

Produção de Compostos com Propriedades Emulsificantes por *Aspergillus flavus* Utilizando Resíduos Agroindustriais

Production of Compounds with Emulsifying Properties by *Aspergillus flavus* Using Agroindustrial Residues

Ellen Francine Rodrigues

Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS

ellen_fr@hotmail.com

Christian Oliveira Reinehr

Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS

reinehr@upf.br

Telma Elita Bertolin

Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS

telma@upf.br

Luciane Maria Colla

Universidade de Passo Fundo - UPF, Passo Fundo, RS

lmcolla@upf.br

Resumo: Os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos aplicáveis em diversos setores industriais devido suas características químicas que possibilitam vantagens em relação aos surfactantes químicos. Porém, a utilização de biossurfactantes microbianos, em larga escala, ainda encontra desafios em virtude dos altos custos de produção associados aos meios de produção e etapas de purificação. Objetivou-se, com a pesquisa, a produção de biossurfactantes via fermentação em estado sólido através da utilização de resíduos agroindustriais e fontes de nutrientes de baixo custo utilizando *Aspergillus flavus*. Utilizaram-se delineamentos experimentais para o estudo das fontes de nitrogênio, indutores e suas concentrações nos meios de cultivo. As maiores atividades emulsificantes foram obtidas utilizando farelo de trigo

Recebido em 13/03/2014 - Aceito em 03/08/2014.

RECEN 16(1) p. 75-93 jan/jun 2014 DOI: 10.5935/RECEN.2014.01.05

ao invés de soja como componente basal do meio de cultivo utilizando 4% de óleo de soja sem a adição de fonte de nitrogênio.

Palavras-chave: *Aspergillus flavus*; biossurfactantes; fermentação em estado sólido; óleo de soja; ureia.

Abstract: Biosurfactants are compounds produced by microorganisms applicable in several industrial sectors due to their chemical characteristics that provide advantages over chemical surfactants. However, the use of microbial biosurfactants in large scale still finds challenges due to the high production costs associated with the means of production and purification steps. We aimed to produce biosurfactants via solid state fermentation using agroindustrial residues and nutrient sources of low cost using *Aspergillus flavus*. Experimental designs were used to study the nitrogen sources, inducers and their concentrations in culture media. Higher emulsification activities were obtained with wheat bran instead of soybean component as basal culture medium using 4% soybean oil without the addition of nitrogen source.

Key words: *Aspergillus flavus*; biosurfactants; solid state fermentation; soya oil; urea.

1 Introdução

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, que reduzem as tensões superficial e interfacial de um líquido [1], com aplicações em diversas áreas como a ambiental, na indústria de alimentos, medicina e indústria farmacêutica. São aplicáveis, por exemplo, como emulsificantes e estabilizantes em produtos alimentícios e farmacêuticos, tais como sorvetes, na panificação; como agentes estabilizantes de molhos e em cremes cosméticos e outras formulações farmacêuticas. A atividade superficial dessas moléculas pode resultar em ação antimicrobiana e antibiótica, propriedade esta também aplicável nos setores alimentício e farmacêutico. Além disso, na área ambiental são utilizados como auxiliares em processos de biorremediação de resíduos oleosos e metais tóxicos em solos e efluentes [2-5]. O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado nas propriedades de emulsificação, umedecimento, solubilização,

separação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos, entre outros [6, 7].

Os biossurfactantes, produzidos a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, podem apresentar características estruturais e propriedades físicas distintas, tornando-os comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência [8, 2, 9]. Os biossurfactantes são compostos biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e apresentam estabilidade em valores extremos de pH [10], temperatura [11] e salinidade [12]. No entanto, a produção de biossurfactantes pode apresentar problemas como o alto custo dos substratos associado com métodos ineficientes de recuperação do produto [13]. Logo, a fim de se aumentar o uso industrial de biossurfactantes, o custo de produção deve tornar-se competitivo comparado aos agentes tensoativos sintéticos. Uma possível estratégia para alcançar este objetivo é o uso de matérias primas alternativas, tais como resíduos agroindustriais [14] resíduos de destilaria [15], derivados de petróleo [16], melação [17, 5], entre outros, que têm sido descritos como substratos importantes para a produção de biossurfactantes [18, 19].

Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos principalmente em meio aquoso [18]. Uma alternativa para produção destes biocompostos é a utilização de fungos filamentosos e fermentação em estado sólido, processos estes ainda sem muitos relatos em literatura especializada [19, 20].

