produção de bioprodutos (MANEERAT, 2005; SANTOS et al., 2016b). As condições limitantes de nitrogênio provocam um declínio das atividades específicas das enzimas que catalisam a oxidação do isocitrato a α -cetoglutarato no ciclo de Krebs. Como resultado, ocorre um acúmulo de citrato que é posteriormente convertido em acetil-CoA, indutor da síntese da porção hidrofílica dos biossurfactantes, conforme mencionado anteriormente (OKOLIEGBE; AGARRY, 2012).

As condições de cultivo, como temperatura, pH, velocidade de agitação e aeração afetam o crescimento e a atividade dos microrganismos, influenciando a produção de biossurfactantes. As condições ambientais ótimas para a biossíntese de tensoativos são específicas para cada processo, de acordo com as características fisiológicas do microrganismo utilizado (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008).

O tipo de cultivo também pode ser um fator que influencia no rendimento da produção de compostos biotecnológicos. Ambos os cultivos sólido e submerso, têm sido reportados na produção de biossurfactantes, sendo o segundo mais explorado pelos pesquisadores. Segundo Colla e colaboradores (2010) os bioprocessos realizados por meio de cultivo em meio líquido tem as vantagens de ter uma melhor homogeneidade do meio de cultura e a manutenção de parâmetros de processo, como pH e temperatura.

O cultivo submerso com bactérias é predominante para a produção de biossurfactante. Porém, bactérias e leveduras podem crescer em substratos sólidos em níveis de 40-70 % de umidade. Os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas utilizando processos fermentativos em estado sólido, pois podem crescer na ausência de água livre (SCHMIDELL et al., 2001; RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

Das e Mukherjee (2007) compararam a capacidade de produção de lipopeptídeos por *Bacillus subtilis* em cultivo em estado sólido e em meio líquido. Estes autores obtiveram um rendimento ligeiramente superior no cultivo em meio sólido comparado ao sistema submerso. Ainda, devido às menores quantidades de água requeridas no sistema sólido, os processos subsequentes de extração e purificação foram favorecidos.

Velioğlu, Zulfiye e Öztürk Ürek (2015) estudaram a produção de biossurfactantes por *Pleurotus ostreatus* em ambos os sistemas de cultivo. Os resultados apresentados indicaram que o cultivo em estado sólido foi mais eficiente para a produção de biossurfactantes, concluindo que esta estratégia de cultivo representa uma abordagem potencial para a obtenção de produtos biotecnológicos de valor agregado.

2.2.5 Desafios e perspectivas na produção de biossurfactantes

Apesar da ampla gama de aplicações e das diversas vantagens supracitadas, a produção em escala industrial de biossurfactantes é ainda escassa. Alguns produtos comerciais já incluíram biossurfactantes em

suas formulações, entretanto, ainda existem vários problemas para que um uso mais generalizado possa ser considerado. Estes problemas referem-se, principalmente, aos baixos rendimentos geralmente obtidos e aos custos de produção. Estima-se que o custo para a produção de biossurfactante é aproximadamente três a dez vezes maior que o custo para produzir um surfactante químico. No entanto, o mercado de biossurfactantes é promissor, o que impulsiona o setor a desenvolver estratégias de produção mais eficientes. De acordo com dados recentes, o mercado global de biossurfactantes valia 1,7 bilhão de dólares em 2011 e deverá atingir 2,2 bilhões de dólares em 2018, com base numa taxa de crescimento de 3,5 % ao ano (REIS et al., 2013).

Em muitos processos biotecnológicos, os processos de extração e purificação (processos *downstream*) representam de 70 % a 80 % dos custos totais, tornando na maioria dos casos o processo de produção inviável economicamente. Desta forma, deve-se desenvolver processos de forma a obter biossurfactantes que possam ser facilmente extraídos, além de serem necessários mais estudos no desenvolvimento de estratégias de extração e purificação mais eficientes (MARCHANT; BANAT, 2012; SANTOS et al., 2016b).

Além disso, a investigação de substratos de baixo custo na produção de biossurfactantes se faz necessária, uma vez que o custo da matéria-prima representa de 10 a 30 % do custo total da produção. Também são essenciais condições de crescimento e produção ótimas, onde o uso de várias ferramentas de otimização estatística e matemática pode melhorar o rendimento e reduzir os custos da produção de biossurfactantes (MULLIGAN; SHARMA; MUDHOO, 2014).

Neste sentido, vários trabalhos estão centrados na minimização dos custos de produção empregando substratos de fontes residuais. A utilização de resíduos, além de reduzir os custos de produção, também confere ao produto um reforço ao título de *eco-friendly*, contribuindo para o apelo mercadológico de produtos sustentáveis. O aproveitamento de substratos provenientes de resíduos oleoso, tais como ácidos graxos, resíduos de óleo de fritura, resíduos da produção de azeite de oliva, subprodutos do refino de petróleo, etc., constituem-se em exemplos de substratos residuais com produtividades interessantes e cuja utilização representa um importante ganho ambiental. Também os materiais lignocelulósicos, compostos de lignina, hemicelulose e celulose, tem se mostrado viáveis para uso em processos biotecnológicos para a produção de diferentes compostos, principalmente, em cultivo de fungos filamentosos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; HENKEL et al., 2012).

Os principais critérios a serem considerados para que a produção de biossurfactantes se torne verdadeiramente viável envolvem: o tipo de matérias-primas, o tipo de microrganismo, a concepção adequada das estratégias de cultivo, a necessidade de utilização de processos de purificação, as propriedades do biossurfactante obtido, condições de produção, especialmente o tempo de processo e a obtenção de rendimentos adequados. A utilização de extratos brutos pode ser uma solução viável, especialmente se a aplicação estiver num contexto ambiental. Os biossurfactantes, nestes casos, não necessitam apresentar níveis de pureza e podem ser sintetizados utilizando uma mistura de fontes de carbono de baixo custo, o que permitiria a criação de uma tecnologia economicamente viável para os processos de biorremediação (MARCHANT; BANAT, 2012).

Tendo em vista o fato de que a estratégia de cultivo é um ponto chave na obtenção viável de biossurfactantes, todas as variáveis acessíveis devem ser testadas, avaliando as cinéticas de consumo de substrato e formação de produtos, buscando encontrar uma solução otimizada das condições de processo (JIRKU et al., 2015). Embora as melhorias na tecnologia dos biossurfactantes tenham permitido um aumento de 10 a 20 vezes na produção destas biomoléculas, é provável que sejam necessários outros avanços significativos para tornar esta tecnologia comercialmente viável (SANTOS et al., 2016b).

2.3 RESÍDUOS OLEOSOS

Os resíduos oleosos são constituídos, principalmente, por gorduras, hidrocarbonetos e frações de petróleo como diesel, gasolina e querosene. Estes resíduos constituem um importante problema ambiental devido à sua alta capacidade contaminante. Estima-se que cada litro de óleo despejado na rede de saneamento tem capacidade de poluir cerca de um milhão de litros de água (FERREIRA, L.C.; FERNANDES, 2011). Ainda, uma vez presente no ambiente, estes compostos permanecem na superfície das águas, dificultando a entrada de luz e a transferência de oxigênio, comprometendo assim a função fotossintética das plantas e a base da cadeia alimentar. Os óleos e graxas em seu processo de decomposição diminuem o oxigênio dissolvido, aumentando assim, a demanda bioquímica de oxigênio e, em última análise, causando alterações no ecossistema aquático (JAMALY; GIWA; HASAN, 2015).

As leis ambientais vigentes vêm contribuindo na minimização dos impactos ambientais decorrentes das grandes quantidades de

contaminantes presentes nas águas residuais, obrigando o setor industrial a obedecer a limites máximos permitidos para o descarte de efluentes, e a investir em processos mais eficientes de tratamento. No Brasil, a resolução nº 430/2011 do CONAMA, estabelece condições e padrões de lançamento de efluentes, onde fica definido um limite de descarte de 20 mg.L^{-1} para óleos minerais e de 50 mg.L^{-1} para óleos vegetais e gorduras animais (BRASIL, 2011). Em sua maior parte, estes efluentes não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, o que os torna em um preocupante problema ambiental (OLIVEIRA et al., 2014).

O tratamento de efluentes oleosos é realizado por uma variedade de tecnologias disponíveis e o grau de remoção depende, principalmente, da concentração e da forma física que ele se encontra. Quanto à forma física, o conteúdo de óleo presente em águas é classificado em quatro categorias de acordo com Coca-Prados e Gutiérrez-Cervelló (2009):

- óleo livre ou flutuante: eleva-se rapidamente para a superfície da água sob condições de repouso;
- óleo disperso: conjunto de diferentes gotículas de óleo estabilizadas por meio de suas cargas elétricas sem a presença de surfactantes;
- óleo emulsionado: possui distribuição semelhante com o óleo disperso, porém sua estabilidade é aumentada devido às interações com surfactantes presentes na interface óleo/água;
- óleo dissolvido: não está presente em gotículas visíveis, mas sim dissolvido quimicamente ou disperso em gotículas extremamente pequenas.

Os efluentes dos mais variados setores industriais possuem teores de óleos e graxas residuais (OGR) variáveis, sendo o setor alimentício e petroquímico os que apresentam os maiores níveis. Na indústria de laticínios, por exemplo, os teores de OGR geralmente encontrados nos seus efluentes estão na faixa de 200 a 4000 mg.L^{-1} . Já para a indústria de extração de óleos vegetais estes níveis estão compreendidos entre 500 a 16000 mg.L^{-1} (OLIVEIRA et al., 2014). A composição das águas residuais geradas nas refinarias de petróleo está relacionada com diversos fatores, sendo que os teores de OGR característicos desta atividade industrial estão na faixa de 20 a 4000 mg.L^{-1} (COCA-PRADOS; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, 2009).

Dentro deste aspecto, os resíduos oleosos já começam a ser reconhecidos como potencialmente recicláveis, podendo servir como

matéria-prima na fabricação de diversos produtos, sendo também amplamente investigados como substratos nos mais diversos processos biotecnológicos para a produção de biossurfactantes (WILDNER; HILLIG, 2012).

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Diante do exposto, nota-se que a produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos tem sido amplamente investigada. Entretanto, conforme mencionado anteriormente, a maioria dos biossurfactantes conhecidos são de origem bacteriana, sendo os biossurfactantes produzidos por fungos pouco conhecidos. Além disso, por meio do levantamento bibliográfico dos principais trabalhos na área, atentou-se para a utilização de substratos hidrofóbicos como indutores do metabolismo responsável pela síntese de biossurfactantes. Ainda, a utilização destes materiais em processos biotecnológicos contribui para a diminuição dos impactos ambientais gerados pelos resíduos oleosos.

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos, utilizando substratos hidrofóbicos. Os principais resultados obtidos contribuem para o avanço na identificação de fungos produtores de metabólitos com atividade de superfície, com enfoque na maximização da produção e avaliação das propriedades destas biomoléculas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho, de acordo com os objetivos elencados. Dois estudos foram realizados, avaliando diferentes estratégias para a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos, utilizando substratos oleosos como fonte principal de carbono.

3.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR *Trametes versicolor* EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

O procedimento adotado para a investigação da produção de biossurfactantes pelo fungo *Trametes versicolor* envolveu inicialmente a avaliação da utilização de um resíduo oleoso da indústria de extração de azeite de oliva como indutor da produção de biossurfactantes, seguido pela caracterização do produto obtido.

Foram realizados os seguintes ensaios: (1) avaliação da composição do substrato sólido na síntese de biomoléculas com atividade de superfície e na produção de enzimas oxidativas; (2) estudo cinético da produção de biossurfactantes; (3) extração e caracterização estrutural do biossurfactante; (4) determinação das propriedades interfaciais e biológicas do biossurfactante.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tensoativos, Enzimas e Emulsões do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Granada – UGR, Espanha. Estes experimentos são condizentes ao desenvolvimento do projeto de cooperação internacional CAPES-DGU, projeto nº 301/13.

3.1.1 Microrganismo

O fungo *Trametes versicolor* CECT 20817 foi adquirido da *Colección Española de Cultivos Tipo*, da Universidade de Valência, Espanha. O fungo foi cultivado em meio ágar batata dextrose (BDA) a 25 °C durante 7 dias, sendo posteriormente armazenado de acordo com o método de preservação Castellani (CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989). Para a manutenção e preparação do inóculo foi utilizado meio BDA em placa de Petri, realizando cultivo a 25 °C por 7 dias.

3.1.2 Substrato sólido

Um resíduo sólido da produção bifásica de azeite de oliva (RSEBAO), conhecido como *alpeorujo* foi utilizado como principal fonte de carbono. O RSEBAO foi cedido pela cooperativa *Nuestra Señora de Araceli*, Lucena, Espanha. A composição do RSEBAO utilizado neste trabalho é apresentada na Tabela 1.

A umidade do resíduo foi removida por secagem convectiva a 60 °C até massa constante, para evitar a degradação dos compostos fenólicos naturalmente presentes na amostra. Farelo de trigo comercial foi utilizado como principal fonte de nitrogênio e caroços de azeitonas foram empregados como suporte inerte, de modo a obter uma estrutura porosa, facilitando a troca gasosa e o controle de temperatura durante o cultivo.

Tabela 1 – Composição e análise elementar do RSEBAO.

Propriedade	% (base mássica)	
Umidade	64,37 ± 0,67	
Óleos e graxas	1,39 ± 0,11	
Proteínas	7,1 ± 0,4	
Carboidratos	3,38 ± 0,13	
Análise elementar	C	48,15
	N	1,18
	H	7,14

Fonte: Maass e colaboradores (2015).

3.1.3 Cultivo em estado sólido

A produção de biossurfactantes foi avaliada em cultivo em estado sólido, utilizando frascos de 300 mL contendo 100 g de substrato. O teor de umidade do meio foi ajustado em 50 % com adição de 80 mL de água destilada, com base em ensaios preliminares realizados. Os frascos contendo o meio foram esterilizados a 121 °C durante 20 min, inoculados com 3 *plugs* (35 mm de diâmetro) de micélio da cultura de *T. versicolor* e incubados por 14 dias na ausência de luz em condições controladas de temperatura (25 °C) e umidade relativa (80 %).

3.1.4 Delineamento experimental

O efeito das concentrações do RSEBAO (X_1), do farelo de trigo (X_2), bem como do caroço de azeitonas (X_3) na produção de

biossurfactantes foi avaliado, utilizando um delineamento experimental de mistura, com três componentes. A fração mássica dos componentes da mistura foi restringida por limites inferiores e superiores, de acordo com as necessidades nutricionais do fungo e da influência da relação carbono/nitrogênio sobre o metabolismo, resultando numa sub-região do espaço *simplex* (Figura 7). Ao total, 9 diferentes composições de substrato foram avaliadas, sendo a matriz experimental gerada em termos dos pseudocomponentes (Tabela 2).

Tabela 2 – Delineamento experimental de mistura com restrições para a avaliação da influência da composição do substrato sólido na produção de biossurfactantes.

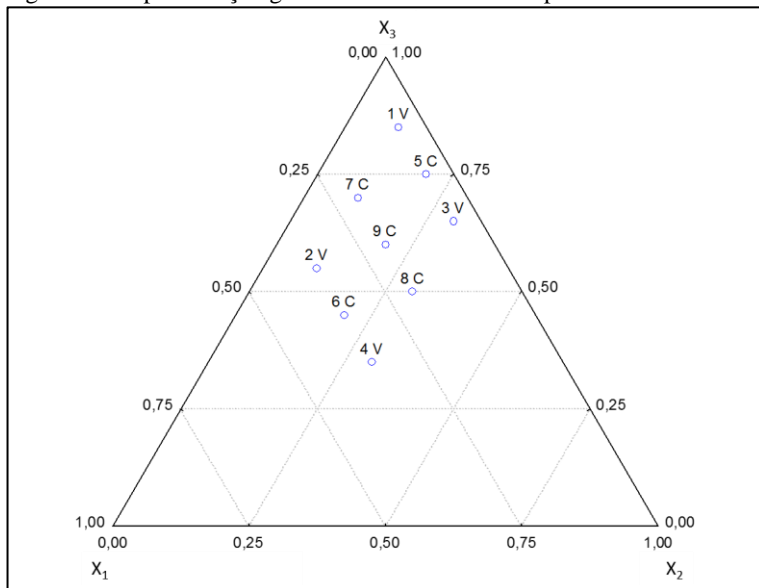
Ensaio	Componentes originais			Pseudocomponentes		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	0,05	0,10	0,85	0,0	0,0	1,0
2	0,35	0,10	0,55	0,6	0,0	0,4
3	0,05	0,30	0,65	0,0	0,4	0,6
4	0,35	0,30	0,35	0,6	0,4	0,0
5	0,05	0,20	0,75	0,0	0,2	0,8
6	0,35	0,20	0,45	0,6	0,2	0,2
7	0,20	0,10	0,70	0,3	0,0	0,7
8	0,20	0,30	0,50	0,3	0,4	0,3
9	0,20	0,20	0,60	0,3	0,2	0,5

Nota: X₁ RSEBAO

X₂ Farelo de trigo

X₃ Carçoço de azeitonas

Figura 7 – Representação gráfica do delineamento experimental de mistura.



Fonte: Autor.

O efeito da composição do substrato sólido foi avaliado sobre as respostas concernentes à produção de biossurfactantes e à expressão de enzimas fenol oxidativas. Os dados experimentais do planejamento foram ajustados aos polinômios canônicos de Sheffé. Essa estratégia permite correlacionar a composição de uma mistura frente aos parâmetros analisados, visando determinar qual a combinação/proporção dos componentes que otimiza a resposta desejada (SPANEMBERG, 2010). Foram testados os modelos linear e quadrático, expressos em termos dos pseudocomponentes, conforme apresentado nas Equações (1) e (2),

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (1)$$

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{21}x_2x_3 \quad (2)$$

3.1.5 Avaliação da produção de biossurfactantes

Ao final do período de incubação, o conteúdo dos frascos foi manualmente homogeneizado. Para a avaliação da produção de

biossurfactantes após o cultivo, uma parcela do material foi submetida à extração sólido-líquido com água destilada numa proporção de 1:6 (m:v), a 50 °C por 30 min (COLLA et al., 2010). Os extratos foram filtrados sob pressão reduzida e centrifugados (9000 xg, 20 min, 4 °C). A produção de biossurfactantes foi indiretamente avaliada pela medida da tensão superficial (TS) dos extratos obtidos e de suas respectivas diluições (fator de diluição igual a 10, TS^{-1}).

A tensão superficial foi determinada em temperatura controlada de 25 ± 2 °C utilizando o método do anel de Du Noüy em um tensiômetro KRUSS K11 (KRUSS GmbH, Hamburgo, Alemanha). Este método consiste na imersão de um anel de platina na solução teste e mede-se a força necessária para puxar o anel através da superfície do líquido, permitindo, assim, a determinação da tensão superficial em condições de equilíbrio (TEIXEIRA NETO; MALTA; SANTOS, 2009).

3.1.6 Avaliação da produção de enzimas oxidativas

Devido à presença de compostos fenólicos tanto no RSEBAO (LAFKA et al., 2011) como no farelo de trigo (WANG et al., 2008) e a capacidade de fungos de podridão branca em produzir complexos enzimáticos, foi avaliada a produção concomitante das enzimas oxidativas lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP).

Os extratos enzimáticos foram obtidos por extração sólido-líquido de uma porção do material sólido após o cultivo, utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), numa proporção de 1:5 (m:v). As amostras foram extraídas à temperatura ambiente por 1 h, sendo posteriormente centrifugadas (5000 x g, 15 min, 4 °C) (GEBIEN, 2013). As atividades enzimáticas do sobrenadante foram determinadas de acordo com a metodologia apresentada por Gil e colaboradores (2012), conforme segue.

Lac foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 1200 µL do extrato enzimático à 600 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e 200 µL da solução de ABTS 1 mM. Após a adição do extrato enzimático, a amostra foi homogeneizada e a reação foi acompanhada durante 5 min a 25 °C, pela medida da absorbância (420 nm).

A atividade enzimática de MnP foi determinada pela oxidação do vermelho fenol. Em um tubo de ensaio foram adicionados 1000 µL do extrato enzimático, 200 µL de lactato de sódio 250 mM, 400 µL de ovo

albumina 0,5 % (m:v), 100 μL de MnSO_4 2 mM, 200 μL de vermelho fenol 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 100 μL de H_2O_2 2 mM em tampão succinato de sódio (pH 4,0). A reação foi acompanhada durante 5 min a 30 °C, pela medida da absorbância a 610 nm, e interrompida pela adição de 80 μL de NaOH 2 N.

A atividade de LiP foi medida pelo acompanhamento da oxidação do álcool veratrílico em veratraldeído, por 5 min à 30 °C. Foram adicionados 400 μL do extrato enzimático, 1300 μL de tampão citrato fosfato (pH 2,6), 200 μL de álcool veratrílico 2 mM e 100 μL de H_2O_2 4 mM em um tubo de ensaio. A variação de absorbância foi medida a 310 nm.

Em todas as determinações descritas, uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto de reação, sendo as atividades enzimáticas expressas em $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato enzimático. Para a obtenção dos valores das atividades enzimáticas foram utilizados os coeficientes de extinção molar das enzimas Lac ($3600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), MnP ($4460 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e LiP ($165 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

3.1.7 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais (FT) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006), de forma a verificar a degradação destes componentes ao longo do cultivo. Para este ensaio, frações dos extratos aquosos foram liofilizadas e diluídas em água destilada na concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de amostra foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, adicionou-se à mistura 1,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 saturada. Decorridos 60 min, a absorbância da solução foi medida à 725 nm.

A concentração de FT, expressa como miligramas de ácido gálico por grama de amostra seca ($\text{mgAG}\cdot\text{g}^{-1}$), foi determinada pela interpolação com uma curva de calibração construída com ácido gálico ($y = 0,006x + 0,017$, $R^2 = 0,998$).

