



Bruna Montalvão Lima

Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

São José do Rio Preto

2012

Bruna Montalvão Lima

Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia – Microbiologia Indústria, Ambiental e de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto

2012

Lima, Bruna Montalvão.

Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato / Bruna Montalvão Lima - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

75 f. ; il; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Bioprocessos - Microbiologia. 3. Biossurfactante - produção. 4. Fermentação semi-sólida. 5. Resíduos agro-industriais. I. Garcia Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 661.185

Bruna Montalvão Lima

Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, Área de Concentração – Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Márcia Nitschke
USP – São Carlos

São José do Rio Preto
03/fevereiro/2012

**Dedico e ofereço
À minha grande família**

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à Deus, que me ajudou a traçar este caminho e ter forças em todos os momentos para seguir em frente.

Ao meu pai, pelo exemplo de coragem, caráter e sabedoria; à minha mãe, pelo carinho e dedicação; à minha irmã Carolina, por todo apoio incondicional; ao meu irmão Fernando, pela força, mesmo à distância, e ao meu namorado Adolfo, pelo carinho e compreensão.

Agradeço ao professor Crispin, pela orientação, dedicação e ensinamentos.

Às amigas de laboratório, pelo apoio no dia-a-dia e pelas ajudas constantes em meus trabalhos. Em especial agradeço à Juliana Guerra, que me auxiliou desde o início com grande prontidão e sabedoria. Agradeço também à técnica de laboratório Tânia, pelo apoio.

Aos professores Vanildo Luiz Del Bianchi e Márcia Nitsckhe, pelo auxílio na conclusão deste trabalho e pela participação na banca examinadora.

Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e à UNESP de São José do Rio Preto, por toda a estrutura física e pessoal, que me propiciaram uma plena formação acadêmica, da graduação ao mestrado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Surfactantes são compostos anfipáticos, que reduzem a tensão interfacial e superficial, além disso, possuem capacidade de detergência, emulsificação, espumante, molhante, de solubilização e dispersão de substâncias. Os biossurfactantes, surfactantes biológicos derivados do metabolismo secundário de microrganismos, são amplamente utilizados na biorremediação e nas indústrias petrolíferas, de alimentos e de produtos de limpeza. Esses compostos podem ser produzidos por fermentação semi-sólida, a qual pode aproveitar resíduos agroindustriais como substrato para o crescimento microbiano. Os objetivos desse trabalho foram produzir biossurfactante utilizando os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* por fermentação semi-sólida usando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos; avaliar a influência destes substratos; avaliar a influência da concentração de sacarose, glicose, óleo diesel e óleo residual de fritura no crescimento microbiano e o potencial de biorremediação dos biossurfactantes produzidos, assim como dos fungos utilizados. Os microrganismos foram propagados em tubos de ensaio inclinados incubados a 25°C em meio PDA. Posteriormente os esporos foram suspensos em solução nutriente e incubados em frascos de Erlenmeyer contendo cinco gramas do substrato a ser utilizado, bagaço de cana-de-açúcar ou farelo de trigo, 30 mL da solução nutriente contendo os esporos ($1,7 \times 10^7$ esporos/mL) e uma fonte de carbono adicional testada: sacarose, glicose, óleo diesel e óleo residual de fritura. Os experimentos foram realizados a 25°C e tempo de fermentação de 72, 120 e 168h. A presença do biossurfactante no caldo de fermentação foi determinada pela medida da tensão superficial, do índice de emulsificação, da concentração micelar crítica e da produção bruta. Os microrganismos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* demonstraram grande potencialidade para a produção de biossurfactantes utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato e glicose, sacarose, óleo diesel e óleo residual de fritura como fontes de carbono. O óleo residual de fritura e o farelo de trigo apresentaram destaque frente às demais fontes de carbono e substratos. Os biossurfactantes produzidos demonstraram grande potencial na biorremediação de áreas poluídas.

Palavras-chave: biossurfactantes, fermentação semi-sólida, resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

*Surfactants are amphiphilic compounds that reduce the interfacial and surface tension; also they have capacity of detergency, emulsifying, wettability, of solubilization and dispersion of substances. The biosurfactants, biologic surfactants derivated from secondary metabolism of microorganism, are widely used in the bioremediation and in the petroleum, food and cleaning industries. These compounds can be produced under solid-state fermentation, which can use agro-industrial wastes as substrates for the microbial growth. The purposes of this study were produce biosurfactants using the fungi *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium expansum* by solid-state fermentation using sugarcane bagasse and wheat bran as substrates; evaluate the influence of these substrates; evaluate the influence of sucrose, glucose, diesel oil and residual frying oil in the microbial growth and the biosurfactants bioremediation potencial, and microorganisms bioremediation potencial. First, for the inoculum preparation, the microorganisms were propagated in the inclined Erlenmeyers flasks containing PDA and kept at 25°C. After that, the spores were suspended in nutrient solution and incubated in Erlenmeyers flasks containing five grams of the substrate, sugarcane bagasse or wheat bran, 30 mL of nutrient solution containing the spores ($1,7 \times 10^7$ spores/mL) and an additional carbon source tested: sucrose, glucose, diesel oil and frying oil. The experiments were realized in 25°C and 72, 120 and 168 hours. The presence of the biosurfactant in the fermentation broth was determinated by the surface tension, the emulsification index and the critical micelle concentration. The microorganisms *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* showed a high potentiality for biosurfactant production using sugarcane bagasse and wheat bran as substrate and glucose, sucrose, diesel oil and frying oil as a carboun source. The frying oil and the wheat bran presented highlight compared with the others substrates and carbon sources. The biosurfactantes produced showed a high potenciality in bioremediation of frying oil and motor oil.*

Keywords: biosurfactants, solid-state fermentation, agro-industrial wastes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tensão superficial (mN/m) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, determinada a 28°C, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato..... **25**
- Figura 2.** Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, determinada a 28°C utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato. **26**
- Figura 3.** Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C..... **28**
- Figura 4.** Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C..... **29**
- Figura 5.** Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *A. ochraceus*..... **32**
- Figura 6.** Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *A. ochraceus*..... **32**
- Figura 7.** Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *A. ochraceus*..... **33**
- Figura 8.** Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *P. expansum*..... **33**
- Figura 9.** Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *P. expansum*..... **34**

Figura 10. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo <i>P. expansum</i>	34
Figura 11. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , determinada a 28°C utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.	35
Figura 12. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , determinada a 28°C utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.	36
Figura 13. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, com diferentes lavagens, determinada a 27°C.	37
Figura 14. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, com diferentes lavagens, determinada a 27°C.....	38
Figura 15. Tensão superficial (mN/m) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , determinada a 28°C, utilizando farelo de trigo como substrato.....	41
Figura 16. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , determinada a 28°C utilizando farelo de trigo como substrato.	42
Figura 17. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.....	43
Figura 18. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.....	45
Figura 19. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>A. ochraceus</i>	47
Figura 20. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>A. ochraceus</i>	48

Figura 21. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>A. ochraceus</i>	48
Figura 22. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>A. ochraceus</i>	49
Figura 23. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>P. expansum</i>	49
Figura 24. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>P. expansum</i>	50
Figura 25. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>P. expansum</i>	50
Figura 26. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo <i>P. expansum</i>	51
Figura 27. Tensão superficial (mN/m) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , determinada a 28°C, utilizando misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato.....	53
Figura 28. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , determinada a 28°C, utilizando misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato.....	53
Figura 29. Imagens do teste de biorremediação de óleo de motor. Na imagem pode ser observado que o óleo que escorre da areia contaminada permanece na placa no experimento controle, à esquerda, e é degradado quando utilizado o biossurfactante produzido por <i>P. expansum</i> , à direita.....	55
Figura 30. Na figura pode ser observado o teste de biorremediação de óleo de motor com aplicação de biossurfactante em um, sete e 21 dias de ação. Na segunda imagem pode ser observada o início da proliferação do microrganismo, que já colonizou o substrato na terceira imagem.....	56

Figura 31. Testes de biorremediação de água contaminada com óleo de motor, com um dia de repouso. Na imagem à esquerda podem ser visualizados os diferentes tratamentos, sendo que os dois primeiros tubos representam a aplicação de biossurfactante; os tubos do meio, os experimentos controle; e os dois últimos tubo, a aplicação da suspensão de esporos de *P. expansum*. Em destaque, na imagem à direita, pode ser observada a formação de emulsão do óleo de motor, quando utilizado o biossurfactante.....**56**

Figura 32. Testes de biorremediação de água contaminada com óleo de motor, com 21 dias de repouso. Na imagem à esquerda podem ser visualizados os diferentes tratamentos, sendo que os dois primeiros tubos representam a aplicação de biossurfactante; os tubos do meio, os experimentos controle; e os dois últimos tubo, a aplicação da suspensão de esporos de *P. expansum*. Em destaque, na imagem à direita, pode ser observada a colonização da camada superficial de óleo pelo microrganismo.....**57**

Figura 33. Curva padrão para a determinação de açúcares pelo método Dubois et al...**75**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (NITSCHKE; PASTORE, 2002)	10
Tabela 2. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.....	28
Tabela 3. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.....	28
Tabela 4. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.....	29
Tabela 5. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.....	29
Tabela 6. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.....	30
Tabela 7. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.....	30
Tabela 8. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C....	31
Tabela 9. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C....	31
Tabela 10. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana como substrato, sem lavagem do substrato.....	37
Tabela 11. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana, lavado uma única vez.....	37

Tabela 12. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana como substrato, com lavagem dupla....	38
Tabela 13. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , sem lavagem do substrato.....	38
Tabela 14. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana, lavado uma única vez.....	39
Tabela 15. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana, com dupla lavagem.....	39
Tabela 16. Produção bruta (g/L) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.....	39
Tabela 17. Produção bruta (g/L) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.....	40
Tabela 18. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	43
Tabela 19. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	43
Tabela 20. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	44
Tabela 21. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	44
Tabela 22. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	45
Tabela 23. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	45
Tabela 24. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	46

Tabela 25. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	46
Tabela 26. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.....	47
Tabela 27. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.....	47
Tabela 28. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	53
Tabela 29. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.....	54
Tabela 30. Comparação entre os valores obtidos para a tensão superficial obtidos em diferentes experimentos, utilizando óleo residual de fritura como substrato, diferentes substratos e 168 horas de fermentação.....	54
Tabela 31. Comparação entre os valores obtidos para o IE ₂₄ obtidos em diferentes experimentos, utilizando óleo residual de fritura como substrato, diferentes substratos e 168 horas de fermentação.....	54
Tabela 32. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 28°C.....	71
Tabela 33. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 28°C.	71
Tabela 34. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.....	71
Tabela 35. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.....	72

Tabela 36. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em diferentes lavagens, determinada a 28°C.	72
Tabela 37. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em diferentes lavagens, determinada a 28°C.....	72
Tabela 38. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.....	73
Tabela 39. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.....	73
Tabela 40. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão dos valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 28°C.....	73
Tabela 41. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 28°C.	73
Tabela 42. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>A. ochraceus</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.....	74
Tabela 43. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 28°C.....	74
Tabela 44. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando misturas de farelo de trigo e bagaço de cana como substrato, determinada a 28°C.	74
Tabela 45. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por <i>P. expansum</i> , utilizando misturas de farelo de trigo e bagaço de cana como substrato, determinada a 28°C.	74
Tabela 46. Valores de açúcares totais determinados pelo método de Dubois et al.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+/- = mais/menos

°C = graus centígrados

A. ochraceus = *Aspergillus ochraceus*

aw = atividade de água

CMC = concentração micelar crítica

et al = abreviação de et alii = e colaboradores

FES = fermentação em estado sólido

FSS = fermentação semi-sólida

g = gravidade na superfície do planeta Terra

g = grama

g/L = grama por litro

h = horas

IE₂₄ = Índice de emulsificação determinado em vinte e quatro horas

MEOR = Microbial enhanced oil recovery

mg = miligramas

min = minuto

mL = mililitro

mm = milímetro

mN/m = miliNewton por metro

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

P. expansum = *Penicillium expansum*

PDA = Potato Dextrose Agar

pH = potencial hidrogeniônico

rpm = rotações por minuto

sp. = espécie

T. apicola = *Torulopsis apicola*

UFC.mL⁻¹ = unidade formadora de colônia por mililitro

v/v = volume por volume

w/w = massa por massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Surfactantes	2
2.2 Biossurfactantes	3
2.2.1 Aplicação dos biossurfactantes	5
2.2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes	7
2.3 Fermentação em estado sólido.....	11
2.3.1 Características Gerais	11
2.3.2 Substratos	12
2.3.3 Fontes de carbono	14
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Microrganismos	18
4.2 Meio de manutenção dos microrganismos	18
4.3 Produção de biossurfactante	18
4.3.1 Preparo do inóculo para a fermentação	18
4.3.2 Fermentação	19
4.3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar como substrato	19
4.3.2.1.1 Influência da sacarose “in natura” na produção de biossurfactante.....	19
4.3.2.1.2 Influência da glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel na produção de biossurfactante	19
4.3.2.2 Farelo de trigo como substrato	20
4.3.2.3 Mistura de substratos	20
4.3.3 Preparo do extrato bruto de fermentação.....	20
4.4 Métodos analíticos	21
4.4.1 Determinação da tensão superficial	21
4.4.2 Índice de emulsificação	21

4.4.3 Concentração Micelar Crítica (CMC)	21
4.5 Precipitação do biossurfactante do caldo de fermentação	21
4.6 Potencial para biorremediação	22
4.6.1 Biorremediação de solo contaminado com óleo de motor e óleo residual de fritura	22
4.6.2 Biorremediação de água contaminada com óleo de motor e óleo residual de fritura	23
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1 Bagaço de cana de açúcar como substrato	25
6.1.1 Influência da glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel na produção de biossurfactante	25
6.1.2 Influência da sacarose “in natura” na produção de biossurfactante.....	35
6.2 Farelo de trigo como substrato	40
6.3 Mistura de substratos	52
6.4 Potencial para biorremediação	55
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS	59
ANEXO I	71
ANEXO II	75

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes, componentes amplamente utilizados em nosso dia-a-dia, são moléculas anfipáticas, constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, capazes de formar filmes moleculares ordenados nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão interfacial e superficial. Desta forma, os surfactantes possuem capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, de solubilização e dispersão de substâncias.

Com o avanço da biotecnologia e com o aumento da preocupação com questões ambientais, aumentou-se a necessidade da produção de surfactantes de origem microbiana, derivados do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras. Esses produtos, chamados biossurfactantes, são capazes de substituir os surfactantes químicos predominantes, produzidos a partir de derivados de petróleo e possuem importantes vantagens como sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e maior compatibilidade com o ambiente. Atualmente, os biossurfactantes são utilizados principalmente na indústria petrolífera e na remoção de resíduos (biorremediação), além da indústria de alimentos, de produtos de limpeza, entre outras.

Outro grande problema ecológico conhecido atualmente está relacionado com a geração de resíduos e subprodutos em diversos setores industriais, os quais além de serem potenciais poluidores, podem representar uma grande perda de biomassa e de nutrientes. Dessa forma, a fermentação semi-sólida (FSS) representa um importante papel no aproveitamento desses resíduos, utilizando-os como substrato para o crescimento de microrganismos e síntese de compostos de grande interesse industrial e ecológico, como os biossurfactantes. Além disso, a utilização de substratos baratos ou subutilizados e abundantes no país como o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo, pode representar uma importante redução de custos na produção desses compostos.

Tendo em vista a importância ambiental dos biossurfactantes, assim como o restrito conhecimento científico na produção de biossurfactantes por fermentação semi-sólida, faz-se necessário o desenvolvimento da produção de tais compostos, utilizando novos microrganismos e metodologias, com o objetivo de aumentar a gama de conhecimento acerca desta questão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Surfactantes

Os surfactantes constituem uma importante classe de produtos químicos amplamente utilizados em vários setores industriais, na agricultura e em residências (BANAT et al., 2000; DELEU; PAQUOT, 2004). De acordo com Van Bogaert e colaboradores, sua produção no ano de 2007 foi estimada em cerca de 10 milhões de toneladas por ano e o principal destino desses produtos foram os detergentes domésticos (MAKKAR et al., 2011). Estes produtos são encontrados também em cosméticos, alimentos, medicamentos, na recuperação de petróleo e na remediação de acidentes envolvendo derramamentos de óleos na natureza (BANAT et al., 2000; BEDNARSKI, 2004; DELEU; PAQUOT, 2004; SANTOS et al., 2007)

Estas moléculas são compostos anfifílicos, orgânicos ou organometálicos que formam colóides ou micelas em solução. O termo anfifílico se refere à sua estrutura, composta por uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, tornando-o ideal para a solubilização de compostos hidrofóbicos (BANAT et al., 2000; BOEK, et al., 2002; SANTOS et al., 2007). O componente hidrofóbico, apolar, é composto por um hidrocarboneto, o qual varia de 8 a 18 átomos de carbono, e a efetividade do surfactante é proporcional ao seu tamanho. O grupo anfifílico tem composição variável e esta determina a característica do surfactante, que por sua vez pode ser aniônica, não-iônica e catiônica (BOEK, et al., 2002). Os surfactantes, também chamados tenso-ativos, com característica aniônica e não iônica são pouco absorvidos pelo solo e os catiônicos são utilizados para diminuir a permeabilidade de materiais em reservatórios aquíferos por sorção (CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009).

Os tenso-ativos apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e aumentar a solubilidade e mobilidade de compostos hidrofóbicos ou compostos orgânicos insolúveis. Esta atividade de superfície faz dos surfactantes uma das mais importantes e versáteis classes de produtos químicos usados em uma variedade de aplicações (DELEU; PAQUOT, 2004). Sua característica anfifílica provoca uma distorção da água pelo grupo hidrofóbico, o que resulta em um aumento da energia livre do sistema. Desta forma, o trabalho necessário para trazer uma molécula surfactante para a superfície é menor do que aquele relativo a uma molécula de água, caracterizando a diminuição da tensão superficial (SANTOS, 2007). Ainda, em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), possibilitando a redução da tensão

interfacial. Devido a estas propriedades, os surfactantes são adequados para muitas aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Outra importante característica de um tenso-ativo é a concentração micelar crítica (CMC) que é um dos índices mais utilizados para avaliar a atividade surfactante. Esta determina a concentração do surfactante necessária para a saturação do meio e formação de micelas, as quais representam a configuração das moléculas de tensoativo com melhor estabilidade na solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas e a parte hidrofílica das moléculas voltada para a água. A partir desta concentração (CMC), a tensão superficial entre a fase aquosa/oleosa muda muito pouco porque todas as moléculas de surfactantes adicionadas formam micelas (LIN, 1996, SANTOS et al, 2007).

A micelização é um processo comum a todos os surfactantes e é uma propriedade intrínseca e característica. A principal razão para a formação desses agregados é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e da água. Sua formação resulta na solubilização de substâncias hidrofóbicas em água, dando origem a uma emulsão. As propriedades únicas de micelas estão sendo exploradas em aplicações como a extração de proteínas do caldo de fermentação, remoção de íons metálicos e orgânicos a partir de solução aquosa e para aplicação ambiental. Após a CMC, as micelas, ao contrário dos monômeros, ficam dispersas em toda a solução, não apresentando efeito sobre a tensão superficial da água (OLIVEIRA, 2010).

A grande maioria dos surfactantes consumidos atualmente pelos países industrializados é produzida a partir de derivados de petróleo. Já nos países em desenvolvimento, os surfactantes naturais são mais utilizados (BOGNOLO, 1998; NITSCHKE; PASTORE, 2002). É possível observar uma recente tendência, nos países industrializados, da substituição dos surfactantes químicos pelos naturais, ambientalmente compatíveis e biodegradáveis, com o intuito de diminuir os danos causados ao ambiente por esses produtos.

2.2 Biosurfactantes

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes como a diminuição da tensão superficial e a capacidade emulsificante são chamados de biosurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (CAMEOTRA; MAKAR, 1998).

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais e apresentam inúmeras vantagens em relação aos compostos químicos, entre elas a alta atividade superficial e interfacial, tolerância à temperatura, pH e força iônica, alta biodegradabilidade na água e no solo e baixa toxicidade (BOGNOLO, 1998; LIN, 1996; BANAT et al., 2010). Tem-se observado um grande aumento do interesse nesses produtos devido às suas características sustentáveis (MAKKAR et al., 2011)

Podem ser classificados de acordo com a sua origem microbiana e composição química, sendo que as principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993; DESAI; BANAT, 1997; BANAT et al. 2000).

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção, pH do produto, tamanho das partículas do substrato, permeabilidade do composto, composição dos indutores, substratos e CMC. (FONTES et al., 2008; CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009). Esses produtos podem ser obtidos utilizando-se procedimentos relativamente simples e substratos baratos, por meio de processos de fermentação (BUENO et al, 2010).

Apesar das inúmeras vantagens desses tensoativos frente aos compostos químicos, um grande problema ainda está relacionado com o aumento de escala de produção e barateamento da produção. O biossurfactante surfactina, produzido pela empresa “Sigma Chemical Company”, custa aproximadamente 153 dólares o frasco contendo 10 mg. Este valor é ainda muito elevado, quando comparado ao surfactante químico, que custa aproximadamente dois dólares por kilo (MAKKAR et al., 2011). Segundo Kosaric e colaboradores (1984) este barateamento deve ser focado na seleção de microrganismos, adaptados ao processo ou geneticamente modificados para este fim; adaptações do processo para que possua baixos custos de aplicação e manutenção; seleção de substratos de baixo custo para o crescimento microbiano e utilização de metodologias de extração e purificação do bioproduto com baixo custo (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Czaplicka e Chmielarz (2009) propõem três principais mecanismos de ação dos biossurfactantes: aumento da área superficial de substratos hidrofóbicos para o crescimento microbiano; aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos por meio do aumento da solubilidade aparente, ou adsorvendo-os nas superfícies, e regulação do ataque de microrganismos às superfícies dos substratos.