Esses compostos produzidos por fungos, bactérias e leveduras podem ser classificados em glicolípidios, lipoaminoácidos, lipopeptídios, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, fosfolipídeos, monoglicerídeos e diglicerídeos, compostos poliméricos e particulados [21,22]. Os microrganismos sintetizam biossurfactantes de massas moleculares altas e baixas. Os biossurfactantes de baixo peso molecular são os ácidos graxos, glicolipídios, lipopeptídios cíclicos e lipopeptídios, já os de alto peso molecular são os polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses polímeros [23]. Os biossurfactantes mais estudados, representantes dessa classe de alto peso molecular, são Biodispersan, Emulsan e Liposan, sendo todos complexos de polissacarídeos com proteínas podendo ser obtidos utilizando culturas de *Aspergillus* spp [24,25].

Os fungos filamentosos e a fermentação em estado sólido constituem alternativas para a produção de biossurfactantes, além do que não se encontram muitos relatos da obtenção destes compostos através deste método [26, 27]. A fermentação em estado sólido (FES) permite a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes e/ou de indução, bem como suporte para o desenvolvimento de microrganismos. Na FES, os fungos são os microrganismos mais promissores, pela variedade de produtos de seu metabolismo e devido ao desenvolvimento das hifas que permite aos mesmos, maior penetração no substrato e nas regiões porosas entre partículas da matéria-prima [28]. Dessa forma, este método de produção, associado do uso de fungos filamentosos, consiste em uma alternativa para a diminuição dos custos de produção.

Objetivou-se, com a pesquisa, a proposição de meios de cultivo para a produção de compostos com atividade emulsificante por *Aspergillus flavus* via fermentação em estado sólido, com a utilização de resíduos agroindustriais e fontes de nutrientes de baixo custo.

2 Material e métodos

2.1 Microrganismo, manutenção e preparo do inóculo

O fungo utilizado para a produção de biossurfactantes foi o *Aspergillus flavus*, isolado por Colla et al. [28] de solo contaminado com óleo diesel (*Aspergillus* sp. cepa O-8) e identificado posteriormente através de Phred/Phrap e Consed, utilizando a metodologia citada por Smanioto et al. [29], no centro de energia Nuclear na Agricultura (Cena), da Universidade de São Paulo, Brasil.

O *Aspergillus flavus* O-8 apresentou a seguinte sequência de bases nitrogenadas: TTTATACTTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAATCAGTTATCGTTTAT TTGATAGTACCTTACTACATGGATACCTGTGTGTAATTCTAGAGCTAAT ACATGCTAAAAACCTCGACTTCGGAAGGGGTGTATTTATTATGATAAAA AAACCAATGCCCTTCGGGGCTCCTTGGTGATTCATAATAACTTAACGA ATCGCATGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTAT CAACTTTCGATGGTAGGATAGTGGCCTACCATGTGTAGGCAACGGGTA ACGGGGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCT

ACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA
CACGGGGAGGTAGTGACAATAAATACTGATACGGGGCTCTTTTGGGT
CTCGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCC.

O microrganismo foi mantido em tubos inclinados com Ágar-batata-dextrose (AB D) sob refrigeração a 4 °C, sendo realizadas repicagens periódicas a cada 3 meses. O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado através da inoculação dos fungos em erlenmeyers de 1 L contendo 100 mL de meio ABD, com posterior incubação a 30 °C por 5 dias a 7 dias. Após a esporulação fúngica, uma suspensão de esporos foi preparada pela adição de solução de Tween 80 a 0,1% sobre os esporos em Agar, seguido da raspagem dos mesmos, filtração em algodão estéril e contagem do número de esporos em câmara de Neubauer.

2.2 Delineamento experimental

As fermentações foram realizadas utilizando meio composto por farelos de soja ou trigo, casca de arroz e solução salina de micronutrientes contendo: (2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄ e 10 mL. L⁻¹ de solução traço, a qual era composta por 0,63 mg. L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg. L⁻¹ de MnSO₄ e 0,62 mg. L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até o volume de 1 L) [23]. O meio de cultivo foi esterilizado por 20 min a 121 °C em autoclave. A umidade ajustada em 60% com água destilada estéril e o pH em 4,5 com uma solução de H₂SO₄ 1,5 mol/L. Os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 300 mL contendo 25 g de meio e uma concentração inicial de inóculo de 10⁶ esporos/g_{meio}. Os experimentos foram incubados a 30 °C durante até 8 dias, sendo coletadas amostras a cada 2 dias para a determinação das atividades emulsificantes.