3.1.8 Extração do biossurfactante

Foram aplicados dois métodos diferentes de extração do biossurfactante a partir dos extratos aquosos: precipitação ácida e extração com solventes orgânicos. O primeiro método consiste na

acidificação dos extratos com uma solução de HCl 6 N até pH 2,0. Após a acidificação, os extratos foram deixados em repouso durante 12 h a 4 °C. O material precipitado foi então separado do meio líquido por centrifugação (9000 rpm, 4 °C, 20 min), diluído em água destilada alcalinizada com NaOH (pH 10,0) e liofilizado, sendo posteriormente armazenado a -18 °C (MAASS et al., 2015)

A extração com solventes orgânicos foi realizada por extração sólido-líquido dos extratos aquosos previamente liofilizados, utilizando como solvente uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1, v:v). A mistura foi mantida sob agitação (200 rpm), à temperatura ambiente, durante 3 h. Após a remoção do resíduo sólido por centrifugação (9000 rpm, 4 °C, 20 min), o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto resultante foi armazenado a -18 °C (VELIOGLU; OZTURK UREK, 2014).

3.1.9 Caracterização do biossurfactante

Os extratos contendo o biossurfactante foram caracterizados quanto ao conteúdo de carboidratos, lipídeos e proteínas e quanto à característica iônica da porção hidrofílica, de maneira a fornecer uma classificação prévia do produto biossintetizado.

O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico BCA (ácido bicinchonínico) utilizando um *kit* de ensaio comercial (Thermo Fisher). O método BCA é um dos mais sensíveis, detectando proteínas em concentrações abaixo de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e possui menos variabilidade que outros métodos convencionais. A concentração de proteínas ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) foi calculada pela interpolação com uma curva de calibração construída com ovo albumina ($y = 904,98x - 153,96$, $R^2 = 0,993$)

O conteúdo de carboidratos foi determinado utilizando o método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de uma solução de biossurfactante na concentração de 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A esta amostra, foram adicionados 0,5 mL de uma solução de fenol 5 % (m:v) e 2,5 mL de H_2SO_4 P.A. A amostra foi cuidadosamente homogeneizada e deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente. A absorbância das amostras foi determinada à 490 nm e a concentração de carboidratos totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) foi calculada pela interpolação com uma curva de calibração construída com glicose ($y = 0,00811x + 0,01605$, $R^2 = 0,999$).

O teor de lipídeos foi determinado de acordo com metodologia apresentada por Rufino e colaboradores (2014), realizando extrações

sucessivas com uma mistura de clorofórmio/metanol com diferentes polaridades. Uma amostra de 0,5 g do extrato contendo o biossurfactante, previamente liofilizado, foi dissolvida em 10 mL de clorofórmio/metanol (2:1, v:v) e a mistura foi mantida sob agitação por 15 min. Após a remoção do solvente por centrifugação (9000 xg, 5 min, 4 °C) o resíduo sólido foi ressuspensão em 10 mL de clorofórmio/metanol (1:1, v:v) e deixado sob agitação por 15 min. Finalmente, após a remoção do solvente por centrifugação (9000 xg, 5 min, 4 °C), o material resultante foi dissolvido em 10 mL de clorofórmio/metanol (1:2, v:v), sendo mantido sob agitação por 15 min. O solvente foi removido por centrifugação (9000 xg, 5min, 4 °C). Ao final do processo, as frações orgânicas coletadas foram misturadas e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O teor de lipídeos totais ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) foi determinado pela relação da massa inicial da amostra com a massa de lipídeos extraída.

A característica iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de dupla difusão em ágar, conforme descrito por Rufino e colaboradores (2014). Em uma placa de Petri contendo ágar 1 % foram feitos 3 poços regularmente espaçados. Foi adicionada uma solução de biossurfactante em um dos poços, sendo os demais preenchidos com um composto puro de característica iônica conhecida. Soluções de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 mM e cloreto de bário 50 mM foram utilizadas como controles aniônicos e catiônicos, respectivamente. A formação de halos pela presença de precipitados é um indicativo do carácter iônico do biossurfactante, sendo monitorado durante um período de 24 h a temperatura ambiente.

3.1.10 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante obtido por ambas as técnicas foi determinada a 25 °C e pH 7,0 pela medida da tensão superficial, conforme descrito no Item 3.1.5, de soluções do biossurfactante em diferentes concentrações. A CMC foi determinada a partir do ponto de ruptura da curva de tensão superficial *versus* o logaritmo da concentração de biossurfactante.

3.1.11 Estabilidade do biossurfactante

A capacidade do biossurfactante de manter a sua atividade interfacial frente a variação de temperatura e pH foi avaliada. Soluções do biossurfactante com concentração igual a CMC foram incubadas

durante 5 dias em diferentes condições de temperatura (24 °C, 45 °C e 65 °C) a pH 7,0 para investigar a estabilidade térmica do produto biossintetizado. Em relação a estabilidade frente ao pH, as soluções de biossurfactantes foram preparadas em diferentes tampões com valores de pH variando de 3,0 a 11,0. As amostras foram incubadas a 25 °C durante 5 dias. A estabilidade foi monitorada pela medida da tensão superficial das amostras a cada 24 h, conforme descrito anteriormente.

3.1.12 Atividade antibacteriana do biossurfactante

A atividade antibacteriana dos extratos de biossurfactantes, bem como dos caldos de cultivo liofilizados foi avaliada contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), e contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 9637). Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, com microplacas de 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012).

As amostras de biossurfactante e do caldo de cultivo liofilizados, diluídas à 2 mg.mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) 10 %, foram colocadas nos primeiros micropoços, e em seguida transferidas para os micropoços adjacentes, os quais contém caldo Müller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, com concentrações da amostra variando entre 1000 µg.mL⁻¹ até 7,81 µg.mL⁻¹. O inóculo bacteriano (5 µL), preparado em 0,5 da escala de McFarland, foi adicionado em cada poço, resultando em uma concentração de 5x10⁵ unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL⁻¹) do microrganismo a ser testado. Alguns poços de cada microplaca, foram reservados para realização dos controles negativos e para controle de meio de cultura (MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico comercial gentamicina, com concentrações variando de 40 a 0,31 µg.mL⁻¹. As microplacas foram incubadas aerobiamente a 37 °C ± 1 °C, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 µL em cada micropoço de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio em metanol (5 mg.mL⁻¹), observando-se a presença do “botão” bacteriano avermelhado no fundo de cada micropoço. A CIM foi definida como a última concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano.

3.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO DIESEL POR UM FUNGO ISOLADO DE UM RESÍDUO DE REFINARIA DE PETRÓLEO

Neste estudo, um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo foi avaliado quanto a sua capacidade de utilizar óleo diesel como fonte de carbono para o crescimento celular e produção de metabólitos com atividade de superfície. A estratégia experimental utilizada permitiu explorar os mecanismos envolvidos no processo e obter informações sobre a interação da produção de biossurfactantes, na presença de substratos hidrofóbicos, e a capacidade de biodegradação pelo microrganismo selecionado.

Foram realizados os seguintes ensaios: (1) avaliação de diferentes fontes de carbono hidrofóbico como indutores da produção de biossurfactantes; (2) análise dos fatores de processo que influenciam a biodegradação de óleo diesel e a produção de biossurfactantes; (3) estudo cinético; (4) avaliação da biodegradabilidade dos hidrocarbonetos; (5) extração, caracterização estrutural e determinação das propriedades interfaciais do biossurfactante.

Os ensaios concernentes a avaliação da capacidade de biodegradação de óleo diesel e a produção *in situ* de biossurfactantes pelo fungo isolado de refinaria de petróleo foi realizado no Laboratório de Transferência de Massa (Labmassa), do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

3.2.1 Microrganismo

No presente estudo foi utilizado um fungo isolado a partir de amostras de resíduo de refinaria de petróleo. O isolado (LEB 25) apresentou capacidade de crescer em substratos contendo hidrocarbonetos alifáticos e baixa atividade de água. Além disso, a estirpe respondeu positivamente aos testes indicativos de produção de biossurfactantes em estudos anteriores (SPERB et al., 2015).

O fungo foi cultivado em meio ágar batata dextrose (BDA) a 25 °C durante 5 dias, sendo armazenado de acordo com o método de preservação Castellani (CAPRILES; MATA; MIDDELVEEN, 1989). Para a manutenção e preparação do inóculo foi utilizado meio BDA em placa de Petri, realizando cultivo a 25 °C por 7 dias.

3.2.2 Meio de cultivo

A avaliação da produção de biossurfactantes pelo fungo isolado foi conduzida em cultivo submerso, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido (Tabela 3) (VELİOĞLU, ZULFIYE ; ÖZTÜRK ÜREK, 2015), suplementado com uma fonte de carbono hidrofóbico.

Tabela 3 – Composição do meio líquido para a produção de biossurfactantes por cultivo submerso do fungo isolado.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	0,7
Extrato de levedura	0,5
Peptona	10,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
KCl	0,5
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0028
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,033

Inicialmente, foi investigada a influência de diferentes fontes de suplementação de carbono hidrofóbico na produção de biossurfactantes. Para isto, ao meio de cultura foi adicionado 1% (m/v) de óleo de soja, óleo lubrificante de motor ou óleo diesel comercial S-10. Os frascos foram esterilizados a 121 °C durante 20 min, inoculados com 1 *plug* (35 mm de diâmetro) de micélio do fungo isolado e incubados por 21 dias em condições controladas de temperatura (25 °C) e agitação (150 rpm). Um ensaio controle, utilizando glicose como fonte de carbono, foi conduzido de forma a comprovar o potencial indutor da produção de biossurfactantes por substratos hidrofóbicos. A produção de biossurfactantes foi monitorada a cada 7 dias, pela medida da tensão superficial do meio de cultivo livre de células, conforme metodologia descrita no item 3.1.5.

3.2.3 Influência das condições de processo na biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo e na produção de biossurfactantes

Diante dos resultados preliminares, foi avaliada a capacidade de biodegradação do substrato hidrofóbico, bem como da produção de

biossurfactantes, pelo fungo selecionado em cultivo submerso. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar as condições ótimas dos principais parâmetros que influenciam o processo de biodegradação de óleo diesel e, conseqüentemente, a produção de biossurfactantes. Foi proposto um delineamento experimental fatorial completo com adição de pontos centrais. Foram selecionados 3 fatores: temperatura (X_1), concentração da fonte de carbono (X_2) e pH (X_3). Os valores dos níveis dos fatores considerados nesta análise são apresentados na Tabela 4. Um total de 22 ensaios, incluindo réplicas, foram realizados, de forma a avaliar os efeitos das variáveis selecionadas no crescimento microbiano, no consumo da fonte de carbono e na produção de biossurfactantes.

Tabela 4 – Parâmetros e níveis experimentais avaliados no processo de biodegradação de hidrocarbonetos e na produção de biossurfactantes.

Fator	Níveis			
		-1	0	+1
Temperatura (°C)	X_1	27	32	37
Concentração da fonte de carbono (g.L ⁻¹)	X_2	3,0	6,5	10,0
pH	X_3	3,0	5,0	7,0

3.2.4 Estudo cinético

A biodegradabilidade dos hidrocarbonetos pelo fungo foi examinada nas condições ótimas estabelecidas pelo planejamento experimental proposto em frascos agitados. Em intervalos de tempo determinados foi acompanhado o crescimento celular, a concentração residual da fonte de carbono e a tensão superficial do meio líquido.

Como forma de se avaliar o crescimento do fungo, foi determinada a velocidade específica de crescimento por regressão não linear dos dados experimentais de concentração celular ao modelo empírico de crescimento microbiano logístico (Equação 3) proposto por Zwietering e colaboradores (1990),

$$X = \frac{A}{1 + \exp \left[\frac{4\mu_m}{A} (\lambda - t) + 1 \right]} \quad (3)$$

onde X é a concentração microbiana no tempo t , em g.L⁻¹, A é a amplitude da curva, μ_m é a velocidade específica máxima de

crescimento (h^{-1}) e λ é um parâmetro relacionado com o período da fase de adaptação do microrganismo ao meio.

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$, $g.g^{-1}$) foi determinado utilizando a razão entre a variação da concentração celular e a variação da concentração da fonte de carbono, durante a fase de crescimento exponencial.

3.2.5 Ensaios de adsorção de óleo diesel

A adsorção do óleo diesel em biomassa fúngica não viável foi avaliada em sistema batelada descontínuo, nas mesmas condições de temperatura e pH definidos nos ensaios de biodegradação. Desta forma, foi verificada a contribuição deste mecanismo na eficiência global de remoção de óleo diesel pelo fungo selecionado.

Para a obtenção da biomassa, o fungo foi cultivado em sistema submerso, utilizando o meio líquido proposto por Mathialagan e Viraraghavan (2009) (Tabela 5). O cultivo foi realizado durante 5 dias em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio líquido, a uma temperatura de 25 °C e 150 rpm de agitação. Como inóculo foram utilizados 3 *plugs* de 35 mm de micélio do fungo. Após o cultivo a biomassa foi separada do meio líquido por filtração sob pressão reduzida, lavada com água deionizada e esterilizada à 121 °C durante 20 min.

Tabela 5 – Composição do meio líquido para obtenção de biomassa.

Composto	Concentração ($g.L^{-1}$)
Dextrose	20,00
Peptona	10,00
NaCl	0,20
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,10
KCl	0,10
KH ₂ PO ₄	0,50
NaHCO	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001

Os ensaios de adsorção foram realizados em frascos Erlenmeyer de 100 mL, contendo 50 mL de meio (Tabela 3) com diferentes concentrações de óleo diesel. Foi utilizada uma concentração de biomassa de 0,15 $g.L^{-1}$ em base seca, de acordo com os resultados de

experimentos preliminares. Após 48 h de processo, as amostras foram filtradas e o conteúdo residual de óleo diesel foi determinado. A quantidade de óleo diesel adsorvida por unidade de biomassa fúngica foi calculada utilizando a Equação (4),

$$q_e = \frac{(C_0 - C^*)V}{W} \quad (4)$$

onde q_e é a capacidade de adsorção expressa em mg de adsorbato por g de adsorvente no estado de equilíbrio, C_0 e C^* são as concentrações inicial e de equilíbrio, respectivamente, em mg.L^{-1} , V é o volume da solução em L e W é a massa de adsorvente em g.

A quantidade de óleo diesel adsorvido por unidade de massa de adsorvente (q_e) foi correlacionada com a concentração de equilíbrio da fase líquida (C^*) através do ajuste não linear dos dados experimentais às isotermas de Langmuir e Freundlich.

3.2.6 Estudo realizado em biorreator de bancada

A partir dos resultados obtidos dos ensaios em frascos Erlenmeyer, foram definidas as melhores condições de cultivo do fungo isolado para o processo de biodegradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes, sendo estas condições avaliadas em um biorreator de bancada (BIO-TEC-FLEX, Tecnal).

Foi utilizado um biorreator batelada tipo tanque agitado, com volume útil e de trabalho de 5,0 L e 4,0 L, respectivamente. O controle do pH do meio foi feito pela adição de soluções de HCl 6 M ou de NaOH 6 M. A aeração do sistema foi realizada pela injeção de ar comprimido no fundo do biorreator a uma vazão de $3,0 \text{ L.min}^{-1}$. A frequência de agitação foi mantida em 300 min^{-1} . O biorreator foi acoplado a um sistema de controle, e a medição da temperatura, pH e oxigênio dissolvido foi realizada por sensores acoplados ao biorreator. O biorreator foi inoculado com uma pré-cultura do fungo isolado, cultivado sob as mesmas condições, durante 7 dias, adotando uma fração de inóculo de 10 % (v:v).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) foi determinado utilizando o método dinâmico proposto por Bandyopadhyay e colaboradores (2009). O método consiste na interrupção no fornecimento de oxigênio e na diminuição quase total do sistema de agitação. Esta perturbação no sistema é realizada em um curto intervalo de tempo, para evitar interferências no processo em

análise. Ao interromper o fornecimento de oxigênio, observa-se uma queda na concentração de oxigênio dissolvido no meio, devido à respiração celular. Ao retornar a aeração e agitação do meio, a concentração de oxigênio dissolvido tende a retornar ao seu nível inicial. Desta forma, o valor de K_La foi determinado realizando um balanço de massa para o oxigênio no período ascendente da curva do método dinâmico (Equação 5),

$$\ln\left(\frac{C_i - C}{C_i - C_0}\right) = -K_La(t - t_0) \quad (5)$$

onde C_i , C_0 e C são as concentrações de oxigênio dissolvido antes de se interromper a aeração e agitação, no tempo t_0 ao retornar a aeração e agitação e em um tempo t durante a etapa de absorção de oxigênio no meio.

3.2.7 Determinação da concentração celular

A biomassa produzida foi removida dos sistemas de cultivo por filtração sob pressão reduzida através de um papel de filtro Whatman de massa conhecida. A fim de remover o óleo diesel fracamente aderido à biomassa, a amostra foi lavada duas vezes com 5 mL de clorofórmio. A massa seca de micélio foi determinada após secagem das amostras a 65 °C até massa constante, sendo a concentração de células expressa em gramas de biomassa seca por litro de meio (g.L^{-1}).

3.2.8 Determinação da concentração de óleo diesel

Para medir a eficiência de biodegradação o óleo diesel residual foi extraído dos sistemas de cultivo por extração líquido-líquido utilizando-se clorofórmio. Num funil de separação foram adicionados 50 mL do meio líquido livre de células e 20 mL de clorofórmio, em duas parcelas. Primeiramente, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e em seguida, procedeu-se a agitação manual do funil de separação por aproximadamente 1 min. Após isso, o funil foi deixado em repouso por aproximadamente 1 min até verificação da separação das fases aquosa e orgânica. Em seguida, a fase orgânica foi drenada e o processo foi repetido com a adição de mais 10 mL de clorofórmio. A absorbância da fase orgânica foi determinada usando um espectrofotômetro UV/visível à 306 nm, correspondendo ao comprimento de onda de máxima

absorção dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel (COSTA et al., 2013; KATIKA et al., 2016). A concentração residual de óleo diesel foi calculada pela interpolação com uma curva de calibração construída com óleo diesel comercial ($y = 6,5807x - 0,2769$, $R^2 = 0,991$).

3.2.9 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa

De forma a investigar a biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel residual, as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-MS) num cromatógrafo a gás Agilent 7890A com detector de espectroscopia de massas serie MSD Agilent 5975C. A separação dos compostos foi realizada utilizando uma coluna HP-5 MS e gás hélio como fase móvel. A vazão volumétrica da fase móvel e o volume de injeção de amostra diluída em clorofórmio foram de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{L}$, respectivamente. Foi utilizada a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial do forno de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ mantida por 2 min, seguida do aquecimento, utilizando um gradiente de $12 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, até uma temperatura de $300 \text{ }^\circ\text{C}$, a qual foi mantida por 5 min. As temperaturas do detector e do injetor foram mantidas a $300 \text{ }^\circ\text{C}$ e $250 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente (CHEN et al., 2016).

3.2.10 Extração e caracterização do biossurfactante

O biossurfactante bruto foi obtido por extração com solvente (VELIOGLU; OZTURK UREK, 2014) e caracterizado de acordo com o seu conteúdo de proteínas, lipídeos e carboidratos, conforme descrito nos itens 3.1.8 e 3.1.9. A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante bruto foi determinada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 7,0, a partir do ponto de ruptura da curva de tensão superficial *versus* o logaritmo da concentração de biossurfactante. O efeito da temperatura e do pH na estabilidade do biossurfactante foi avaliado de acordo com metodologia descrita no Item 3.1.11.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados obtidos, bem como dos resultados dos delineamentos experimentais referentes aos estudos propostos, foi realizada utilizando o *software* Statística 7.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). Análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste foram

utilizados para verificar a adequação dos dados experimentais decorrentes da matriz experimental aos modelos de regressão. Ainda, a análise comparativa dos resultados experimentais foi realizada utilizando o teste de comparação de médias de Tukey, a um nível de significância de 5 %.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos nos ensaios realizados de acordo com os objetivos traçados neste trabalho são apresentados e discutidos a seguir. Foram obtidos dois conjuntos de resultados referentes as diferentes estratégias adotadas para a avaliação da produção de biossurfactantes por fungos.

Inicialmente serão apresentados e discutidos os resultados concernentes à produção de biossurfactantes por *Trametes versicolor* CECT 20817 em cultivo em estado sólido, no que diz respeito a produção de biossurfactantes e enzimas utilizando um resíduo da indústria de azeite de oliva como substrato, bem como a extração e caracterização do biossurfactante obtido. Em seguida, são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos concernentes a utilização de hidrocarbonetos hidrofóbicos na produção de biossurfactantes em cultivo submerso, utilizando um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo.

4.1 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES E ENZIMAS por *Trametes versicolor* em cultivo em estado sólido

Trametes versicolor foi capaz de crescer em todos os sistemas sólidos propostos pelo delineamento experimental de mistura. A matriz experimental e os resultados concernentes à produção de biossurfactantes e de enzimas oxidativas após 14 dias de cultivo em condições controladas de umidade relativa (80 %) e temperatura (25 °C) são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz experimental e resultados referentes à produção de biossurfactantes e enzimas oxidativas por *Trametes versicolor* CECT_20817 em cultivo em estado sólido.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	TS* (mN.m ⁻¹)	TS (mN.m ⁻¹)	TS ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	Lac (U.L ⁻¹)	MnP (U.L ⁻¹)
1	0,05	0,10	0,85	52,5	41,9	62,4	19,29	93,18
2	0,05	0,30	0,65	51,5	43,5	61,8	16,90	84,66
3	0,35	0,10	0,55	53,7	30,3	44,0	3,38	14,98
4	0,35	0,30	0,35	55,1	43,9	57,1	11,70	139,31
5	0,05	0,20	0,75	50,1	51,2	62,5	19,42	97,51
6	0,35	0,20	0,45	52,5	32,7	52,0	12,12	80,96
7	0,20	0,10	0,70	51,3	34,7	55,9	16,40	97,67
8	0,20	0,30	0,50	50,3	40,7	64,8	15,69	113,28
9	0,05	0,10	0,85	55,1	37,2	53,2	19,49	90,78
10	0,05	0,30	0,65	54,6	45,1	65,5	14,74	88,07
11	0,35	0,10	0,55	51,2	30,2	45,4	2,92	16,06
12	0,35	0,30	0,35	52,0	42,5	62,5	12,33	132,70
13	0,05	0,20	0,75	55,2	50,4	66,3	20,18	99,24
14	0,35	0,20	0,45	49,1	33,2	54,7	13,11	96,68
15	0,20	0,10	0,70	52,8	32,5	56,2	14,37	92,51
16	0,20	0,30	0,50	53,6	40,7	61,1	15,90	115,69
17	0,20	0,20	0,60	52,5	33,1	55,3	18,77	96,48
18	0,20	0,20	0,60	53,6	32,8	52,6	20,53	92,53

Ensaio	X_1	X_2	X_3	TS* (mN.m ⁻¹)	TS (mN.m ⁻¹)	TS ⁻¹ (mN.m ⁻¹)	Lac (U.L ⁻¹)	MnP (U.L ⁻¹)
19	0,20	0,20	0,60	52,8	33,7	60,4	20,71	114,08
20	0,20	0,20	0,60	51,9	33,2	57,2	18,49	109,98
21	0,20	0,20	0,60	51,7	32,6	58,1	19,62	103,10
22	0,20	0,20	0,60	50,2	31,8	55,4	18,63	107,17

*TS corresponde aos dados de TS dos extratos das amostras controle.