2.2.1 Aplicações dos biossurfactantes

A maior aplicação de biossurfactantes está na indústria petrolífera, seja na produção de derivados de petróleo, recuperação melhorada de petróleo (MEOR), remobilização e remoção de resíduos ou biorremediação (VAN DYKE; LEE; TREVORS, 1991; RON; ROSENBERG, 2002). Além disso, estes compostos são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, produtos cosméticos e de limpeza, na agricultura, para formulação de pesticidas, indústria têxtil, de papel, entre outros (LAYMAN, 1985).

Recuperação melhorada do petróleo (MEOR)

A recuperação melhorada do petróleo consiste em uma tecnologia de recuperação terciária do petróleo que utiliza microrganismos ou produtos do seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem polímeros e surfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo nas rochas. A utilização de biossurfactantes em MEOR envolve várias estratégias, como a injeção de microrganismos produtores no reservatório e subsequente propagação in situ, ou a injeção de nutrientes no reservatório, estimulando o crescimento dos microrganismos produtores de biossurfactantes (NEVES et al., 2004).

Indústria de alimentos

Na indústria de alimentos os biossurfactantes são utilizados na substituição de emulsificantes químicos, grandes responsáveis pelas características de textura, consistência, dispersão de fases e solubilização de aromas. Por este motivo, podem ser amplamente encontrados em panificação, por influenciar na reologia da farinha, diminuindo a formação de pó; em produtos derivados de carne, alterando a emulsificação das gorduras e características sensoriais; como anti-oxidantes e conservantes, por retardar a colonização de *Streptococcus thermophilus* nos laticínios, grande responsável por mau cheiro durante a pasteurização (NITSCHKE; PASTORE, 2002; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; BEDNARSKI et al., 2004).

Ainda, os biossurfactantes podem representar grandes vantagens econômicas para a indústria de alimentos no que se refere à utilização de seus resíduos ou subprodutos para a produção de biossurfactantes. Isto é possível devido à característica desses resíduos, com

altos níveis de carboidratos ou lipídios, necessários para sustentar o crescimento microbiano e a síntese dessas moléculas (OLIVEIRA, 2010)

Indústria de cosméticos e produtos de saúde

Este ramo industrial também utiliza surfactantes em uma ampla variedade de produtos, como repelentes de insetos, desodorantes, soluções para lentes de contato, cremes dentais, entre outros, devido à sua alta compatibilidade com a pele, baixa toxicidade e propriedades emulsificante e dispersante. Nesses produtos, eles atuam como emulsificantes, agentes espumantes, solubilizantes, umectantes e agentes de limpeza (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Os principais surfactantes utilizados nessa área são os soforolipídeos e ramnolipídeos.

Aplicações terapêuticas

São descritas algumas aplicações terapêuticas para biossurfactantes como emulsificante em fármacos, agentes anti-virais, anti-microbianos, anti-fúngicos e anti-tumorais, fator estimulante de granulócitos (G-CSF), inibição de formação de coágulos, entre outros (BANAT et al, 2010).

A surfactina, um dos mais conhecidos biossurfactantes, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos; formação de canais iônicos em membranas; atividade antibacteriana e antifúngica; atividade antiviral e antitumoral e é capaz de inibir a formação de biofilmes de algumas bactérias (ARIMA et al., 1968; PEYPOUX et al., 1999; BARROS et al., 2007).

A utilização de biossurfactantes no controle de biofilmes, reduzindo a aderência destes, em combinação com antibióticos pode representar uma eficiente estratégia antimicrobiana, uma vez que os antibióticos são em geral menos eficazes contra os biofilmes (IRIE et al., 2005). Essa característica pode representar grande importância para a saúde, visto que os biofilmes são importantes responsáveis por infecções hospitalares.

Biorremediação

Em decorrência da industrialização, uma ampla variedade de substâncias tóxicas e perigosas têm sido introduzidas no meio ambiente, em especial, aquelas decorrentes de despejos de efluentes industriais e as provenientes de acidentes envolvendo derramamentos de petróleo e seus derivados (CERQUEIRA; COSTA, 2009). Bartha, em 1986, estimou que os derramamentos de petróleo alcançam de 0,08 a 0,4% da produção mundial. O aumento da poluição ambiental tem levado a uma maior conscientização quanto à importância da restrição

de lançamentos indiscriminados de poluentes e da necessidade de remediar esses locais impactados, por meio do desenvolvimento de variadas técnicas e procedimentos como a biorremediação (BANAT et al., 2000).

A biorremediação envolve a aceleração dos processos naturais de biodegradação. Essas técnicas de tratamento biológico estão divididas em duas categorias: bioestimulação e bioaumentação. A bioestimulação consiste na adição *in situ* de nutrientes específicos com o intuito de estimular o crescimento da microbiota local, a qual será responsável pela degradação dos poluentes presentes. Já a bioaumentação consiste em uma abordagem mais controlada e programada de biorremediação. Neste procedimento, são adicionados microrganismos de eficiência conhecida para o ambiente degradado e os nutrientes e condições físicas e químicas são monitorados (CALVO et. al, 2008).

Hidrocarbonetos são compostos hidrofóbicos com baixa solubilidade em água. Alguns microrganismos têm desenvolvido diversas estratégias para utilizar estes compostos como fonte de carbono e energia, como a formação de biofilmes e a produção de surfactantes biológicos (BOGNOLO, 1998; CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Os biossurfactantes apresentam a capacidade de emulsificar misturas de hidrocarbonetos em água. Isto pode ser demonstrado por meio do aumento significativo da degradação dos hidrocarbonetos presentes no meio, o que torna muito freqüente sua utilização em processos de biorremediação de solos e mananciais contaminados. Esse processo é baseado na habilidade dos biossurfactantes reduzirem a tensão superficial pelo remanejamento molecular, por meio do acúmulo de compostos insolúveis em superfícies, influenciando as ligações de hidrogênio e interações hidrofílicas-hidrofóbicas. Isto faz com que a área superficial aumente, proporcionando uma maior biodisponibilidade desses compostos para os microrganismos e conseqüente aumento da biodegradabilidade. (CASTIGLIONE et al, 2009; CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009)

2.2.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes

Os microrganismos produzem uma ampla diversidade de biossurfactantes, com diferentes estruturas e aplicações, como pode ser observado na Tabela 1 (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O tipo de microrganismo utilizado, assim como as condições de cultivo, substrato e meio de cultura influenciam na produção e no nível de expressão do biossurfactante.

Foi verificado em alguns estudos que a produção de emulsificantes pelos microrganismos ocorre em condições de alta densidade celular e com o surgimento da fase

estacionária de crescimento, podendo ser induzida por moléculas envolvidas em sinais de “quorum sensing”. Esta regulação característica parece ser geral, e provavelmente aplica-se a produção de emulsificantes de altos e baixos pesos moleculares (ROSEMBERG; RON, 1999; VAN DELDEN et al., 1998).

Diversos gêneros de bactérias são amplamente explorados para a produção de biossurfactantes em pequena e grande escala. Os principais tensoativos conhecidos são os ramnolipídeos e a surfactina, já introduzidos em diversos setores industriais, devido às suas comprovadas eficiências para este fim.

Os ramnolipídeos foram isolados pela primeira vez por Bergstrom e colaboradores em 1946, a partir de culturas de *Pseudomonas pyocyanea*, porém sua estrutura química foi elucidada apenas em 1965, por Edwards e Hayashi (DUARTE, 2003). Este glicolipídeo, isolado de espécies do gênero *Pseudomonas*, principalmente *P. aeruginosa*, possui alta capacidade emulsificante e reduz a tensão superficial até 30 mN/m (WEI et. al, 2005) Possui ampla aplicação industrial e em processos de biorremediação. Em 2009, Pomsunthorntawee e colaboradores avaliaram a capacidade de produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* SP4, isolada a partir de solo contaminado com petróleo na Tailândia. Os resultados demonstraram potencial para produção em grande escala.

A surfactina, um biossurfactante lipoproteico produzido por *Bacillus subtilis*, é um dos biossurfactantes produzidos por microrganismos com maior aplicação comercial (YEH et al., 2005). A surfactina tornou-se conhecida na década de 60, porém apenas na década de 80 passou a atrair a atenção dos pesquisadores para uma possível substituição dos surfactantes químicos. Estes compostos apresentam significativa biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, remoção de óleo de areia e formação de emulsões estáveis (BARROS et al, 2007).

A produção de biossurfactantes por fungos é ainda incipiente e poucos pesquisadores têm atraído sua atenção para estes microrganismos, principalmente em relação aos fungos filamentosos. Apesar disso, alguns estudos têm demonstrado que estes microrganismos também são capazes de produzir tensoativos com excelentes propriedades.

Dentre as leveduras, as espécies do gênero *Candida* têm sido utilizadas com sucesso para a produção de biossurfactantes, dentre elas a *Candida bombicola* tem-se destacado. Em um estudo realizado por Daverey e Pakshirajan (2009), utilizando resíduos de baixo custo como melaço e óleos, foi obtido um biossurfactante soforolipídio por esta espécie. Bednarski e colaboradores (2004) induziram a produção de glicolipídios por *Candida antarctica* e *Candida apicola* a partir de resíduos do refino de óleo e o biossurfactante produzido foi capaz

de reduzir a tensão superficial do meio para 35,7 mN/m, o que demonstra uma grande potencialidade deste bioproduto como surfactante.

Aragão e colaboradores (2007) estudaram duas espécies de leveduras, *Pichia membranaefaciens* e *Pichia anomala* e obtiveram a produção de biossurfactantes utilizando meio mineral com a adição de glicerol, gasolina e querosene.

A espécie *Pseudozyma fusiformata* produz um biossurfactante termoestável de baixa massa molar com propriedade fungicida (LANG, 2002). Em um trabalho realizado por Fukuoka e colaboradores (2008), uma levedura do gênero *Pseudozyma* apresentou potencial para produzir um glicolípido.

Recentemente foi observada a produção de um biossurfactante caracterizado como glicoproteína de um fungo marinho *Aspergillus ustus* isolado da costa da Índia, este tensoativo apresentou amplo espectro de atividade antimicrobiana, assim como alto potencial para aplicação ambiental (KIRAN et al., 2009).

Em um estudo utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus* em cultivo sólido, Cerqueira e Costa (2009) obtiveram a produção de um eficiente biossurfactante, com grande potencial para degradação de tolueno e óleo de pescado em solo contaminado.

Martins e colaboradores (2008) produziram lipases e biossurfactantes a partir dos fungos *Phialemonium* sp. e *Aspergillus fumigatus* em cultivo sólido, obtendo altas taxas de emulsificação a partir desses bioprodutos.

Não foram encontradas na literatura referências de produção de biossurfactantes pelos microrganismos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*, utilizados neste estudo.

Tabela 1. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Tipo de Biosurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

2.3 Fermentação em estado sólido

2.3.1 Características Gerais

Fermentação em estado sólido ou fermentação semi-sólida é o processo no qual ocorre o crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas forma uma fina camada na superfície das partículas sólidas (RAIMBAULT, 1998). Esta técnica é utilizada há muitos séculos para obtenção de alimentos fermentados, e nos últimos tempos sua aplicação biotecnológica vem ganhando crescente atenção (GUTARRA et al., 2003). Como exemplo de sua utilização industrial é possível citar o desenvolvimento do bioprocessos como biorremediação e biodegradação de contaminantes; biotransformação e enriquecimento de grãos e resíduos; biopolpação; produção de antibióticos; produção de compostos derivados do metabolismo secundário dos microrganismos como enzimas de grande interesse comercial, ácidos orgânicos, biopesticidas, biosurfactantes, biocombustíveis e compostos aromáticos (BALAKRISHNAN; PANDEY, 1996; PANDEY et al., 2000; SINGHAL, 2008).

A grande atenção atual perante esta tecnologia também reflete as inúmeras vantagens que a fermentação em estado sólido apresenta perante a fermentação submersa. Dentre elas, é possível citar o baixo custo, devido à utilização de diversos resíduos como substrato; a reprodução do habitat natural do microrganismo, principalmente para os fungos; o favorecimento da produção de alguns compostos como enzimas; maior facilidade para a recuperação desses produtos; diminuição da contaminação por bactérias e leveduras; melhoramento da estabilidade dos produtos; necessidade de um meio de cultura mais simples, pois o substrato muitas vezes proporciona uma grande quantidade de nutrientes para o microrganismo; diminuição da formação de espuma, a qual pode representar grandes perdas de produção na fermentação submersa (RAIMBAULT, 1998; SILVEIRA et al., 1999; PANDEY et al., 2000; PÉREZ-GUERRA et al., 2003; SINGHAL, 2008).

A obtenção do produto desejado utilizando FES e a otimização do processo depende do controle de alguns fatores como a seleção do microrganismo, a escolha do substrato, a composição do meio de cultura inicial, a temperatura de incubação, umidade, entre outros (PANDEY, 2003; JACOB; PREMA, 2008).

A habilidade de um microrganismo para crescer em um substrato sólido depende de suas características fisiológicas como requerimentos de atividade de água, capacidade de aderência e penetração no substrato e a habilidade de assimilar nutrientes a partir de fontes

complexas como as disponíveis em produtos naturais como grãos e resíduos agrícolas. Dessa forma, diversos microrganismos, incluindo fungos, bactérias e leveduras, podem se desenvolver em um substrato sólido, porém os fungos filamentosos são mais adaptados a esse ambiente (AIDOO et al, 1982; DURAND, 2003). Esta superioridade dos fungos filamentosos em FES deve-se à sua capacidade de se desenvolver em condições de baixa atividade de água (*aw*) e alta pressão osmótica; alta produção de enzimas lignocelulolíticas, capazes de degradar substratos sólidos para a absorção de nutrientes e a formação de hifas, que traz ao fungo um grande poder de penetração nos substratos (PÉREZ-GUERRA et al., 2003, CASTIGLIONE et al., 2009). Culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicilium* e *Aspergillus* são exemplos de alguns fungos amplamente utilizados para obtenção de vários bioprodutos por FES, incluindo biossurfactantes (CASTIGLIONE et al., 2009)

2.3.2 Substratos

A FES dispensa o uso de substratos de alto custo, podendo ser utilizados resíduos agroindustriais, o que economicamente viabiliza o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (CASTIGLIONE et al., 2009). Além da questão econômica, a utilização de resíduos representa uma importante alternativa para a grande quantidade de resíduos agro-industriais produzidos diariamente, principalmente em um país como o Brasil, essencialmente agrícola, os quais são descartados em aterros ou, na maioria das vezes, são queimados, gerando importantes problemas ambientais e de saúde pública (NITSCHKE; PASTORE, 2003; GUTARRA et al, 2003; MAKKAR et al., 2011).

Uma ampla gama de resíduos amiláceos ou lignocelulósicos pode ser utilizada neste processo. Recentemente, a escolha do substrato está centrada principalmente em resíduos agroindustriais de culturas tropicais, como a mandioca, soja, trigo, beterraba, batata, sorgo, cana-de-açúcar, milho, arroz e cevada (SOUZA et al., 1999; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; PANDEY, 2003; MILAGRES et al., 2004; ISIL e NILUFER, 2005; PINHEIRO, 2006; KRONBAUER et al., 2007; CASTIGLIONE et al., 2009).

Um substrato pode servir apenas como um suporte inerte ou pode também ser utilizado como fonte de nutrientes para o desenvolvimento dos microrganismos. Os substratos inertes são compostos lignocelulósicos, e geralmente devem sofrer um tratamento prévio para seu aproveitamento adequado, como a redução do tamanho das partículas, hidrólise química ou enzimática e suplementação de nutrientes. Apesar disso, a utilização desse tipo de substrato possibilita um maior controle e monitoramento do processo e reprodutibilidade.

Como exemplo desse tipo de substrato, temos o bagaço de cana-de-açúcar, fibras inertes, resinas, espuma de poliuretano e vermiculita (PÉREZ-GUERRA et al., 2003). Visto que os produtos lignocelulósicos são os principais componentes dos resíduos produzidos industrialmente, a utilização destes para a obtenção de bioprodutos como biossurfactantes e combustíveis torna-se extremamente importante (MAKKAR et al., 2011).

Makkar e colaboradores (2011) relatam a crescente atenção e importância da produção de biossurfactantes por FES utilizando substratos alternativos ricos em carboidratos como o bagaço de cana, beterraba, sorgo, uva, e grãos como o trigo e o milho.

Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana é resultado da extração do caldo da cana-de-açúcar, durante seu esmagamento, e é considerado o principal resíduo agroindustrial brasileiro. Ele representa aproximadamente 30% da cana integral moída (THIAGO; VIEIRA, 2002). Desta forma, das 250 milhões de toneladas de cana produzidas anualmente no Brasil, são geradas 75 milhões de toneladas de bagaço (BURGI, 1995). O Brasil tornou-se o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área cultivada de aproximadamente quatro milhões de hectares (0,5% do território nacional), e tem no Estado de São Paulo um complexo agroindustrial responsável por 60% da cana cultivada no País (COMITRE; CARMO, 2004; TEIXEIRA; PIRES; NASCIMENTO, 2007).

Esse resíduo é constituído por 45% de fibras lignocelulósicas, 50% de umidade, 2 a 3% de sólidos insolúveis e 2 a 3% de sólidos solúveis em água, o que o torna um interessante substrato para a fermentação semi-sólida. Quimicamente, constitui-se de celulose, hemicelulose e lignina, com 41%, 25% e 20%, respectivamente, baseado no peso seco de bagaço (ICIDCA; GEPLACEA; PNUD, 1990 apud TEIXEIRA; COSTA; SANTANA, 1997).

Com o aumento da produção sucroalcooleira, houve o surgimento de diversas linhas de pesquisa para o aproveitamento dos subprodutos da cana como a vinhaça, melaço, torta de filtro e bagaço de cana (BARROS et al., 2008; SILVA, 2009; OLIVEIRA, 2010). Vários estudos relatam a produção de biossurfactantes utilizando bagaço de cana em FES (CAMILIOS NETO et al., 2008;). Ainda, uma importante utilização desse resíduo em FES é a produção de enzimas como a xilanase, ligninase e celulasas para a geração de etanol de segunda geração (BENEDETTI, 2009; ADSUL et al., 2004).

Farelo de trigo

O trigo é o principal cereal produzido no mundo, e no Brasil sua produção é de destaque na região Sul. Seu cultivo é direcionado principalmente para a alimentação humana, por meio de seu processamento para a obtenção da farinha e outros produtos (RABALHO, 2002; SOARES et al., 2004). Durante esse processamento, 28% do grão não é aproveitado, originando o subproduto farelo de trigo (ANDRIGUETO et al., 1986).

O farelo de trigo é principalmente destinado à alimentação animal. Porém, por ser um resíduo de baixo valor comercial e rico em nutrientes como nitrogênio, carbono e sais orgânicos, é considerado um substrato ideal para o cultivo de microrganismos (FABRIANI; LINTAS, 1988 apud RABALHO, 2002; EL-HAWARY; MOSTAFA, 2001 apud UMSZAGUEZ, 2009). Este substrato é amplamente utilizado no cultivo de microrganismos em fermentação semi-sólida para a obtenção de diversas enzimas e substâncias orgânicas como o ácido cítrico (PINTO et al., 2005). O processo de obtenção de ácido cítrico a partir do farelo de trigo, representa um quinto de todo o citrato produzido no Japão (PANDEY et al., 2001). No estudo de Silva e colaboradores (2010) o farelo de trigo mostrou-se como o substrato mais adequado para a produção de fitases entre o bagaço de cana, o bagaço da mandioca, a quirela, o farelo de arroz, o farelo de trigo e o farelo de aveia. Benedetti, em 2009, obteve resultados semelhantes para a produção de xilanases. Vários autores apontam esse substrato como adequado para a produção de biossurfactantes, devido às suas características (VEENANADIG et al, 2000; MARTINS et al, 2009; KIRAN et al, 2010; AQUINO et al, 2011; BUENO et al, 2010).

2.3.3 Fontes de carbono

A escolha da fonte de carbono tem um importante papel sobre o rendimento dos biossurfactantes. Existem microrganismos que produzem biossurfactantes apenas quando crescem em hidrocarbonetos e outros que requerem substratos simples, solúveis em água tais como carboidratos e aminoácidos (DUARTE, 2003) Açúcares e óleos são considerados como fontes de carbono adequadas para a obtenção de tensoativos (BUENO et al., 2010).

Glicose e sacarose

A glicose, também chamada de dextrose, representa a unidade fundamental de carboidratos maiores, como a sacarose e maltose. Por esse motivo, é utilizada como fonte de

energia e intermediário metabólico, em nível celular, sendo considerada, desta forma, o carboidrato mais importante.

A sacarose é um glicídio formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, é o açúcar comercial comum e está amplamente distribuído entre as plantas superiores, encontra-se na cana de açúcar de 15 a 20 % e na beterraba de 14 a 18 % (OLIVEIRA, 2010).

Sacarose e glicose são substratos utilizados como padrão para a produção de biossurfactantes. Batista e colaboradores (2006) isolaram e caracterizaram bactérias produtoras de surfactantes/bioemulssificantes, coletadas de ambientes marinhos e terrestres contaminados com óleos residuais ou seus subprodutos. Estas amostras foram avaliadas quanto à fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose e querosene), sendo a glicose a fonte que se apresentou mais eficiente na produção de biossurfactante.

Óleos

A produção mundial de óleos e gorduras alcança atualmente cerca de 2,5 milhões de toneladas por ano. Estes produtos, em geral, são utilizados na indústria de alimentos, como matéria-prima para novos produtos, ou diretamente na alimentação humana. Por este motivo, são geradas grandes quantidades de resíduos pelas indústrias de óleo e gorduras: óleos residuais, sebo, óleos marinhos, óleos provenientes de fritura. (HABA et al., 2000).