Foram realizados três Delineamentos Fatoriais Completos (DFC) sequenciais. Primeiramente, um Delineamento Fatorial Completo 2² (Tabela 1) foi utilizado para o estudo da influência da fonte de nitrogênio e do indutor sobre a produção de biossurfactantes. O meio de cultivo foi composto por 85% de farelo de soja, 15% de casca de arroz e 70% de solução salina. As fontes de nitrogênio (ureia e nitrato de sódio) e indutores (óleo de soja e azeite de oliva) foram adicionadas na concentração de 3%, sendo adicionadas com base na quantidade de meio úmido (%p/p). A seguir,

foram realizados mais dois Delineamentos Fatoriais Completos 2^2 , objetivando estudar: a) influência da concentração de ureia (%p/p) e do tipo de farelo (trigo ou soja) utilizado como base no preparo do meio da fermentação em estado sólido (Tabela 3), b) influência da proporção farelo de trigo e casca de arroz na composição do meio de cultivo e da concentração de óleo de soja (%p/p) sobre a produção de biossurfactantes (Tabela 5). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e as condições de umidade (60%) e pH (4,5) foram mantidas constantes.

Os limites das variáveis foram determinados conforme estudos já realizados descritos na literatura por Colla et al. [30,31]. Nos trabalhos citados, utilizaram-se fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas em concentrações variando de 1 a 3%, por esse motivo a estratégia de adição das fontes de nitrogênio no atual estudo iniciou com concentrações mais altas, buscando-se a redução a fim de atingirem-se as concentrações para o detrimento da fonte de nitrogênio, necessárias para a produção de biossurfactantes, sem afetar, no entanto, o crescimento microbiano.

2.3 Determinações analíticas

2.3.1 Extração do biossurfactante

Os farelos fermentados foram submetidos à extração segundo metodologia proposta por Colla et al. [31], utilizando 5 g de farelo fermentado extraídos com 30 mL de água destilada a 90 °C seguido para o banho-maria a 50 °C durante 30 min, com posterior filtração em algodão, centrifugação por 15 min com 6000 rpm para separação das células fúngicas e esporos, filtração em papel filtro. Os extratos obtidos foram utilizados para a determinação das atividades emulsificantes O/A (óleo em água) e A/O (água em óleo).

2.3.2 Determinação das atividades emulsificantes

As atividades emulsificantes óleo em água e água em óleo foram determinadas segundo metodologia proposta por Pinto et al. [32], utilizando 3,5 mL de extrato e 2 mL de óleo de milho. A mistura foi agitada em agitador Vórtex a 700 rpm por 1 min. Após 60 min de repouso foi lida a absorbância do meio emulsificado óleo/água em

espectrofotômetro a 610 nm. Após 24 h de repouso realizou-se a leitura em paquímetro, da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo). Três brancos foram realizados como controles da determinação analítica. As atividades emulsificantes foram calculadas através das Equações (1) e (2), sendo: AE = atividade emulsificante (obtida em unidade de emulsificação UE); O/A = óleo em água; A/O = água em óleo; ABS = absorvância; E = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total; D = diluição da amostra em água.

$$AE_{O/A} = (ABS_{amostra} \cdot D) - ABS_{branco} \quad (1)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} \cdot D) - E_{branco} \quad (2)$$

A atividade emulsificante óleo em água foi definida como a quantidade de biossurfactante necessária para aumentar a absorvância em 1,0 a 610 nm, e a atividade emulsificante água em óleo como a quantidade de biossurfactante necessária para manter a emulsão estável por 24 h [32].

Os resultados de atividades emulsificantes obtidos foram utilizados como variável de resposta e avaliados através de análise de variância, sendo calculados os efeitos estimados e os coeficientes de regressão dos modelos gerados utilizando-se o *software Statistica 6.0*.

3 Resultados e discussão

3.1 Estudo da fonte de nitrogênio e indutor para a produção de biossurfactantes

Os resultados das atividades emulsificantes (AE), obtidos no primeiro delineamento fatorial completo, estão apresentados na Tabela 1. Foram apresentados os resultados do tempo de 8 dias de fermentação (T8), visto neste tempo terem sido observados as maiores atividades emulsificantes.