Nota: X_1 RSEBAO

X_2 Farelo de trigo

X_3 Caroço de azeitonas

4.1.1 Avaliação da produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactantes foi avaliada indiretamente pela medida da tensão superficial (TS) dos extratos aquosos obtidos, bem como de suas diluições (TS^{-1}). De acordo com os dados de TS apresentados na Tabela 6, pode-se concluir que o fungo *T. versicolor* é promissor para a produção de biossurfactantes, uma vez que valores de TS da ordem de 30 mN.m^{-1} foram obtidos. Valores de TS menores que 35 mN.m^{-1} têm sido reportados na literatura como um indicativo da produção significativa de biossurfactantes (MAASS et al., 2015; VELİOĞLU, ZULFIYE; ÖZTÜRK ÜREK, 2015; SANTOS et al., 2016a). Deve-se ainda considerar o fato de que a medida TS apresenta um limite de detecção, sendo este atingido quando a concentração do biossurfactante no meio se iguala a sua concentração micelar crítica (CMC). Diante disto, diluições sucessivas (fator de diluição igual a 10) foram realizadas, com a finalidade de alterar a concentração do surfactante nos extratos aquosos. A tensão superficial destas amostras foi medida (TS^{-1}) possibilitando uma melhor análise dos resultados. Isto pode ser ilustrado analisando os dados dos ensaios 3 e 6. Observa-se que em ambos os ensaios foram obtidos valores de TS próximos (variação de $2,4 \text{ mN.m}^{-1}$) e menores que 35 mN.m^{-1} , o que dificulta a análise comparativa destas condições experimentais. Entretanto, o valor da TS^{-1} do ensaio 3 é menor em comparação ao experimento 6, o que indica maior produção de biossurfactantes nesta condição. Ainda, a medida de TS^{-1} fornece um indicativo de concentração do produto no meio em relação a sua CMC.

Os dados experimentais de TS e TS^{-1} foram ajustados a modelos de regressão linear (Equações 6 e 7), baseados na análise estatística do planejamento experimental de mistura. A adequação dos modelos (variáveis não codificadas) foi confirmada pela análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste (*lack of fit*) apresentados nas Tabela 7 e Tabela 8. Os modelos apresentaram coeficientes de determinação (R^2) de 0,8999 (TS) e 0,7382 (TS^{-1}), indicando concordância entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo, uma vez que processos microbiológicos são de difícil predição, devido principalmente a heterogeneidade das amostras e a existência de fatores não controláveis no processo.

$$TS = 36,0074 - 29,1378X_1 + 30,1174X_2 - 0,32656X_3 \quad (6)$$

$$TS^{-1} = 55,0714 - 45,1012X_1 + 41,4976X_2 - 1,20123X_3 \quad (7)$$

Tabela 7 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de TS ao modelo de regressão linear.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
Regressão	185,9106	2	92,95528	37,78909	0,000042
Resíduos	22,1386	9	2,45984		
Falta de ajuste	16,0486	4	4,01215	3,29405	0,111616
Erro puro	6,0900	5	1,21800		
Total	208,0492	11	18,91356		

Nota: SQ Soma dos quadrados
 GL Graus de liberdade
 QM Quadrado médio

Tabela 8 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de TS⁻¹ ao modelo de regressão linear.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
Regressão	764,739	2	382,3694	21,14243	0,000043
Resíduos	271,281	15	18,0854		
Falta de ajuste	171,101	6	28,5169	2,56191	0,099010
Erro puro	100,180	9	11,1311		
Total	1036,020	17	60,9424		

Nota: SQ Soma dos quadrados
 GL Graus de liberdade
 QM Quadrado médio

Os gráficos de contorno para as respostas de TS e TS⁻¹ gerados a partir das equações de regressão obtidas, ilustram a influência da composição do meio de cultura na produção de biossurfactantes (Figura 8). Os componentes RSEBAO (X_1) e farelo de trigo (X_2) exercem efeito significativo ($p < 0,05$) sobre ambas as respostas, de acordo com o teste de significância dos coeficientes das variáveis consideradas (Tabela 9 e Tabela 10).

Figura 8 – Gráficos de contorno para as respostas TS (a) e TS^{-1} (b) obtidos a partir dos modelos de regressão linear.

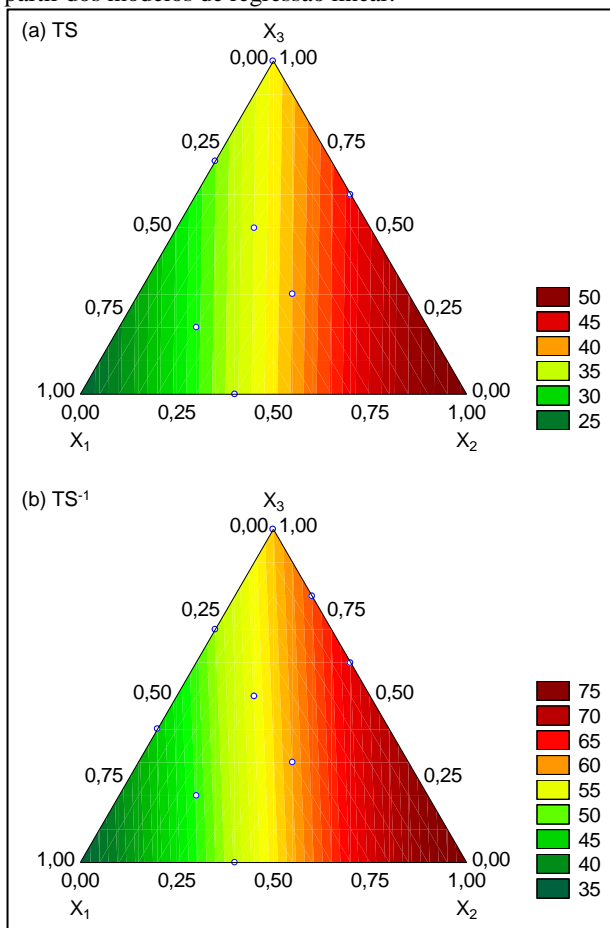


Tabela 9 – Teste de significância dos coeficientes do modelo linear ajustado aos dados experimentais de TS.

Fator	Coeficiente	Desvio Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança	
				-95 %	+95 %
Constante	36,007	1,638	3,95E-09	32,3007	39,714
X_1	-29,137	3,818	3,22E-05	-37,775	-20,501
X_2	30,117	4,802	0,00014	19,252	40,982
X_3	-0,326	2,031	0,87587	-4,9231	4,2700

Tabela 10 – Teste de significância dos coeficientes do modelo linear ajustado aos dados experimentais de TS⁻¹.

Fator	Coeficiente	Desvio Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança	
				-95 %	+95 %
Constante	55,071	4,3705	2,21E-09	45,755	64,386
X_1	-45,101	8,292	6,85E-05	-62,776	-27,426
X_2	41,498	11,152	0,002049	17,727	65,268
X_3	1,201	5,346	0,825249	-10,194	12,596

Um aumento na fração mássica do RSEBAO (X_1) na mistura resulta na diminuição da TS dos extratos, o que significa que o RSEBAO utilizado como fonte de carbono exerce um efeito significativo positivo na produção de biossurfactantes. A influência da concentração de RSEBAO na produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em cultivo submerso foi avaliada por Moya-Ramírez e colaboradores (2015). Esses autores observaram um aumento de aproximadamente 21 vezes na produtividade aumentando a concentração do RSEBAO de 2 % para 10 %, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho.

A influência da fonte de carbono na produção de biossurfactantes tem sido bastante estudada, sendo relatado que sistemas que contenham simultaneamente fontes de carbono solúvel e hidrofóbico fornecem melhores rendimentos. Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo microrganismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Estes resultados reforçam o interesse no aproveitamento de resíduos

agroindustriais contendo carboidratos e lipídeos, como o RSEBAO, como substratos para a produção de biossurfactantes. Além disso, os resultados encontrados neste trabalho indicam que não há efeito de inibição da produção de biossurfactantes decorrentes da presença de compostos potencialmente tóxicos e de difícil assimilação metabólica no RSEBAO, mesmo em concentrações mais elevadas.

O componente farelo de trigo (X_2) apresenta um efeito negativo sobre a produção de biossurfactantes. Um aumento da fração mássica de X_2 na mistura resulta num aumento nos valores de TS dos extratos. O farelo de trigo é um substrato rico em proteínas (aproximadamente 15 % em massa), sendo utilizado como fonte principal de nitrogênio, e sua adição no meio de cultura diminui a relação C/N do substrato. Desta forma, pode-se concluir que uma diminuição da relação C/N decorrente do aumento da fração mássica do farelo de trigo na composição do substrato sólido, desfavorece a produção de biossurfactantes. De acordo com Fontes, Amaral e Coelho (2008), a produção de biossurfactante ocorre principalmente durante a fase de crescimento estacionária, indicando que o mecanismo de síntese acontece em condições limitantes de nitrogênio. Quando a limitação por nutrientes é iniciada, o crescimento microbiano diminui ao mesmo tempo que a fonte de carbono continua sendo transportada às células, ocorrendo as reações de síntese dos metabólitos secundários (DECESARO et al., 2013). Desta forma, o tipo e a concentração da fonte de nitrogênio são importantes para a otimização da produção de biomoléculas. Elevadas razões C/N, isto é, níveis baixos da fonte de nitrogênio, limitam o crescimento microbiológico, favorecendo o metabolismo celular para a produção de metabólitos de interesse, como os biossurfactantes. Em contraste, o excesso de nitrogênio leva à síntese de material celular e limita o acúmulo de produtos (SANTOS et al., 2016b). Embora existam informações sobre o efeito das fontes de nitrogênio e carbono sobre a produção de biossurfactantes, a influência da relação C/N tem sido pouco investigada (FONSECA et al., 2007).

Os efeitos das concentrações das fontes de carbono e nitrogênio no sistema sólido na produção de biossurfactantes podem ser melhor compreendidos analisando os valores de TS dos ensaios 1, 3 e 4 e suas réplicas (ensaios 9, 11 e 12). Aumentando a fração mássica da fonte de carbono (X_1) de 5 % para 35 % e fixando a fração mássica da fonte de nitrogênio (X_2) em seu valor mínimo (10 %), foi verificada uma diminuição nos valores de TS dos extratos de $39,55 \pm 2,35 \text{ mN.m}^{-1}$ para $30,25 \pm 0,05 \text{ mN.m}^{-1}$. Porém, fixando-se a fração mássica da fonte de carbono no seu valor máximo (35 %) e aumentando a fração da fonte de

nitrogênio de 10 % para 30 %, observa-se um aumento nos valores de TS ($43,2 \pm 0,70 \text{ mN.m}^{-1}$).

4.1.2 Avaliação da produção de enzimas oxidativas

A produção de enzimas extracelulares tem sido relacionada à degradação de lignina e outros compostos fenólicos presentes principalmente no RSEBAO (TSIOULPAS et al., 2002; ERGÜL et al., 2009; NTOUGIAS et al., 2015). No processo de degradação da lignina, lacases (Lac) e peroxidases lignolíticas, como a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) produzidas por vários microrganismos, promovem a oxidação do polímero, gerando radicais aromáticos que são utilizados em diferentes mecanismos que constituem as reações de degradação. Como resultado deste processo, estruturas de derivados de lignina simples são produzidas e utilizadas em reações metabólicas intracelulares (MARTÍNEZ et al., 2005; ALOUI et al., 2007).

A produção de enzimas oxidativas pelo fungo *Trametes versicolor* em cultivo em estado sólido foi avaliada concomitantemente à produção de biossurfactantes, pela medida da atividade das enzimas Lac, MnP e LiP. De acordo com os resultados concernentes à produção de enzimas (Tabela 6), observa-se que a atividade da enzima MnP foi maior em todos os ensaios, ao mesmo tempo que não foi possível detectar atividade enzimática de LiP. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo da degradação de compostos fenólicos presentes em resíduo de azeite de oliva por uma estirpe de *Trametes versicolor* (ERGÜL et al., 2009). Micronutrientes presentes no RSEBAO, como manganês e cobre, são relatados como indutores da produção tanto de MnP como de Lac, enquanto que a produção de LiP pode ser inibida pela presença de íons de Mn^{2+} (JANUSZ et al., 2013). Além disso, maiores taxas de degradação de compostos lignocelulósicos foram reportados por fungos que produzem apenas MnP e Lac no processo de biodegradação, em comparação a um complexo enzimático contendo MnP, Lac e LiP (ROUCHES et al., 2016). Ainda, a determinação de uma atividade menor de Lac pode estar relacionada ao seu potencial redutor. Lacases possuem um baixo potencial de redução o que permite apenas a oxidação direta da fração fenólica da molécula da lignina, representando menos de 10 % do polímero total, enquanto que os íons de Mn^{3+} produzidos por MnP atuam como um oxidante das porções fenólicas e não-fenólicas da lignina (MARTÍNEZ et al., 2005).

Os dados experimentais de atividade das enzimas Lac e MnP foram ajustados satisfatoriamente aos modelos de regressão quadráticos

(Equações 8 e 9), apresentando coeficientes de determinação (R^2) de 0,9549 e 0,8999 respectivamente, indicando concordância entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo. A adequação ao modelo foi ainda verificada pela análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste (*lack of fit*), apresentados nas Tabela 11 e Tabela 12.

$$Lac = -20,8584X_1 - 37,7059X_2 + 19,2787X_3 + 163,1087X_1X_2 + 38,5719X_1X_2 + 19,9118X_2X_3 \quad (8)$$

$$MnP = -112,008X_1 + 14,658X_2 + 102,399X_3 + 809,087X_1X_2 + 203,552X_1X_2 + 51,993X_2X_3 \quad (9)$$

Tabela 11 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de atividade de Lac ao modelo de regressão quadrático.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
Regressão	275,7922	5	55,15844	33,88542	0,000035
Resíduos	13,0223	8	1,62779		
Falta de ajuste	8,1835	3	2,72782	2,81864	0,146751
Erro puro	4,8389	5	0,96778		
Total	288,8145	13	22,21650		

Nota: SQ Soma dos quadrados

GL Graus de liberdade

QM Quadrado médio

Tabela 12 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de atividade de MnP ao modelo de regressão quadrático.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
Regressão	8833,172	5	1766,634	14,37805	0,000801
Resíduos	982,962	8	122,870		
Falta de ajuste	646,698	3	215,566	3,20530	0,121076
Erro puro	336,264	5	67,253		
Total	9816,134	13	755,087		

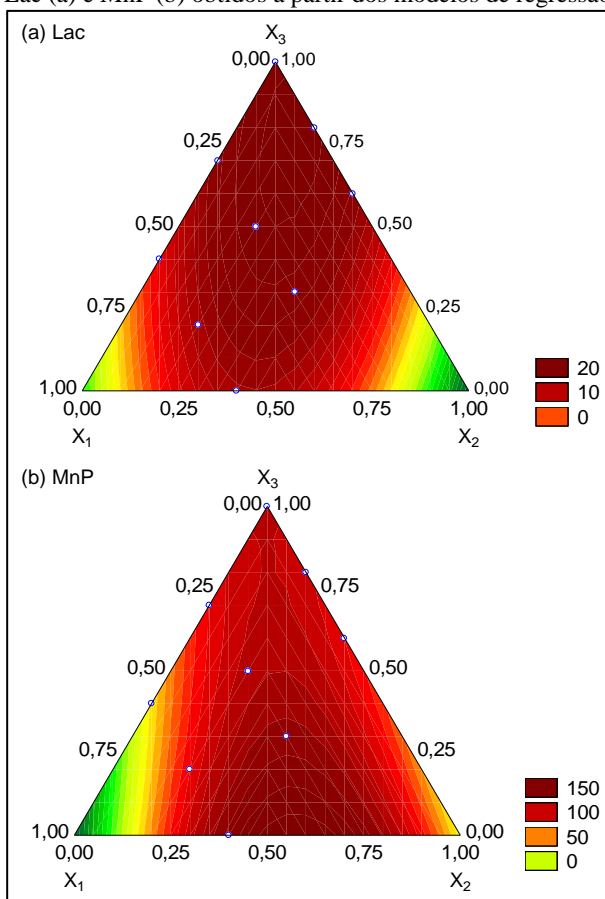
Nota: SQ Soma dos quadrados

GL Graus de liberdade

QM Quadrado médio

A influência da composição do substrato sólido na expressão das enzimas Lac e MnP pode ser verificada pela análise dos gráficos de contorno (Figura 9 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**), gerados a partir das equações de regressão obtidas, e pelos testes de significância dos coeficientes dos fatores considerados no delineamento experimental, apresentados nas Tabela 13 e Tabela 14.

Figura 9 – Gráficos de contorno para as respostas de atividade enzimática de Lac (a) e MnP (b) obtidos a partir dos modelos de regressão quadrático.



Fonte: Autor.

Nota: X_1 RSEBAO

X_2 Farelo de trigo

X_3 Carço de azeitonas

Sabe-se que a composição do meio e as condições de cultura influenciam a produção de enzimas ligninolíticas que são produzidas principalmente durante o metabolismo secundário. A atividade enzimática depende, principalmente, das fontes de carbono e nitrogênio e de suas concentrações relativas. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a produção das enzimas lacase e manganês peroxidase é afetada pela composição do meio e dos efeitos de interação dos componentes do substrato.

Tabela 13 – Teste de significância dos coeficientes do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais de atividade de Lac.

Fator	Coeficiente	Desvio Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança	
				-95 %	+95 %
X_1	-20,8584	4,16531	0,001043	-30,4636	-11,2532
X_2	-37,7059	12,10245	0,014325	-65,6142	-9,7976
X_3	19,2787	1,13344	0,000000	16,6650	21,8924
X_1X_2	163,1087	20,24972	0,000042	116,4127	209,8046
X_1X_3	38,5719	8,42186	0,001802	19,1510	57,9927
X_2X_3	79,9118	18,94919	0,002927	36,2149	123,6087

Tabela 14 – Teste de significância dos coeficientes do modelo quadrático ajustado aos dados experimentais de atividade de MnP.

Fator	Coeficiente	Desvio Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança	
				-95 %	+95 %
X_1	-112,008	36,1886	0,014775	-195,459	-28,557
X_2	14,658	105,1471	0,892577	-227,812	257,127
X_3	102,399	9,8474	0,000006	79,691	125,107
X_1X_2	809,087	175,9312	0,001758	403,389	1214,785
X_1X_3	203,552	73,1698	0,023854	34,822	372,282
X_2X_3	51,993	164,6321	0,760228	-327,650	431,635

O RSEBAO apresentou um efeito principal negativo sobre as respostas, ou seja, em sistemas com um maior percentual da fonte de carbono, observa-se uma menor atividade enzimática de Lac e MnP. Entretanto, conjecturava-se sobre a influência positiva da concentração do RSEBAO sobre a expressão de enzimas, como consequência do

aumento na concentração de compostos presentes no resíduo que podem ser indutores a produção destas enzimas. A influência negativa da fonte de carbono na produção enzimática pode ser atribuída a efeitos de inibição devido ao aumento da concentração de determinados componentes do resíduo no sistema. Num estudo da produção de enzimas pelo fungo *Trichoderma harzianum*, utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono, foi constatado que elevadas concentrações de resíduo resultaram em menores valores de atividade enzimática. Este fenômeno foi atribuído ao efeito de repressão catabólica induzida por elevadas concentrações de fonte de carbono (GELAIN; DA CRUZ PRADELLA; DA COSTA, 2015).

O efeito principal da fonte de nitrogênio somente foi significativo na expressão de Lac, sendo este um efeito negativo. Janusz e colaboradores (2013) relataram que para as espécies *Pleurotus ostreatus* e *Trametes trogii*, elevadas quantidades de Lac e MnP são produzidas na presença de altas concentrações de nitrogênio. Porém, conforme mencionado anteriormente, o excesso de nitrogênio desfavorece a produção de metabólitos como resultado do deslocamento do metabolismo para a síntese de material celular. Stajic e colaboradores (2006) estudaram a produção de enzimas por *Pleurotus* ssp. e observaram diminuição de aproximadamente 72 % nos níveis de atividade enzimática de Lac com o aumento da concentração de nitrogênio.