Após o aquecimento dos óleos, são gerados inúmeros compostos de degradação, que tornam os óleos excelentes fontes de carbono para crescimento microbiano e produção de surfactantes (FIRESTONE et al., 1991). Levando em consideração que o Brasil não possui normativas para o descarte correto destes produtos, a utilização e descarte sustentável destes resíduos representam grandes ganhos econômicos, sociais e ambientais.

Os constituintes do petróleo são moléculas hidrofóbicas, com baixa massa molar, contribuindo para o seu acúmulo em sedimentos e persistência no ambiente (DUARTE, 2003). O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo constituído por, predominantemente, hidrocarbonetos alifáticos contendo de 9 a 28 átomos de carbono na cadeia. Ainda, pode conter outros compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados alquílicos e altos teores de enxofre (BRAUN, 2003). Devido à sua constituição, diversas bactérias, fungos filamentosos e leveduras são capazes de degradar petróleo e seus derivados, utilizando-os para a obtenção de biomassa.

Algumas bactérias tais como *P. aeruginosa* são mais eficientes na produção de biossurfactantes quando crescem em substratos insolúveis em água. Ainda, o comprimento da

cadeia de hidrocarboneto tem um efeito significativo sobre a concentração final do produto no caldo fermentado (GEORGIU et al., 1992 apud Duarte, 2003).

Alguns estudos relataram a produção de tensoativos por *A. fumigatus* utilizando óleo diesel, óleo de soja e tolueno como fontes de carbono (MARTINS et al., 2008; CASTIGLIONE et al., 2009; CERQUEIRA; COSTA, 2009).

Em 2000, Haba e colaboradores verificaram produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044 (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando como fonte de carbono óleos residuais de fritura (óleo de oliva e óleo de girassol). Espécies de *Candida* também demonstraram potencial para produção de biossurfactantes utilizando óleos regionais (MARÇAL, 1991; SARUBBO et al., 1999).

Em 2004, Bednarski e colaboradores determinaram a eficiência de produção de biossurfactantes (glicolípidios) por leveduras a partir de resíduos de refinaria de óleo.

Em um trabalho realizado por Vega e colaboradores, em 2007, foi verificada a produção de biossurfactantes por *Candida ingens*. Ainda neste ano, Morita e colaboradores verificaram o potencial de conversão do glicerol em biossurfactantes por leveduras.

Barbosa e Paz (2007) utilizaram óleo de pequi para produzir biossurfactante por *Chromobacterium violaceum*. Sarubbo e colaboradores também em 2007 utilizaram óleo de canola por *Candida lipolytica* para produção de um biossurfactante. Em ambas as pesquisas, foi observada produção de biossurfactante mostrando que estes microrganismos são capazes de se desenvolverem em um meio de cultivo contendo substratos oleosos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Produzir biossurfactante a partir dos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do bagaço de cana-de-açúcar e do farelo de trigo como substratos na produção de biossurfactantes em fermentação semi-sólida;
- Avaliar a influência da concentração de sacarose contida no bagaço de cana “*in natura*”;
- Avaliar a influência da glicose, do óleo diesel e do óleo residual de fritura como fontes de carbono na produção de biossurfactantes em estado semi-sólido;
- Avaliar o potencial de biorremediação do biossurfactante produzido em amostras de solo e água contaminadas com óleo residual de fritura e óleo diesel.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram os fungos filamentosos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*, pertencentes à coleção do Laboratório de Biopolímeros, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), São José do Rio Preto/SP.

4.2 Meio de manutenção dos microrganismos

A viabilidade dos microrganismos foi mantida por meio de repiques periódicos a cada 90 dias em tubos inclinados contendo meio ágar batata-dextrose (PDA), pH $5,6 \pm 0,2$, adicionados de 1% de glicerina (v/v). Os tubos foram previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos e, posteriormente, mantidos sob refrigeração a 4°C.

4.3 Produção de biossurfactante

4.3.1 Preparo do inóculo para a fermentação

A propagação dos fungos foi realizada em tubos de ensaio inclinados incubados a 25°C contendo 7 mL de meio PDA, pH $5,6 \pm 0,2$, durante um período de sete dias. Posteriormente, os esporos foram suspensos em solução nutriente até que atingissem uma concentração de aproximadamente $1,7 \cdot 10^6$ esporos/mL, sendo que esta foi determinada em testes anteriores como adequada para o cultivo. A concentração de células foi determinada por meio de contagem em câmara de Neubauer. A solução nutriente citada foi composta por (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NaNO_3 (3,0), KH_2PO_4 (1,0), extrato de levedura (1,0) e peptona (0,3) e pH de 5,3 (CASTIGLIONE et al, 2009). Esta suspensão foi utilizada como inóculo do cultivo.

4.3.2 Fermentação

4.3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar como substrato

Para a produção do biossurfactante utilizando o bagaço de cana como substrato foram utilizados frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo porções de cinco gramas de bagaço de cana em todos os experimentos. Foram analisadas nesses experimentos quatro fontes de carbono distintas: glicose, óleo diesel, óleo residual de fritura e sacarose “in natura”. O bagaço de cana foi doado pela Usina de Açúcar e Alcool São Domingos – Catanduva/SP e o óleo diesel foi adquirido no comércio local.

4.3.2.1.1 Influência da sacarose “in natura” na produção de biossurfactante

Para avaliar a influência da sacarose “in natura”, o bagaço de cana passou pela extração da sacarose por maceração. Para isto, foram realizadas duas lavagens do bagaço, intercalados por período de descanso de uma hora. Desta forma foram obtidas três diferentes porções de bagaço de cana, o bagaço sem lavagem, com uma lavagem e com duas lavagens. A concentração da sacarose foi determinada pelo método de Dubois et al., 1956 na água de maceração a cada intervalo. Posteriormente, o substrato foi seco em estufa a 55°C e moído no triturador Trapp Trf 400, sendo selecionadas as partículas de até 2 mm de diâmetro. A seguir, as porções de bagaço de cana com diferentes tempos de maceração foram umedificadas com 30 mL da solução nutriente contendo o inóculo e incubadas a 25°C durante 72, 120 e 168 horas. Em cada etapa foram realizadas as determinações analíticas descritas no item 4.4.

4.3.2.1.2 Influência da glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel na produção de biossurfactante

Para avaliar a influência da glicose, do óleo residual de fritura e do óleo diesel como fontes de carbono na produção de biossurfactante, foram utilizadas porções de bagaço de cana-de-açúcar isentas de sacarose, conforme exposto no item 4.3.2.1. Após a extração da sacarose, secagem, trituração e esterilização dos frascos, as porções foram umedificadas com 30 mL de solução nutriente contendo o inóculo, sendo adicionada à suspensão a fonte adicional de carbono testada (glicose, óleo residual de fritura ou óleo diesel) na proporção de 1% (w/w), em experimentos separados. Os experimentos foram realizados em triplicata,

incubados a 25°C e pH 5,3. As determinações analíticas descritas no item 4.4 foram realizadas em intervalos de fermentação de 72, 120 e 168 horas.

4.3.2.2 Farelo de trigo como substrato

Para avaliarmos a influência do farelo de trigo como substrato na produção de biossurfactantes foram realizados experimentos utilizando frascos de Erlenmeyers de 250 mL contendo cinco gramas de farelo de trigo. O farelo de trigo foi lavado em água corrente e seco em estufa a 55°C. As porções de farelo foram umidificadas com 30 mL da solução, contendo a fonte adicional de carbono a ser testada na concentração de 1 % (w/w) e o inoculo acima referido e foram incubadas a 25°C e pH 5,3. Nesse caso foram testadas sacarose, glicose, óleo diesel e óleo residual de fritura como fontes de carbono. As determinações analíticas foram realizadas também em intervalos de 72, 120 e 168 horas.

4.3.2.3 Mistura de substrato

Com o objetivo de obtermos melhores resultados foram realizados dois ensaios utilizando a mistura dos substratos farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar. Estes foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo cinco gramas de substrato, 60% de farelo de trigo (três gramas) para 40% de bagaço de cana (duas gramas) e, em outro ensaio, 40% de farelo de trigo para 60% de bagaço de cana. As porções de substrato foram umidificadas com 30 mL da solução, contendo o inoculo escolhido e a fonte adicional de carbono que se destacou nos experimentos anteriores na concentração de 1 % (w/w), incubadas a 25°C e pH 5,3. As determinações analíticas foram realizadas em intervalos de 72, 120 e 168 horas e os ensaios foram conduzidos em triplicata.

4.3.3 Preparo do extrato bruto de fermentação

O preparo do extrato bruto foi realizado após cada período de fermentação. Para a extração foi utilizada água destilada aquecida a 50°C na proporção 1:5 (1 parte de soluto para 5 partes de solvente). Após a adição do solvente, a amostra foi submetida à agitação em agitador orbital rotatório (Marca MARCONI modelo MA 830) a 160 rpm e 50°C por 60 minutos. A seguir, as amostras foram filtradas em tecido “voal” para a separação de partículas maiores e, posteriormente, o caldo resultante da filtração foi centrifugado a 7700 G por 15

minutos a 4°C. Após a centrifugação e decantação, o sobrenadante foi selecionado para as análises descritas no item 4.4.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada medindo-se diretamente um volume de 10 mL do extrato bruto em um tensiômetro de Leconde Du Nouy na temperatura de 25°C (BICCA; FLECK; AYUB, 1999).

4.4.2 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado por meio da adição de 2 mL de tolueno em tubos de ensaio 100 x 15 mm com 3,5 mL do extrato bruto obtido após a centrifugação. Os tubos foram submetidos à agitação em vortex durante 2 minutos. Em seguida foi realizada a leitura das colunas formadas e da camada de emulsão nos tempos de 10 minutos (t0), 24, 48, 72 e 96 horas (t1, t2, t3 e t4) (BICCA; FLECK; AYUB, 1999).

O índice de emulsificação foi calculado segundo Iqbal e colaboradores (1995): $IE = (\text{altura da camada de emulsão (mm)} / \text{altura total da amostra (mm)}) \times 100$.

4.4.3 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada pela diluição do caldo de fermentação livre de células em água destilada até alcançar a concentração na qual o biossurfactante começa a se agregar e não é mais observada significativa redução da tensão superficial.

A determinação da CMC foi dada por um gráfico da tensão superficial versus concentração do biossurfactante no ponto de inflexão da curva (KIM et al., 2000).

4.5 Precipitação do biossurfactante do caldo de fermentação

Para a determinação da produção bruta de biossurfactante foi realizada a precipitação do caldo de fermentação. Para isso, 15 mL do sobrenadante resultante da centrifugação (caldo

de fermentação) foram colocados em frascos previamente pesados. O produto bruto foi separado por precipitação com etanol absoluto (1:3 v/v) e em seguida mantido em repouso por dois dias à temperatura de 4°C. Posteriormente, foi seco em estufa a 55°C até peso constante. No caso de formação de precipitado viscoso foi realizada nova precipitação. Vale ressaltar que não é possível garantir que todo o produto precipitado é um surfactante, por este motivo o resultado é expresso como produção bruta. O rendimento do biossurfactante foi expresso em g/L.

4.6 Potencial para biorremediação

Para a avaliação de biorremediação de solo ou água contaminados foram testados dois tipos de biorremediação, o primeiro por meio de aplicação do biossurfactante no local contaminado e o segundo “in situ”, por meio da inoculação dos fungos no foco da contaminação.

Para a realização do teste foi utilizado o fungo e o biossurfactante com melhor eficiência nos testes anteriores.

4.6.1 Biorremediação de solo contaminado com óleo de motor e óleo residual de fritura

Para a avaliação da capacidade de remoção do óleo diesel e óleo residual de fritura em solo contaminado utilizando o biossurfactante produzido pelos fungos foram utilizadas porções de 60 gramas de areia grossa misturada com 5 mL de óleo residual de fritura ou óleo de motor, em experimentos separados. Porções de 20g desta areia contaminada foram colocadas em placas de petri contendo 10 mL do extrato bruto dos biossurfactantes produzidos pelos dois fungos. Estas placas permaneceram em repouso por 24 e 168 horas e foram submetidas à análise visual para observação ou não da liquefação do contaminante.

Para a verificação ou não da biorremediação “in situ”, porções de 20g de areia contaminada com óleo de motor e óleo residual de fritura, em experimentos separados, foram colocadas com 10 mL das suspensões contendo um dos dois diferentes fungos, incubadas a 25°C por 24 e 168 horas. Posteriormente foram submetidas à análise visual para observação ou não da liquefação do contaminante.

Todas as análises foram realizadas em duplicata e foi utilizado um controle com a ausência do biossurfactante ou do fungo em questão.

4.6.2 Biorremediação de água contaminada com óleo diesel e óleo residual de fritura

Para a verificação de remoção de óleo da água pelos biossurfactantes produzidos, porções de 5 mL de extrato bruto dos biossurfactantes foram colocadas em tubos de ensaio com 5 mL de água contaminada com óleo de fritura e óleo de motor, em experimentos separados, agitadas em agitador de tubos em velocidade máxima por 2 minutos e mantidas em repouso por 24 e 168 horas para análise macroscópica. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Já para a avaliação do efeito dos microrganismos “in situ” foram colocados em tubos de ensaio 5 mL de soluções de um dos dois diferentes inóculos $1,7 \cdot 10^6$ esporos/mL juntamente com 5 mL de água contaminada com o óleo de motor ou óleo residual de fritura e incubados a 25 °C por 24 horas, 7, 14 e 21 dias. Todas as análises foram realizadas em duplicata e foi utilizado um controle com a ausência do biossurfactante ou do microrganismo.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos sofreram análise exploratória para a verificação de valores atípicos (“outliers”). Posteriormente, as variáveis fonte adicional de carbono e tempo de fermentação sofreram análise de variância ANOVA para os diferentes tratamentos utilizando o software Minitab 15.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Bagaço de cana-de-açúcar como substrato

6.1.1 Influência da glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel na produção de biossurfactantes

Tensão superficial

A determinação da tensão superficial é um importante parâmetro para indicar a presença do biossurfactante no caldo de fermentação. Quanto mais eficiente for o biossurfactante, menor será o seu valor. Nas Figuras 1 e 2 estão representados os valores obtidos nos experimentos utilizando bagaço de cana-de-açúcar e as fontes de carbono glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel, utilizando como inóculo os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum*, respectivamente. O valor de tensão superficial inicial foi determinado na solução nutriente utilizada, antes do início dos experimentos. Em geral, foi possível observar que tanto as fontes de carbono (indutores) quanto o inóculo tiveram influência sobre a redução da tensão superficial. As médias e desvios padrão, analisados pelo teste de Tukey, podem ser observados no Anexo I (Tabelas 32 e 33).

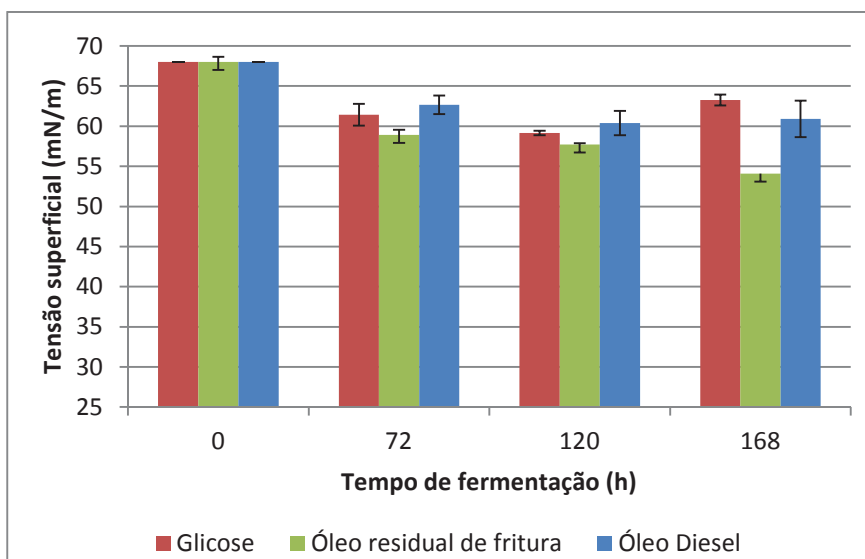


Figura 1. Tensão superficial (mN/m) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, determinada a 28°C, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

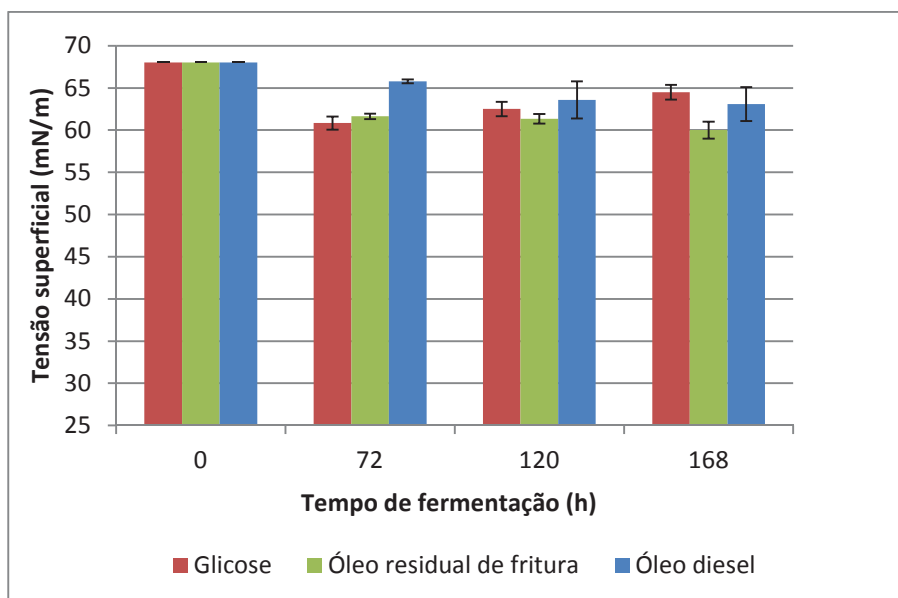


Figura 2. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, determinada a 28°C utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato.

Nos experimentos utilizando *A. ochraceus* (Figura 1), o menor valor de tensão superficial encontrado foi de 52,9 mN/m, para o biossurfactante utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono em 168h de fermentação. Este indutor apresentou os menores valores de tensão superficial para todos os tempos de fermentação, enquanto que o óleo diesel apresentou os maiores valores; a glicose apresentou-se intermediária nos tempos 72 e 120h e apresentou valor significativamente semelhante ao óleo diesel em 168h. Em relação aos diferentes tempos de fermentação, o indutor óleo residual de fritura apresentou significativa redução da tensão com o tempo, o óleo diesel não apresentou redução significativa e a glicose apresentou declínio nas primeiras 120h e posterior aumento da tensão superficial. Tendo em vista que a glicose é uma fonte de carbono facilmente assimilável, é possível que a redução inicial se deva à facilidade do microrganismo em metabolizar a glicose, produzindo biossurfactante e reduzindo a tensão superficial. Posteriormente, com a diminuição da concentração de glicose disponível, o microrganismo poderia diminuir a produção de biossurfactante pelo fato de poder estar utilizando outras fontes de carbono disponíveis como a peptona e o extrato de levedura, contidos na solução nutritiva, utilizando as proteases produzidas durante este período.

A Figura 2 apresenta os valores obtidos para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*. O menor valor encontrado foi de 60,0 mN/m, utilizando óleo residual de fritura. Tanto o óleo residual como o óleo diesel apresentaram redução significativa da tensão com

relação ao tempo. Já para a glicose foi novamente observada uma redução inicial e posterior aumento da tensão superficial, assim como ocorreu para o fungo *A. ochraceus*.

Índice de emulsificação

O índice de emulsificação analisa se o biossurfactante possui a propriedade de emulsificação, assim como a estabilidade das emulsões formadas com o tempo. O IE₂₄, que analisa a estabilidade das emulsões após 24h de repouso, é amplamente utilizado para este fim. Porém, no presente trabalho o IE₂₄ foi complementado pela análise da emulsão em diferentes tempos de repouso, 10 min, 24, 48, 72 e 96h (t_0 , t_1 , t_2 , t_3 e t_4).

Analizando o IE₂₄ para os biossurfactantes produzidos com *A. ochraceus*, o maior valor encontrado foi de 44,21% de emulsão, utilizando o óleo diesel como indutor (Figura 3). Este indutor foi capaz de formar emulsões estáveis a partir de 120h de fermentação e apresentou um significativo aumento em 168h. O surfactante produzido com óleo de fritura também produziu emulsão estável apenas em 120h de fermentação, porém este valor permaneceu constante com o tempo. Já para a glicose foi observada emulsão estável apenas em 168h de fermentação. Quando analisada a estabilidade das emulsões (Tabelas 2, 3 e 4), a emulsão proveniente do óleo diesel e 168h de fermentação permanece estável e acima de 30% a partir de t_2 ; nas emulsões provenientes do óleo residual, com 120 e 168h de fermentação, é observado leve decréscimo da emulsão até 17,66% e 20,13% em t_4 e para a glicose, a emulsão com 168h decresce até 8,28% em t_4 .

Para *P. expansum*, conforme a Figura 4 foi possível observar que o IE₂₄ sofreu aumento significativo com o tempo para todas as fontes de carbono e o maior valor obtido foi de 45,79% para óleo residual em 168h. Analisando a estabilidade das emulsões (Tabelas 5, 6 e 7), apenas o biossurfactante produzido com glicose apresentou considerável estabilidade, pois apesar dos valores, em 168h de fermentação, apresentarem leve decréscimo com o tempo, em t_4 foi ainda observado IE superior à 20%. Para os outros indutores, a partir de t_2 os valores foram inferiores a 10%.