As maiores atividades emulsificantes O/A foram obtidas com ureia como fonte de nitrogênio, como observado nos experimentos 1 e 3. Com relação aos induto-

res oleosos, a maior atividade emulsificante O/A foi obtida com óleo de soja. Já as maiores AE A/O, foram obtidas no experimento 3 (ureia e óleo de soja).

Tabela 1. Atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) obtidas em 8 dias de fermentação para os experimentos do primeiro delineamento fatorial completo

Exp.	Fonte de Nitrogênio (X ₁)	Indutor (X ₂)	AE _{O/A} (UE)*	AE _{O/A} (UE)*
1	Ureia (-1)	Azeite de Oliva (-1)	4,39±0,93	46,20±24,47
2	Nitrato de Sódio (+1)	Azeite de Oliva (-1)	3,22±0,13	11,27±2,16
3	Ureia (-1)	Óleo de Soja (+1)	5,93±0,23	79,75±3,22
4	Nitrato de Sódio (+1)	Óleo de Soja (+1)	0,00±0,00	25,39±25,58

*média±desvio padrão dos resultados obtidos a partir da réplica dos experimentos

A análise dos efeitos estimados das variáveis sobre as atividades emulsificantes (Tabela 2) demonstrou que a fonte de nitrogênio apresentou efeitos negativos e significativos ($p < 0,05$) sobre a AE_{O/A}.

Tabela 2. Efeitos estimados das variáveis do primeiro delineamento fatorial completo sobre as atividades emulsificantes óleo em água (AE_{O/A}) e água em óleo (AE_{A/O})

Fonte de Variação	AE _{O/A}		AE _{A/O}	
	Efeitos Estimados	P	Efeitos Estimados	P
Média	3,38750	0,000040	40,6575	0,002961
FN (X ₁)	-3,55250	0,000501	-44,6428	0,023901
I (X ₂)	-0,84000	0,071519	23,8417	0,131242
X ₁ .X ₂	-2,38250	0,002302	-9,7161	0,483413

FN: Fonte de nitrogênio; I: Indutor; p: nível de significância.

A partir dos resultados de atividades emulsificantes O/A e A/O, obtidos no primeiro delineamento, observou-se que a ureia pode ser utilizada como fonte de nitrogênio. Além da ureia possibilitar a obtenção de maiores atividades emulsificantes, é considerada um insumo de baixo custo [33].

Como o indutor não apresentou efeito significativo optou-se por utilizar o óleo

de soja para a produção de bioemulsificantes. O óleo de soja, além de ter menor custo e ser mais disponível no Brasil do que o azeite de oliva, tem apresentado resultados promissores para a produção de biossurfactantes isoladamente ou combinados com substratos como açúcares [17, 19]. A produção de raminolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UW-1 utilizando 6% (v/v) de diferentes óleos vegetais demonstraram que o óleo de soja foi uma das melhores fontes de carbono. Os óleos de oliva e milho também favoreceram a produção de biossurfactantes, apesar dos rendimentos terem sido inferiores comparativamente ao óleo de soja [34]. Nitschke et al. [35], também, utilizaram resíduo de óleo de soja como fonte de carbono em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LB1, sendo que o biossurfactante sintetizado no estudo foi capaz de emulsificar 100% de óleo de soja, bem como gordura de frango, mostrando elevada potencialidade para ser utilizado na indústria de alimentos.

3.2 Estudo do meio base e da concentração da fonte de nitrogênio para produção de biossurfactantes

Para o estudo do meio base e da concentração da fonte de nitrogênio apropriada para a produção de biossurfactantes via FES, utilizou-se o delineamento fatorial completo 2^2 apresentado na tabela 3, com óleo de soja como indutor em uma concentração fixa (%p/p) de 3%. As variáveis estudadas foram a concentração de ureia adicionada (1% e 0%) e o tipo de farelo (trigo ou soja). Os farelos de trigo e soja foram utilizados em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa para a produção de lipases em fermentação em estado sólido pelo *Aspergillus flavus* cepa O-8, sendo que o melhor meio encontrado foi aquele utilizando o farelo de soja.

Por esse motivo, no primeiro delineamento experimental foi utilizado o farelo de soja. Entretanto, sabe-se que o farelo de soja possui maior conteúdo de proteínas que o farelo de trigo, e que a produção de biossurfactantes depende, muitas vezes, do detrimento da fonte de nitrogênio. Por esse motivo foi estudada a concentração da fonte de nitrogênio e o tipo de farelo utilizado como meio basal.