Analisando o efeito de interação dos componentes X_1 e X_2 , que corresponde as frações mássicas das fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, verifica-se um efeito de interação positivo e significativo ($p < 0,05$). A interação entre os fatores corresponde a diferença de comportamento de uma variável nos diferentes níveis do outro fator com respeito a resposta de interesse. O efeito sinérgico pode ser melhor entendido mediante análise dos valores de atividade enzimática mínimo e máximo obtidos. Os menores valores de atividade enzimática de Lac ($3,15 \pm 0,23 \text{ U.L}^{-1}$) e MnP ($15,52 \pm 0,54 \text{ U.L}^{-1}$) foram observadas no cultivo em meio sólido composto de 35% de RSEBAO e 10% de farelo de trigo. Aumentando a fração mássica do farelo de trigo de 10 % para 30 % e mantendo fixa a fração mássica do RSEBAO em 35 %, obtiveram-se os maiores valores de atividade enzimática de MnP ($136,01 \pm 3,31 \text{ U.L}^{-1}$), ao mesmo tempo que foi observado um aumento de aproximadamente 4 vezes nos valores de atividade enzimática de Lac ($12,02 \pm 0,32 \text{ U.L}^{-1}$).

Uma vez que a expressão destas enzimas está associada ao tratamento biológico de resíduos contendo compostos aromáticos

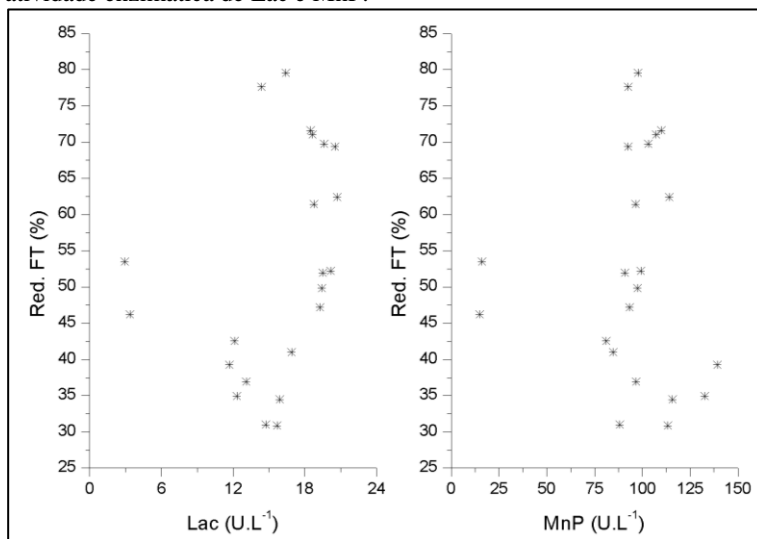
recalcitrantes, incluindo os compostos fenólicos monoméricos e poliméricos, foi determinado o percentual de redução dos compostos fenólicos totais (FT) nos extratos obtidos em cada ensaio. Percentuais de redução dos compostos FT na faixa de 30 % a 70 % foram observados (Tabela 15), sendo que estes resultados não são significativamente afetados pela composição do meio de cultura.

Tabela 15 – Percentuais de redução dos compostos fenólicos totais (FT) presentes no substrato sólido.

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Red. FT (%)
1	0,05	0,10	0,85	49,57 ± 2,37 ^a
2	0,05	0,30	0,65	36,00 ± 5,02 ^{a,b}
3	0,35	0,10	0,55	49,83 ± 3,65 ^a
4	0,35	0,30	0,35	37,09 ± 2,18 ^{a,b}
5	0,05	0,20	0,75	51,02 ± 1,18 ^a
6	0,35	0,20	0,45	39,73 ± 2,81 ^{a,b}
7	0,20	0,10	0,70	78,59 ± 0,95 ^c
8	0,20	0,30	0,50	32,64 ± 1,81 ^b
9	0,20	0,20	0,60	67,60 ± 4,10 ^c

Relacionando estes resultados com os dados de atividade enzimática obtidos (Figura 10) verifica-se que não há correlação entre a redução no teor dos compostos FT e a expressão das enzimas fenol oxidativas. Ainda, observa-se que nas condições onde foram encontrados os menores valores de atividade enzimática de Lac e MnP (ensaio 3), houve um percentual de redução dos compostos FT de aproximadamente 50 %.

Figura 10 – Correlação entre o percentual de redução dos compostos FT e a atividade enzimática de Lac e MnP.



Fonte: Autor.

Os percentuais de redução encontrados nos sistemas que apresentaram baixa atividade enzimática podem ser justificados devido à característica antioxidante dos compostos fenólicos presentes no RSEBAO. Vários são os mecanismos que os tornam susceptíveis à degradação, podendo ser influenciados pela presença de luz, calor e íons metálicos (LAFKA et al., 2011).

4.1.3 Análise da produção concomitante de biossurfactantes e enzimas oxidativas

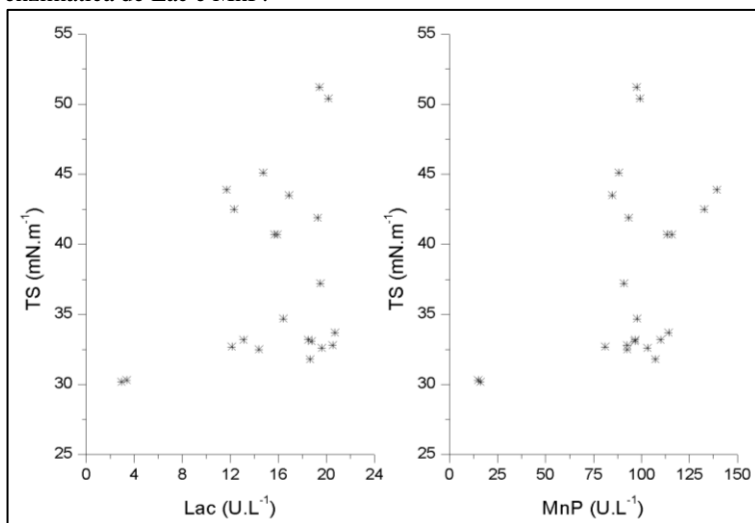
Como forma de avaliar se a expressão de enzimas oxidativas e a capacidade de produção de biossurfactantes por *Trametes versicolor* em cultivo em estado sólido estão relacionadas, os dados de atividade enzimática e TS foram correlacionados. Da análise da Figura 11 conclui-se que não há correlação entre a atividade enzimática e a redução da tensão superficial devido a produção de biossurfactantes, embora ocorra simultaneamente a produção de ambos metabólitos. Entretanto, observa-se que existe uma condição experimental onde foram obtidos os menores valores tanto de TS, como de atividade enzimática. Este resultado sugere que nestas condições houve maior

produção de biossurfactante e menor expressão de enzimas oxidativas. De acordo com Mougín, Kollmann e Jolivalt (2002) a presença de tensoativos é mencionada como repressora da produção de enzimas por várias espécies fúngicas, o que pode justificar este resultado em específico.

Martins, Kalil e Costa (2008) avaliaram a coprodução de biossurfactantes e lipases em cultivo em estado sólido pelos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* ssp. Ao relacionar os dados da produção de biossurfactante com os de atividade lipolítica, estes autores concluíram que a produção de lipase não interferiu na produção do biossurfactante.

Velioglu e Urek (2014) relataram a síntese simultânea de enzimas ligninolíticas e biossurfactante pelo fungo *Pleurotus* spp. em cultivo em estado sólido. De acordo com estes autores, a coprodução pode estar associada a necessidade do microrganismo em metabolizar compostos orgânicos e insolúveis em água. Uma vez que o RSEBAO apresenta teor de azeite residual, a produção de biossurfactantes pode ser induzida como mecanismo para auxiliar biodisponibilidade de porções hidrofóbicas, enquanto que as enzimas oxidativas permitem a biodegradação, principalmente, do material lignocelulósico, fornecendo assim carbono assimilável pelo metabolismo do microrganismo.

Figura 11 – Correlação entre os dados de TS dos extratos e de atividade enzimática de Lac e MnP.

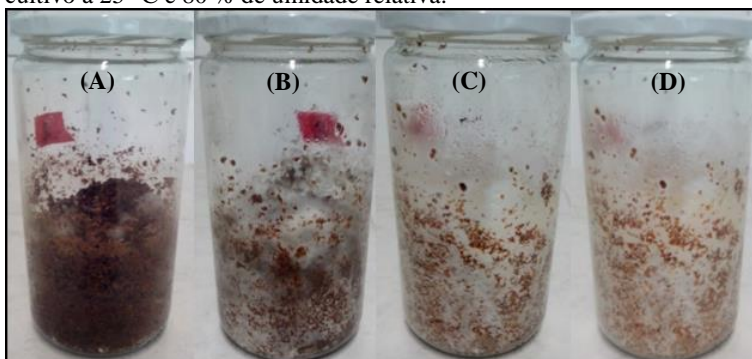


Fonte: Autor.

4.1.4 Cinética da produção de biossurfactantes

De acordo com os objetivos deste trabalho, e a partir da análise estatística dos dados referentes à produção de biossurfactantes, foi obtida a composição do substrato sólido que favorece a produção de metabólitos com atividade de superfície: 35 % de RSEBAO, 10 % de farelo de trigo e 55 % de caroço de azeitonas. Nestas condições, um estudo cinético da produção de biossurfactantes durante 28 dias de cultivo foi realizado. A evolução do crescimento do fungo sobre o substrato sólido ao longo do tempo pode ser visualizada na Figura 12. Não foram observadas variações significativas, a um nível de 95 % de confiança, nos valores de pH ($5,08 \pm 0,17$) e umidade ($49,37 \pm 0,17\%$) do substrato ao longo dos 28 dias de cultivo. O controle destes parâmetros é importante em sistemas sólidos, onde níveis elevados de umidade causam diminuição na porosidade do meio, reduzindo assim a aeração e o controle de temperatura (MARTINS; KALIL; COSTA, 2008).

Figura 12 – Evolução do crescimento do fungo *Trametes versicolor* sobre o substrato sólido composto por 35 % de RSEBAO, 10 % de farelo de trigo e 55 % de caroço de azeitonas, nos tempos 7 (A), 14 (B), 21 (C) e 28 (D) dias de cultivo à 25 °C e 80 % de umidade relativa.



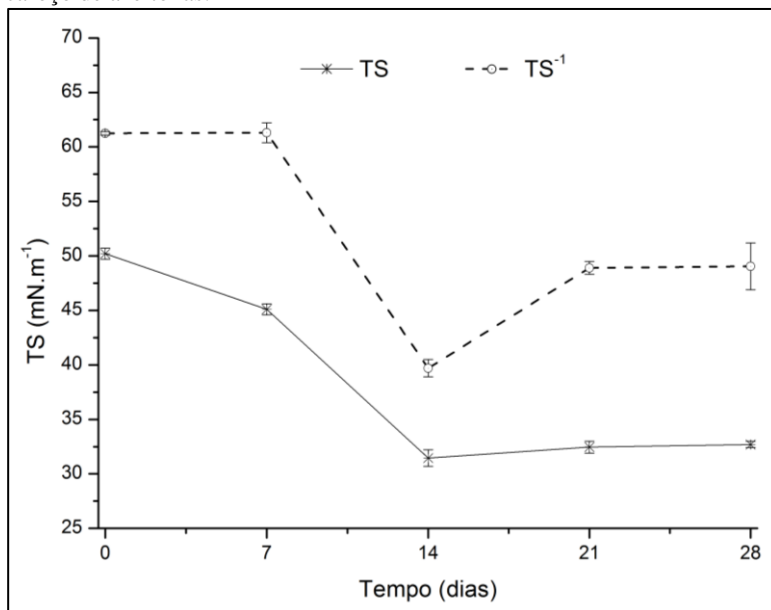
Fonte: Autor.

A Figura 13 apresenta a evolução das medidas de TS e TS^{-1} dos extratos ao longo dos 28 dias de cultivo. Como pode-se observar, há um pequeno decréscimo nos valores de TS decorridos sete dias de cultivo, seguido de uma diminuição progressiva até o 14º dia, atingindo um valor mínimo de $31,5 \pm 0,8 \text{ mN.m}^{-1}$. A partir deste ponto, a TS dos extratos permanece praticamente constante, sendo este um indicativo de

que a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante foi atingida. Como forma de melhor avaliar a cinética da produção de biossurfactantes foram determinados os valores de TS^{-1} , que correspondem a tensão superficial das amostras diluídas em água ultrapura, utilizando um fator de diluição 10. A diluição das amostras tem por objetivo alterar a concentração do biossurfactante no extrato para que se atinja valores inferiores a sua CMC. Desta forma, pode-se constatar variações nas medidas de tensão superficial.

Da análise destes dados, observa-se igualmente um decréscimo nos valores de tensão superficial a partir do 7º dia de cultivo, atingindo seu valor mínimo em 14 dias. Porém, houve um aumento nos valores de TS^{-1} a partir do 14º, o que pode ser resultado de alguma reação de degradação do biossurfactante ou seu consumo pelo microrganismo. Resultados semelhantes foram relatados por Maass e colaboradores (2015) no estudo da cinética de produção de surfactina por *Bacillus subtilis* em sistema submerso. Além disso, em condições de crescimento estático, como as empregadas neste trabalho, a disponibilidade de nutrientes é um fator crítico que pode resultar em um esgotamento nutricional local. Por consequência, a falta pontual de nutrientes pode resultar no consumo dos produtos do cultivo pelo microrganismo (CASTRO et al., 2013; ROELANTS et al., 2014). Desta forma, conclui-se que um tempo de cultivo de 14 dias é o indicado para se obter uma maior produtividade.

Figura 13 – Evolução da medida da tensão superficial (TS) dos extratos e de suas diluições (TS^{-1}) durante 28 dias de cultivo *T. versicolor* sobre o substrato sólido composto por 35 % de RSEBAO, 10 % de farelo de trigo e 55 % de caroço de azeitonas.



Fonte: Autor.

4.1.4 Extração e caracterização do biossurfactante

Conforme esperado, diferentes quantidades de biossurfactante bruto foram obtidas de acordo com a técnica de extração utilizada. Utilizando a metodologia de precipitação ácida foram obtidos $373,6 \pm 19,4$ mg de biossurfactante bruto por 100 g de substrato. Ao obter o produto por extração com solventes orgânicos, um rendimento de $125,0 \pm 10,0$ mg de biossurfactante bruto por 100 g de substrato foi obtido. Estas variações podem ser atribuídas à falta de especificidade do método de precipitação ácida, uma vez que esta técnica não só promove a extração do biossurfactante, como também induz a desnaturação de proteínas presentes no sistema. A desnaturação ácida induzida diminui, em última análise, a solubilidade destes compostos, resultando na sua precipitação (ZHANG et al., 2014). Além disso, outros compostos presentes no sistema podem ser precipitados pela diminuição do pH dos

extratos. Desta forma, o grau de pureza do produto obtido por este método deve ser inferior a do biossurfactante obtido por extração com solventes.

Até onde se tem conhecimento, este é o primeiro estudo sobre a avaliação da produção de biossurfactantes por *Trametes versicolor*, e por consequência, não se conhece a estrutura do biossurfactante obtido.

Como forma de se obter uma caracterização inicial do produto, a composição química do biossurfactante produzido pelo fungo foi determinada por meio da quantificação do conteúdo de lipídeos, proteínas e carboidratos (Tabela 16). A análise destes dados permite classificar o biossurfactante produzido por *T. versicolor*, sendo este pertencente à classe dos lipopeptídeos. Ainda, observa-se que o produto obtido por precipitação ácida apresenta em sua composição o dobro do conteúdo de proteínas comparado àquele obtido por extração com solventes. Este resultado corrobora com a hipótese da desnaturação ácida das proteínas presentes no substrato, conforme mencionado anteriormente. Geralmente, lipopeptídeos são produzidos por microrganismos aeróbios, podendo ser obtidos a partir de substratos hidrofóbicos como hidrocarbonetos e óleos vegetais. Além disso, a presença de cátions divalentes (Mn^{2+} e Fe^{2+}) auxiliam na síntese destes compostos (INÊS; DHOUHA, 2015b).

Tabela 16 – Caracterização química do biossurfactante obtido por precipitação ácida e extração com solventes.

	Precipitação ácida	Extração com solventes
Lipídeos ($\mu g.mg^{-1}$)	678,77 \pm 29,38	831,75 \pm 45,02
Proteínas ($\mu g.mg^{-1}$)	283,99 \pm 3,77	138,26 \pm 19,35
Carboidratos ($ug.mg^{-1}$)	ND	ND

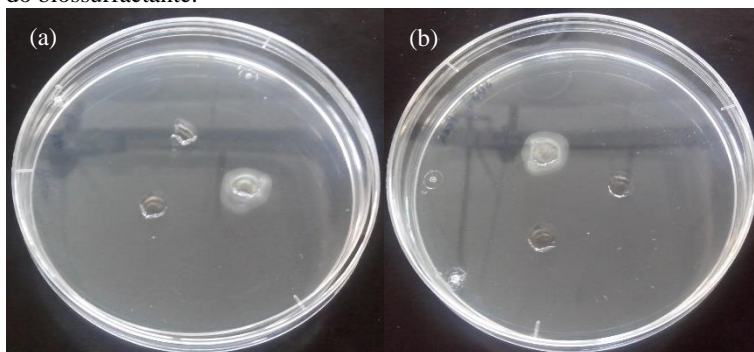
Nota: ND Resultado abaixo do limite de detecção.

Vários gêneros como *Aspergillus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* são conhecidos como produtores de lipopeptídeos. Estas moléculas são caracterizadas por um oligopeptídeo pequeno, linear ou circular, acoplado a um ácido graxo. Os oligopeptídeos podem variar tanto no número quanto nos tipos de aminoácidos. Surfactina é o lipopeptídeo mais conhecido, biossintetizado por *Bacillus subtilis*. Os lipopeptídeos atraem interesse significativo devido ao seu potencial como agentes antimicrobianos (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014).

Os resultados dos testes de característica iônica (Figura 14) indicam claramente que o biossurfactante produzido possui caráter

anfótero, ou seja, apresenta comportamento catiônico e aniônico quando em solução aquosa, podendo ser classificado como zwitteriônico. Surfactina, um dos lipopeptídeos mais estudados, também possui esta característica iônica. De modo geral, surfactantes anfotéricos possuem baixa toxicidade, estabilidade e apresentam propriedades antibacterianas (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014).

Figura 14 – Visualização da formação de halo positivo contra os padrões catiônico (a) e aniônico (b) no ensaio de determinação da característica iônica do biossurfactante.



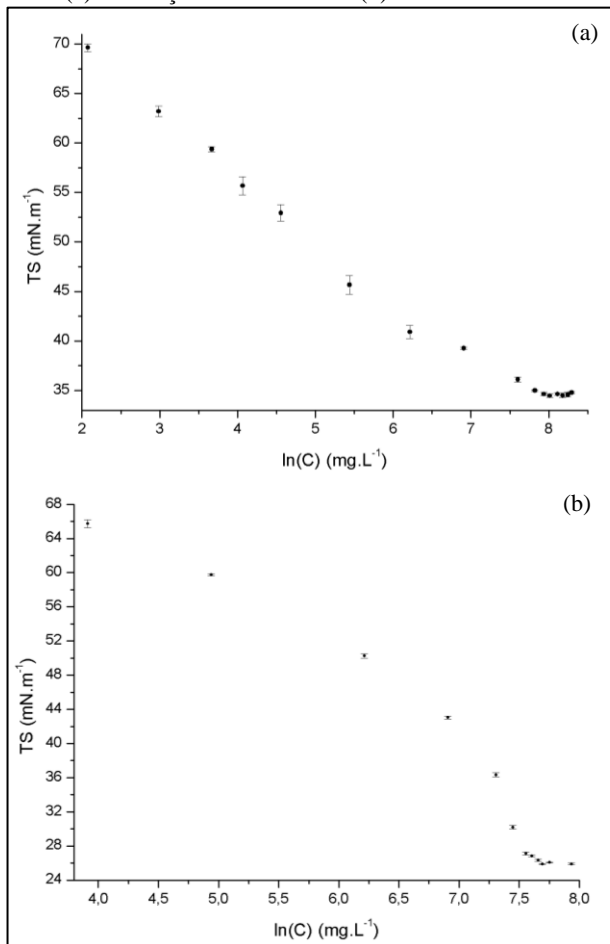
Fonte: Autor.

A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante obtido por precipitação ácida e por extração com solventes foi determinada, pela medida da TS da solução aquosa do biossurfactante em diferentes concentrações a 25 °C e pH 7,0. A variação da TS em função do logaritmo da concentração do biossurfactante é apresentado na Figura 15. De acordo com estes resultados, foram obtidos valores de CMC iguais a $2,10 \pm 0,16 \text{ g.L}^{-1}$ para o produto obtido por precipitação ácida e $1,98 \pm 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ para o biossurfactante obtido por extração com solventes. Embora os valores determinados sejam estatisticamente iguais a 95 % de significância, foram observados valores de TS da solução do biossurfactante na CMC diferentes. Na CMC, a tensão superficial da solução do biossurfactante extraído via precipitação ácida e extração com solvente é igual a $34,5 \pm 0,3 \text{ mN.m}^{-1}$ e $26,4 \pm 0,2 \text{ mN.m}^{-1}$, respectivamente.

Estudos apontam que para biossurfactantes são encontrados valores de CMC típicos na faixa de 5 mg.L^{-1} a 386 mg.L^{-1} (ABBASI et al., 2012), sendo estas concentrações muito menores daquelas determinadas neste trabalho. Entretanto, deve-se considerar a não

especificidade das técnicas de extração empregadas e que nenhuma técnica de purificação foi utilizada. Desta forma, os valores de CMC determinados neste trabalho são referentes aos extratos brutos do biossurfactante.