Os valores das médias seguidos pelo desvio padrão e análise de Tukey podem ser observados no Anexo I (Tabelas 34 e 35)

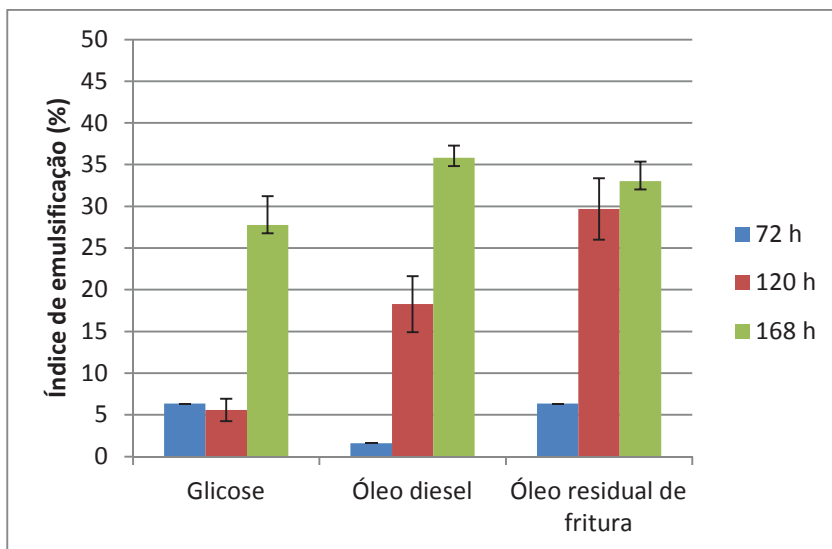


Figura 3. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

Tabela 2. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	31,33 ±1,17 Ba	4,76 ±0 Aa	4,76 ±0 Aa	4,76 ±0 Aa	4,76 ±0 Aa
120h	44,4 ±0,73 Bb	5,59 ±1,34 Aa	5,59 ±1,34 Aa	4,8 ±0,07 Aa	4,8 ±0,07 Aa
168h	47,62 ±2,06 Db	27,77 ±3,46 Cb	19,07 ±2,67 Bb	15,09 ±2,78 Abb	8,28 ±3,37 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 3. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	41,2 ±1,66 Ba	4,76 ±0 Aa	4,76 ±0 Aa	4,76 ±0 Aa	4,76 ±0 Aa
120h	44,58 ±2,15 Bab	28,68 ±7,18 Abb	24,87 ±8,38 Ab	24,89 ±7,72 Ab	17,66 ±7,73 Aab
168h	45,97 ±0,64 Cb	33,04 ±2,31 Bb	26,6 ±4,04 Abb	24,16 ±4,53 Ab	20,13 ±3,41 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 4. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	41,14 ±3,04 Ba	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
120h	43,17 ±3,59 Ca	26,19 ±2,38 Bb	22,22 ±3,64 Bb	10,64 ±3,57 Ab	9,52 ±2,38 Ab
168h	45,76 ±1,73 Ba	44,21 ±1,03 Abc	43,01 ±0,16 Ac	41,89 ±0,97 Ac	41,89 ±0,97 Ac

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

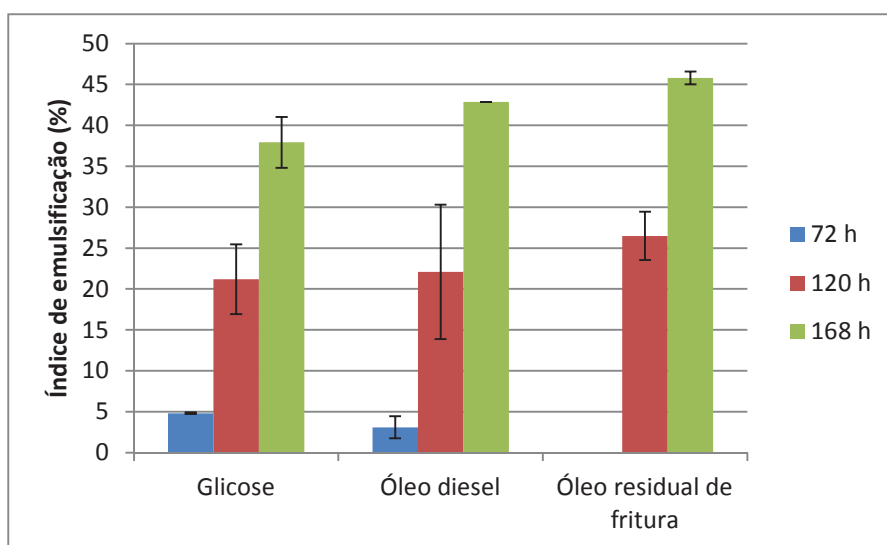


Figura 4. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

Tabela 5. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	26,19 ±0 Ca	4,82 ±0,06 Ba	4,8 ±0,07 Ba	4,8 ±0,07 Ba	3,55 ±1,26 Aa
120h	44,46 ±1,93 Db	21,19 ±4,26 Cb	13,25 ±8,05 BCa	4,7 ±6,13 ABa	1,21 ±1,22 Aa
168h	45,16 ±6,1 Bb	37,92 ±3,1AB c	35,52 ±4,14 ABb	33,14 ±8,18 ABb	26,73 ±7,55 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 6. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	29,4 ±0,83 Ba	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
120h	42,71 ±1,94 Cb	26,49 ±2,09 Bb	0,83 ±1,43 Aab	0 Aa	0 Aa
168h	44,41 ±2,44 Cb	45,79 ±0,55 Cc	3,57 ±1,16 Bb	0 Aa	0 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 7. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	24,4 ±1,16 Ca	3,1 ±1,34 Ba	2,33 ±0 Bb	0 Aa	0 Aa
120h	39,05 ±1,43 Cb	22,1 ±5,81 Bb	1,19 ±1,19 Aab	0 Aa	0 Aa
168h	45,6 ±2,6 Bc	42,85 ±0,01 Bc	0 Aa	0 Aa	0 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Produção bruta do biossurfactante

Para a determinação da produção de biossurfactante foi utilizada a precipitação em etanol e secagem do precipitado até peso constante. Visto que o produto não foi purificado e pode conter impurezas como açúcares, foi utilizada a nomenclatura “produção bruta” para o precipitado obtido.

Diferentemente dos resultados observados para os outros parâmetros analisados, em geral, a produção bruta demonstrou não sofrer influencia tanto do tempo de fermentação quanto das diferentes fontes de carbono.

Para *A. ochraceus* (Tabela 8), apenas o óleo de fritura apresentou aumento significativo em relação ao tempo de fermentação. O maior valor obtido foi de 2,46 g/L utilizando o óleo residual como indutor em 168h. No caso da glicose, apesar da redução da produção com o tempo não ser significativa, esta concorda com a diferença observada para a tensão superficial desses surfactantes.

Da mesma forma, utilizando *P. expansum*, apenas para o tempo 120h foi observada uma pequena diferença em relação às fontes de carbono utilizadas, sendo que o maior valor obtido foi de 2,23 g/L para glicose em 120h de fermentação (Tabela 9).

Tabela 8. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72h	1,45 ±0,29 Aa	1,66 ±0,36 Aa	1,75 ±0,25 Aa
120h	1,29 ±0,70 Aa	2,15 ±0,12 Aab	2,12 ±0,43 Aa
168h	1,23 ±0,78 Aa	2,46 ±0,23 Ab	1,76 ±0,25 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 9. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72h	2,15 ±0,23 Aa	2,03 ±0,81 Aa	2,10 ±0,39 Ab
120h	2,23 ±0,50 Ba	1,93 ±0,66 ABa	0,95 ±0,09 Aa
168h	2,03 ±1,1 Aa	1,61 ±0,35 Aa	2,20 ±0,45 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Concentração Micelar Crítica (CMC)

Determinar a CMC é de fundamental importância para quaisquer processos envolvendo tensoativos, pois o efeito desses compostos é maior quando uma quantidade significativa de micelas encontra-se presente, portanto, quanto menor seu valor melhor é o surfactante.

Os valores de CMC obtidos para os surfactantes produzidos em bagaço de cana e *A. ochraceus* foram 0,13, 0,26 e 0,29 para glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel, respectivamente (Figuras 5, 6 e 7). De acordo com Mulligan e colaboradores (2001) esses valores devem variar de 0,001 a 2 g/L. dessa forma, todos os tensoativos obtidos apresentaram um bom valor de CMC e o biossurfactante proveniente de óleo residual foi considerado mais uma vez como o melhor dentre os produzidos.

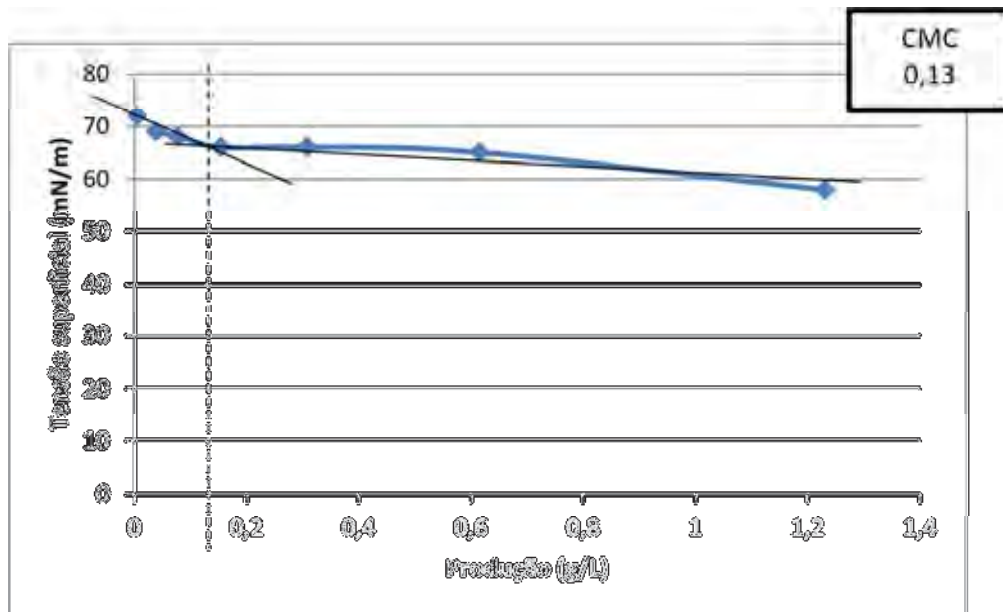


Figura 5. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

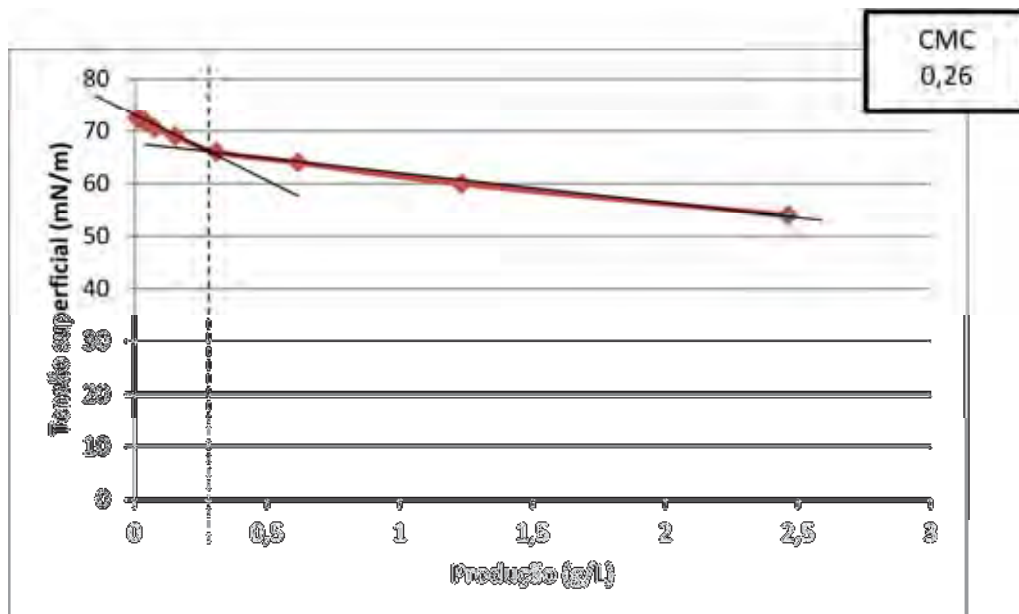


Figura 6. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

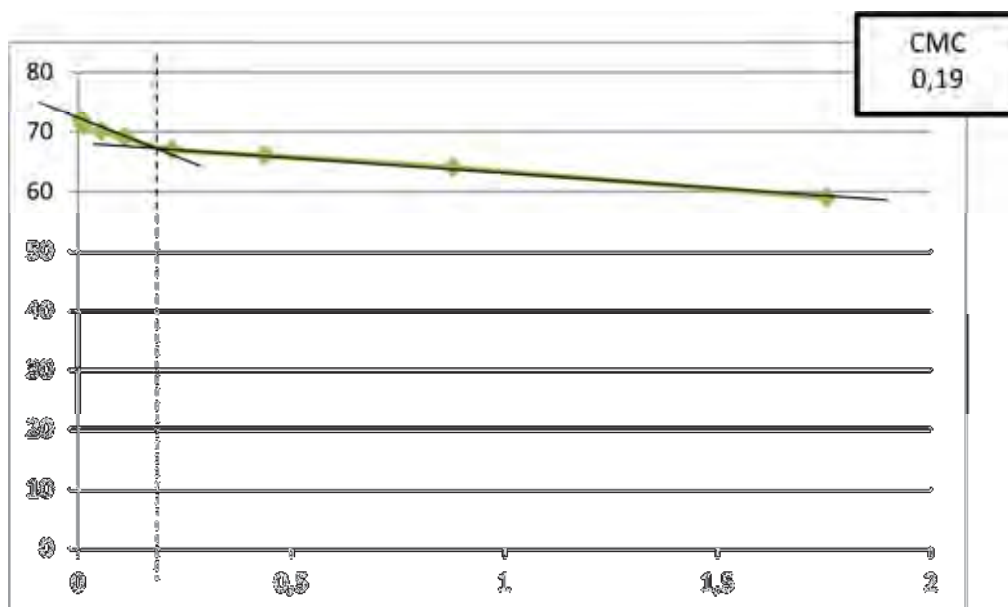


Figura 7. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

Para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, os valores de CMC encontrados foram de 0,12, 0,23 e 0,11, para glicose, óleo residual de fritura e óleo diesel, respectivamente (Figuras 8, 9 e 10). Novamente os valores encontrados ficaram dentro do intervalo considerado ideal.

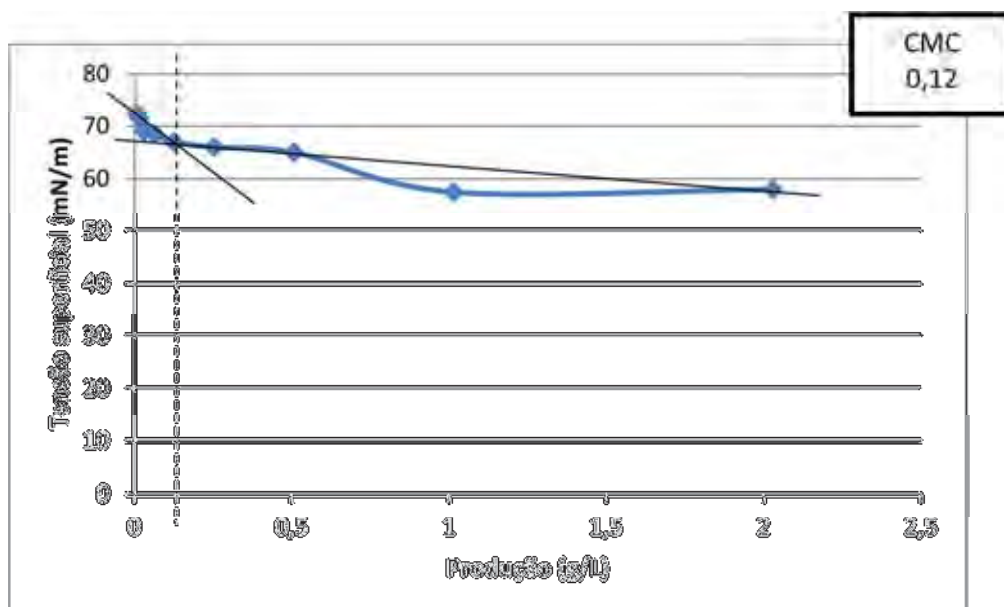


Figura 8. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *P. expansum*.

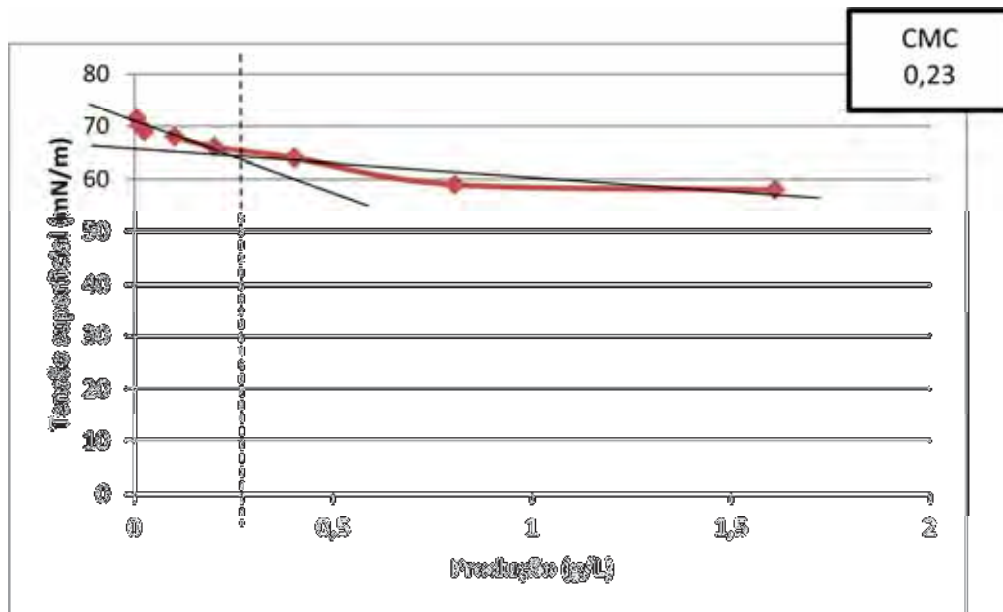


Figura 9. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *P. expansum*

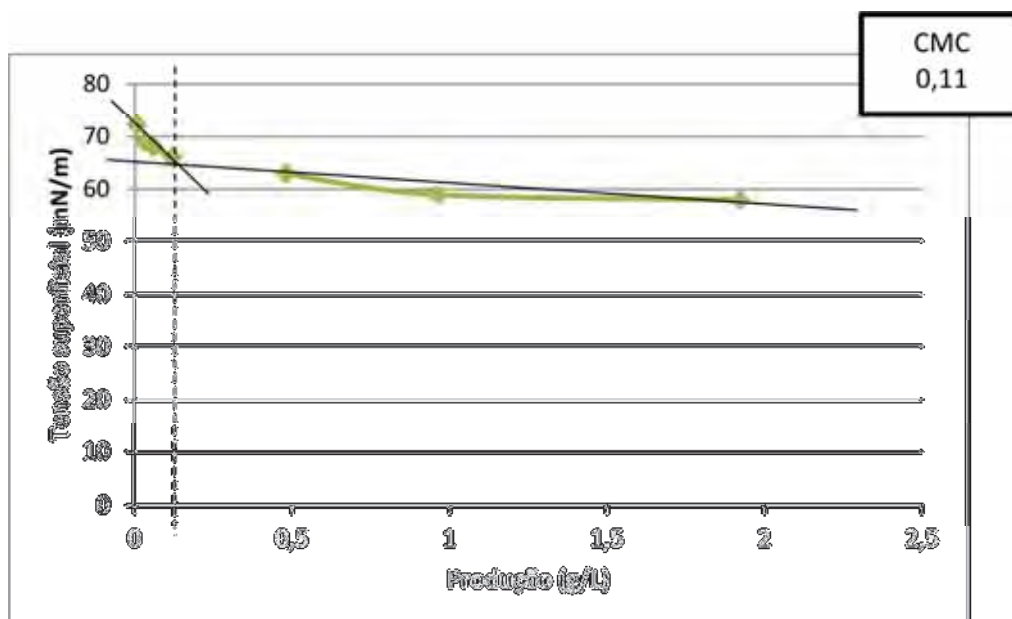


Figura 10. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo diesel como fonte de carbono e bagaço de cana como substrato pelo fungo *P. expansum*.

6.1.2 Influência da sacarose “in natura” na produção de biossurfactantes

Tensão superficial

Para *P. expansum*, os resultados obtidos para tensão superficial apresentaram pequenas variações com relação às diferentes lavagens e diferentes tempos de fermentação (Figura 11). Os melhores resultados foram obtidos no tratamento com duas lavagens, sendo o menor valor encontrado 57,33 mN/m, com 72h de fermentação. Estes resultados podem demonstrar que altas concentrações de açúcar poderiam interferir no crescimento no microrganismo e, consequentemente, na produção de biossurfactante. Em comparação com os experimentos que utilizaram bagaço de cana lavado e outras fontes de carbono, os resultados também se apresentaram semelhantes.

Nos experimentos realizados com o fungo *A. ochraceus*, os valores de tensão superficial obtidos apresentaram diferenças significativas com relação ao tempo de fermentação, porém com um comportamento não usual, alternando aumento e diminuição da tensão superficial, conforme Figura 12. Ainda, não foram obtidos valores semelhantes aos obtidos com outras fontes de carbono. O menor valor obtido foi com o tratamento de duas lavagens e 120 horas de fermentação, 58 mN/m.

As médias e desvios padrão, analisados pelo teste de Tukey, podem ser observados no Anexo I (Tabelas 36 e 37).

