



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



ELIZANDRO LIMA FREITAS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR *PENICILLIUM SCLEROTIORUM* (UCP 1040) NA SÍNTESE DE BIOSURFACTANTE APLICADOS NA BIODETERIORAÇÃO DE PETRODERIVADOS**

Campina Grande  
2021

ELIZANDRO LIMA FFREITAS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR *PENICILLIUM SCLEROTIORUM* (UCP 1040) NA SÍNTESE DE BIOSSURFACTANTE APLICADOS NA BIODETERIORAÇÃO DE PETRODERIVADOS**

Trabalho de Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

**Área de concentração:** Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo

**Campina Grande  
2021**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F866b Freitas, Elizandro Lima.  
Biotransformação de resíduos agroindustriais por *penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na síntese de biossurfactante aplicados na biodeterioração de petroderivados [manuscrito] / Elizandro Lima Freitas. - 2022.  
74 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Química - Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Hέλvia Walewska Casullo de Araújo, Departamento de Química - CCT."

1. Tensão superficial. 2. Bioemulssificante. 3. Impactos ambientais. 4. Fungos filamentosos. I. Título

21. ed. CDD 540

ELIZANDRO LIMA FREITAS

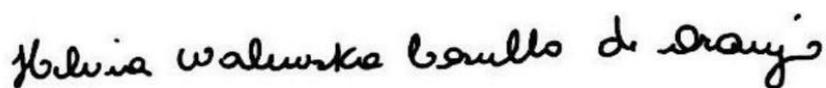
BIOTRASNFORMAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR *PENICILLIUM SCLEROTIORUM* (UCP 1040) NA SÍNTESE DE BIOSSURFACTANTE APLICADOS NA BIODETERIORAÇÃO DE PETRODERIVADOS

Trabalho de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Biotecnologia.

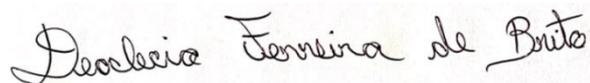
Aprovada em: 09/03/22.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Prof. Dr. Deoclecio Ferreira de Brito  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Prof. Dr. Marcello Maia de Almeida  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Aos meus pais, pela dedicação,  
companheirismo e amizade, DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças para continuar nos dias difíceis, mesmo eu não acreditando que seria mais possível prosseguir.

Aos meus pais (Antônio e Eliane), pelo incentivo e encorajamento na busca de novos horizontes e por todo apoio e carinho que me foi dado, se hoje eu cheguei até aqui, foi graças a vocês.

A minha orientadora, Hélvia Walewska Casullo de Araújo, que tem sido essencial nesta nova etapa da minha vida acadêmica, mostrando-me que existe um mundo que não enxergamos a ser explorado e pesquisado e por todo apoio, paciência e dedicação que me foi dado ao longo deste trabalho.

A Sonally de Oliveira Lima, que tem contribuído em todos os momentos da pesquisa, meu muito obrigado por todo conhecimento compartilhado durante esse tempo.

Aos professores do Curso de pós-graduação em química da UEPB, que contribuíram ao longo desse tempo, por meio das disciplinas e debates, para a minha formação e o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao PPGQ e a coordenação do programa, na pessoa de Mary Cristiana e Simone Simões, e ao secretário do programa de pós-graduação da UEPB, David, por toda atenção e suporte durante cada etapa do mestrado.

Aos amigos que aqui fiz: Darlei Gutierrez, Elane Salvador, Idris, Rénally Marraly, que me acompanham desde o PIBIC, e Vitor Dantas, por todo o apoio durante esses dois anos e conhecimentos compartilhados e por tornar tudo mais fácil, meu muito obrigado.

Aos meus amigos, Raquel Araújo Luna, Hamilton Macêdo, Suênia Samara, por sempre me apoiarem, incentivarem a continuar e por acreditar que sou capaz, a vocês, deixo minha eterna gratidão.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, por ter cedido o fungo utilizado na pesquisa.

Agradeço, a Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e a Fundação de apoio à pesquisa do estado da Paraíba (FAPESQPB), pelo apoio financeiro durante o tempo que foi me concedida a bolsa, tem sido de grande valia para a disseminação do conhecimento.