Os resultados de atividades emulsificantes O/A obtidos nos experimentos do segundo delineamento experimental (Tabela 3) demonstraram que as atividades foram semelhantes no tempo inicial e final de fermentação. Para a realização da análise de va-

riância foram calculados os adimensionais de AE, dividindo-se os resultados obtidos no tempo final pelos obtidos no tempo inicial. Os adimensionais T8/T0 da atividade emulsificante O/A foram inferiores ou iguais a 1, ou seja, não houve aumento nas atividades emulsificantes O/A como resultado do crescimento fúngico. Com relação às atividades emulsificantes A/O, adimensionais de 29,9 e 30,4 foram obtidos nos experimentos 1 (Farelo de trigo sem adição de ureia) e 2 (Farelo de soja sem adição de ureia), respectivamente.

Tabela 3. Atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) obtidas no estudo da influência da concentração de fonte de nitrogênio e do tipo de farelo, sobre a produção de biosurfactantes pelo Aspergillus flavus

Exp.	Tipo de farelo X ₁	[Ureia] X ₂	AE _{O/A} (UE)*		AE _{A/O} (UE)*	
			Início	8 dias	Início	8 dias
1	FT (-1)	0 % (-1)	5,51 ± 0,36	3,07 ± 0,8	5,41 ± 0,22	162,20 ± 4,38
2	FS (+1)	0 % (-1)	4,64 ± 0,26	4,86 ± 0,13	5,45 ± 0,11	165,86 ± 12,58
3	FT (-1)	1 % (+1)	3,27 ± 0,75	3,60 ± 0,17	110,51 ± 0,96	165,47 ± 0,87
4	FS (+1)	1 % (+1)	3,94 ± 0,39	3,88 ± 0,89	81,58 ± 16,68	167,18 ± 9,12

FT: farelo de trigo; FS: farelo de soja; AE: atividade emulsificante; O/A: óleo em água; A/O: água em óleo; [ureia]: concentração de ureia *Resultados média±desvio padrão

A tabela 4 apresenta os efeitos estimados das variáveis tipo de farelo e concentração de ureia sobre as atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O). Ambas variáveis apresentaram efeito negativo e significativo ($p < 0,05$) sobre a AE O/A, entretanto, para a AE A/O observou-se que somente o tipo de farelo apresentou efeito negativo significativo ($p < 0,05$), ou seja, o farelo de trigo apresentou melhores resultados comparados com o farelo de soja, sem a necessidade de adição de ureia como fonte de nitrogênio. Zinjarde e Pant [36] avaliaram a produção de biosurfactante por *Y. lipolytica* frente a diferentes fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, cloreto de amônio, ureia, e nitrato de sódio. Os resultados mostraram que o sulfato de amônio e cloreto de amônio foram as fontes que proporcionaram maior atividade emulsificante, enquanto que esta atividade foi reduzida em 50% quando se utilizou nitrato de amônio e ureia.

Segundo estudos relatados na literatura [21, 37, 38], a limitação de nutrientes ocasiona diminuição no crescimento microbiano, mas na presença da fonte de carbono,

este continua sendo transportado às células para a biossíntese de lipídios. Os produtos finais formados podem ser lipídios, polissacarídeos e polímeros de estocagem como o poli-hidroxibutirato. Os nutrientes limitantes podem ser o nitrogênio, ferro, magnésio e fósforo [37, 38]. Este comportamento, de maior produção de biossurfactantes na limitação de nitrogênio, foi observado no presente trabalho. O farelo de soja apresenta cerca de 44,86% de proteínas, respectivamente, em comparação com 18,85% de proteína no farelo de trigo. As maiores concentrações de proteína no farelo de soja representam maior disponibilidade de fontes de nitrogênio oriundas do substrato, o que pode limitar a produção dos biossurfactantes, como explicado anteriormente. O farelo de trigo é um subproduto do processo de produção de farinha branca, apresentando de proteínas e carboidratos, o que o torna um ótimo substrato para fungos na fermentação em estado sólido [39]. A utilização deste farelo como substrato para produção de biossurfactante é uma possibilidade atrativa, já que a matéria-prima é de fácil obtenção e baixo custo, possibilitando a obtenção de um produto de alto valor agregado.