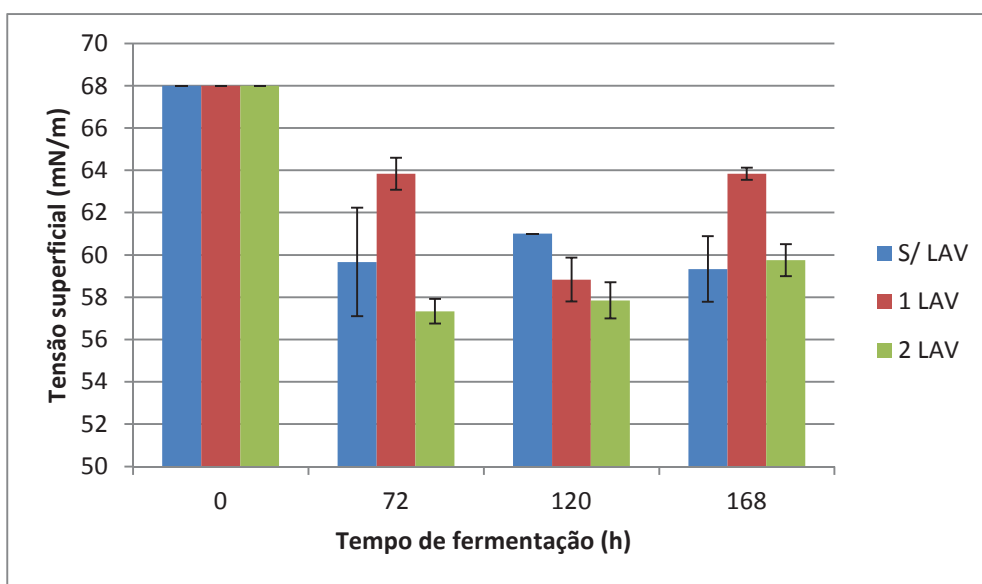


Figura 11. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, determinada a 28°C utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.

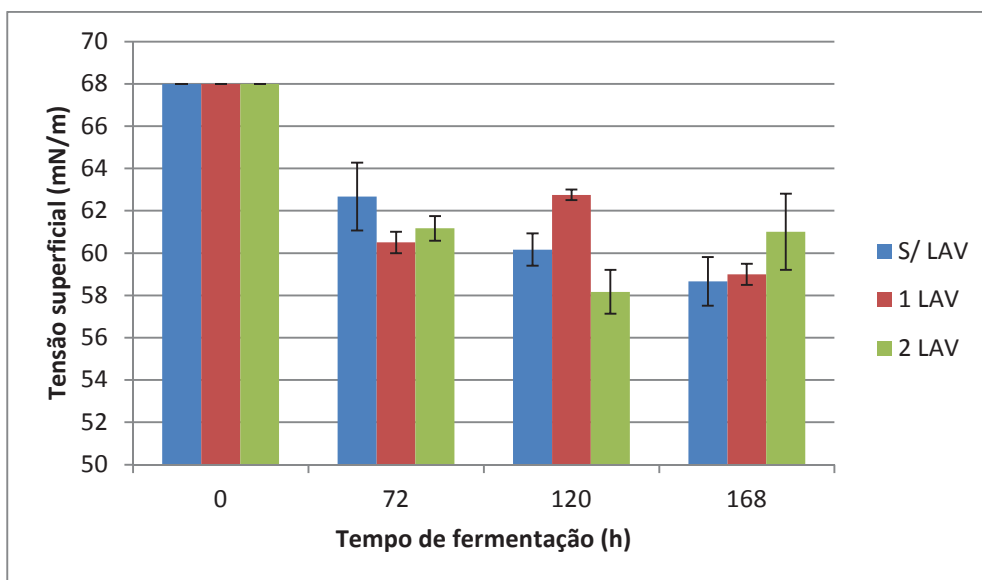


Figura 12. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, determinada a 28°C utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.

Índice de emulsificação

Para *P. expansum*, o índice de emulsificação IE₂₄ foi próximo a zero, em geral. Apenas o experimento sem lavagem e com 168h de fermentação apresentou emulsão estável por 24h (Figura 13). Desta forma, não houve estabilidade das emulsões após t₀, como pode ser observado nas tabelas 10, 11 e 12.

Já nos experimentos utilizando *A. ochraceus* como inoculo, foi observado significativo aumento de estabilidade com o tempo, semelhante ao comportamento com outras fontes de carbono (Figura 14). O maior valor encontrado foi de 47%, com uma lavagem e 120h de fermentação. Ainda, as emulsões foram mais estáveis com relação aos experimentos anteriores, com outras fontes de carbono (Tabelas 13, 14 e 15).

As médias e desvios padrão, para o IE₂₄, analisados pelo teste de Tukey, podem ser observados no Anexo I (Tabelas 38 e 39).

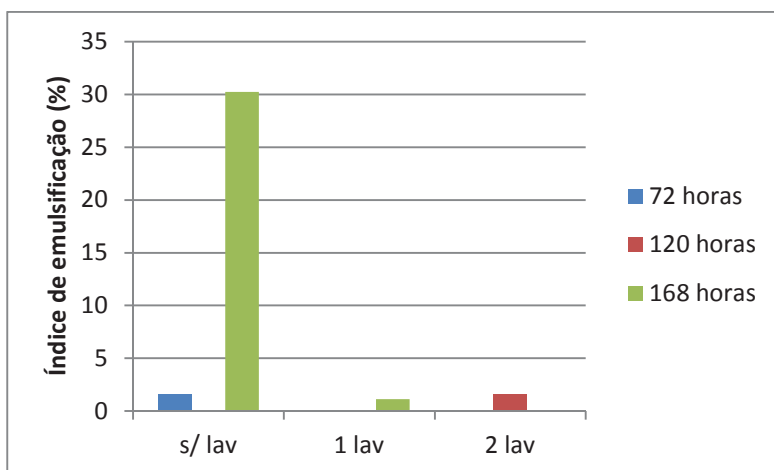


Figura 13. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, com diferentes lavagens, determinada a 27°C.

Tabela 10. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana como substrato, sem lavagem do substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	1,55 ±1,34 Aa	1,55 ±1,34 Aa	0,76 ±1,31 Aa	0,76 ±1,31 Aa	0,76 ±1,31 Aa
120h	27,93 ±2,75 Bb	0 ±0 A a	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa
168h	43,85 ±0,58 Ac	27,66 ±5,88 Bb	22,29 ±3,3 BCb	15,35 ±4,57 CDb	8,4 ±6,5 Da

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 11. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana, lavado uma única vez.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	30,23 ±8,39 Ba	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa
120h	29,64 ±10,59 Ba	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa
168h	42,78 ±2,37 Ba	1,13 ±1,13 Aa	1,13 ±1,13 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 12. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana como substrato, com lavagem dupla.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	14,55 ±12,63 Ba	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa
120h	42,21 ±2,87 Ab	1,55 ±2,68 Aa	1,55 ±2,68 Aa	1,55 ±2,68 Aa	1,55 ±2,68 Aa
168h	45,45 ±0 Bb	4,54 ±7,87 Aa	2,27 ±3,92 Aa	0,75 1,31 Aa	0 ±0 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

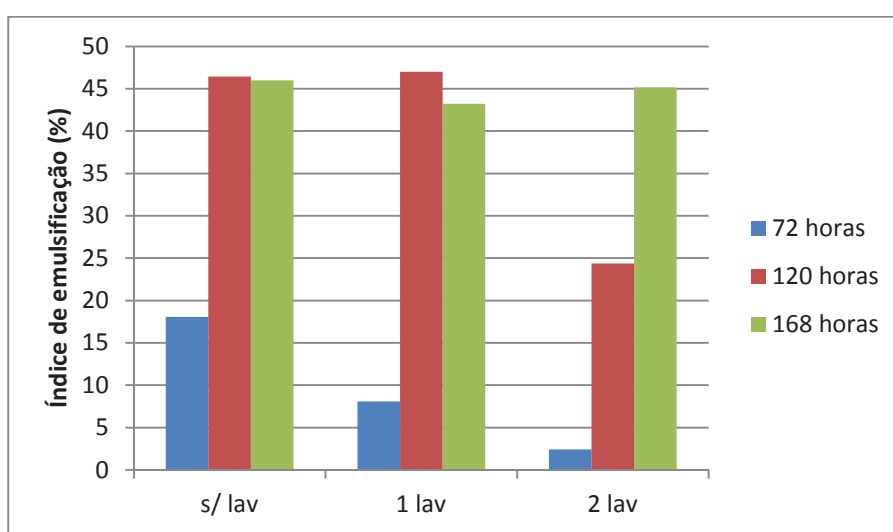


Figura 14. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, com diferentes lavagens, determinada a 27°C.

Tabela 13. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, sem lavagem do substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	49,59 ±0,7 Ca	18,06 ±0,99 Ba	10,83 ±1,07 Aa	9,64 ±0,12 Aa	9,64 ±0,12 Aa
120h	50,39 ±0,67 Bab	46,42 ±1,13 Ab	44,8 ±0,55 Ab	44,8 ±0,55 Ab	44,8 ±0,55 Ab
168h	52,42 ±1,22 Bb	45,98 ±1,78 ABb	45,59 ±2,44 ABb	44,79 ±3,78 ABb	41,99 ±5,57 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 14. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana, lavado uma única vez.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	49,4 ±1,04 Ba	8,08 ±3,58 Aa	7,28 ±2,4 Aa	7,28 ±2,4 Aa	7,28 ±2,4 Aa
120h	51,8 ±0,58 Bb	46,98 ±0,64 Ab	46,98 ±0,64 Ab	46,98 ±0,64 Ab	46,98 ±0,64 Ab
168h	51,84 ±0,64 Bb	43,23 ±2,95 ABb	39,92 ±6,8 Ab	39,92 ±6,8 Ab	43,6 ±2,16 ABb

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 15. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana, com dupla lavagem.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	48,6 ±0,34 Ba	2,43 ±2,44 Aa	2,43 ±2,44 Aa	2,43 ±2,44 Aa	0,8 ±1,38 Aa
120h	51,62 ±1,87 Bb	24,39 ±23,27 ABab	6,09 ±6,09 Aa	4,85 ±4,87 Aa	3,67 ±3,66 Aa
168h	51,61 ±0,67 Ab	45,14 ±3,25 Ab	43,92 ±4,42 Ab	42,31 ±4,96 Ab	40,28 ±7,46 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Produção bruta do biossurfactante

Com relação à produção bruta, para *P. expansum* foram observados resultados maiores nos experimentos sem lavagem do substrato ou com apenas uma lavagem. Este resultado demonstra uma possível detecção de açúcar mesmo após a precipitação, presente em maior concentração nos tratamentos citados. O experimento que utilizou bagaço de cana lavado duas vezes apresentou valores de produção semelhantes àqueles encontrados nos experimentos com outras fontes de carbono (Tabelas 16). Já para *A. ochraceus*, a produção bruta, desta vez, foi maior para o tratamento com duas lavagens e foi observada pouca variação com relação ao tempo de fermentação, conforme tabela 17.

Tabela 16. Produção bruta (g/L) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.

	Sem lavagem	1 lavagem	2 lavagens
72 h	0,96 ±0,15 Aa	1,16 ±0,12 ABa	1,77 ±0,5 Ba
120 h	1,55 ±0 Ab	1,12 ±0,17 Aa	2,03 ±0,66 Aa
168 h	1,51 ±0,38 Ab	1,29 ±0,2 Aa	1,71 ±0,01 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 17. Produção bruta (g/L) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana como substrato, em diferentes lavagens.

	Sem lavagem	1 lavagem	2 lavagens
72 h	3,05 $\pm$ 0,73 Aa	2,6 $\pm$ 0,42 Aa	2,03 $\pm$ 0,5 Aa
120 h	2,6 $\pm$ 0,06 Ba	2,82 $\pm$ 0,1 Ba	1,88 $\pm$ 0,22 Aa
168 h	1,97 $\pm$ 0,07 Aa	2,41 $\pm$ 0,27 Aa	2,0 $\pm$ 0,31 Aa

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em geral, foi possível observar que as diferentes lavagens do bagaço de cana tiveram pouca influência sobre o biossurfactante produzido, principalmente para o fungo *P. expansum*. Quando foi possível observar diferenças significativas, em geral, o tratamento com duas lavagens apresentou melhores resultados.

A lavagem do bagaço, além de facilitar o crescimento do microrganismo, por eliminar sujidades e concentrações inibitórias de sacarose, permitiu a padronização do bagaço de cana com relação à fonte de carbono a ser utilizada, o que contribui para a diminuição da incerteza e aumenta a confiabilidade nos resultados.

A concentração de sacarose, estimada pelo método de Dubois et al., 1956, é apresentada no ANEXO II.

6.2 Farelo de trigo como substrato

Tensão superficial

Para os experimentos realizados utilizando o inóculo *A. ochraceus* e farelo de trigo, o tempo de fermentação teve pequena influência sobre a redução da tensão superficial. O menor valor encontrado foi de 39,5 mN/m, novamente utilizando o óleo residual de fritura em 168h de fermentação (Figura 15). Os biossurfactantes produzidos utilizando óleo residual de fritura e glicose apresentaram valores de tensão superficial semelhantes entre si e entre os diferentes tempo de fermentação, além de serem inferiores aos valores obtidos com a sacarose e óleo diesel. Estes últimos, também apresentaram valores semelhantes entre si, exceto para o tempo 120h; apresentaram significativa redução da tensão superficial com relação ao tempo de fermentação, porém não alcançaram os valores obtidos pela glicose e óleo residual. Levando em conta que o tempo de fermentação é um fator importante no processo industrial, os biossurfactantes produzidos utilizando o farelo de trigo como substrato e a glicose e óleo

residual seriam mais eficientes, visto que em apenas 72h de fermentação apresentam uma redução da tensão superficial superior aos surfactantes provenientes do bagaço de cana.

Os valores obtidos utilizando *P. expansum* podem ser observados na Figura 16. Nesta foi observada diminuição dos valores com o tempo para todos os indutores. Os valores observados para o óleo diesel e óleo residual foram semelhantes e inferiores aos outros indutores em todos os tempos de fermentação. Além disso, todos os valores obtidos em 72h de fermentação foram muito inferiores aos valores finais obtidos em bagaço de cana. O menor valor alcançado foi de 33,5 mN/m, para óleo residual de fritura em 168h, o que representa redução de 46% em relação à tensão da água (78 mN/n). Segundo Desai e Banat (1997) bons surfactantes devem reduzir a tensão superficial abaixo de 40 mN/n e em torno de 35,5 mN/m. Dessa forma, todos os biossurfactantes produzidos com este substrato e 168h de fermentação podem ser considerados eficientes.

As médias e desvios padrão, para a tensão superficial em farelo de trigo, analisados pelo teste de Tukey, podem ser observados no Anexo I (Tabelas 40 e 41).

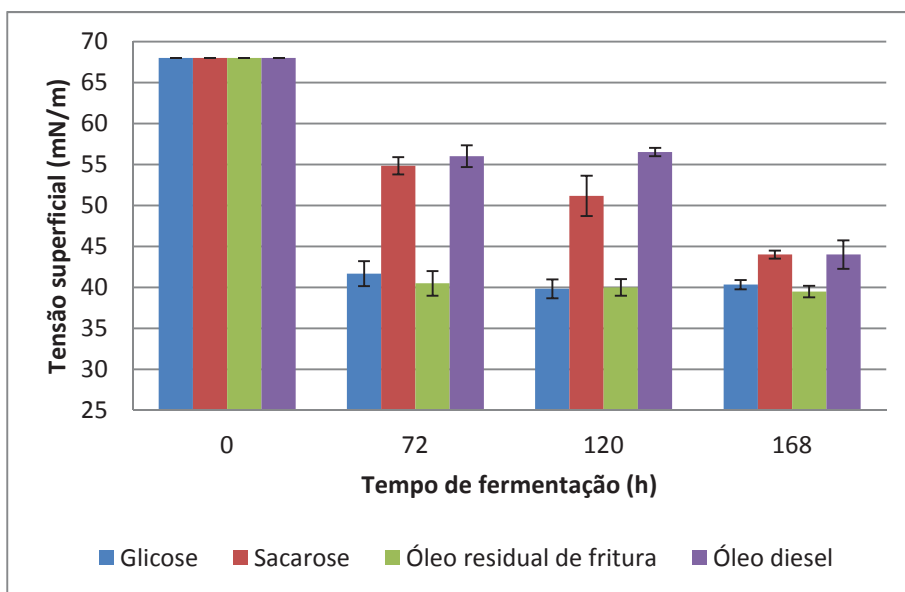


Figura 15. Tensão superficial (mN/m) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, determinada a 28°C, utilizando farelo de trigo como substrato.

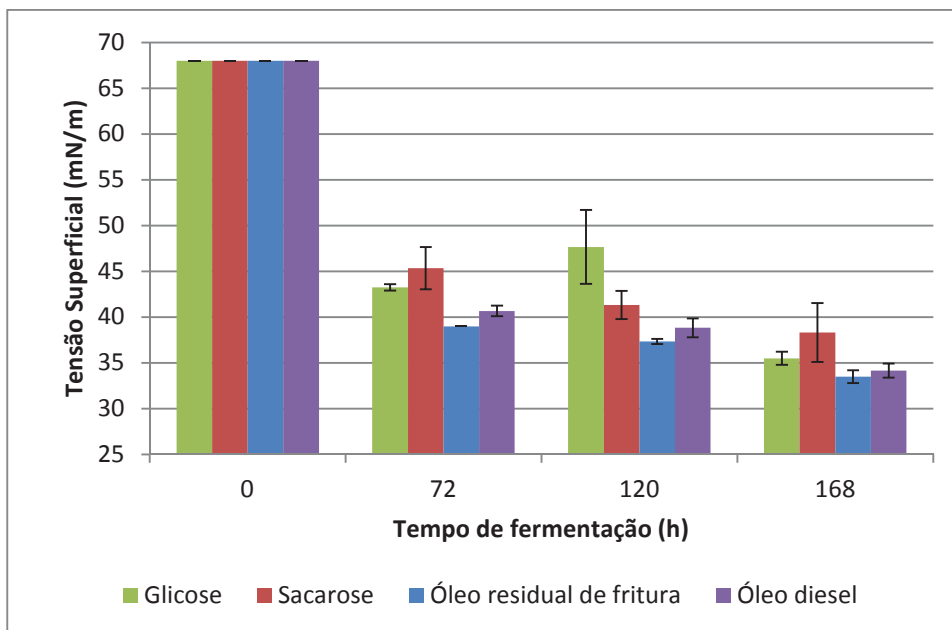


Figura 16. Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, determinada a 28°C utilizando farelo de trigo como substrato.

Veenanadig e colaboradores (2000) produziram biossurfactantes em FSS utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* e farelo de trigo como substrato e encontraram valores de tensão superficial de até 24 mN/m. A diferença observada neste trabalho pode ser devido a utilização de microrganismos com estruturas e características muito distintas como fungos filamentosos e bactérias, uma vez que as características de um biossurfactante são influenciadas pelo microrganismo produtor e o substrato utilizado como fonte de carbono (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Índice de Emulsificação

Em relação ao índice de emulsificação, o IE₂₄ foi novamente semelhante para a glicose e óleo residual, com *A. ochraceus*, e o maior valor encontrado foi de 35,23% utilizando a glicose em 120h de fermentação (Figura 17). Em relação ao tempo de fermentação só foi observada diferença significativa em 72h de fermentação para o óleo diesel e sacarose. Para estes dois, só foi observada emulsão estável em 168h de fermentação. Nas Tabelas 18 a 21, podemos observar mais uma vez que os biossurfactantes produzidos em farelo de trigo são mais eficientes, visto que a maioria das emulsões permaneceu estável até t₄. Das emulsões produzidas em 168h de fermentação, apenas a de sacarose apresentou valor inferior a 20% em t₄. Para glicose e óleo residual as emulsões em 120h também permaneceram acima deste nível.

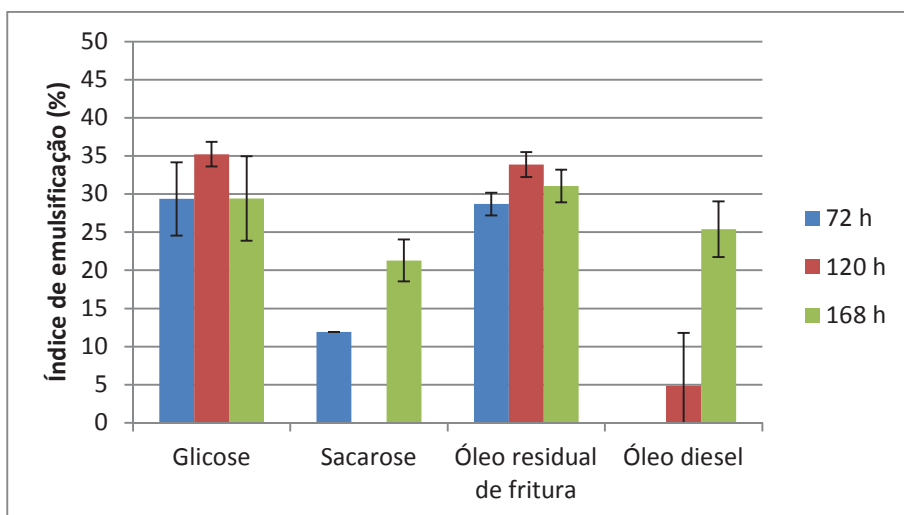


Figura 17. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.