“Só sabemos com exatidão quando sabemos pouco. À medida que vamos adquirindo conhecimento, instala-se a dúvida.”

Johann Wolfgang Von Goethe

## RESUMO

Os resíduos agroindustriais aplicados aos microrganismos apresentam elevado potencial na produção de biomoléculas de interesse industrial, através da produção de metabólitos secundários. Dentre esses, destaca-se os biossurfactantes, que são moléculas anfipáticas capazes de reduzir a tensão superficial. Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar o potencial biotecnológico do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na produção de biossurfactante utilizando substratos de baixo custo como: milhocina, soro de leite e óleo pós-fritura, de acordo com o planejamento fatorial de  $2^2$ , obtendo como variável resposta a tensão superficial (m.N/m) e o índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>). A eficiência do biossurfactante produzido foi analisado pelo líquido metabólito em propriedades dispersantes e biodegradação em compostos hidrofóbicos utilizando o DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol) como indicador de forma qualitativa. Foram realizados dois experimentos: o experimento 1, foi dividido em duas fases. Fase I, foi utilizado o soro de leite e o óleo pós-fritura segundo o planejamento fatorial de  $2^2$ , adicionados aos mesmos 20 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) à 28°C por 96h em condições estática, as mesmas condições em agitação a 150 rpm. Na fase II, foram repetidas as mesmas condições da fase I, utilizando a milhocina e o óleo pós-fritura, este sob agitação de 150 rpm. No experimento 2, foram utilizados os mesmos substratos da fase I e II, variando as concentrações do planejamento fatorial de  $2^2$ , a quantidade de discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) para 40 discos a 28°C e sob agitação a 150 rpm por 144h. O fungo apresentou a melhor redução da tensão superficial 42,77 m.N/m (condição 2: 5% de milhocina e 3% óleo pós-fritura) e índice de emulsificação de 52,2% (condição 8: 10% de milhocina e 3% óleo pós-fritura), utilizando como substrato o óleo de motor queimado, ambos no experimento 2. Embora, o biossurfactante produzido nestas condições não tenha apresentado bons resultados para a tensão superficial e índice de emulsificação, mostrou-se como excelente na biodegradação em compostos hidrofóbicos e, também como propriedade dispersante com 44,18 cm<sup>2</sup> de área. Tornando o processo econômico e atraente para as diversas indústrias utilizando substratos alternativos e de baixo custo, para a produção do biossurfactante.

**Palavras-Chave:** Tensão superficial. Bioemulsificante. Impactos ambientais. Fungos filamentosos.

## ABSTRACT

Agro-industrial residues applied to microorganisms have high potential in the production of biomolecules of industrial interest, through the production of secondary metabolites. Among these, biosurfactants stand out, which are amphipathic molecules capable of reducing surface tension. In this sense, the present work sought to evaluate the biotechnological potential of the fungus *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) in whey for biosurfactant production using low-cost substrates such as corn steep liquor, production whey and post-frying oil, according to a 2<sup>2</sup> factorial design, obtaining surface tension as a variable response (m.N/m) and the emulsion index (IE<sub>24%</sub>). The efficiency of the biosurfactant produced was analyzed by the metabolite liquid in dispersion properties and biodegradation in hydrophobic compounds using DCPIP (2,6-dichlorophenol-indophen) as an indicator in a qualitative way. Two experiments were accomplished: experiment 1 was divided into two phases. Phase I, whey and post-frying oil were used according to a factorial design of 2<sup>2</sup>, added to the same 20 discs of the fungus *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) at 28°C for 96h in static conditions, the same conditions in agitation at 150 rpm. In phase II, the same conditions as in phase I were repeated, using corn steep liquor and post-frying oil, the latter under agitation at 150 rpm. In experiment 2, the same substrates from phases I and II were used, varying the concentrations of the factorial design from 2<sup>2</sup>, the number of disks of the fungus *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) to 40 disks at 28°C and under agitation at 150 rpm for 144h. The fungus showed the best surface tension reduction of 42.77 m.N/m (condition 2: 5% corn steep liquor and 3% post-frying oil) and an emulsification index of 52.2% (condition 8: 10% of corn steep liquor and 3% post-frying oil), using burnt engine oil as substrate, both in experiment 2. Although the biosurfactant produced under these conditions did not show good results for surface tension and emulsification index, it showed excellent biodegradation in hydrophobic compounds and as a dispersing property with 44.18 cm<sup>2</sup> of area. Making the process economical and attractive for different industries using alternative and low-cost substrates to produce biosurfactant.