Tabela 4. Efeitos estimados das variáveis do segundo delineamento fatorial completo 2² sobre os adimensionais das atividades emulsificantes O/A e A/O

Fonte de Variação	AE _{O/A}		AE _{A/O}	
	Efeitos Estimados	P	Efeitos Estimados	P
Média	0,959815	0,000014	15,1336	0,000000
Tipo farelo (X ₁)	-0,300638	0,016069	-27,3180	0,000000
[ureia] (X ₂)	-0,411724	0,005384	0,1096	0,411300
X ₁ x X ₂	-0,026603	0,740963	0,0371	0,771814

AE: atividade emulsificante; O/A: óleo em água; A/O: água em óleo; p: nível de significância.

Na terceira etapa do trabalho, estudou-se a influência do percentual de casca de arroz adicionado no meio basal, a qual possui a função de aumentar a porosidade do meio, condição importante para possibilitar maior aeração do cultivo. Utilizou-se um DFC 2², com três pontos centrais, sendo o erro experimental calculado a partir dos pontos centrais e não das duplicatas dos experimentos. Como ambas variáveis utilizadas foram quantitativas, os pontos centrais possuem a função de avaliar a presença de curvatura no modelo, além de permitirem a estimativa do erro experimental

com um número menor de experimentos. Em função de no delineamento anterior terem sido obtidos bons resultados na ausência da fonte de nitrogênio, optou-se por estudar a influência da concentração de indutor (óleo de soja).

No terceiro DFC 2², as maiores atividades emulsificantes O/A foram obtidas nos experimentos 5 ($5,32 \pm 1,50$ UE) e 6 ($5,43 \pm 0,43$ UE), utilizando 20% de casca de arroz e 3% de óleo de soja (%p/p) (tabela 5). Com relação às atividades emulsificantes A/O as maiores atividades foram obtidas nos experimentos 3 ($193,34 \pm 14,51$ UE) utilizando 15% de casca de arroz e 2% de óleo de soja e 7 ($171,40 \pm 10,42$) com 20% de casca de arroz e 3% de óleo de soja.

A análise de variância do adimensional da atividade emulsificante O/A (tabela 6) considerando-se os tempos iniciais e final de fermentação demonstrou que as variáveis casca de arroz e concentração de óleo de soja não foram significativas ($p > 0,05$) sobre esta resposta.

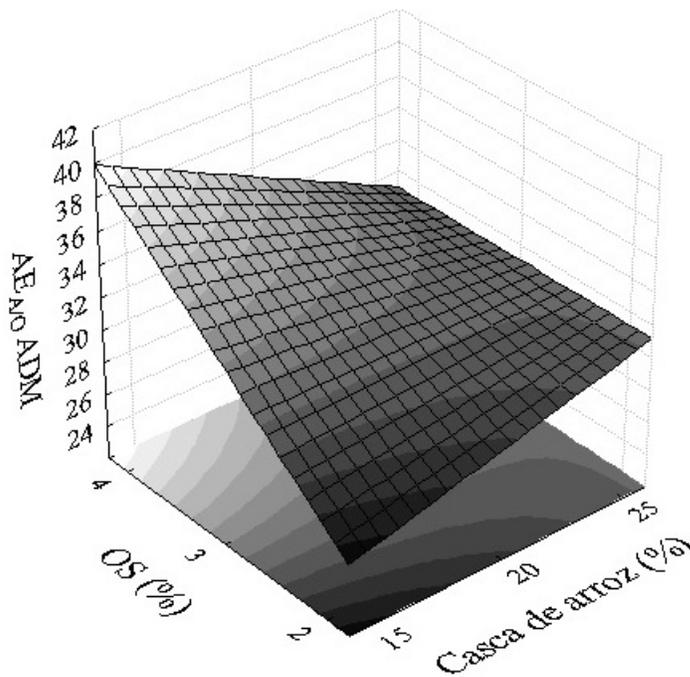


Figura 1. Superfície de resposta do adimensional (ADM) da atividade emulsificante água em óleo ($AE_{A/O}$) em função da concentração de óleo de soja e do percentual de casa de arroz

A análise dos efeitos estimados das variáveis sobre os resultados de atividade emulsificante A/O (Tabela 6) demonstrou que o efeito do óleo de soja foi positivo (5,5745) e significativo ($p < 0,05$), ou seja, a atividade emulsificante aumentou ao passar do nível inferior para o nível superior. A interação entre as variáveis casca de arroz e óleo de soja (-4,7422) apresentou efeito significativo e negativo, conforme tabela 6. Como a interação das variáveis apresentou efeito significativo ($p = 0,023$) esta deve ser avaliada em detrimento dos fatores individuais, como mostrado na figura 1, que apresenta a superfície de resposta do adimensional da atividade emulsificante água em óleo em função do percentual de casca de arroz e da concentração de óleo de soja no meio de cultivo. Pode-se inferir que as maiores AE A/O foram obtidas no nível superior da concentração de óleo de soja (4%) e utilizando-se 15% de casca de arroz como componente do meio.