Tabela 18. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	41,35 ±0,76 Ca	29,36 ±4,83 Ba	24,11 ±5,93 Aba	20,35 ±6,97 Aba	15,81 ±4,03 Aa
120h	41,21 ±1,84 Ca	35,23 ±1,14 Ba	30,69 ±1,14 Ba	25,0 ±2,27 Aa	23,84 ±3,41 Aa
168h	41,84 ±1,35 Ca	29,41 ±5,54 Ba	27,1 ±3,21 Aba	24,02 ±0,89 Aba	20,92 ±2,14 Aa

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 19. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	30,16 ±1,37 Bb	11,9 ±0 Ab	11,9 ±0 Ab	8,33 ±3,57 Ab	8,33 ±3,57 Ab
120h	10,46 ±5,81 Ba	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
168h	37,77 ±1,06 Cb	21,3 ±2,77 Bc	14,99 ±1,83 Ac	14,99 ±1,83 Ac	14,24 ±2,85 Ab

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 20. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	41,4 ±1,67 Ba	28,69 ±1,48 Aa	27,9 ±2,09 Aa	27,1 ±3,21 Aa	22,45 ±3,28 Aa
120h	43,3 ±0,77 Bab	33,87 ±1,64 Ab	33,87 ±1,64 Ab	33,09 ±2,75 Aa	29,94 ±1,76 Ab
168h	44,61 ±0,73 Cb	31,03 ±1,51 Bab	29,93 ±0,35 Abab	29,93 ±0,35 Aba	27,74 ±2,63 Aab

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 21. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	T ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	29,25 ±6,77 Bab	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
120h	24,57 ±2,29 Ba	4,87 ±4,87 Ba	3,66 ± 3,66 Ba	0 Aa	0 Aa
168h	38,89 ±1,37 Bb	25,39 ±3,64 Ab	23,81 ±4,12 Ab	20,63 ±2,75 Aa	20,63 ±2,75 Aa

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Para todos os experimentos realizados com *P. expansum*, os valores de IE₂₄ obtidos em 72h foram estatisticamente iguais aos obtidos em 168h, tanto em relação ao tempo quanto ao indutor (Figura 18). Porém, em 120h foram observados valores inferiores para glicose e óleo diesel, valor igual para óleo residual e valor inferior para a sacarose. O maior IE obtido foi de 42,64% para óleo diesel em 72h. De acordo com as Tabelas 22 a 25, todos surfactantes apresentaram estabilidade com o tempo, sendo que os valores para 72 e 168h foram todos superiores à 30% e, no caso do óleo diesel, todos superiores à 40%. Ainda, em 120h os valores foram superiores a 20%.

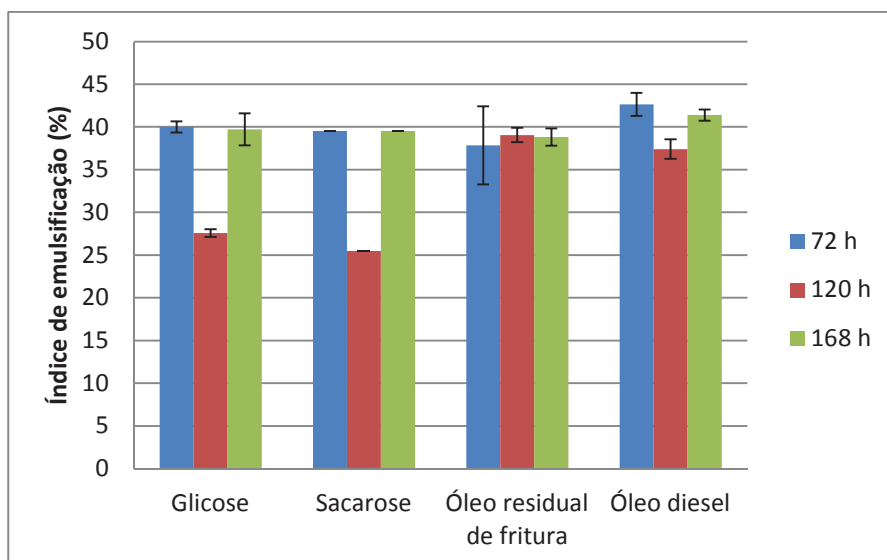


Figura 18. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.

Tabela 22. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	41,71 ±3,2 Aa	40,0 ±0,47 Ab	40,0 ±0,47 Ac	40,0 ±0,47 Ab	40,0 ±0,47 Ab
120h	43,09 ±1,89 Ba	27,56 ±0,32 Aa	27,56 ±0,32 Aa	25,29 ±4,19 Aa	25,29 ±4,19 Aa
168h	47,34 ±1,72 Ba	39,71 ±1,86 Ab	38,94 ±0,52 Ab	38,94 ±0,52 Ab	38,94 ±0,52 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 23. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	46,51 ±2,33 Ba	39,53 ±0 Ab	38,76 ±1,34 Ab	38,76 ±1,34 Ab	38,76 ±1,34 Ab
120h	45,74 ±1,34 Da	25,58 ±0 Ca	22,19 ±1,18 Ba	19,68 ±1,17 Aa	19,68 ±1,17 Aa
168h	46,51 ±2,33 Ba	39,54 ±0 Ab	39,54 ±0 Ab	39,54 ±0 Ab	39,54 ±0 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 24. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	43,23 ±1,73 Ba	40,40 ±0 Ab	40,40 ±0 Ac	40,40 ±0 Ab	40,40 ±0 Ab
120h	44,54 ±0,61 Ca	39,05 ±0,83 Bab	39,05 ±0,83 Bb	36,71 ±0,86 Aa	35,94 ±1,18 Aa
168h	43,76 ±1,73 Ba	38,81 ±0,72 Ba	37,65 ±0,44 ABa	37,65 ±0,44 ABa	35,27 ±1,94 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 25. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄
72h	48,89 ±2,33 Bb	42,64 ±1,34 Ab	41,08 ±2,68 Ab	41,08 ±2,68 Ab	41,08 ±2,68 Ab
120h	40,45 ±2,4 Ba	37,4 ±1,15 ABa	32,05 ±3,75 ABa	30,51 ±5,07 ABa	28,98 ±6,4 Aa
168h	47,34 ±1,72 Bb	41,38 ±0,48 Ab	41,38 ±0,48 Ab	41,38 ±0,48 Ab	41,38 ±0,48 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

As médias e desvios padrão, para o IE₂₄, analisados pelo teste de Tukey, podem ser observados no Anexo I (Tabelas 42 e 43).

Produção bruta do biossurfactante

Em farelo de trigo, os surfactantes produzidos com óleo de fritura e glicose novamente apresentam comportamento semelhante, porém não apresentam os maiores valores de produção, conforme Tabela 26. Os maiores valores foram de 6,44 e 9,11 g/L, encontrados para o óleo diesel em 72h, seguido pela sacarose também em 72h.

Diferentemente dos resultados observados para os outros parâmetros analisados, em geral, a produção bruta demonstrou não sofrer influencia tanto do tempo de fermentação quanto das diferentes fontes de carbono, apenas para o tempo 120h foi observada uma pequena diferença em relação às fontes, para ambos os substratos. Já em relação aos substratos, o farelo de trigo apresentou resultados muito superiores ao bagaço de cana, como observado em todas as análises. O maior valor de produção obtido em bagaço de cana foi de 2,23 g/L para glicose em 120h, enquanto que para o farelo de trigo o maior valor foi de 7,08 g/L. Os valores obtidos podem ser observados na Tabela 27.

Tabela 26. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por *A. ochraceus*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Sacarose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72	1,85 ± 0,65 Aa	6,44 ± 0,11 Bb	2,68 ± 0,08 Aa	9,11 ± 1,04 Cb
120	2,37 ± 0,77 Aa	3,80 ± 0,48 Aa	2,94 ± 0,87 Aa	3,59 ± 0,35 Aa
168	2,81 ± 0,003 Aa	5,54 ± 0,88 Bb	2,41 ± 0,94 Aa	4,19 ± 1,24 ABa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 27. Produção bruta dos biossurfactantes (g/L) produzidos por *P. expansum*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Sacarose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72 h	7,08 ±3,18 Aa	4,89 ±0,29 Aa	6,32 ±0,12 Aa	6,11 ±2,12 Aa
120 h	6,96 ±1,66 Ba	5,66 ±1,19 ABa	6,11 ±0,12 ABa	3,53 ±0,88 Aa
168 h	6,09 ±1,04 Aa	6,01 ±0,99 Aa	5,41 ±0,73 Aa	5,75 ±1,02 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Concentração Micelar Crítica

Para os surfactantes produzidos em farelo de trigo e *A. ochraceus*, os valores de CMC obtidos foram 0,41, 0,9, 0,16 e 0,4 para glicose, sacarose, óleo residual de fritura e óleo diesel, respectivamente (Figuras 19, 20, 21 e 22).

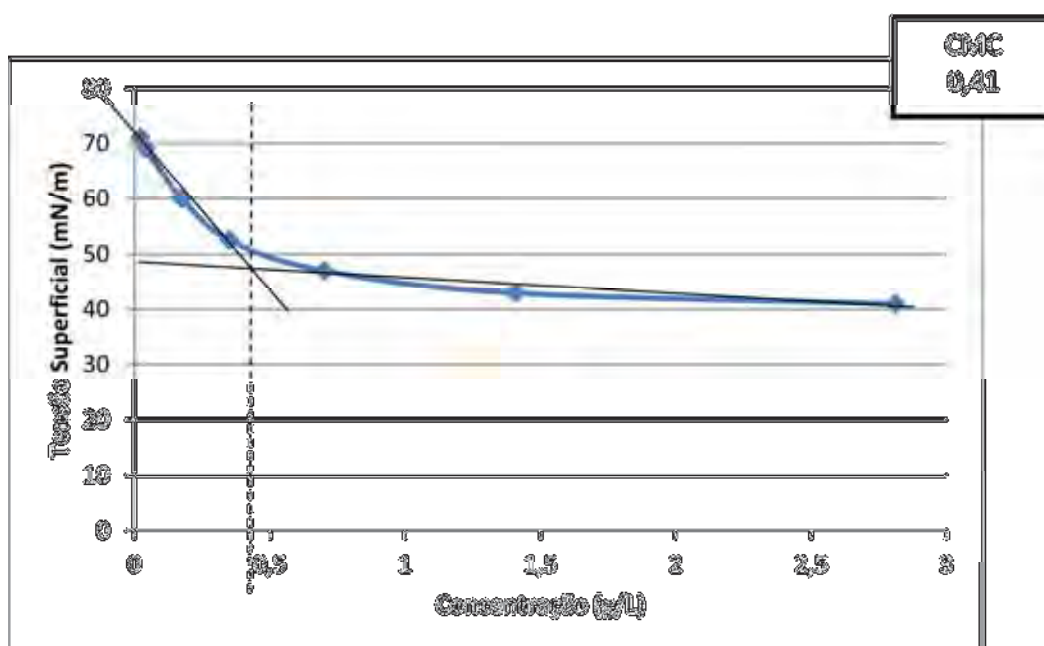


Figura 19. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

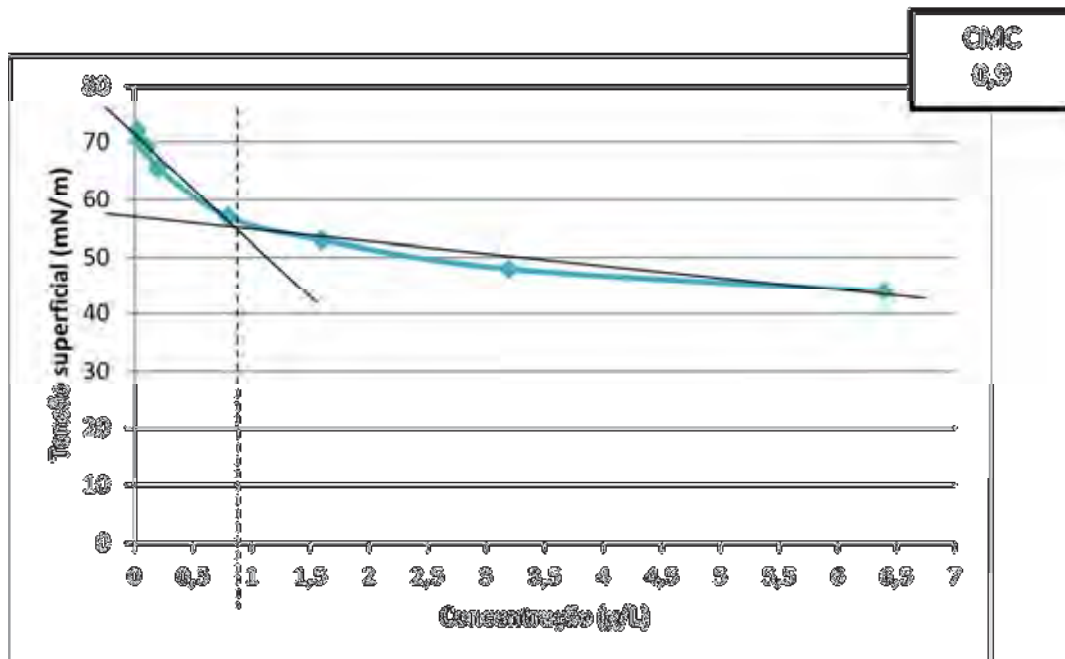


Figura 20. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

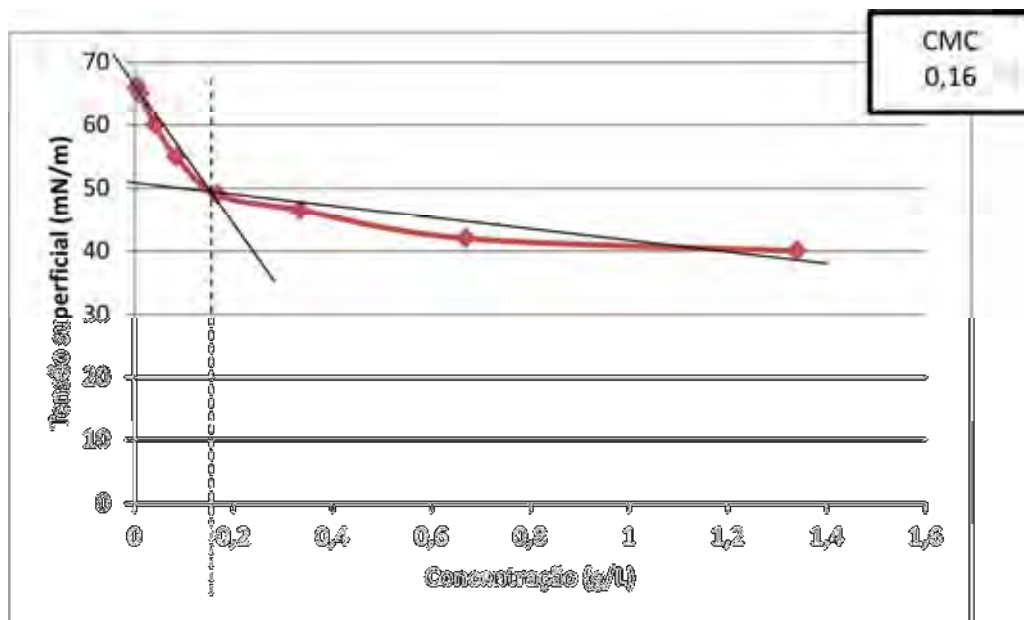


Figura 21. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

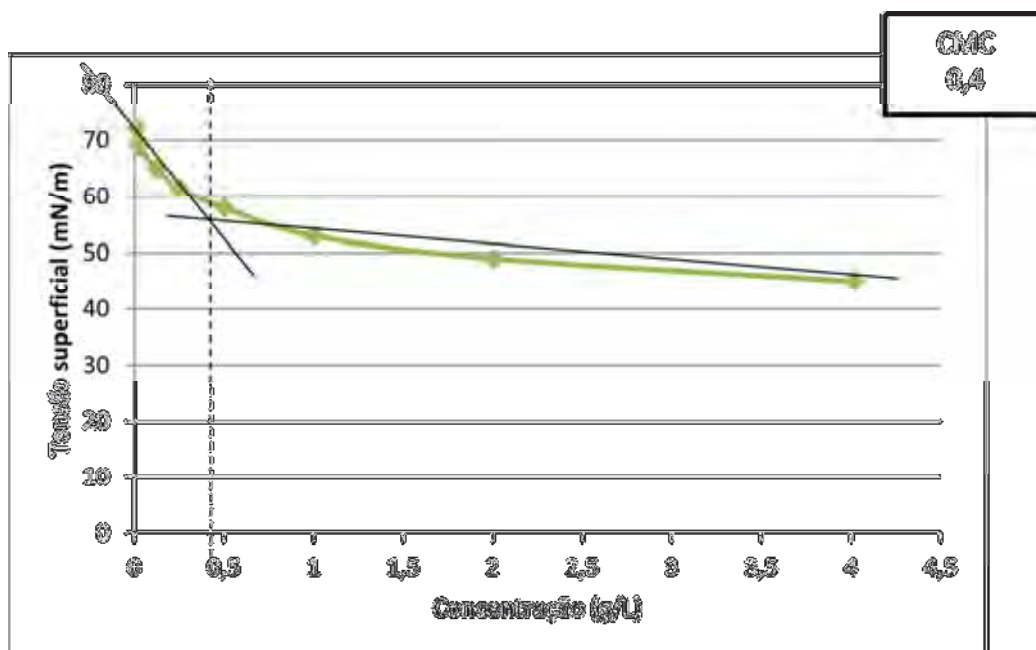


Figura 22. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *A. ochraceus*.

Para os surfactantes utilizando *P. expansum* como inoculo e farelo de trigo, os valores de CMC obtidos foram 0,9, 0,47, 0,32 e 0,5 para glicose, sacarose, óleo residual de fritura e óleo diesel, respectivamente (Figuras 23, 24, 25 e 26).

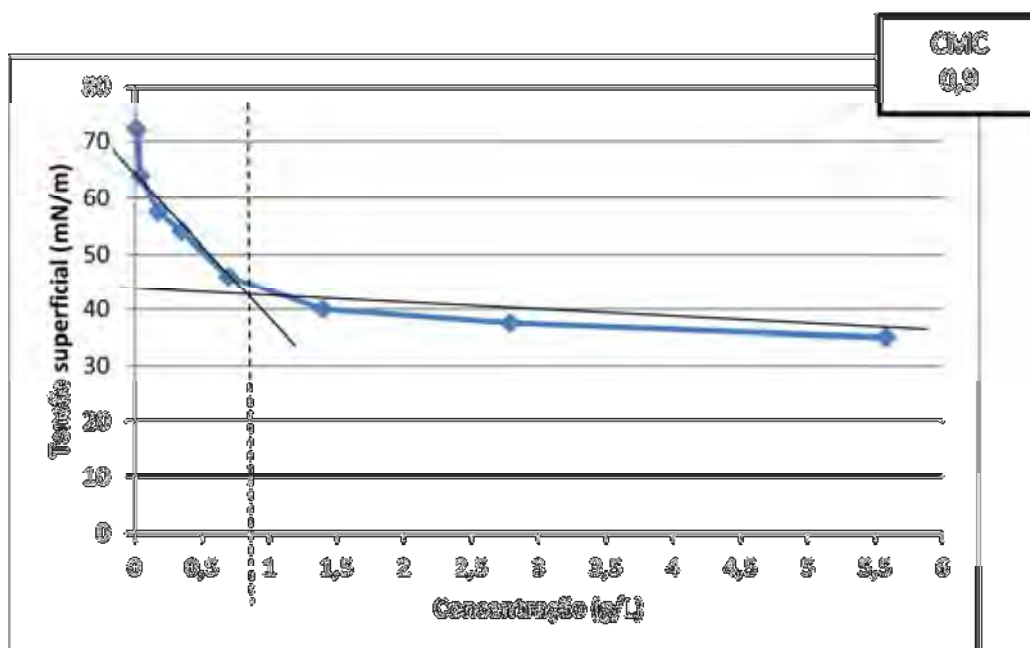


Figura 23. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada glicose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *P. expansum*.

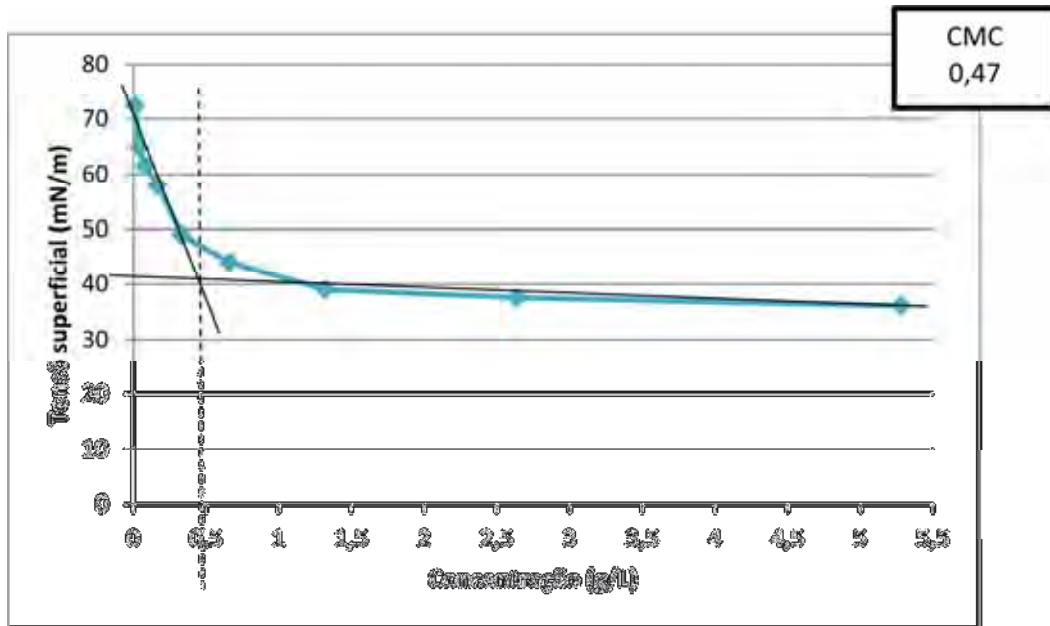


Figura 24. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizada sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *P. expansum*.