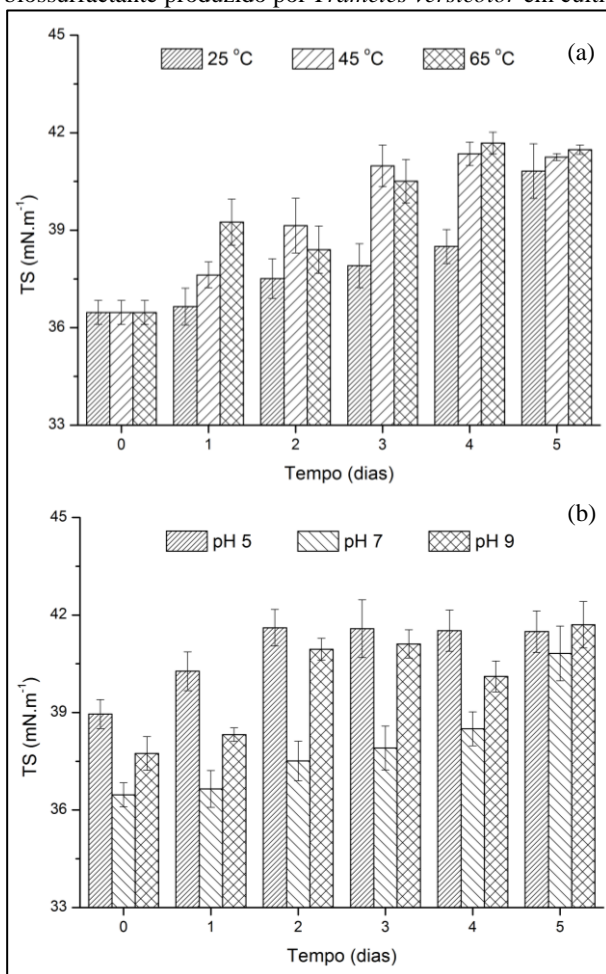
Figura 15 – Variação da TS *versus* o logaritmo da concentração do biossurfactante produzido por *Trametes versicolor* extraído por precipitação ácida (a) e extração com solventes (b).



Fonte: Autor.

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada pela variação da tensão superficial de soluções de biossurfactante com concentrações iguais a sua CMC, incubadas em diferentes condições de temperatura e pH (Figura 16).

Figura 16 – Efeito da temperatura (a) e do pH (b) na estabilidade do biossurfactante produzido por *Trametes versicolor* em cultivo em estado sólido.



Fonte: Autor.

Diferenças significativas foram observadas nos valores de TS das amostras incubadas nas temperaturas de 25 °C, 45 °C e 65 °C. Porém, esta variação corresponde a um incremento nos valores de tensão superficial de aproximadamente 5 mN.m⁻¹, em comparação ao tempo inicial, indicando estabilidade térmica satisfatória na faixa de temperatura avaliada.

Em relação ao efeito do pH na estabilidade do biossurfactante, verificou-se igualmente um aumento nos valores de TS na ordem de 5 mN.m⁻¹ para as soluções com pH na faixa de 5 a 9, sendo obtido os menores valores de TS em pH 7,0, em concordância com resultados reportados na literatura para lipopeptídeos (MAASS et al., 2015; BALAN; KUMAR; JAYALAKSHMI, 2016). Ainda, foi verificada a diminuição da solubilidade do biossurfactante em pH 3 e 11, resultando na formação de precipitados.

Na avaliação da atividade antibacteriana do biossurfactante contra as bactérias gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* e gram-negativa *Escherichia coli*, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), utilizando a técnica de micro diluição em caldo. A atividade antibacteriana de uma amostra controle foi determinada a fim de se verificar uma possível atividade biológica dos componentes do substrato contra os microrganismos selecionados. De acordo com os dados apresentados na Tabela 17 e dos critérios estabelecidos por Machado e colaboradores (2005), verifica-se uma atividade antibacteriana moderada do biossurfactante contra *E. coli*. Ao mesmo tempo, observa-se uma atividade fraca contra *E. coli* da amostra controle, indicando que alguns componentes do substrato, compostos pelo RSEBAO e pelo farelo de trigo, possuem atividade antibacteriana.

Não foram detectadas atividade antibacteriana contra *S. epidermidis* das amostras controle e de biossurfactante. Lipopeptídeos, como a surfactina, formam a classe mais amplamente divulgada de biossurfactantes com ação antimicrobiana. Além da surfactina, outros lipopeptídeos como a fengicina, bacillomicina e mycosubtilina produzidos por *B. subtilis* são bastante conhecidos. Lichenisina e pumilacidina, produzida por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*, respectivamente, também são lipopeptídeos com ação antimicrobiana. Rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* também têm sido relatados por apresentar atividade contra bactérias gram-positivas (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; INÈS; DHOuha, 2015b).

Tabela 17 – Dados de concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do biossurfactante produzido por *T. versicolor*, da amostra controle e do padrão positivo contra as bactérias selecionadas.

Amostra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Controle	1000	> 1000
Biossurfactante	500	> 1000
Padrão positivo *	2,5	2,5

* Gentamicina

4.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR UM FUNGO ISOLADO DE UM RESÍDUO DE REFINARIA DE PETRÓLEO UTILIZANDO SUBSTRATOS HIDROFÓBICOS COMO FONTE DE CARBONO

Sabe-se que a produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos e variações das condições de cultivo, ou quando o crescimento microbiano é mantido sob condições de estresse (SANTOS et al., 2016b). Desta forma, o potencial de produção de biossurfactantes por um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo foi avaliado em sistema submerso, suplementado com hidrocarbonetos hidrofóbicos como fonte de carbono. Um ensaio controle utilizando glicose como fonte de carbono foi conduzido com o objetivo de verificar se a produção de biossurfactantes pelo fungo é associada a presença de substratos hidrofóbicos no sistema. A produção de biossurfactantes foi avaliada pela medida da tensão superficial (TS) do meio livre de células a cada 7 dias, durante 21 dias de cultivo (Tabela 18).

Tabela 18 – Dados experimentais de tensão superficial (TS) do meio de cultivo suplementados com diferentes fontes de carbono.

Tempo Fonte de C	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
	TS (mN.m^{-1})			
Glicose	63,4 ± 0,4 ^a	64,8 ± 4,2 ^a	61,2 ± 2,4 ^a	62,7 ± 0,9 ^a
Óleo de soja	64,8 ± 1,2 ^a	32,9 ± 1,9 ^b	40,7 ± 1,7 ^c	47,2 ± 2,0 ^d
Óleo lubrificante de motor	62,3 ± 0,8 ^a	64,2 ± 2,7 ^a	57,9 ± 0,2 ^b	55,7 ± 1,1 ^b
Óleo diesel	62,1 ± 0,7 ^a	31,2 ± 1,5 ^b	39,3 ± 3,1 ^c	41,9 ± 2,4 ^c

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que nos ensaios contendo óleo de soja e óleo diesel como fonte de carbono foi observada a produção de metabólitos com atividade de superfície. Ainda, conclui-se que o fungo isolado é promissor para a produção de biossurfactantes, uma vez que foram determinados valores de TS inferiores a 35 mN.m^{-1} . Estes resultados indicam que o cultivo do fungo nestas fontes de carbono induz a produção de biossurfactantes, uma vez que o acesso aos substratos hidrofóbicos, como óleo de soja e óleo diesel, é aumentado pela redução da tensão superficial do meio e da tensão interfacial entre a parede da célula e a fonte de carbono (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012).

A produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos utilizando óleos vegetais como fonte de carbono tem sido amplamente investigada (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014). A utilização do óleo de soja como indutor da produção de compostos com atividade de superfície é atribuída a presença de ácidos graxos, cuja molécula contém de 8 a 20 átomos de carbono, que são utilizados como substrato para a síntese, por exemplo, da fração lipídica de biossurfactantes, via β -oxidação (DECESARO et al., 2013). Entretanto, a utilização de óleos comestíveis como precursores de síntese de biomoléculas está cedendo espaço para a utilização dos subprodutos e resíduos decorrentes dos processos de extração de óleos vegetais (SLIVINSKI et al., 2012; CHAKRABORTY et al., 2015; LI et al., 2016; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017). A utilização de resíduos agroindustriais diminui os custos de produção e tem sido considerada importante estratégia para a produção viável de biossurfactantes em maiores escalas (SANTOS et al., 2016b).

Estudos de biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo tem explorado a capacidade de diferentes microrganismos em crescer nestes substratos, onde a eficiência do processo está em muitos casos associada à produção de metabólitos, como enzimas e biossurfactantes (SOUZA; VESSONI-PENNA; DE SOUZA OLIVEIRA, 2014). A questão mais importante é selecionar os microrganismos apropriados, que devem ser capazes de usar os hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, uma vez que estes compostos estão pouco acessíveis às células microbianas (PACWA-ŁŁOCINICZAK et al., 2016). Para superar este obstáculo e aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos, propõe-se a utilização de microrganismos produtores de biossurfactantes nos processos de biodegradação, onde a síntese de biossurfactantes é decorrente da conversão dos hidrocarbonetos lineares em álcoois, aldeídos e ácidos

graxos, que posteriormente são metabolizados (DECESARO et al., 2013).

O fungo avaliado neste trabalho apresenta potencial uso em processos de biorremediação de derivados de petróleo, uma vez que foi verificada a capacidade de produção de biossurfactantes em sistemas contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono. Apesar de serem conhecidos os mecanismos envolvidos no processo de biodegradação de substratos hidrofóbicos por microrganismos produtores de biossurfactantes, há poucos avanços na investigação de fungos com esta finalidade. Desta forma, evidencia-se a importância da avaliação dos parâmetros envolvidos de forma a viabilizar estratégias para a utilização de fungos em processos de biorremediação.

4.2.1 Influência das condições ambientais no crescimento do fungo, no processo de biodegradação e na produção de biossurfactantes

A biodegradação é definida como uma reação de oxidação ou redução catalisada biologicamente, que envolve compostos químicos complexos, relacionada com o crescimento e o metabolismo microbiano. Como resultado, poluentes orgânicos são degradados e utilizados como fonte de carbono e energia. Além disso, as taxas de biodegradação dos poluentes orgânicos são influenciadas por diferentes fatores: (a) características dos poluentes e sua biodisponibilidade; (b) vias metabólicas do microrganismo utilizado; (c) condições ambientais como pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio e necessidades nutricionais (VARJANI, 2017).

Entre os fatores externos, a temperatura exerce grande influência na taxa dos processos biotecnológicos, afetando aspectos morfológicos dos microrganismos e a disponibilidade nutricional. Ao mesmo tempo, o pH do substrato afeta a disponibilidade de íons metálicos, a permeabilidade da membrana celular, o pH interno do micélio e as atividades enzimáticas. Em geral, os fungos são microrganismos mesófilos, crescem a uma temperatura ótima entre 25 °C e 40 °C, e são capazes de se multiplicar dentro de uma ampla faixa de pH (ROUCHES et al., 2016).

Diante do exposto e do indicativo da capacidade do fungo isolado em produzir biossurfactantes, a influência dos fatores ambientais (temperatura e pH) e da concentração de substrato no processo de biodegradação de óleo diesel em sistema submerso foi investigada. A matriz experimental e as respostas em termos do crescimento celular (X), da eficiência de remoção de óleo diesel (η) e da tensão superficial

(TS) para todas as condições experimentais, incluindo repetições, são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 – Matriz experimental e resultados referentes ao crescimento celular (X), remoção de óleo diesel (η) e produção de biossurfactantes (TS) no processo de biodegradação do óleo diesel pelo fungo isolado.

Ensaio	T (°C)	S (g.L⁻¹)	pH	X (g.L⁻¹)	η (%)	TS (mN.m⁻¹)
1	37	10,0	7,0	1,60	24,02	47,8
2	37	3,0	7,0	0,84	29,44	49,9
3	32	6,5	5,0	2,14	59,16	36,2
4	37	10,0	3,0	0,21	0,00	62,5
5	32	6,5	5,0	2,17	52,37	38,8
6	37	10,0	3,0	0,19	0,00	60,9
7	27	10,0	7,0	2,36	77,54	32,6
8	27	10,0	3,0	2,31	58,59	42,7
9	37	3,0	3,0	0,24	12,49	57,0
10	37	10,0	7,0	1,75	5,98	46,1
11	32	6,5	5,0	1,78	56,48	38,7
12	27	3,0	7,0	1,02	72,49	35,3
13	27	3,0	3,0	2,20	60,21	41,8
14	27	10,0	7,0	3,12	79,07	31,2
15	32	6,5	5,0	2,51	57,47	37,1
16	27	10,0	3,0	4,06	56,06	44,0
17	32	6,5	5,0	1,99	57,83	40,2
18	37	3,0	7,0	0,65	28,88	53,8
19	27	3,0	7,0	1,51	81,70	34,1
20	27	3,0	3,0	2,01	50,32	39,0
21	37	3,0	3,0	0,20	10,12	58,0
22	32	6,5	5,0	1,91	60,19	39,6

Numa primeira análise, pode-se constatar que foram obtidos percentuais de biodegradação de óleo diesel em até 80 %, evidenciando a capacidade do fungo selecionado em se adaptar a substratos hidrofóbicos. Além disso, nos ensaios onde foram observados os maiores percentuais de remoção de óleo diesel (experimentos 7, 12, 14 e

19) foram obtidos os menores valores de TS, sendo este indicativo da produção de biossurfactantes nestas condições. Ao mesmo tempo, não foi observado consumo da fonte de carbono nos ensaios 4 e 6, resultando num baixo crescimento celular ($0,20 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$) em comparação com as demais condições experimentais. Ainda, a produção de biossurfactante não foi expressiva nos ensaios onde houve pouco consumo de óleo diesel pelo fungo, comprovada pelos valores de TS obtidos. Todos estes resultados corroboram com os mecanismos de biodegradação de substratos hidrofóbicos por microrganismos produtores de biossurfactantes propostos na literatura (KACZOREK; URBANOWICZ; OLSZANOWSKI, 2010; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2016).

Da análise do planejamento experimental proposto foram obtidos modelos de regressão quadráticos que predizem o comportamento do crescimento celular (Equação 10), da eficiência de remoção de óleo diesel (Equação 11) e da produção de biossurfactantes avaliada em termos dos valores de tensão superficial (Equação 12), em relação a temperatura (X_1), concentração de óleo diesel (X_2) e pH do meio (X_3). A adequação dos modelos aos dados experimentais foi confirmada por análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste (*lack of fit*) (Tabelas 20, 21 e 22). Ainda, os modelos apresentaram valores de coeficiente de determinação (R^2) de 0,8877 (Equação 10), 0,9795 (Equação 11) e 0,9824 (Equação 12).

$$X (\text{g.L}^{-1}) = 10,5634 - 0,2905X_1 + 0,3804X_2 - 1,4266X_3 - 0,0118X_1X_2 + 0,0411X_1X_3 - 0,02401X_2X_3 \quad (10)$$

$$\eta (\%) = 127,1970 - 3,3564X_1 + 6,1051X_2 + 9,1408X_3 - 0,2052X_1X_2 - 0,1245X_1X_3 - 0,0660X_2X_3 \quad (11)$$

$$\text{TS} (\text{mN.m}^{-1}) = -12,5954 + 1,9398X_1 + 1,5005X_2 + 0,6768X_3 - 0,0061X_1X_2 - 0,0406X_1X_3 - 0,2652X_2X_3 \quad (12)$$

Tabela 20 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de X (g.L^{-1}) ao modelo de regressão quadrático.

Fator	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
X_1	10,41837	1	10,41837	58,89619	0,000004
X_2	3,00416	1	3,00416	16,98282	0,001205
X_3	0,12906	1	0,12906	0,72959	0,408480
X_1X_2	0,67774	1	0,67774	3,83134	0,072124
X_1X_3	2,70520	1	2,70520	15,29281	0,001790
X_2X_3	0,44991	1	0,44991	2,54337	0,134772
Falta de ajuste	0,07467	1	0,07467	0,42209	0,527208
Erro puro	2,29962	13	0,17689		
Total	21,15119	21			

Nota: SQ Soma dos quadrados
 GL Graus de liberdade
 QM Quadrado médio

Tabela 21 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de η (%) ao modelo de regressão quadrático.

Fator	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
X_1	11290,10	1	11290,10	491,6879	0,000000
X_2	123,16	1	123,16	5,3637	0,037530
X_3	1431,47	1	1431,47	62,3409	0,000003
X_1X_2	206,42	1	206,42	8,9895	0,010273
X_1X_3	24,78	1	24,78	1,0793	0,317801
X_2X_3	3,41	1	3,41	0,1487	0,706046
Falta de ajuste	1,01	1	1,01	0,0438	0,837526
Erro puro	298,50	13	22,96		
Total	14613,07	21			

Nota: SQ Soma dos quadrados
 GL Graus de liberdade
 QM Quadrado médio

Tabela 22 – ANOVA para o ajuste dos dados experimentais de TS (mN.m^{-1}) ao modelo de regressão quadrático.

Fator	SQ	GL	QM	Teste F	Valor p
X_1	1144,131	1	1144,131	517,3760	0,000000
X_2	0,076	1	0,076	0,0342	0,856141
X_3	352,501	1	352,501	159,4008	0,000000
X_1X_2	0,181	1	0,181	0,0817	0,779538
X_1X_3	2,641	1	2,641	1,1941	0,294343
X_2X_3	55,131	1	55,131	24,9301	0,000246
Falta de ajuste	2,806	1	2,806	1,2687	0,280373
Erro puro	28,748	13	2,211		
Total	1838,948	21			

Nota: SQ Soma dos quadrados

GL Graus de liberdade

QM Quadrado médio

Os efeitos principais dos fatores considerados, bem como os efeitos de interação de segunda ordem, foram avaliados utilizando o teste t de *Student* a um nível de confiança de 95%. Em geral, quanto maior a magnitude do valor de t e menor o valor de p, mais significativo é o fator correspondente. Analisando os efeitos principais, a temperatura exerceu influência significativa ($p < 0,05$), sendo este efeito negativo sobre o crescimento celular e remoção de óleo diesel, e positivo para a resposta de tensão superficial. Isto significa que ao realizar o cultivo em temperaturas mais altas, dentro do intervalo analisado (27 °C a 37 °C), observa-se menor crescimento microbiano e, conseqüentemente, menor consumo de óleo diesel (efeito negativo) independente dos valores de pH e concentração inicial de óleo diesel.

Ao mesmo tempo, conforme já mencionado, em condições onde verifica-se baixos percentuais de remoção de óleo diesel, elevados valores de TS são obtidos (efeito positivo). Deve-se considerar ainda, que embora a temperatura exerça efeito positivo para a resposta de TS, valores elevados de tensão superficial indicam ausência ou baixa produção de biossurfactantes. Desta forma, conclui-se que temperaturas mais baixas de operação favorecem o consumo do substrato e a produção de metabólitos com atividade de superfície. Em média, a diminuição da temperatura de 37 °C para 27 °C resultou num aumento na eficiência de remoção em até 50 %. Ainda, a concentração celular

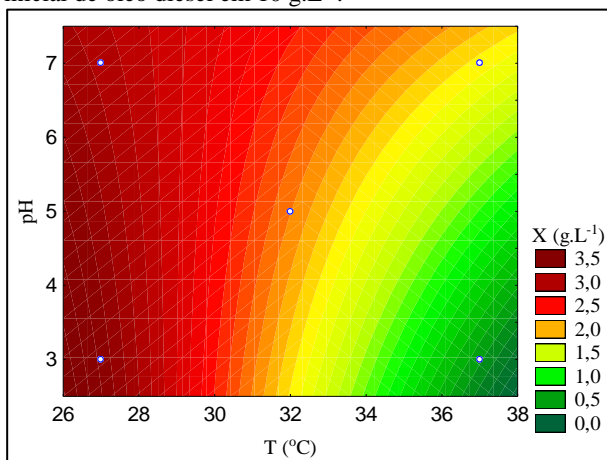
aumentou de $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ para $2,25 \text{ g.L}^{-1}$ e os valores de TS obtidos diminuíram de $54,5 \text{ mN.m}^{-1}$ para $37,6 \text{ mN.m}^{-1}$.

O pH apresentou um efeito principal significativo ($p < 0,05$), positivo para a remoção de óleo diesel e negativo para a TS. Dentro do intervalo averiguado (pH 5 a 7) quanto maior o valor de pH, maior será a remoção de óleo diesel e menor será a TS do meio. Isto pode ser observado nos ensaios conduzidos a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ e 3 g.L^{-1} de óleo diesel (experimentos 12, 13, 19 e 20). Nestas condições de temperatura e concentração de substrato e pH do meio igual a 3, foi obtido uma eficiência de remoção de óleo diesel igual a $55,26 \pm 4,95 \%$, ao mesmo tempo que a TS do meio é igual a $40,4 \pm 1,4 \text{ mN.m}^{-1}$. Em pH 7, sob as mesmas condições de temperatura e concentração de óleo diesel, a eficiência de remoção do substrato aumentou para $77,10 \pm 4,61 \%$ enquanto que a TS diminui para $34,7 \pm 0,6 \text{ mN.m}^{-1}$.

No que se refere ao crescimento do fungo, não foi observada influência significativa do pH em relação aos dados de concentração celular ($p > 0,05$). No entanto, o efeito de interação de segunda ordem temperatura-pH é significativo, sendo este efeito positivo para o crescimento do fungo. O efeito de interação pode ser melhor compreendido a partir da análise da Figura 17. Em condições de temperatura alta ($37 \text{ }^\circ\text{C}$), são observados maiores valores de concentração celular (X , g.L^{-1}) em pH 7,0 em comparação aos sistemas em pH 3,0. Ao mesmo tempo, em condições favoráveis de temperatura para o metabolismo ($27 \text{ }^\circ\text{C}$), não são verificadas diferenças nos valores de X em função das alterações dos valores de pH. Desta forma, pode-se concluir que o efeito do pH se torna significativo para o crescimento microbiano em condições desfavoráveis de temperatura. Além disso, deve-se notar que foram obtidos valores de desvio padrão elevados em algumas condições experimentais, o que aumenta a variabilidade da resposta.

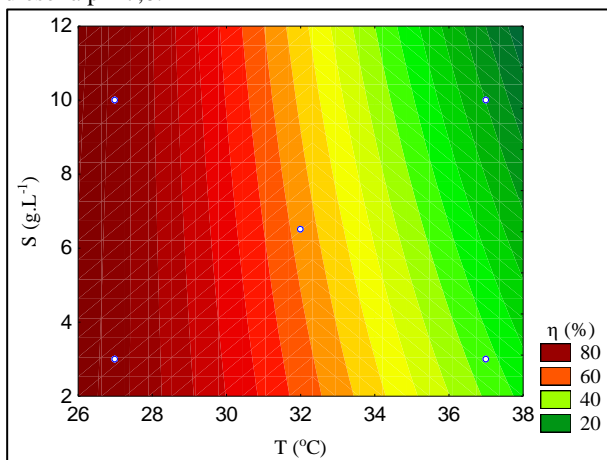
Não foi observado efeito inibitório do óleo diesel sobre o crescimento do fungo dentro da faixa de concentração avaliada (3 g.L^{-1} a 10 g.L^{-1}). De acordo com os dados obtidos e a partir da análise do planejamento experimental, a concentração inicial de óleo diesel teve um efeito positivo sobre a concentração celular. Isto indica o potencial do fungo em metabolizar substratos complexos, uma característica desejável nos processos de biodegradação. No entanto, observou-se uma eficiência de remoção ligeiramente superior nos ensaios conduzidos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com menores concentrações de óleo diesel (Figura 18).