Tabela 5. Atividades emulsificantes óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O) obtidas no estudo da influência da proporção de casca de arroz: farelo de trigo, e concentração de óleo de soja sobre a produção de biossurfactantes pelo *Aspergillus flavus*

Exp.	Proporção casca (X_1)	COS (X_2)	AE _{O/A} (UE)*		AE _{A/O} (UE)*	
			Início	6 dias	Início	6 dias
1	-1 (15%)	-1 (2%)	2,40 ± 0,54	3,96 ± 1,85	5,63 ± 0,31	153,42 ± 14,46
2	+1 (25%)	1 (4%)	2,74 ± 1,59	3,42 ± 2,62	5,59 ± 0,38	149,17 ± 9,09
3	-1 (15%)	-1 (2%)	2,16 ± 0,25	5,10 ± 0,66	5,16 ± 0,19	193,34 ± 14,51
4	+1 (25%)	1 (4%)	2,91 ± 0,52	4,20 ± 3,02	5,69 ± 0,83	158,32 ± 12,78
5	0 (20%)	0 (3%)	1,51 ± 1,11	5,32 ± 1,50	5,24 ± 0,90	155,18 ± 18,70
6	0 (20%)	0 (3%)	1,60 ± 0,79	5,43 ± 0,43	23 ± 0,87	152,66 ± 8,64
7	0 (20%)	0 (3%)	0,90 ± 0,42	2,87 ± 1,45	4,96 ± 0,17	171,40 ± 10,42

AE: atividade emulsificante; O/A: óleo em água; A/O: água em óleo; COS: concentração de óleo de soja; * Resultados de média ± desvio padrão.

A diminuição da fonte de nitrogênio, ocasionada pela substituição do farelo de soja pelo farelo de trigo, aliado ao aumento das concentrações de óleo de soja adicionado como indutor, ocasionou aumento nas atividades emulsificantes, e, portanto, da produção de biossurfactantes pelo *A. flavus*. Considerando-se os resultados de atividade emulsificante água em óleo, estas passaram de 79 UE para 193 UE, do primeiro ao terceiro delineamento experimental, com diminuição do tempo de fermentação de 8 dias para 6 dias.

Tabela 6. Efeitos estimados das variáveis do terceiro delineamento fatorial completo 2² sobre os adimensionais das atividades emulsificantes O/A e A/O

Fonte de Variação	AE _{O/A}		AE _{A/O}	
	Efeitos Estimados	P	Efeitos Estimados	P
Média	1,979	<0,001	32,120	0,000
Curvatura	2,845	0,022	1,004	0,714
[Casca] (X ₁)	0,508	0,471	-1,690	0,356
[OS] (X ₂)	0,214	0,758	5,574	0,011
X ₁ x X ₂	-1,093	0,140	-4,742	0,023

AE: atividade emulsificante; O/A: óleo em água; A/O: água em óleo; p: nível de significância.

4 Conclusão

Este estudo demonstrou a possibilidade de manutenção e aumento da atividade emulsificante de *Aspergillus flavus* utilizando-se farelo de trigo e casca de arroz como componentes do meio de cultivo. Demonstrou-se que é possível a produção de compostos emulsificantes sem a adição de fontes de nitrogênio e com a adição de até 4% de óleo de soja como indutor, sendo esta uma estratégia de fácil proposição que permite a redução dos custos de produção destes compostos. Além disso, a produção destes compostos por fungos filamentosos em fermentação em estado sólido, devido à possibilidade de uso de resíduos agroindustriais, é uma alternativa viável para a produção de biossurfactantes.

5 Agradecimentos

Agradecemos à Universidade de Passo Fundo e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências

- [1] BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para a aplicações em alimentos. *Quim Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, mar./abr. 2007.