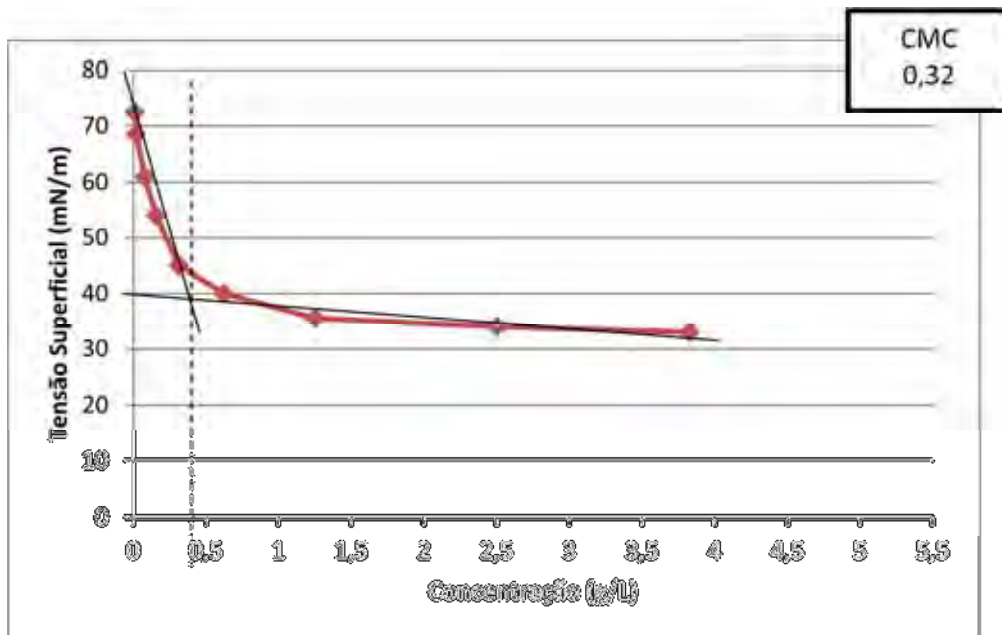


Figura 25. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo residual de fritura como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *P. expansum*.

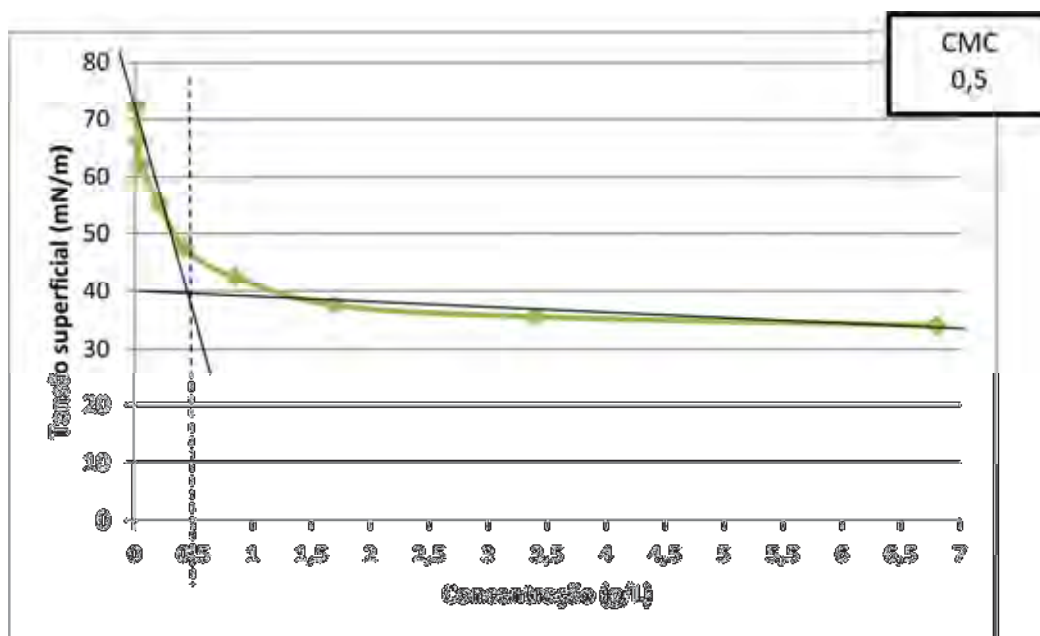


Figura 26. Concentração Micelar Crítica determinada a 28°C a partir do sobrenadante livre de células quando utilizado óleo diesel como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato pelo fungo *P. expansum*.

De acordo com os resultados obtidos, os microrganismos foram capazes de produzir biossurfactantes eficientes utilizando ambos os substratos e todas as fontes de carbono, capazes de reduzir a tensão superficial, formar emulsões estáveis e apresentar uma baixa CMC. Ainda, é possível destacar entre os substratos, as fontes de carbono e entre os inóculos, respectivamente, o farelo de trigo, o óleo residual de fritura e o fungo *P. expansum*.

A maior eficiência do farelo de trigo como substrato pode ser devido a sua constituição, visto que este resíduo é rico em proteínas, carboidratos, sais orgânicos e inorgânicos e, desta forma, apresenta-se como um substrato adequado ao crescimento de microrganismos (UMSZA-GUEZ, 2009). Por outro lado, o bagaço de cana-de-açúcar é constituído basicamente por fibras lignocelulósicas e sólidos solúveis.

Segundo Camilios Neto e colaboradores (2011) a produção de ramnolipídeos por fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar é eficiente apenas quando utilizada suplementação por outros componentes como a semente de girassol. Já o farelo de trigo vem sendo apontado como um eficiente substrato para a produção de biossurfactantes em diversos estudos (VEENANADIG et al, 2000; MARTINS et al, 2009; KIRAN et al, 2010; AQUINO et al, 2011; BUENO et al, 2010).

Nos experimentos utilizando farelo de trigo foi observado que, em geral, nenhum dos parâmetros apresentou grandes alterações nos diferentes tempos de fermentação e no crescimento celular, diferente do que ocorreu com o bagaço de cana. Duas hipóteses podem

ser feitas a partir do observado. Em primeiro lugar, pode ser considerado que a partir de 72h de fermentação os microrganismos foram capazes de produzir o biossurfactante necessário para a absorção dos nutrientes e manutenção do seu metabolismo e, desta forma, não necessitaram de uma maior produção. Por outro lado, pode ser considerado que, como nesses experimentos houve maior compactação do substrato e maior crescimento apenas na superfície, a falta de aeração pode não ter permitido uma maior produção de biossurfactantes no substrato. É possível afirmar que o fato de o farelo de trigo ser um substrato rico em nutrientes, representa um estímulo à produção de enzimas pelo microrganismo que auxiliariam na degradação do substrato, não sendo mais necessária a síntese de surfactantes para absorção de nutrientes.

6.3 Mistura de substratos

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, foi levantada a hipótese de que a mistura dos substratos poderia proporcionar melhores resultados na produção de surfactantes, isto porque o bagaço de cana auxiliaria na diminuição da compactação do farelo de trigo, rico em nutrientes essenciais para o processo. Para a realização destes experimentos foi utilizado como inóculo o microrganismo *P. expansum* e, como fonte de carbono, o óleo residual de fritura.

Com relação à tensão superficial, em geral, não houve diferença entre os experimentos e entre os tempos de fermentação. Apenas o experimento 2, com 168 horas de fermentação apresentou uma redução significativamente menor, com tensão superficial de 58,3 mN/m (Figura 27).

Para o índice de emulsificação, os experimentos com 72 e 120h apresentaram resultados semelhantes e considerados como boas emulsões. Apenas com 168h os valores decresceram significativamente. Estes resultados, possivelmente podem ser explicados pela produção de proteases, as quais aumentariam a concentração de nutrientes disponíveis para absorção, levando à diminuição da produção de biossurfactantes (Figura 28). Com relação à estabilidade das emulsões, os experimentos com 72 e 120h de fermentação novamente apresentaram resultados satisfatórios, com emulsões acima de 30% até t_4 . Para o tempo 168h, as emulsões foram reduzidas consideravelmente após t_0 , o que não é desejável ao processo (Tabelas 28 e 29).

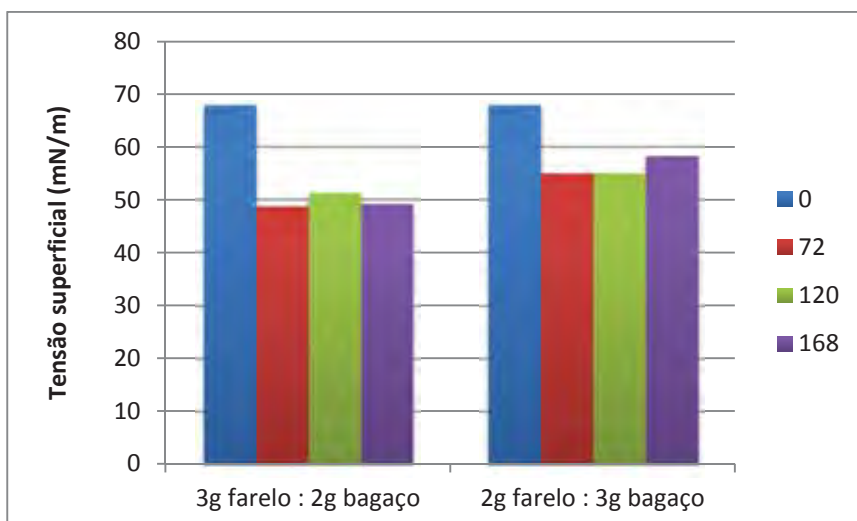


Figura 27. Tensão superficial (mN/m) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, determinada a 28°C, utilizando misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato.

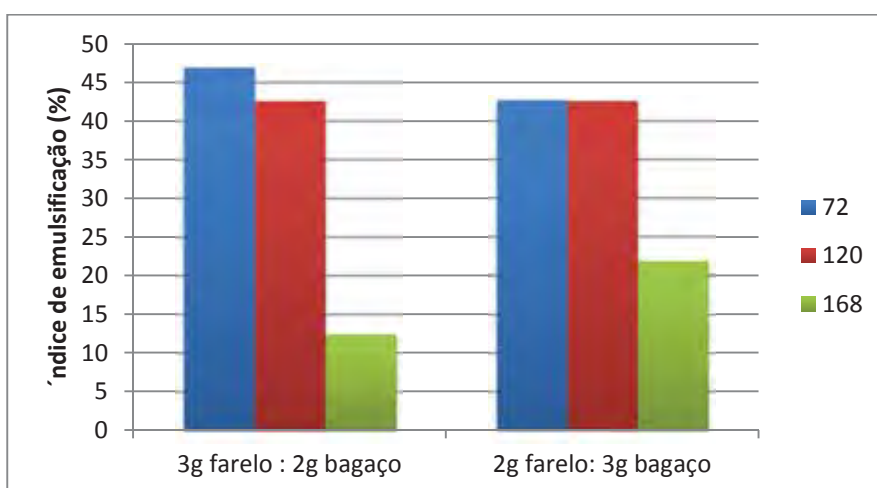


Figura 28. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, determinada a 28°C, utilizando misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato.

Tabela 28. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	t0	t1	t2	t3	t4
72h	48,85 ±1,13 Ba	46,92 ±0,7 Ba	44,99 ±1,79 ABc	43,07 ±1,16 Ac	40,75 ±3,14 Ac
120h	48,84 ±0 Ba	42,64 ±4,84 ABa	38,76 ±3,55 ABb	34,11 ±3,55 Ab	32,55 ±2,32 Ab
168h	48,11 ±0,66 Ca	22,73 ±17,75 Ba	2,27 ±2,27 Aa	0,0 ±0 Aa	0,0 ±0 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 29. Índice de emulsificação (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando sacarose como fonte de carbono e farelo de trigo como substrato.

	t0	t1	t2	t3	t4
72h	47,34 ±1,72 Ba	42,76 ±3,63 ABb	41,38 ±0,48 ABb	37,97 ±3,9 Ab	34,53 ±4,99 Ab
120h	47,67 ±1,16 Ba	42,63 ±2,68 ABb	40,31 ±4,84 ABb	35,66 ±3,5 ABb	31,01 ±9,39 Ab
168h	48,08 ±1,3 Da	21,85 ±1,4 Ca	16,09 ±0,18 Ba	8,08 ±3,54 Aa	3,87 ±3,55 Aa

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

As médias e desvios padrão, para a tensão superficial e o IE₂₄, analisados pelo teste de Tukey, podem ser observados no Anexo I (Tabelas 44 e 45).

Foi possível observar que os valores atingidos não foram tão bons quanto os dos experimentos com farelo de trigo puro, conforme Tabelas 30 e 31. Dessa forma, pode-se supor que a constituição nutricional do substrato é uma característica limitante para o desenvolvimento e produção de biossurfactantes por este microrganismo. Por esse motivo, a mistura de substratos não ofereceu a concentração de nutrientes necessária para se obter um eficiente surfactante, como acontecia para a utilização de apenas farelo de trigo como substrato. Os resultados diferem dos obtidos por Camassola e Dillon na produção de celulasas e hemicelulasas, nos quais as proporções 40% de bagaço de cana com 60% de farelo de trigo e 20% de bagaço de cana com 80% de farelo de trigo apresentaram as maiores produções e atividades enzimáticas. Para Babu e Rao (2007), na produção de lipases, a mistura dos substratos já citados também favoreceu a atividade enzimática.

Tabela 30. Comparação entre os valores obtidos para a tensão superficial obtidos em diferentes experimentos, utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono, diferentes substratos e 168 horas de fermentação.

Substrato	100% Farelo de trigo	60% Farelo de trigo 40 % Bagaço de cana	40% Farelo de trigo 60 % Bagaço de cana	100% Bagaço de cana
Tensão superficial (mN/m)	33,5 ±0,7	49,17 ±2,6	58,33 ±0,58	60,0 ±1,0

Tabela 31. Comparação entre os valores obtidos para o IE₂₄ obtidos em diferentes experimentos, utilizando óleo residual de fritura como fonte de carbono, diferentes substratos e 168 horas de fermentação.

Substrato	100% Farelo de trigo	60% Farelo de trigo 40 % Bagaço de cana	40% Farelo de trigo 60 % Bagaço de cana	100% Bagaço de cana
IE ₂₄ (%)	38,81 ±1,02	12,5 ±1,13	21,85 ±1,4	45,79±0,55

6.4 Potencial para biorremediação

O potencial de biorremediação do biossurfactante foi avaliado utilizando água e areia contaminados com óleo residual de fritura e óleo de motor.

Para a realização destes testes foram selecionados os biossurfactante produzidos por *P. expansum*, utilizando farelo de trigo, óleo residual de fritura e 168h de fermentação, considerado o melhor surfactante produzido durante o estudo. Ainda, foi utilizada aplicação direta do biossurfactante, aplicação da suspensão de esporos e água como controle.

Diante da análise macroscópica, foi possível observar que o biossurfactantes apresentou grande emulsificação tanto do óleo residual quanto do óleo de motor. Isto porque, nos experimentos controle e com a suspensão de esporos, o óleo escorreu pela placa e permaneceu imiscível. Já quando o biossurfactante foi utilizado, o óleo foi degradado, mesmo com apenas 24 horas de ação e houve proliferação do fungo na areia contaminada, facilmente visualizável com sete e 21 dias de ação, conforme Figuras 29 e 30.

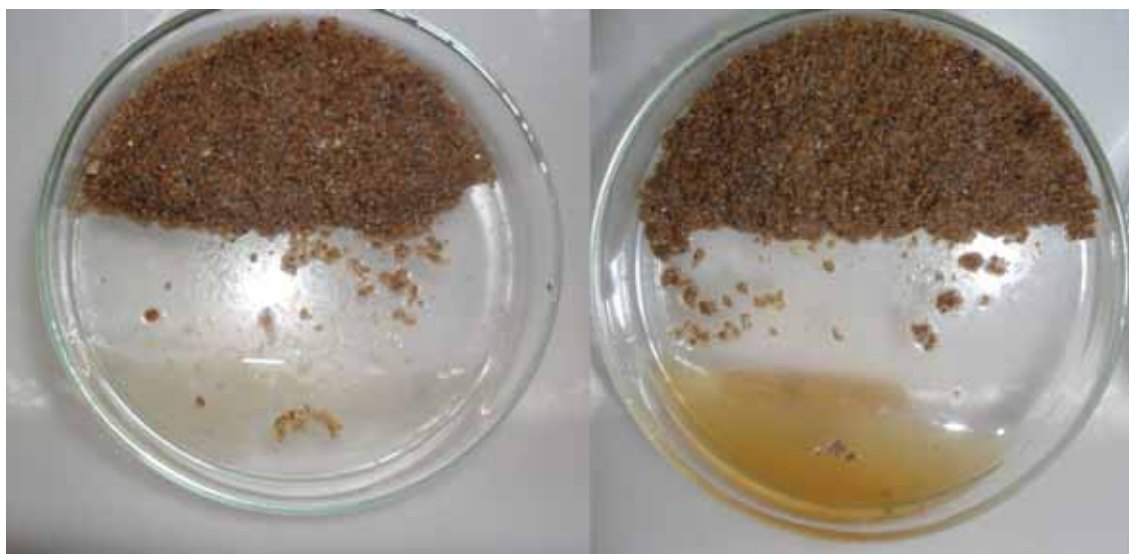


Figura 29. Imagens do teste de biorremediação de óleo de motor. Na imagem pode ser observado que o óleo que escorre da areia contaminada permanece na placa no experimento controle, à esquerda, e é emulsificado quando utilizado o biossurfactante produzido por *P. expansum*, à direita.

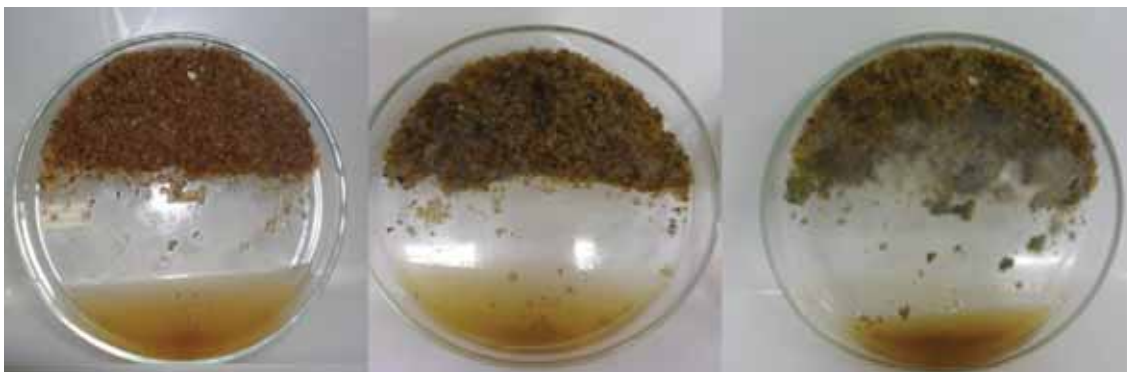


Figura 30. Na figura pode ser observado o teste de biorremediação de óleo de motor com aplicação de biossurfactante em um, sete e 21 dias de ação. Na segunda imagem pode ser observada o início da proliferação do microrganismo, que já colonizou o substrato na terceira imagem.

Para a biorremediação da água, o mesmo foi verificado. a aplicação direta de biossurfactante emulsificou o óleo presente, diferente do observado para a suspensão de esporos e do experimento controle. A partir de sete dias, foi verificada a proliferação do microrganismo na camada de óleo superficial, demonstrando sua capacidade de se proliferar em ambiente poluído (Figuras 31 e 32).



Figura 31. Testes de biorremediação de água contaminada com óleo de motor, com um dia de repouso. Na imagem à esquerda podem ser visualizados os diferentes tratamentos, sendo que os dois primeiros tubos representam a aplicação de biossurfactante; os tubos do meio, os experimentos controle; e os dois últimos tubo, a aplicação da suspensão de esporos de *P. expansum*. Em destaque, na imagem à direita, pode ser observada a formação de emulsão do óleo de motor, quando utilizado o biossurfactante.



Figura 32. Testes de biorremediação de água contaminada com óleo de motor, com 21 dias de repouso. Na imagem à esquerda podem ser visualizados os diferentes tratamentos, sendo que os dois primeiros tubos representam a aplicação de biossurfactante; os tubos do meio, os experimentos controle; e os dois últimos tubo, a aplicação da suspensão de esporos de *P. expansum*. Em destaque, na imagem à direita, pode ser observada a colonização da camada superficial de óleo pelo microrganismo.

Foi verificado que a aplicação direta do biossurfactante foi mais eficiente que a suspensão de esporos. Este fato ocorreu, possivelmente, porque o microambiente simulado não apresentou características adequadas para o crescimento do microrganismo. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (2010) utilizando biossurfactantes provenientes de *B. pumilus*.

7. CONCLUSÕES

Os microrganismos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* demonstraram grande potencialidade para a produção de biossurfactantes utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato e glicose, sacarose, óleo diesel e óleo residual de fritura como fontes de carbono.

Os surfactantes demonstraram sofrer grande influência do microrganismo utilizado assim como dos substratos e fontes de carbono. O tempo de fermentação, em geral, demonstrou não ter grande influência sobre os experimentos utilizando farelo de trigo como substrato.

A lavagem do bagaço de cana demonstrou ter efeito positivo sobre as características dos biossurfactantes.

A mistura dos substratos não demonstrou vantagens em relação à utilização do uso exclusivo de farelo de trigo.

O menor valor de tensão superficial obtido foi de 33,5 mN/m para o tensoativo proveniente de *P. expansum*, utilizando farelo de trigo e óleo residual de fritura. Este surfactante também apresentou potencialidade para aplicação em biorremediação de areia contaminada com poluentes oleosos.