Figura 17 – Gráfico de contorno para a resposta concentração celular (X , g.L^{-1}) em função da variação dos fatores de temperatura e pH, fixando a concentração inicial de óleo diesel em 10 g.L^{-1} .



Fonte: Autor.

Figura 18 – Gráfico de contorno para a resposta eficiência de remoção (η , %) em função da variação dos fatores temperatura e concentração inicial de óleo diesel à pH 7,0.

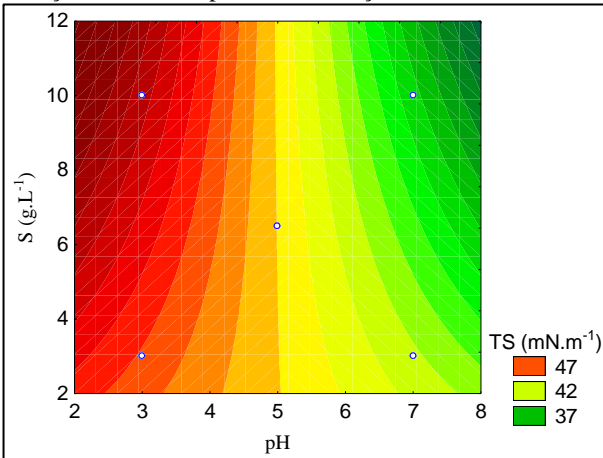


Fonte: Autor.

A concentração inicial de óleo diesel não exerceu efeito significativo sobre os valores de TS, e conseqüentemente, não influencia a produção de biossurfactantes. Porém, o efeito de interação das

variáveis pH e concentração de substrato foi significativo para esta resposta. Da análise da Figura 19 pode-se observar que um aumento da concentração de óleo diesel em pH 7,0 resulta em menores valores de TS.

Figura 19 – Gráfico de contorno para a resposta TS (mN.m^{-1}) em função da variação dos fatores pH e concentração inicial de óleo diesel a 27 °C.



Fonte: Autor.

Estes resultados reforçam a hipótese de que a produção de biossurfactantes e o consumo de óleo diesel pelo fungo estão relacionadas, uma vez que os fatores ambientais estudados exercem efeitos contrários e significativos na eficiência de remoção e nos valores de tensão superficial. Em última análise, ajustando as condições para que se obtenham maiores percentuais de remoção de óleo diesel, a produção de biossurfactantes é concomitantemente favorecida. Utilizando o modelo de regressão quadrático (Equação 11) que descreve a eficiência de remoção do óleo diesel, são obtidas as condições ótimas de temperatura e pH para o processo de biodegradação. Maiores percentuais de remoção de óleo diesel, e conseqüentemente, maior produção de biossurfactantes são obtidos a 27 °C e pH 7,0. Desta forma, pode-se optar por trabalhar a temperatura ambiente (sem controle) e sem o ajuste do pH do meio, uma vez que o meio de cultivo possui pH próximo de 7,0. Em relação a concentração inicial de óleo diesel, foram obtidos valores máximos de remoção, preditos pelo modelo, utilizando as concentrações de 3 g.L^{-1} (81,93 %) e 10 g.L^{-1} (82,64 %), nas condições ótimas de temperatura de pH.

Embora existam alguns estudos reportando a produção de biossurfactantes na literatura concomitante ao processo de biodegradação de derivados de petróleo (BORAH; YADAV, 2016; LEITE et al., 2016), a maioria dos trabalhos estão orientados no estudo de biodegradação por diferentes microrganismos auxiliados pela adição de biossurfactantes (WHANG et al., 2009; BEN AYED et al., 2015; SAJNA et al., 2015; TIAN et al., 2016). A utilização de microrganismos produtores de biossurfactantes em processos de biodegradação de hidrocarbonetos hidrofóbicos mostra ser uma estratégia interessante, uma vez que produção *in situ* destes compostos auxilia o processo de degradação. Ainda, não é necessária a utilização de técnicas de extração para a utilização de biossurfactantes em estratégias de biodegradação, o que acarreta na diminuição nos gastos de energia e insumos requeridos.

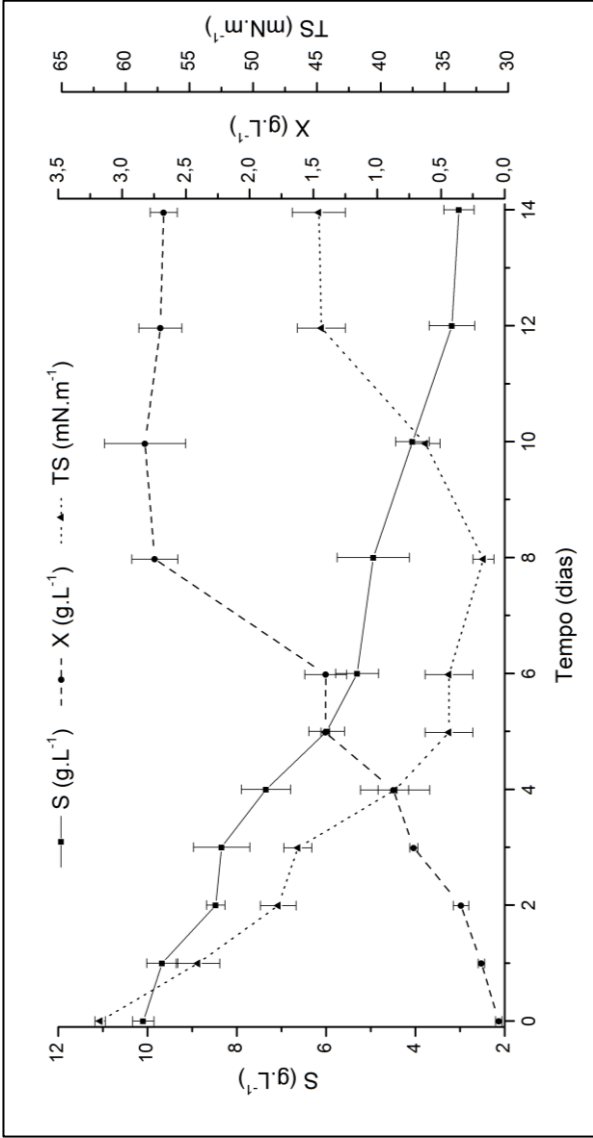
4.2.3 Estudo cinético da biodegradação do óleo diesel e produção de biossurfactantes

A cinética da biodegradação do óleo diesel pelo fungo foi avaliada nas melhores condições obtidas de acordo com os resultados do planejamento experimental fatorial completo 2³. O fungo foi cultivado em meio líquido (pH 7,0) suplementado com óleo diesel comercial, nas concentrações de 3 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹, e o processo de biodegradação foi acompanhado durante 14 dias a 27 °C. O crescimento celular (X, g.L⁻¹), a tensão superficial do meio (TS, mN.m⁻¹) e a concentração residual de óleo diesel (S, g.L⁻¹) foram determinados ao longo do processo (Figuras 21 e 21).

De acordo com os resultados obtidos, observa-se um período curto de adaptação do fungo ao meio, mostrando a afinidade do microrganismo selecionado ao substrato em estudo. Ainda, o isolado mostrou capacidade de biodegradação de óleo diesel, onde foram observadas uma redução em 50 % da quantidade de óleo diesel no sistema após 4 e 8 dias de cultivo, partindo de uma concentração inicial de 3 g.L⁻¹ e 10 g.L⁻¹, respectivamente.

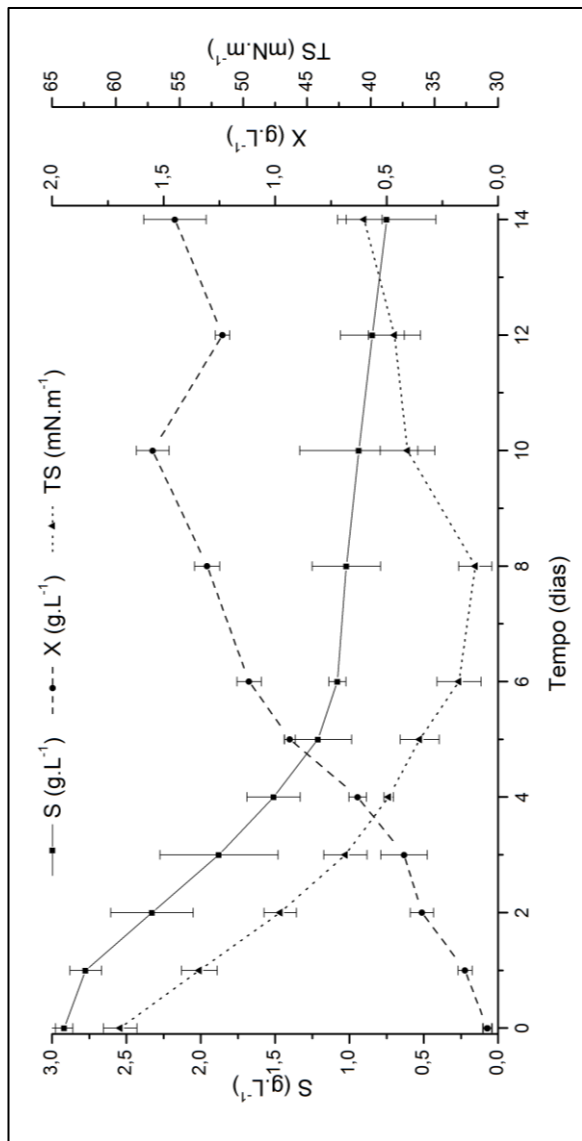
Estes resultados podem ser explicados pelo fato que microrganismos provenientes de áreas contaminadas com hidrocarbonetos apresentam capacidade de biodegradação de derivados de petróleo. Isso é decorrente das mutações genéticas que ocorrem nas gerações subsequentes para que se mantenha a microbiota na presença de substratos complexos (VARJANI, 2017).

Figura 20 – Cinética da biodegradação do óleo diesel (concentração inicial de 10 g.L^{-1}) a 27°C e $\text{pH } 7,0$.



Fonte: Autor.

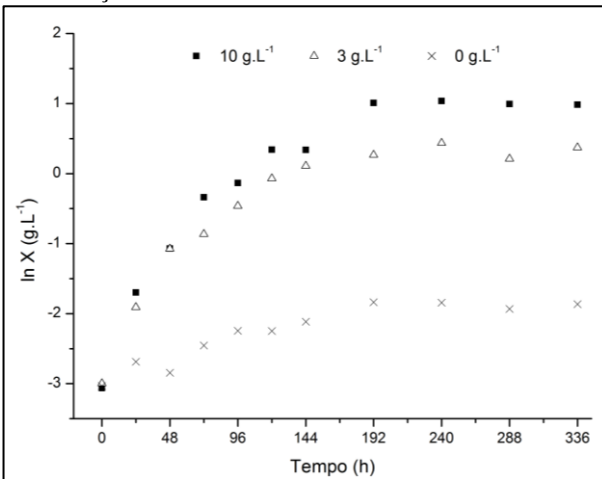
Figura 21 – Cinética da biodegradação do óleo diesel (concentração inicial de 3 g.L^{-1}) a 27°C e pH 7,0.



Fonte: Autor.

A concentração de biomassa aumentou exponencialmente com o tempo de incubação atingindo um estado estacionário após 8 dias de cultivo, onde o crescimento celular permaneceu praticamente constante. Ainda, um ensaio controle foi realizado (sem adição de óleo diesel) sendo verificado crescimento microbiano inferior a $0,16 \text{ g.L}^{-1}$ na ausência deste substrato. A Figura 22 apresenta as curvas de crescimento do fungo nos ensaios com 10 g.L^{-1} e 3 g.L^{-1} de óleo diesel e no ensaio controle.

Figura 22 – Curvas de crescimento do fungo isolado em diferentes concentrações de óleo diesel.



Fonte: Autor.

Os dados de crescimento celular foram ajustados ao modelo logístico, obtendo-se assim os valores das velocidades específicas máxima de crescimento (μ_{\max}) em função da concentração inicial de óleo diesel. Em concentrações de 3 g.L^{-1} obteve-se um valor de μ_{\max} igual a $0,0105 \text{ h}^{-1}$. Aumentando a concentração inicial de óleo diesel para 10 g.L^{-1} foi obtido um valor de μ_{\max} igual a $0,0184 \text{ h}^{-1}$, confirmando que não há inibição do crescimento microbiano pelo substrato, em função do aumento da concentração da fonte de carbono, dentro do intervalo avaliado.

O crescimento microbiano resulta no consumo de nutrientes e na excreção de produtos metabólicos. Com o aumento do tempo de incubação foi observada uma diminuição na concentração do óleo diesel, principalmente durante a fase de crescimento exponencial.

Verifica-se que o fungo pode utilizar o substrato fornecido como fonte de carbono para multiplicação celular, sugerindo a presença de correlação entre o perfil de crescimento e a extensão da remoção de óleo diesel, sendo este comportamento observado em outros trabalhos (WANG et al., 2015). Ainda, foram obtidos fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$, g.g^{-1}) iguais à $0,5412 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,6596 \text{ g.g}^{-1}$, para concentração inicial de óleo diesel igual a 10 g.L^{-1} e 3 g.L^{-1} , respectivamente.

A biossíntese de surfactantes pelo fungo foi evidenciada pela redução da TS do meio, atingindo um valor mínimo (32 mN.m^{-1}) nos 8 primeiros dias de cultivo. Este resultado sugere que a produção de biosurfactantes está relacionada ao crescimento microbiano, uma vez que foi observada diminuição nos valores de TS durante a fase de crescimento exponencial. De acordo com os dados referentes a cinética de consumo de substrato e os valores de TS pode-se concluir que existe uma relação aparente entre a produção de biosurfactantes e a capacidade de remoção de óleo diesel.

A presença de substâncias, tais como biosurfactantes, podem melhorar a biodisponibilidade dos substratos hidrofóbicos pela redução da tensão superficial e interfacial entre a parede celular e o substrato lipofílico. Estudos apontam que a presença destas moléculas pode ser um fator determinante, atuando sobre as taxas de biodegradação de muitos compostos orgânicos com baixa solubilidade em água (MARCHUT-MIKOLAJCZYK et al., 2015). O efeito de surfactantes sobre o aumento da solubilidade de óleo em água e da característica hidrofóbica da superfície celular foi confirmado por Tian e colaboradores (2016). Estes autores verificaram que quando a concentração de surfactante é igual a sua CMC, a solubilidade aparente do óleo em água aumenta em 50 %. Ao mesmo tempo, em concentrações acima da CMC, a formação de micelas aumenta a solubilidade aparente pela dissipação de óleo no núcleo de micelas, que é composto pela extremidade hidrófoba de molécula do tensoativo. Desta forma, a produção de biosurfactantes em sistemas de degradação de hidrocarbonetos altera as propriedades superficiais dos microrganismos e aumenta a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos (FERRADJI et al., 2014; BEN AYED et al., 2015; SAJNA et al., 2015).

A partir de 8 dias de cultivo foi identificada a fase de crescimento estacionário do fungo. A interrupção do crescimento exponencial pode ser devido ao esgotamento de algum nutriente essencial no meio

(limitação do substrato), ao acúmulo de algum produto autotóxico ou a uma combinação de ambos fatores (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017). Durante este período, foi verificado aumento nos valores de TS do sistema líquido. Este comportamento pode ser devido a necessidade de suprir os requisitos energéticos ou nutricionais do microrganismo, à medida que a disponibilidade da fonte principal de carbono se esgota (MAASS et al., 2015). Como resultado, a atividade superficial diminui prejudicando a partição dos hidrocarbonetos presentes na fase lipofílica para o meio líquido. Consequentemente, a eficiência da remoção destes compostos é comprometida, observando-se valores baixos de consumo de óleo diesel neste período. Contudo, obtiveram-se valores de eficiência global de remoção de aproximadamente 70 %.

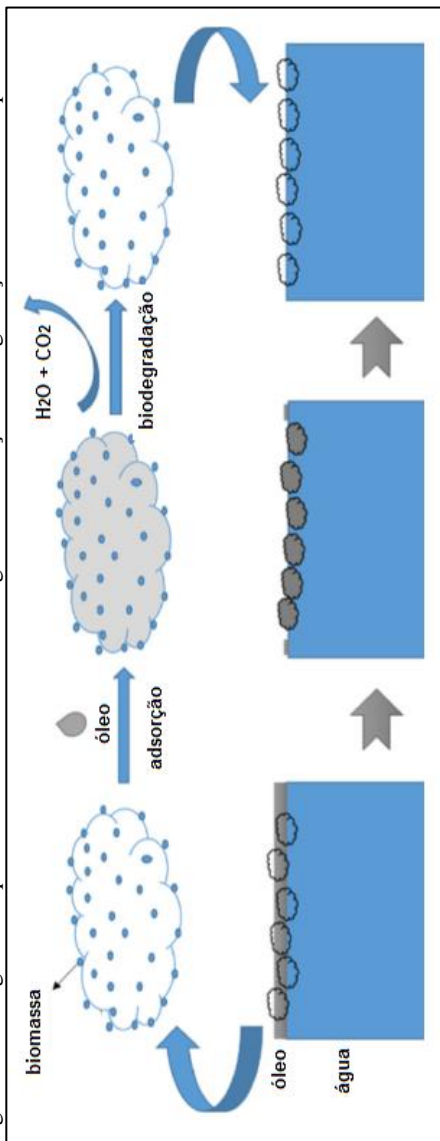
4.2.4 Biossorção de óleo diesel

Recentemente, biomassa microbiana viável e não viável tem sido avaliada na remoção de poluentes por biossorção. O conceito de biossorção refere-se a sorção e/ou complexação passiva de solutos presentes em soluções aquosas, por materiais de origem biológica, como algas, resíduos de fermentação de fungos e bactérias e lodos ativados (SOTO et al., 2011; MOUBARIK; GRIMI, 2015). A capacidade de biossorção de óleo diesel por biomassa microbiana tem sido pouco explorada, entretanto alguns estudos utilizando biomassa fúngica não viável tem demonstrado a capacidade de remoção de solutos hidrofóbicos (SRINIVASAN; VIRARAGHAVAN, 2010).

A presença de mecanismos de adsorção em sistemas de biodegradação pode justificar a redução brusca na concentração de poluentes hidrofóbicos nos instantes iniciais do processo. Num primeiro momento, o processo de adsorção desempenha papel principal, e a concentração de óleo diesel é reduzida em um curto intervalo de tempo, iniciando-se o processo de biodegradação em seguida (Figura 23). Como resultado, a ação sinérgica dos dois mecanismos leva a um equilíbrio dinâmico que auxilia a redução global da concentração de óleo diesel no sistema (WANG et al., 2015).

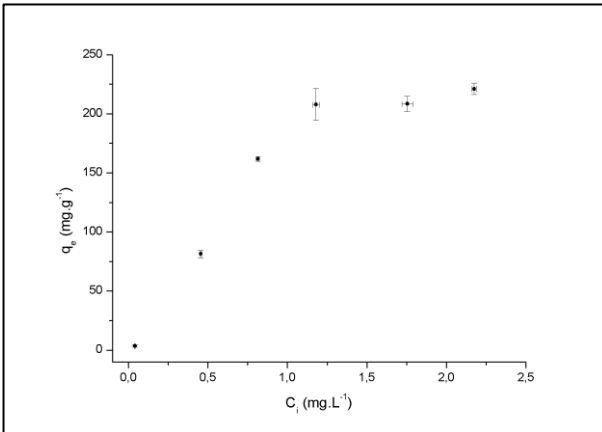
Ensaio de equilíbrio foram conduzidos de forma a quantificar a contribuição da adsorção no processo de biodegradação de óleo diesel, nas condições ótimas estabelecidas (27 °C e pH 7,0) por um período de 24 h. A Figura 24 mostra a isoterma de adsorção de óleo diesel por biomassa fúngica não viável. Nesta figura, pode-se observar a relação entre as quantidades adsorvidas no equilíbrio (q_e) e a concentração de equilíbrio (C_e) de óleo diesel.

Figura 23 – Diagrama esquemático do mecanismo sinérgico de adsorção-biodegradação de óleo diesel pela biomassa fúngica.



Fonte: Adaptado de Wang e colaboradores (2015).

Figura 24 – Isoterma de adsorção de óleo diesel por biomassa fúngica não viável.



Fonte: Autor.

Os dados de equilíbrio são obtidos de forma a avaliar a capacidade do material adsorvente para adsorver uma determinada molécula. A maioria dos trabalhos de adsorção de óleo diesel utilizando diferentes adsorventes utilizam, principalmente, os modelos de isoterma de Freundlich e Langmuir para interpretar os dados de equilíbrio (PINTOR et al., 2016). Desta forma, os resultados experimentais foram ajustados seguindo estas duas abordagens (Tabela 23).

Verifica-se que o modelo de Langmuir se ajusta melhor aos dados de equilíbrio, indicando que a adsorção ocorre preferencialmente em monocamadas. A teoria de Langmuir diz que a adsorção ocorre em sítios homogêneos, específicos e com uma molécula adsorvida em cada sítio da superfície do adsorvente, não ocorrendo nenhuma adsorção adicional. Ainda, a capacidade máxima de adsorção ($q_{máx}$) foi de 389,50 mg.g⁻¹. Estes resultados são similares aos obtidos por Yang e colaboradores (2014) no estudo de adsorção de óleo mineral por biomassa não viável de *Auricularia polytricha*. Estes autores ajustaram os dados de equilíbrio ao modelo de Langmuir-Freundlich, obtendo um valor de capacidade máxima de adsorção de 398 mg.g⁻¹.