- [2] APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloid Surface B*, v. 95, p. 23-29, 2012.
- [3] FRANZETTI A.; GANDOLFI I.; BESTETTI G.; SMYTH T. J. P.; BANAT I. M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur J Lipid Sci Tech*, n. 112, p. 617-627, 2010.
- [4] IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying Properties of a Marine Bacterial Exopolysacchride. *Enzyme Microb Tech*, v. 38, p. 220-222, 2006.
- [5] RODRIGUES, L.; BANAT, I.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. *J Antimicrob Chemoth*, v. 57, p. 609-618, 2006.
- [6] MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng Geol*, v. 60, n. 1-4, p. 193-207, 2001.
- [7] FIECHTER, A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. *Food Sci Technol*, v. 31, p. 283-293, 1992.
- [8] CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technol*, v. 76, p. 113-117, 2002.
- [9] MEDEIROS, S. I. G. Síntese enzimática de biosurfactante e sua aplicabilidade na indústria do petróleo. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Exatas da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN, 2007.
- [10] FRANÇA, I. W. L. Influência da concentração de substrato na produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* LAMI005. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010.

- [11] BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MAROSTICA JR., M. R. e PASTURE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quim Nova*, v.30, n.2, p. 409-414, 2007.
- [12] GIRO, M. E. A.; MARTINS, J. J. L.; ROCHA, M. V. P.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Seleção de cepas de *Bacillus* produtoras de biosurfactantes utilizando suco de caju como meio de cultura. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 17, 2008, Recife. Anais... Recife: UFPE, 2008.
- [13] OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloid Surface B*, v.101, p.34-43, 2013.
- [14] DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J Micro Biot*, v. 17, p. 61-69, 2001.
- [15] ALBUQUERQUE, C.D.C.; FILETTI, A.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Can J Microbiol*, v.52, n.6, p. 575-583, 2006.
- [16] NITSCHKE, M.; FERRA, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Braz J Microbiol*, v.35, p.81-85, 2004.
- [17] RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M., Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J Micro Biot*, v. 23, p.734-741, 2007.
- [18] SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M., Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr Microbiol*, v. 54, p.68-73, 2007.

- [19] COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. *Cienc Tecnol Aliment*, v.28, p.34-38, 2008.
- [20] AMEZCUA-VEGA, C.; POGGI-VARALDO, F.; ESPARZA-GARCIA, F.; RIOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VAZQUES, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresource Technol*, v.98, p.237-240, 2007.
- [21] MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Poll.* v.133, p.183-198, 2005.
- [22] MAIER, R.M. SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.54, p.625-633, 2000.
- [23] CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol.* v.7, p.262-266, 2008.
- [24] RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol*, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.
- [25] LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin Colloid In*, v. 7, p. 12-20, 2002.
- [26] VEENANADIG, N.K.; GOLTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G.K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. *Bioprocess Eng.* v. 22, p. 95-99, 2000.
- [27] RODRIGUES, A. B. C.; ALMEIDA, C. A. V.; ROCHA, C. P.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*, 2009. Disponível em: <http://www.ic-ufu.org/cd2009/pdf/ic2009-0337.pdf>

- [28] COLLA, L. M. A Solid-State Bioprocess for Selecting Lipase-Producing Filamentous Fungi. *Z.Naturforsch*, v. 64c, p. 131-137, 2009.
- [29] SMANIOTTO, A.; SKOVRONSKI, A.; RIGO, E.; TSAI, S.M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Synthetic lipase production from a newly isolated *Sporidobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. *Braz J Microbiol*. v. 43, n.4, p. 1490-1498, 2013.
- [30] COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. L. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Revista CIATEC – UPF*. v. 4, n. 1, p. 1-10, 2012.
- [31] 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 bioprocess. *Bioresource Technology*, n. 101, p. 8308-8314, 2010.
- [32] PINTO, M.H.; MARTINS, R.G.; COSTA, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. *Quim Nova*, v.32, n.8, 2009.
- [33] MFRURAL. Disponível em: <http://www.mfrural.com.br>. Acesso em: jul/2013.
- [34] SIM, L., WARD, O.P., LI, Z.Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biot*, v. 19, p.232-238, 1997.
- [35] NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIEIRO, J. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 160, p. 2066-2074, 2010.
- [36] ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Basic Microbiol*. v.42, p. 67-73, 2002.

- [37] SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A. S.; PEREIRA, Jr., N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactantes from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz J Chem Eng*, v. 19, n. 2, p.159-166, 2002.
- [38] DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- [39] NANDINI, C.D., SALIMATH, P.V. Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapatti/roti (Indian flat bread) marking quality. *Food Chem*, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2001.