Os surfactantes produzidos em farelo de trigo apresentaram maiores valores de emulsão, assim como maior estabilidade dessas emulsões.

Os maiores valores de produção foram encontrados utilizando o fungo *P. expansum* em farelo de trigo.

Os biossurfactantes produzidos demonstraram ser eficientes, uma vez que, foram capazes de reduzir a tensão superficial e apresentaram baixos valores de CMC.

O óleo residual de fritura e o farelo de trigo apresentaram os melhores resultados frente às demais fontes de carbono e substratos.

8. REFERENCIAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D.V.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67-72, 2004.

AIDOO, K. E.; HENRY, R.; WOOD, B. J. B. Solid state fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, v. 28, p. 201-237, 1982.

ANDRIGUETO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I. et al. **Nutrição Animal**. v.1, 4.ed., Ed. Nobel, São Paulo, 1986.

AQUINO, P.L.M.; BUENO, G. F.; NASCIMENTO, V. M.; DEL BIANCHI, V. L. Effect of Inoculum in the Emulsification Index of Biosurfactants Produced by *Bacillus Velezensis* using Wheat Bran as Substrate in Solid State Fermentation. **Anais do V Simpósio de Microbiologia Aplicada**, 2011.

ARAGÃO, V. O.; ROCHA, L. L.; ANJELINA, A. L.; PAES F. A.; HISSA, D. C.; PINTO, N. W.; MELO, V. M. M. M.; MARTINS, S. C. S. Leveduras degradadoras de hidrocarbonetos e produtoras de biossurfactantes. **Anais da Reunião Anual da SBPC**, v. 57, Fortaleza, 2007.

ARIMA, K. KAKINUMA, A.; TAMURA, G. **Biochemistry Biophysical Research Commun**, v.31, p.488, 1968.

BALAKRISHNAM, K; PANDEY, A. Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. **J. Sci. Ind. Res**, v. 55, p. 365-372, 1996.

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

BANAT, I.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol and Biotechnol**, v. 87, n. 427–444, 2010.

BARBOSA, M. M. C.; PAZ, M. C. F. Produção de biossurfactantes por *Chromobacterium violaceum* utilizando como substrato óleo vegetal (óleo de pequi). **Anais do II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais, para aplicação em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409-414, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, p. 979-985, 2008.

BARTHA, Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Microbiological Ecology**, v. 12, p. 155-172, 1986. Apud: BANAT, I. M.; MAKKAR, M. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F.R; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 187–194, 2006.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZIK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Technology**, v.95, p.15–18, 2004.

BENEDETTI, A. C. E. P. **Isolamento de fungo produtor de enzimas xilanolíticas: Produção e caracterização de xilanase**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

BERGSTRÖM, S.; THEORELL, H.; DAVILE, H. On a metabolic product of *Pseudomona pyocyanea* pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. **Ark Kem Mineral Geol.** p. 1–12, 1946. Apud: DUARTE, S. M. **Caracterização de bactérias produtoras de ramnolípídios**

isoladas de poços de petróleo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2003.

BICCA, F.C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 8, p. 231-236, 1999.

BOEK, D.; INDIVINO, E.; MARSO, K.; SMOLLAR, K. **Colloidal and Surface Phenomena of Liquid Laundry Detergent.** 2002. Disponível em : http://www.eng.buffalo.edu/Courses/ce457_527/ce457_pro/g11_doc.htm Acessado em: 05/05/2011.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, v. 152, p. 41-52, 1999.

BRAUN, S. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 472-482, 2003.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biosurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

BURGI, R. Utilização de resíduos culturais e de beneficiamento de na alimentação de bovinos. **Anais do 6º simpósio sobre nutrição de bovinos da FEALQ**, p. 153–169, Piracicaba, 1995.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZALES-LOPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, 2008.

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

CAMILIOS NETO, D. MEIRA, J. A.; ARAÚJO, J. M. MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, p.441–448, 2008.

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.

CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A. V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 394-400, 2009.

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

COMITRE, V.; CARMO, M. S. Produção de Energia Elétrica a Partir do Bagaço de Cana-de-Açúcar: Cenários de Substituição na Indústria de Alimentos e Bebidas do Estado de São Paulo. **Anais do XLII Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural (SOBER)**, v. 1, p. 375, Cuiabá, 2004.

CZAPLICKA, M.; CHMIELARZ, A. Application of biosurfactants and non-ionic surfactants for removal of organic matter from metallurgical lead-bearing slime. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 645-649, 2009.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media, **Food Research International**, p. 1-6, 2009.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, n. 7, p. 641-646, 2004.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties, applications**. Editora Marcel Decker, Nova York, 1993, cap. 3. Disponível em: www.books.google.com.br. Acessado em: 10/06/2011.

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

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

DURAND, A. Bioreactors designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 113-125, 2003.

EDWARDS JR.; HAYASHI. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomona aeruginosa*. **Arch Biochem Biophys**, v. 111, p. 415 – 421, 1965. Apud: DUARTE, S. M. **Caracterização de bactérias produtoras de ramnolípídios isoladas de poços de petróleo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2003.

EL-HAWARY, F. I.; MOSTAFA, Y. S. Factors affecting cellulose-production by *Trichoderma Koningii*. **Acta Alimentaria**, v. 30, p. 3-13, 2001. Apud UMSZA-GUEZ, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

FABRIANI, G.; LINTAS, C. Durum wheat: Chemistry and Thecnology. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemistis, 1988 apud RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas termofílias amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

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

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v.31, n.8, 2008.

FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a novel glycolipid biosurfactant. The identification of a new diastereomer of mannosylerythritol lipid-B. **Carbohydrate Research**, v.343, p.555-560, 2008.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-Active compounds from microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 67-72, 2004.

GUTARRA, M. L. E.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Seleção de Fungos Produtores de Lipase por Fermentação no Estado Sólido. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**, p. 063-1-063-7, Florianópolis, 2003.

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

ICIDCA; GEPLACEA; PNUD. **Manual de los derivados de La caña de azúcar**. 2.ed, 1990. Apud TEIXEIRA, D. E.; COSTA, A. F.; SANTANA, M. A. E. Aglomerados de bagaço de cana-de-açúcar: resistência natural ao ataque de fungos apodrecedores. **Scientia Forestalis**, n. 52, p. 29-34, 1997.

IRIE, Y.; OTOLLE, G. A.; YUK, M. H. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse Bordetella bronchiseptica biofilms. **Microbiology Letters**, v.250, p. 237-243, 2005.

ISIL, S.; NILUFER, A. Investigation of factors affecting xylanase activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **Braz. Arch. of Biol.**, v. 48, n. 2, p. 187–193, 2005.

JACOB, N.; PREMA, P. Novel process for the simultaneous extraction and degumming of banana fibers under solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 115-121, 2008.

KIM, S.K.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and Characterization of Biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnonology Applied and Biochemistry**, v. 31, p.249-253, 2000.

KIRAN, G. S.; HEMA, T. A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; MANILAL, A.; SUJITH, S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Revista Colloids and Surfaces**, v.10, 2009.

KIRAN, G. S.; THOMAS, T. A.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A. P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, v.101, p.2389-2396, 2010.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C.; STECHEY, D.; WOOD, J. The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. **J Am Oil Chem Soc**, v. 61, p. 1735–1743, 1984. Apud MAKKAR, M. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanase por *Aspergillus casielus* com diferentes fontes de carbono. **B. CEPPA**, v.25, n. 2, p. 207-216, 2007.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.7, p. 12-20, 2002.

LAYMAN, P. L. Industrial surfactants set for strong growth. **Chemistry Engineering News**, v. 23, p. 23-48, 1985.

LIN, S. C. Biosurfactants recent advances. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

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

MAKKAR, M. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, p1-5, 2011.

MARÇAL, M. Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê). Dissertação (mestrado em nutrição) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1991.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. In situ bioremediation using biosurfactant produced by solid state fermentation. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 843–851, 2009.

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.

MILAGRES, A. M. F.; SANTOS, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, L. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochem.**, v. 39, n.11, p. 1387-1391, 2004.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

NEVES, E.; FORGIARINI, E.; SCHOENHALS, M.; CAMPREGHER, N.; GUZZI, R. Biosurfactants. **Environmental International**, v.30, p. 50-62, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, 2003.

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

OLIVEIRA, J. G. **Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e avaliação da biorremediação de solo e água contaminados com óleo.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

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

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGON, P. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, 2001.

PÉREZ-GUERRA, N.; TORRADO-AGRASAR, A.; LÓPEZ-MACIAS, C.; PASTRANA, L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 3, p.343-350, 2003.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p.553. 1999.

PINHEIRO, T. L. F. **“Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo”.** Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Embrapa – Comunicado Técnico on-line**, n. 102, 2005

POMSUNTHORNTAWEE, O.; MAKSUNG, S.; HUAYYAI, O.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing

batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 812–818, 2009.

RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas termofílicas amilolíticas, produção, caracterização e aplicação das amilases na hidrólise do amido de mandioca.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, 1998.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants an oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 249-252, 2002.

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

SANTOS, F. K. G.; ALVES, J. V. A.; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; DUTRA JÚNIOR, T. V.; BARROS NETO, E. L. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. IV PDPETRO, Campinas, 2007.

SARUBBO L. A.; MARÇAL, M. C; NEVES M. L .C ; PORTO. A. L . F; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadyan Journal of Microbiology**, v.45, p1-4, 1999.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; TAKAKI, G. M. C. Co-Utilization of Canola Oil and Glucose on the Production of a Surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 68–73, 2007.

SILVA, A. N. **Produção otimizada de alginato e plástico biodegradável (poli-hidroxibutirato) por *Azotobacter vinelandii*.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

SILVA, L. T.; MOREIRA, K. A.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Produção de fitases a partir de resíduos agroindustriais em fermentação no estado sólido utilizando fungos do gênero *Aspergillus*. **Anais da X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE**, Recife, 2010.

SILVEIRA, F. Q. P.; XIMENES, F. A.; CACAIS, A. O. G.; MILAGRES, A. M. F.; MEDEIROS, C. L.; PULS, J.; FILHO, E. X. F. Hydrolysis of xylans by enzyme systems from solid cultures of *Trichoderma harzianum* strains. **Braz. J. of Med. and Biol. Research.**, v. 32, p. 947-952, 1999.

SINGHAL, R. S. Solid state fermentation for the production of commercially important metabolites. **Abstracts of International Seminar and Workshop on Sustainable Utilization of Tropical Plant Biomass**, Kaiavattom-India, 2008.

SOARES, C. A.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; MENDONÇA, S. S.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P. Consumo, Digestibilidade Aparente, Produção e Composição do Leite de Vacas Leiteiras Alimentadas com Farelo de Trigo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.6, p. 2161-2169, 2004.

SOUZA, M. C. O.; ROBERTO, I. C.; MILAGRES, A. M. F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 52, p. 768 – 772, 1999.

TEIXEIRA, F. A.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 8, n. 6, 2007.

THIAGO, L. R. L. S.; VIEIRA, J. M. Cana-de-açúcar: uma alternativa para a seca. **Comunicado Técnico – Embrapa – Gado de Corte**, n. 73, 2002. Disponível em: www.cnpqc.embrapa.br. Acessado em: 22/06/2010.

UMSZA-GUEZ, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

VAN BOGAERT, I.; SAERENS, K.; DE MUYNCK, C.; DEVELTER, D.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Microbial production and application of sophorolipids. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 76, n. 23–34, 2007.

VAN DELDEN, D.; PESCI, E. C; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H. Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. **Infect Immunology**, v.66, p.4499-4502, 1998.

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

VEENANADIG N. K.; GOWTHAMAN, M. K.; KARANTH, N. G. K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000.

VEGA, C. A.; VERALDO, H. M. P.; GARCIA, F. E.; RIOS-LEAL, E. R.; VAZQUEZ, R. R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Trends in Biotechnology**, v.3, p.32–36, 2007.

WEI, Y. H.; CHOU, J. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater, **Biochemical Engineering Journal**, v.2, p.146–154, 2005.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v.21, p.1329–1334, 2005.

ANEXO I

Tabela 32. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 28°C.

	Glicose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
0h	68 Ad	68 Ad	68 Ab
72h	61,43 ± 1,36 ABb	58,9 ± 0,65 Ac	62,67 ± 1,15 Ba
120h	59,17 ± 0,29 ABa	57,73 ± 0,64 Ab	60,4 ± 1,5 Ba
168h	63,27 ± 0,68 Bc	52,9 ± 2,1 Aa	60,9 ± 2,26 Ba

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 33. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 28°C.

	Glicose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
0h	68 ± 0 Ac	68 ± 0 Ac	68 ± 0 Ab
72h	60,83 ± 0,76 Aa	61,63 ± 0,32Ab	65,77 ± 0,23 Bab
120h	62,5 ± 0,87 Aa	61,33 ± 0,58 Aab	63,57 ± 2,2 Aa
168h	64,5 ± 0,87 Bb	60,0 ± 1,0 Aa	63,1 ± 2,0 ABa

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 34. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72h	4,76 ± 0 Ba	4,76 ± 0 Ba	0 ± 0 Aa
120h	5,59 ± 1,34 Aa	33,55 ± 3,67 Cb	26,19 ± 3,37 Bb
168h	27,77 ± 3,46 Ab	33,04 ± 2,31 Ab	44,21 ± 1,45 Bc

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 35. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72h	4,82 ± 0,08 Ba	0 ± 0 Aa	3,10 ± 1,34 Ba
120h	21,19 ± 4,2 Ab	26,48 ± 2,9 Ab	22,09 ± 8,22 Ab
168h	37,92 ± 3,1 Ac	45,79 ± 0,78 Bc	42,86 ± 0 ABc

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 36. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em diferentes lavagens, determinada a 28°C.

	s/ lavagem	1 lavagem	2 lavagens
0 h	68 ± 0 Ab	68 ± 0 Ac	68 ± 0 Ac
72 h	59,67 ± 2,56 Aa	63,83 ± 0,76 Bb	57,33 ± 0,58 Aa
120 h	61,0 ± 0 Ba	58,83 ± 1,04 Aa	57,85 ± 0,85 Aa
168 h	59,33 ± 1,55 Aa	63,83 ± 0,29 Bb	59,75 ± 0,75 Ab

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 37. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato em diferentes lavagens, determinada a 28°C.

	s/ lavagem	1 lavagem	2 lavagens
0 h	68 ± 0 Ac	68 ± 0 Ad	68 ± 0 Ac
72 h	62,67 ± 1,6 Ab	60,5 ± 0,5 Ab	61,17 ± 0,58 Ab
120 h	60,17 ± 0,76 Bab	62,75 ± 0,25 Cc	58,17 ± 1,04 Aa
168 h	58,67 ± 1,15 Aa	59 ± 0,5 Aa	61 ± 1,8 Ab

A, B... (linhas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 38. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

	s/ lavagem	1 lavagem	2 lavagens
72 h	1,55 ±1,34 Aa	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa
120 h	0 ±0 Aa	0 ±0 Aa	1,55 ±2,68 Aa
168 h	30,23 ±0,92 Bb	1,14 ±1,14 Aa	0 ±0 Aa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 39. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, determinada a 27°C.

	s/ lavagem	1 lavagem	2 lavagens
72 h	18,06 ±1,39 Ba	8,07 ±3,58 Aa	2,44 ±3,45 Aa
120 h	46,42 ±1,33 Ab	46,98 ±0,9 Ab	24,39 ±23,27 Aab
168 h	45,98 ±1,78 Ab	43,23 ±2,95 Ab	45,14 ±3,25 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 40. Os resultados representam a média ± desvio padrão dos valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 28°C.

	Glicose	Sacarose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
0 h	68 ± 0 Ab	68 ± 0 Ad	68 ± 0 Ab	68 ± 0 Ac
72 h	41,67 ± 1,53 Aa	54,83 ± 1,04 Bc	40,5 ± 1,5 Aa	56 ± 1,32 Bb
120 h	39,83 ± 1,15 Aa	51,17 ± 2,46 Bb	40 ± 1,0 Aa	56,5 ± 0,5 Cb
168 h	40,33 ± 0,58 Aa	44 ± 0,5 Ba	39,5 ± 0,7 Aa	44 ± 1,73 Ba

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 41. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 28°C.

	Glicose	Sacarose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
0 h	68 ±0 Ac	68 ±0 Ac	68 ±0 Ad	68 ±0 Ad
72 h	43,25 ±0,35 BCb	45,33 ±2,3 Cb	39 ±0 Ac	40,67 ±0,58 ABc
120 h	47,67 ±4,04 Bb	41,33 ±1,53 Aab	37,33 ±0,29 Ab	38,83 ±1,04 Ab
168 h	35,5 ±0,7 ABa	38,33 ±3,21 Ba	33,5 ±0,7 Aa	34,17 ±0,76 ABa

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 42. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *A. ochraceus*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 27°C.

	Glicose	Sacarose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72 h	29,36 ±4,82 Ca	11,90 ±0 Bb	28,69 ±1,48C a	0 ±0 Aa
120 h	35,23 ±1,6 Ba	0 ±0 Aa	33,87 ±1,64 Bb	4,88 ±6,9 Aa
168 h	29,41 ±5,54 ABa	21,30 ±2,76 Ac	31,05 ±2,13 Bab	25,39 ±3,64 ABb

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 43. Índice de Emulsificação em 24h de repouso (%) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando farelo de trigo como substrato, determinada a 28°C.

	Glicose	Sacarose	Óleo residual de fritura	Óleo diesel
72 h	40,01 ±0,66 Ab	39,53 ±0 Ab	37,84 ±4,5 Aa	42,64 ±1,34 Ab
120 h	27,59 ±0,45 Ba	25,48 ±0 Aa	39,05 ±0,83 Ca	37,41 ±1,15 Ca
168 h	39,71 ±1,86 Ab	39,53 ±0 Ab	38,81 ±1,02 Aa	41,38 ±0,67 Ab

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 44. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando misturas de farelo de trigo e bagaço de cana como substrato, determinada a 28°C.

	3g farelo : 2g bagaço	2g farelo : 3g bagaço
0 h	68 ±0 Ab	68 ±0 Ac
72 h	48,75 ±0,75 Aa	55 ±0 Aa
120 h	51,33 ±2,30 Aa	55 ±0 Aa
168 h	49,17 ±2,6 Aa	58,33 ±0,58 Bb

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Tabela 45. Valores de Tensão superficial (mN/n) para os biossurfactantes produzidos por *P. expansum*, utilizando misturas de farelo de trigo e bagaço de cana como substrato, determinada a 28°C.

	3g farelo : 2g bagaço	2g farelo : 3g bagaço
72 h	46,92 ±0,7 Ab	42,76 ±3,63 Ab
120 h	42,64 ±4,84 Ab	42,63 ±2,68 Ab
168 h	12,5 ±1,13 Aa	21,85 ±1,4 Ba

A, B... (linhas)– médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

a, b... (colunas) – médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

ANEXO II

Para a determinação do teor de sacarose pelo método de Dubois et al. foi construída a curva padrão, apresentada a seguir.

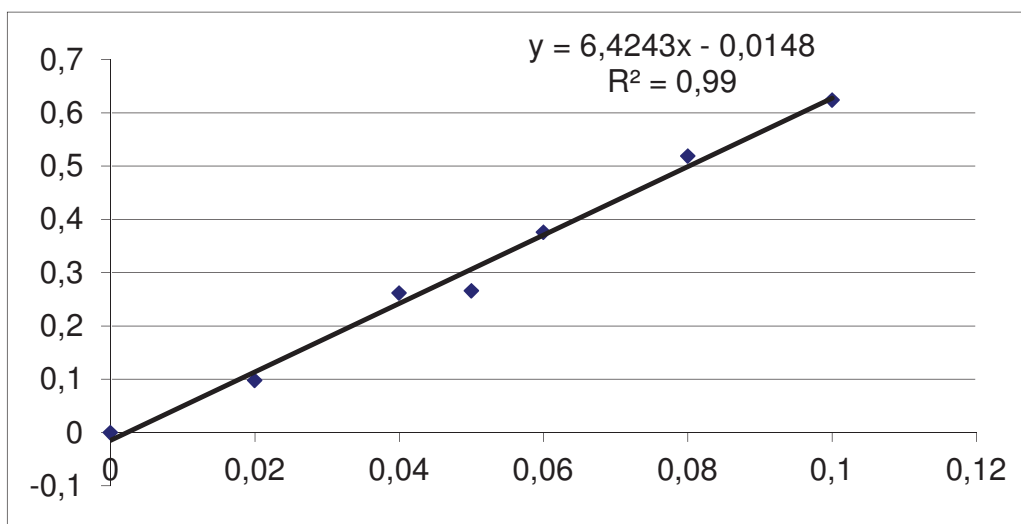


Figura 33. Curva padrão para a determinação de açúcares pelo método Dubois et al., 1956.

As amostras analisadas foram provenientes da água de maceração do bagaço de cana. Para o tratamento com duas lavagens, uma amostra do bagaço de cana após duas lavagens foi embebido em água e esta água foi utilizada para a medição de açúcar (amostra 1). O mesmo foi realizado para o bagaço com uma lavagem (amostra 2) e sem lavagem (amostra 3).

Desta forma, o valor de sacarose para o bagaço com duas lavagens foi igual ao valor da amostra 1, para uma lavagem, igual a soma da amostra 1 com amostra 2 e, para o bagaço sem lavagem, amostra um somada com a amostra 2 e 3.

AMOSTRA	ABSORBÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Amostra 1	0,111	0,047134
Amostra 2	0,077	0,014289
Amostra 3	0,288	0,019582

Tabela 46. Valores de açúcares totais determinados pelo método de Dubois et al.

A partir destes cálculos foram encontrados valores de 0,019 g/L, 0,033 e 0,08 g/L, para o bagaço com duas lavagens, uma lavagem e sem lavagem, respectivamente.