Biomassa fúngica tem sido utilizada em diferentes processos de separação, devido principalmente a sua composição. As grandes quantidades de quitosana, quitina, fosfato e polissacarídeos nas paredes celulares fúngicas fazem dos fungos um adsorvente promissor (YANG et al., 2014).

Sugere-se, desta forma, que o processo de biodegradação de óleo diesel pelo fungo isolado é composto por diferentes mecanismos, onde a capacidade de adsorção pode ainda ser melhorada pela redução da tensão interfacial entre a parede celular e o soluto hidrofóbico. Assim, a eficiência de remoção de óleo diesel está relacionada pela capacidade de expressão de biossurfactantes e de adsorção do substrato hidrofóbico pela biomassa fúngica, possibilitando as reações de degradação (SAJNA et al., 2015; CHEN et al., 2016; TAO et al., 2017)

Tabela 23 – Parâmetros obtidos das isotermas de adsorção para a biomassa fúngica não viável a 27 °C e pH 7,0 para os modelos e Langmuir e Freundlich.

Parâmetro	Langmuir	Freundlich
K_L (L.mg ⁻¹)	0,7551 ± 0,3852	-
$q_{máx}$ (mg.g ⁻¹)	389,5001 ± 113,8813	-
K_f (L.mg ⁻¹)	-	156,1850 ± 17,3325
N	-	1,3789 ± 0,2839
R^2	0,9706	0,9190

4.2.5 Estudo em biorreator de bancada

Ensaio em um biorreator de bancada foram realizados nas condições ótimas estabelecidas neste trabalho, de forma a verificar a transferência de oxigênio durante o processo de biodegradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes. Em cultivos aeróbios, o crescimento celular eleva a demanda de oxigênio do processo e simultaneamente a viscosidade aparente do meio de cultivo, que acaba por dificultar a transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida, reduzindo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}). Como resultado, pode ser observada uma limitação no crescimento do microrganismo e na biossíntese do produto desejado (DORAN, 1995). Ainda, a otimização do processo de produção de biossurfactantes implica a elucidação da influência das condições hidrodinâmicas e o efeito dos biossurfactantes na transferência de oxigênio. A presença de surfactantes modifica o coeficiente de transferência de massa da fase líquida, bem como a área de contato gás-líquido, devido às modificações das condições hidrodinâmicas e propriedades físico-químicas do sistema (FAHIM et al., 2013).

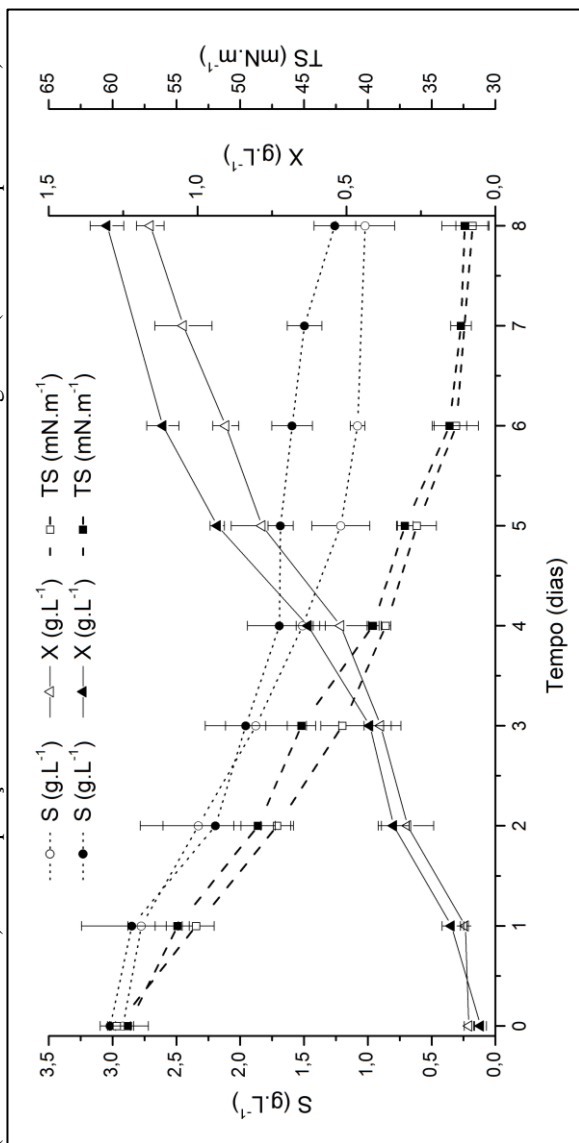
O fungo foi cultivado em meio líquido contendo 3 g.L⁻¹ de óleo diesel durante 8 dias, de acordo com os dados obtidos no estudo cinético. A concentração celular (X), a concentração residual de óleo diesel (S) e a tensão superficial (TS) do meio líquido foram

determinadas durante o processo e confrontadas com os dados obtidos em frascos agitados, sob as mesmas condições (Figura 25). De acordo com os resultados gerados, pode-se observar que as respostas avaliadas apresentaram a mesma tendência, sendo observadas pequenas variações nos parâmetros determinados em biorreator de bancada em comparação àqueles obtidos em frascos agitados. Este resultado mostra a reprodutibilidade dos dados experimentais, o que garante a similaridade dos parâmetros obtidos em diferentes escalas.

Como forma de avaliar a transferência de oxigênio durante o cultivo, foram determinados os valores de K_{La} nos tempos 2, 4, 6 e 8 dias, utilizando o método dinâmico. A curva que apresenta o perfil temporal de oxigênio dissolvido no meio líquido, devido a interrupção da aeração e do sistema de agitação e sua posterior retomada pode ser observada na Figura 26.

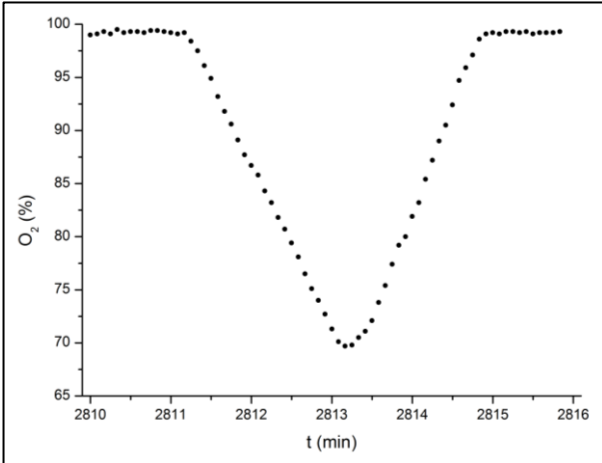
Os valores de K_{La} determinados a partir da linearização dos dados experimentais de oxigênio dissolvido no trecho ascendente das curvas obtidas no método dinâmico são apresentados na Tabela 24. Foi observada diminuição significativa nos valores de K_{La} ($p < 0,05$) durante o processo de biodegradação de óleo diesel, a partir de 6 dias de cultivo. Estes resultados indicam que o decréscimo nos valores de K_{La} são decorrentes da produção de biossurfactantes no sistema, uma vez que valores de TS abaixo de 35 mN.m^{-1} foram obtidos no mesmo período. Tensoativos afetam a dinâmica da formação de bolhas, a retenção de gás e a transferência de massa gás-líquido, podendo exercer tanto efeito positivo como negativo sobre o K_{La} . Quando a tensão superficial é reduzida, devido a presença de surfactantes, são geradas bolhas de menor tamanho, conduzindo a um aumento da área interfacial e, portanto, aumentando o coeficiente volumétrico de transferência de massa (HASSAN et al., 2012). No entanto, estas estruturas podem também ficar aderidas na superfície das bolhas, o que dificulta a transferência de massa (YI Y. ZUO et al., 2005). Comportamento similar foi observado num estudo da transferência de oxigênio durante a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* (FAHIM et al., 2013). Estes autores constataram que a diminuição significativa nos valores de K_{La} (variação de 27 %) foi resultado da diminuição da tensão superficial devido à presença de biossurfactantes. Deve-se ainda considerar que a evolução da concentração de oxigênio no biorreator é uma função das taxas de transferência de oxigênio e de respiração dos microrganismos, sendo que o consumo de oxigênio pelo fungo para seu crescimento e metabolismo não foi avaliado.

Figura 25 – Cinética do processo de biodegradação de óleo diesel e produção de biossurfactantes em biorreator de bancada (marcadores vazados) em comparação com os dados obtidos em frascos agitados (marcadores preenchidos).



Fonte: Autor.

Figura 26 – Concentração de oxigênio dissolvido durante a aplicação do método dinâmico para a determinação do $K_L a$ após 2 dias de cultivo.



Fonte: Autor.

Tabela 24 – Valores de $K_L a$ obtidos em diferentes tempos de cultivo.

Tempo (dias)	$K_L a$ (s ⁻¹)
2	$0,0154 \pm 0,0005^a$
4	$0,0149 \pm 0,0009^a$
6	$0,0125 \pm 0,0007^b$
8	$0,0091 \pm 0,0002^c$

4.2.6 Caracterização do biossurfactante produzido

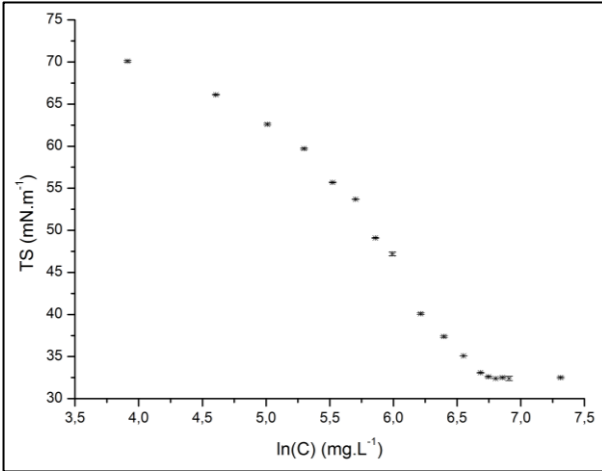
Ao final do cultivo o biossurfactante produzido pelo fungo foi extraído utilizando solventes orgânicos, obtendo-se um rendimento de $939,15 \pm 78,42 \text{ mg.L}^{-1}$. Foi realizada a caracterização química do biossurfactante bruto quanto ao teor de lipídeos, proteínas e carboidratos, auxiliando na identificação da estrutura da biomolécula, uma vez que biossurfactantes fúngicos são pouco relatados na literatura. De acordo com os dados obtidos, o biossurfactante sintetizado é composto principalmente por lipídeos ($545,87 \pm 31,57 \text{ } \mu\text{g.mg}^{-1}$) e carboidratos ($324,23 \pm 5,19 \text{ } \mu\text{g.mg}^{-1}$), não sendo detectada a presença de proteínas nas amostras. Desta forma, há um indicativo que o produto obtido é um derivado de glicolipídeo. Estruturalmente, os glicolipídeos são constituídos por um ácido graxo em combinação com uma porção de carboidrato e têm sido utilizados em várias aplicações, estando entre os

biossurfactantes mais popularmente conhecidos (INÈS; DHOUBA, 2015a).

A característica iônica do biossurfactante foi determinada por difusão em ágar, indicando ser um biossurfactante aniônico. Outros glicolipídeos produzidos pela espécie *Candida* também apresentaram caráter aniônico quando submetidos ao mesmo teste (LUNA; RUFINO; SARUBBO, 2016). Tensoativo aniônico é a classe mais comumente utilizada, apresentando íons carregados negativamente, quando em solução aquosa. A porção hidrofóbica é, geralmente, composta por uma cadeia alquila enquanto que a porção hidrofílica é composta por sulfatos, sulfonatos, fosfatos ou carboxilatos (KOSARIK; VARDAR-SUKAN, 2015).

A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante foi determinada a 25 °C e pH 7,0, uma vez que nestas condições a maioria dos biossurfactantes apresentam máxima atividade de superfície. A variação da tensão superficial (TS) em função do incremento da concentração do biossurfactante em solução aquosa foi determinada (Figura 27). De acordo com os dados obtidos, o biossurfactante bruto apresentou um valor de CMC igual a $837,41 \pm 53,15 \text{ mg.L}^{-1}$. Ainda, na CMC foi observado um valor de TS igual a $32,5 \text{ mN.m}^{-1}$. Deve-se ressaltar que nenhuma técnica de purificação foi utilizada, o que justifica o alto valor da CMC obtida, podendo haver impurezas hidrofóbicas, visto que o método de extração do biossurfactante não é seletivo (ABBASI et al., 2012).

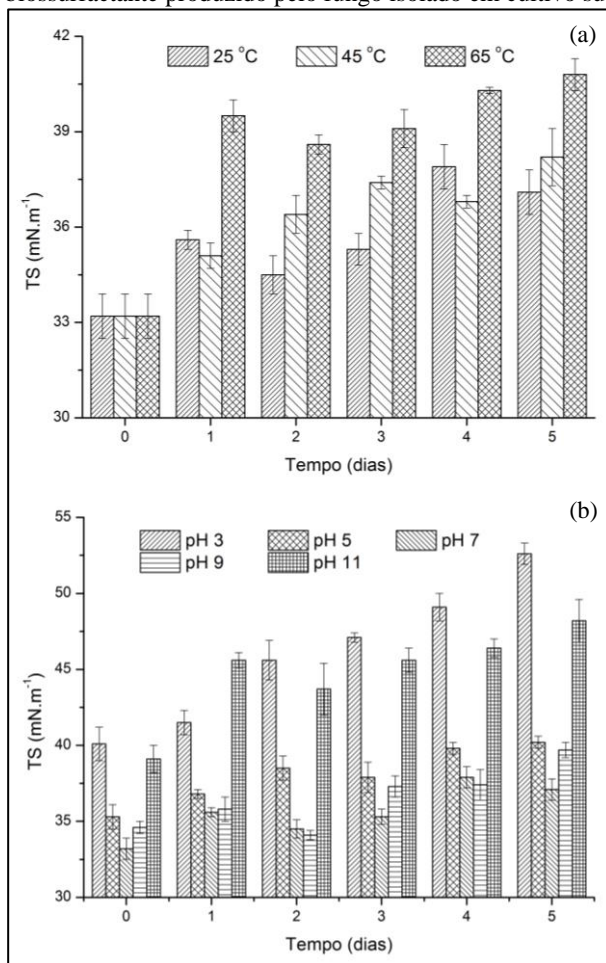
Figura 27 – Variação da TS versus o logaritmo da concentração do biossurfactante produzido pelo fungo isolado em cultivo submerso.



Fonte: Autor.

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada frente as condições de temperatura e pH, pelo monitoramento das variações dos valores de tensão superficial de soluções do biossurfactante bruto com concentração igual a sua CMC (Figura 28). Foi constatada estabilidade térmica do biossurfactante, dentro do intervalo de temperatura investigado. No entanto, observou-se um pequeno aumento nos valores de TS (menor que 8 mN.m^{-1}) das soluções incubadas a $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Em relação ao efeito do pH sobre as propriedades superficiais, conclui-se que o biossurfactante é estável apenas no intervalo de pH de 5 a 9, sendo verificadas variações significativas dos valores de TS das soluções em pH 3 e 11. Estes resultados estão em concordância com os resultados de estabilidade de diferentes biossurfactantes reportados na literatura (KIRAN; THOMAS; SELVIN, 2010; BEN AYED et al., 2015; MAASS et al., 2015; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015).

Figura 28 – Efeito da temperatura (a) e do pH (b) na estabilidade do biossurfactante produzido pelo fungo isolado em cultivo submerso.



Fonte: Autor.

4.2.7 Análise da biodegradação dos hidrocarbonetos presentes no óleo diesel

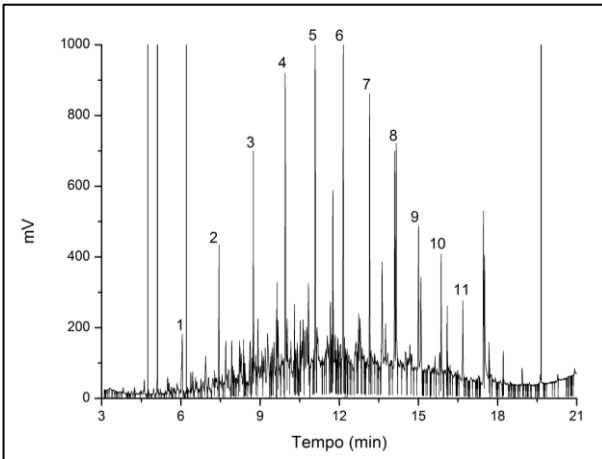
O fungo isolado apresentou capacidade de degradar hidrocarbonetos hidrofóbicos quando cultivado em sistema líquido suplementado com diferentes concentrações de óleo diesel. De forma a investigar o mecanismo presente no processo de degradação, amostras

da porção hidrofílica residual dos sistemas após 8 e 14 dias de cultivo, foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG-EM), e comparadas a uma amostra controle (ensaio sem microrganismo). A escolha destas amostras está relacionada a identificação das fases de crescimento exponencial e estacionário do fungo.

Os perfis de degradação foram semelhantes para ambos os ensaios com concentração inicial de 10 g.L^{-1} e 3 g.L^{-1} . Os cromatogramas mostram claramente a redução na intensidade dos picos de absorção dos compostos alifáticos presentes no óleo diesel após 8 e 14 dias de processo (Figura 30 e

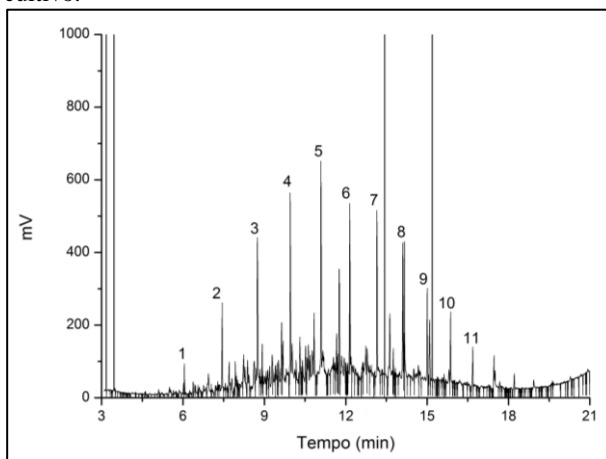
Figura 31), em comparação com a amostra controle (Figura 29). Foram detectadas a presença de hidrocarbonetos alifáticos de C10 a C20 nas amostras, sequencialmente identificados nos cromatogramas (picos identificados numericamente de 1 a 11).

Figura 29 – Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos alifáticos presentes na amostra controle de óleo diesel.



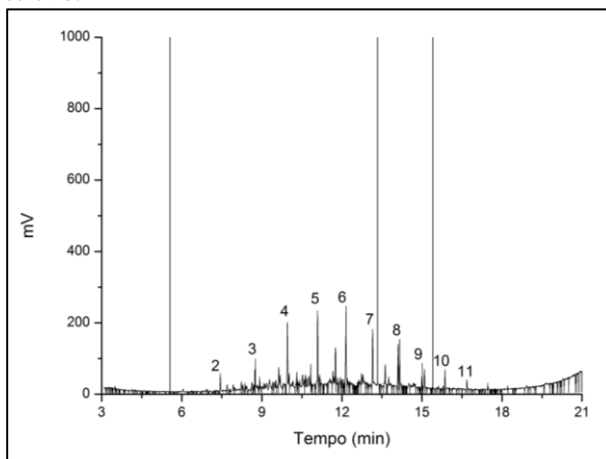
Fonte: Autor.

Figura 30 – Cromatograma da amostra de óleo diesel residual após 8 dias de cultivo.



Fonte: Autor.

Figura 31 – Cromatograma da amostra de óleo diesel residual após 14 dias de cultivo.



Fonte: Autor.

Os percentuais de biodegradação individual dos compostos alifáticos identificados nos cromatogramas foram determinados em

relação a diminuição das áreas correspondentes de cada pico (Tabela 25).

Tabela 25 – Percentuais de biodegradação individuais dos hidrocarbonetos alifáticos presentes no óleo diesel após 8 e 14 dias de cultivo.

Pico	Composto	% Redução	
		8 dias	14 dias
1	C10	63,42	100,00
2	C11	24,17	83,11
3	C12	55,29	89,08
4	C13	37,48	77,93
5	C14	38,23	77,99
6	C15	76,04	76,13
7	C16	18,47	71,07
8	C17	42,39	82,47
9	C18	38,71	95,79
10	C19	38,71	83,69
11	C20	48,29	82,52
-	Total	43,86	81,07

Deve-se ressaltar que as reduções nas intensidades de absorção dos picos identificados são decorrentes do processo de biodegradação, uma vez que as possíveis degradações abióticas afetam igualmente todas as amostras. Diante desta análise pode-se observar que houve uma redução de 43,86 % e 81,07 % dos compostos alifáticos analisados, após 8 e 14 dias de cultivo.

Apesar de serem observadas diferenças nos percentuais de redução dos compostos identificados após 8 dias, não há uma clara tendência na ordem de biodegradação em função do tamanho da molécula. Ao final do processo, foram obtidos percentuais de redução acima de 70 %, sendo que o composto C10 foi completamente degradado. Este perfil de degradação está de acordo com a maioria dos trabalhos reportados na literatura. Nkem e colaboradores (2016) avaliaram a biodegradação de óleo diesel por duas bactérias isoladas de ambientes contaminados com óleo, obtendo percentuais de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos na faixa de 53,4 % a 95,4 %.

De acordo com Varjani (2017), hidrocarbonetos alifáticos são os mais suscetíveis ao ataque microbiano, seguidos por alcanos ramificados, compostos aromáticos de baixa massa molar e cicloalcanos, sendo estes últimos os que apresentam geralmente baixa biodegradabilidade. A biodegradação incompleta de alcanos de cadeia curta pode ser devida à sua biodisponibilidade e solubilidade às membranas celulares, enquanto a toxicidade do substrato devida aos compostos de biodegradação intermediária poderia ser a razão para a biodegradação limitada de alcanos de cadeia longa (NKEM et al., 2016).

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os microrganismos *Trametes versicolor* CECT 20817 e o fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo mostraram potencialidade para a produção de biossurfactantes utilizando substratos hidrofóbicos como fonte de carbono.

Trametes versicolor foi capaz de crescer em um substrato sólido composto pelo resíduo sólido da extração bifásica do azeite de oliva (RSEBAO) e de produzir metabólitos com atividade de superfície. Ainda, a produção de biossurfactantes foi favorecida pelo aumento da fração mássica do RSEBAO no sistema de cultivo em estado sólido, o que reforça o interesse da utilização de resíduos agroindustriais oleosos como precursores da produção de tensoativos.

Devido a presença de compostos fenólicos no RSEBAO foi investigada a produção concomitante de enzimas oxidativas e biossurfactantes durante o cultivo em estado sólido. Apesar de o fungo produzir as enzimas lacase e manganês peroxidase durante o cultivo, não foi possível estabelecer uma correlação entre a produção de enzimas e biossurfactantes. Desta forma, conclui-se que as vias metabólicas para a síntese destas biomoléculas não são competitivas.

O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial dos extratos, atingindo um valor mínimo de $31,5 \pm 0,8$ mN.m⁻¹ após 14 dias de cultivo, apresentando um rendimento de $125,0 \pm 10,0$ mg de biossurfactante bruto por 100 g de substrato sólido.

Os resultados da caracterização química indicaram que o fungo *Trametes versicolor* é produtor de lipopeptídeos. Ainda o biossurfactante produzido apresentou propriedades interfaciais, mantendo-se estável em diferentes valores de temperatura e pH.

O biossurfactante fúngico não purificado apresentou atividade antibacteriana moderada contra bactérias gram-negativas, o que sugere sua potencial aplicação nas áreas médicas e de alimentos.

Em relação a avaliação da produção de biossurfactantes utilizando um fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo, foi verificado que a presença de substratos hidrofóbicos, como o óleo diesel, no cultivo submerso, induz a produção destes metabólitos. Além disso, o fungo isolado mostrou capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo.

A produção do biossurfactante foi monitorada ao longo do processo de biodegradação de óleo diesel, sendo observada que a eficiência de degradação está associada a capacidade de produção de

tensoativos, visto que a redução da tensão superficial do meio aumenta a biodisponibilidade dos substratos hidrofóbicos.

O biossurfactante produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio líquido, atingindo um valor mínimo de 32 mN.m^{-1} após 8 dias de cultivo. A caracterização química do biossurfactante indicou que a estirpe utilizada é capaz de produzir glicolípideos com propriedades interfaciais satisfatórias. Além disso, a partir dos estudos de estabilidade, pode-se constatar que o produto biossintetizado apresenta estabilidade frente a variações de temperatura e pH.

Os ensaios de adsorção utilizando biomassa fúngica não viável revelaram que, durante o processo de biodegradação de óleo diesel, ocorrem fenômenos de sorção do substrato na biomassa. Estes resultados são indicativos que a dinâmica do processo de remoção de óleo diesel em meio aquoso está relacionada a um mecanismo simultâneo de adsorção-biodegradação.

No cultivo conduzido em biorreator de bancada utilizando as mesmas condições estabelecidas nos ensaios em frascos agitados, foi verificada a influência da produção de biossurfactantes na transferência de oxigênio para o meio líquido. Apesar de ter sido observada diminuição nos valores dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio (K_{La}) em função da produção de biossurfactantes, a quantidade de oxigênio dissolvido no sistema foi suficiente para permitir o crescimento do fungo, não afetando seu metabolismo.

Estes resultados reforçam a potencialidade da utilização de fungos produtores de biossurfactantes em processos de biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos derivados de petróleo. Além disso, a produção *in situ* de biossurfactantes nestes processos descarta a necessidade de se utilizar técnicas de extração e purificação, reduzindo os custos de operação.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Propor estratégias para a purificação do biossurfactante produzido por *Trametes versicolor* e pelo fungo isolado de um resíduo de refinaria de petróleo;
- Avaliar a cinética de crescimento de *Trametes versicolor* em sistema sólido;
- Realizar estudo da produção de biossurfactantes em biorreator de coluna utilizando o substrato sólido proposto neste trabalho;

- Investigar a produção de biossurfactantes em cultivo submerso utilizando fontes de carbono solúvel e não solúvel concomitantes;
- Avaliar o efeito do biossurfactante produzido e de surfactantes sintéticos na hidrofobicidade da parede celular do fungo isolado;
- Investigar a produção de biossurfactantes por culturas mistas em ambos os cultivos, em sistema sólido e submerso.

REFERÊNCIAS

ABBASI, H.; HAMED, M. M.; LOTFABAD, T. B.; ZAHIRI, H. S.; SHARAFI, H.; MASOOMI, F.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; ORTIZ, A.; AMANLOU, M.; NOGHABI, K. A. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 211–219, 2012.

ALLOUI, F.; ABID, N.; ROUSSOS, S.; SAYADI, S. Decolorization of semisolid olive residues of “alperujo” during the solid state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 2, p. 120–125, 2007.

ALVES, E. P. **Avaliação da produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por pleurotus sajor-caju a partir de óleo de soja**. 2015. Universidade da Região de Joinville, 2015.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V. P.; ASSIMOPOULOU, A. N.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19–25, 2006.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23–29, 2012.

BAGHERI LOTFABAD, T.; EBADIPOUR, N.; ROOSTAAZAD, R.; PARTOVI, M.; BAHMAEI, M. Two schemes for production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Applying residues from soybean oil industry and silica sol–gel immobilized cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 159–168, 2017.

BALAN, S. S.; KUMAR, C. G.; JAYALAKSHMI, S. Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter koralensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2198–2207, 2016.

BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Fuel and Energy Abstracts**, v. 38, n. 4, p. 221, 1997.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.

BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H.; GOVIND RAO, I. by. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 5, p. 841–853, 2009.

BEN AYED, H.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUDH, A.; HMIDET, N.; NASRI, M. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 8–14, 2015.

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Pyrene biodegradation enhancement potential of lipopeptide biosurfactant produced by *Paenibacillus dendritiformis* CN5 strain. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 218–227, 2017.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.

BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 26, n. 1, p. 181–188, 2016.

CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v. 106, n. 2, p. 73–79, 1989.

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.

CASTRO, C.; VALLE, P.; RÚA, J.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M.; BUSTO, F.; DE ARRIAGA, D. Antioxidant defence system during exponential and stationary growth phases of *Phycomyces blakesleeanus*: Response to oxidative stress by hydrogen peroxide. **Fungal Biology**, v. 117, n. 4, p. 275–287, 2013.

CHAKRABORTY, S.; GHOSH, M.; CHAKRABORTI, S.; JANA, S.; SEN, K. K.; KOKARE, C.; ZHANG, L. Biosurfactant produced from *Actinomyces nocardiformis* A17: Characterization and its biological evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 405–412, 2015.

CHEN, Y.; YU, B.; LIN, J.; NAIDU, R.; CHEN, Z. Simultaneous adsorption and biodegradation (SAB) of diesel oil using immobilized *Acinetobacter venetianus* on porous material. **Chemical Engineering Journal**, v. 289, p. 463–470, 2016.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement**. 184 p. 2012.

COCA-PRADOS, J.; GUTIÉRREZ-CERVELLÓ, G. **Water purification and management**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2009.

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.

CORTES-SANCHEZ, A.; JARAMILLO-FLORES, M.; HERNANDEZ-SANCHEZ, H. Study of growth and production of glycolipids by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture using various hydrophobic carbon sources. **Journal of Biotechnology**, v. 150, 2010.

COSTA, J. A.; FARIAS, N. C.; QUEIRÓS, Y. G. C.; MANSUR, C. R. E. Determination of oil-in-water using nanoemulsions as solvents and UV visible and total organic carbon detection methods. **Talanta**, v. 107, p. 304–311, 2013.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1191–1199, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 25, p. 165–185, 2008.

DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947–954, 2013.

DÍAZ DE RIENZO, M. A.; KAMALANATHAN, I. D.; MARTIN, P. J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by *B. thailandensis* E264 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 using foam fractionation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 820–827, 2016.

DUARTE, S. M. **Caracterização de bactérias produtoras de rhamnolípídios isoladas de poços de petróleo** title. 2003. Universidade Federal do Pernambuco, 2003.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 3, p. 293–298, 2016.

ERGÜL, F. E.; SARGIN, S.; ÖNGEN, G.; SUKAN, F. V. Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 1, p. 1–6, jan. 2009.

FADHILE ALMANSOORY, A.; ABU HASAN, H.; IDRIS, M.; SHEIKH ABDULLAH, S. R.; ANUAR, N.; MUSA TIBIN, E. M. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (*HDB*) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 272–280, 2017.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; VAUCHEL, P.; GANCEL, F.; DELAPLACE, G.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three

phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 70–76, 2013.

FARN, R. J. **Chemistry and technology of surfactants**. 1. ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006.

FERRADJI, F. Z.; MNIF, S.; BADIS, A.; REBBANI, S.; FODIL, D.; EDDOUAOUA, K.; SAYADI, S. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 300–308, 2014.

FERREIRA, L. C.; FERNANDES, G. Etanólise Do Oleo Residual De Fritura Para Producao De Biodiesel Utilizando Diferentes Catalisadores. **FAZU em Revista**, n. 8, p. 95–99, 2011.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 208–217, 1992.

FONSECA, R. R.; SILVA, A. J. R.; DE FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L.; SÉRVULO, E. F. C. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 471–486, abr. 2007.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091–2099, 2008.

FOOLADI, T.; MOAZAMI, N.; ABDESHAHIAN, P.; KADIER, A.; GHOJAVAND, H.; WAN YUSOFF, W. M.; HAMID, A. A. Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 145, p. 510–519, 2016.

GEBIEN, G. **Produção de enzimas hidrolíticas em biomassas florestais visando fins energéticos**. 2013. Universidade Regional de Blumenau, 2013.

GELAIN, L.; DA CRUZ PRADELLA, J. G.; DA COSTA, A. C. Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma*

harzianum P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 101–107, 2015.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 66–72, 2014.

GIL, L. M.; PIÑEROS CASTRO, Y.; MANJARRES PINZON, K.; RODRIGUEZ SANDOVAL, E. Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno en la producción de ligninasas. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 10, n. 1, p. 173–181, 2012.

GURJAR, J.; SENGUPTA, B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus Subtilis* MTCC 2423. **Bioresource Technology**, abr. 2015.

HASSAN, R.; LOUBIERE, K.; LEGRAND, J.; DELAPLACE, G. A consistent dimensional analysis of gas–liquid mass transfer in an aerated stirred tank containing purely viscous fluids with shear-thinning properties. **Chemical Engineering Journal**, v. 184, p. 42–56, 2012.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207–1219, ago. 2012.

INÈS, M.; DHOuha, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 59–69, 2015a.

INÈS, M.; DHOuha, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 2015b.

JAMALY, S.; GIWA, A.; HASAN, S. W. Recent improvements in oily wastewater treatment: Progress, challenges, and future opportunities. **Journal of Environmental Sciences**, v. 37, p. 15–30, 2015.

JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIK, A.; STASZCZAK, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 1, p. 1–12, 10 jan. 2013.

JIRKU, V.; CEJKOVA, A.; SCHREIBEROVA, O.; JEZDIK, R.; MASAK, J. Multicomponent biosurfactants — A “Green Toolbox” extension. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1272–1276, 2015.

KACZOREK, E.; URBANOWICZ, M.; OLSZANOWSKI, A. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 363–368, 2010.

KATIKA, K.; AHKAMI, M.; FOSBØL, P. L.; HALIM, A. Y.; SHAPIRO, A.; THOMSEN, K.; XIARCHOS, I.; FABRICIUS, I. L. Comparative analysis of experimental methods for quantification of small amounts of oil in water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 147, p. 459–467, 2016.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, n. 1, p. 8–16, 2010.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, 1 jan. 1992.

KOSARIK, N.; VARDAR-SUKAN, F. **Biosurfactantes: production and utiization**. Flórida: Taylor & Francis Group, 2015.

KULKARNI, V. S.; SHAW, C.; KULKARNI, V. S.; SHAW, C. Chapter 2 – Surfactants, Lipids, and Surface Chemistry. In: **Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages**. p. 5–19, 2016.

KUMARI, B.; SINGH, S. N.; SINGH, D. P. Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2463–2471, 2012.

LAFKA, T. I.; LAZOU, A. E.; SINANOGLU, V. J.; LAZOS, E. S. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 92–98, 2011.

LEITE, G. G. F.; FIGUEIRÔA, J. V.; ALMEIDA, T. C. M.; VALÔES, J. L.; MARQUES, W. F.; DUARTE, M. D. D. C.; GORLACH-LIRA, K. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 2, p. 262–270, mar. 2016.

LI, J.; DENG, M.; WANG, Y.; CHEN, W. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoloides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 112, p. 72–79, 2016.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558–566, 2016.

MAASS, D.; MOYA RAMÍREZ, I.; GARCÍA ROMÁN, M.; JURADO ALAMEDA, E.; ULSON DE SOUZA, A. A.; BORGES VALLE, J. A.; ALTMAJER VAZ, D. Two-phase olive mill waste (alpeorujo) as carbon source for biosurfactant production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 7, p. 1990–1997, 2015.

MACHADO, K. E.; CECHINEL FILHO, V.; TESSAROLO, M. L.; MALLMANN, R.; MEYRE-SILVA, C.; BELLA CRUZ, A. Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 7, p. 636–639, 2005.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 27, n. 3, p. 675–683, 2005.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558–565, 2012.

MARCHUT-MIKOLAJCZYK, O.; KWAPISZ, E.; WIECZOREK, D.; ANTCZAK, T. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with *Mucor circinelloides* enzyme preparation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 142–148, 2015.

MARTÍNEZ, Á. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195–204, 2005.

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.

MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 549–58, jan. 2009.

MNIF, I.; ELLEUCH, M.; CHAABOUNI, S. E.; GHRIBI, D. *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant: Production optimization and insecticidal activity against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae*. **Crop Protection**, v. 50, p. 66–72, 2013.

MOUAFI, F. E.; ABO ELSOUD, M. M.; MOHARAM, M. E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 31–37, 2016.

MOUBARIK, A.; GRIMI, N. Valorization of olive stone and sugar cane bagasse by-products as biosorbents for the removal of cadmium from aqueous solution. **Food Research International**, v. 73, p. 169–175, jul. 2015.

MOUGIN, C.; KOLLMANN, A.; JOLIVALT, C. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 2, p. 139–142, 2002.

MOYA-RAMÍREZ, I.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; GARCÍA-ROMÁN, M.; BANAT, I. M. Rhamnolipid and Surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 231–236, set. 2015.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Biosurfactantes: research trends and applications**. Flórida: Taylor & Francis Group, 2014.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Bioresource Technology Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 231–238, 2014.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial

wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1–2, p. 81–85, 2004.

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

NKEM, B. M.; HALIMOON, N.; YUSOFF, F. M.; JOHARI, W. L. W.; ZAKARIA, M. P.; MEDIPALLY, S. R.; KANNAN, N. Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 1, p. 261–268, 2016.

NTOUGIAS, S.; BALDRIAN, P.; EHALIOTIS, C.; NERUD, F.; MERHAUTOVÁ, V.; ZERVAKIS, G. I. Olive mill wastewater biodegradation potential of white-rot fungi--Mode of action of fungal culture extracts and effects of ligninolytic enzymes. **Bioresource technology**, v. 189, p. 121–30, jan. 2015.

OKOLIEGBE, I. N.; AGARRY, O. O. Application of microbial surfactant (a review). **Scholarly Journals of Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 15–23, 2012.

OLIVEIRA, J. G. **Produção de biossurfactante por bacillus pumilus e avaliação da biorremediação de solo e água contaminados com óleo**. 2010. Universidade Estadual Paulista, 2010.

OLIVEIRA, J. P.; ANTUNES, P. W. P.; PINOTTI, L. M.; CASSINI, S. T. A. Physico-chemical characterization of oily sanitary waste and of oils and greases extracted for conversion into biofuels. **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 597–602, 2014.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁOCINICZAK, T.; IWAN, J.; ZARSKA, M.; CHORAZEWSKI, M.; DZIDA, M.; PIOTROWSKA-SEGĘT, Z. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. **Journal of Environmental Management**, v. 168, p. 175–184, 2016.

PINTOR, A. M. A.; VILAR, V. J. P.; BOTELHO, C. M. S.; BOAVENTURA, R. A. R. Oil and grease removal from wastewaters: Sorption treatment as an alternative to state-of-the-art technologies. A critical review. **Chemical Engineering Journal**, v. 297, p. 229–255, 2016.

PIROG, T.; SHULYAKOVA, M.; SOFILKANYCH, A.; SHEVCHUK, T.; MASHCHENKO, O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel production. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 11–18, 2015.

RADZUAN, M. N.; BANAT, I. M.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99–105, 2017.

RAGHAVARAO, K. S. M. .; RANGANATHAN, T. .; KARANTH, N. . Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 127–135, mar. 2003.

RAHMAN, P. K. S. M.; GAKPE, E. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review. **Biotechnology(Faisalabad)**, v. 7, n. 2, p. 360–370, 2008.

REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: Production and Applications. In: **Biodegradation - Life of Science**. InTech, 2013.

ROELANTS, S. L. K. W.; DE MAESENEIRE, S. L.; CIESIELSKA, K.; VAN BOGAERT, I. N. A.; SOETAERT, W. Biosurfactant gene clusters in eukaryotes: regulation and biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 8, p. 3449–3461, 15 abr. 2014.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154–162, 23 ago. 1999.

ROUCHES, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; STEYER, J. P.; CARRERE, H. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179–198, jun. 2016.

RUFINO, R. D.; DE LUNA, J. M.; DE CAMPOS TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34–38, jan. 2014.

SAJNA, K. V.; SUKUMARAN, R. K.; GOTTUMUKKALA, L. D.; PANDEY, A. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 133–139, 2015.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source – Their production, modeling and properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 100–111, 2015.

SANTOS, D. K. F.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, 2016a.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 18 mar. 2016b.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001.

SEN, R. **Biosurfactants**. Nova York: Springer Science+Business Media, 2010.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 207–217, 1995.

SIÑERIZ, F.; HOMMEL, R. K.; KLEBER, H. P. Production of biosurfactants. In: **Encyclopedia of Life Support Systems**. Paris: Eolss, 2001.

SLIVINSKI, C. T.; MALLMANN, E.; DE ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1848–1855, dez. 2012.

SOTO, M. L.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 1, p. 1–27, jul. 2011.

SOUZA, E. C.; VESSONI-PENNA, T. C.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 88–94, 2014.

SPANEMBERG, F. E. M. **Planejamento de experimentos com mistura no estudo da vida útil de balas duras**. 2010. Universidade Metodista de Piracicaba, 2010.

SPERB, J. G. C.; COSTA, T. M.; VAZ, D. A.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. C. S. C.; TAVARES, L. B. B. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385–397, 2015.

SRINIVASAN, A.; VIRARAGHAVAN, T. Oil removal from water by fungal biomass: A factorial design analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1, p. 695–702, 2010.

STAJIĆ, M.; PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; VUKOJEVIĆ, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 65–73, 2006.

STANBURY, P.; WHITAKER, A.; HALL, S. Copyright. In: **Principles of Fermentation Technology**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2017.

TADROS, T. F. **An introduction to surfactants**. 1. ed. Berlin: Walter de Gruyter GmbH, 2014.

TAO, K.; LIU, X.; CHEN, X.; HU, X.; CAO, L.; YUAN, X. Biodegradation of crude oil by a defined co-culture of indigenous bacterial consortium and exogenous *Bacillus subtilis*. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 327–332, 2017.

TEIXEIRA NETO, É.; MALTA, M. M.; SANTOS, R. G. Medidas de tensão superficial pelo método de contagem de gotas: Descrição do método e experimentos com tensoativos não-iônicos etoxilados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 223–227, 2009.

TIAN, W.; YAO, J.; LIU, R.; ZHU, M.; WANG, F.; WU, X.; LIU, H. Effect of natural and synthetic surfactants on crude oil biodegradation by indigenous strains. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 129, p. 171–179, 2016.

TSIOULPAS, a.; DIMOU, D.; ICONOMOU, D.; AGGELIS, G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. **Bioresource Technology**, v. 84, n. 3, p. 251–257, 2002.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, 2017.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 510–516, 2016.

VELİOĞLU, ZULFIYE ; ÖZTÜRK ÜREK, R. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. p. 160–166, 2015.

VELIOGLU, Z.; OZTURK UREK, R. Concurrent Biosurfactant and Ligninolytic Enzyme Production by *Pleurotus* spp. in Solid-State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1354–1364, 2014.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804–810, 2008.

WANG, X.; WANG, X.; LIU, M.; BU, Y.; ZHANG, J.; CHEN, J.; ZHAO, J. Adsorption–synergic biodegradation of diesel oil in synthetic seawater by acclimated strains immobilized on multifunctional materials. **Marine Pollution Bulletin**, v. 92, n. 1, p. 195–200, 2015.

WHANG, L.-M.; LIU, P.-W. G.; MA, C.-C.; CHENG, S.-S. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation—Effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. 2, p. 1045–1050, 2009.

WILDNER, L. B. A.; HILLIG, C. Reciclagem de Óleo Comestível e Fabricação de Sabão como Instrumentos de Educação Ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 5, n. 5, p. 813–824, 2012.

YANG, X.; GUO, M.; WU, Y.; WU, Q.; ZHANG, R. Removal of Emulsified Oil from Water by Fruiting Bodies of Macro-Fungus (*Auricularia polytricha*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

ZHANG, N.; LIU, F.-F.; DONG, X.-Y.; SUN, Y. Synergistic inhibition of acid-induced protein denaturation by trehalose and NaCl: Thermodynamic and kinetic studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 231–239, 2014.

ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 96–102, 2013.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN 'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875–81, jun. 1990.