**Keywords:** Superficial tension. Bioemulsifier. Environmental impacts. Filamentous fungi.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Identificação macroscópica do fungo <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040) em meio BDA.....	19
Figura 2 - Identificação microscópica do fungo <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040) em meio BDA.....	20
Figura 3 - Esquema do processo de adsorção com moléculas tensoativas: (a) a maioria das cadeias hidrofóbicas apresenta característica linear, (b) múltiplas cadeias hidrocarbônicas.....	24
Figura 4 - Estrutura de um surfactante (tensoativo) .....	25
Figura 5 - Representação esquemática dos surfactantes sintéticos .....	26
Figura 6 - Estruturas químicas de alguns dos principais biossurfactantes .....	28
Figura 7 - Processo de biodegradação por microrganismo.....	35
Figura 8 - Processo de formação de micelas .....	36
Figura 9 - Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol como acceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula.....	42
Figura 10 - Processo de produção de biossurfactante .....	45
Figura 11 - Diagrama de Pareto para avaliação da Tensão superficial na produção de biossurfactante utilizando 20 discos do <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040) no modo estático e rotacionado por 96h e 28°C. ....	50
Figura 12 - Desvio padrão da milhocina.....	51
Figura 13 - Diagrama de Pareto para a variável resposta tensão superficial .....	53
Figura 14 - Valores previstos e experimentais da tensão superficial de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> aplicados ao biossurfactante produzido por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP) 1040.....	54
Figura 15 - Diagrama de Pareto para a variável resposta tensão superficial .....	55
Figura 16 - Valores previstos e experimentais da tensão superficial de acordo com o planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> aplicados ao biossurfactante produzido por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP) 1040.....	55
Figura 17 - Gráfico comparativo dos Índice de Emulsificação (96 horas, 28°C, 150 rpm, com 20 discos).....	57

Figura 18 - Índice de emulsificação da condição 1 do Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> (10% de milhocina e 5% de óleo pós-fritura) 96 dias de fermentação, 28°C,150 rpm.....	58
Figura 19 - Gráfico dos índices de emulsificação de todos os ensaios, utilizando 40 discos do fungo <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040).....	59
Figura 20 - Índice de emulsificação óleo queimado e óleo pós-fritura de diferentes ensaios.....	60
Figura 21 - Registros fotográficos realizados na análise qualitativa do método colorimétrico dos ensaios 1, 2, 5, 8, 9 ,10 da tabela 3, (A) Adição do DCPIP, (B) registro fotográficos em 24h, (C) registro fotográficos em 48h.....	61
Figura 22 - Dispersão obtida por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040).....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais classes de biossurfactantes e microrganismo envolvidos. ....	29
Tabela 2 - Classificação em relação ao peso molecular dos biossurfactantes .....	30
Tabela 3 - Primeiro ensaio: concentração máxima e mínima das variáveis independentes.....	44
Tabela 4 - Segundo ensaio: concentração máxima e mínima das variáveis independentes.....	44
Tabela 5 - Composição dos ensaios colorimétricos .....	47
Tabela 6 - Resultados da Tensão superficial (TS) da fermentação em agitação 150 rpm e estático por 96h a temperatura ambiente por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP) 1040).....	49
Tabela 7 - Resultados da Tensão superficial (TS mN/m) da fermentação em agitação 150 rpm por 96h a temperatura ambiente por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040).51	
Tabela 8 - Resultados da Tensão superficial (TS) da fermentação da milhocina e do soro de leite sob agitação 150 rpm por 144h a temperatura ambiente utilizando o fungo <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP) 1040.....	52
Tabela 9 - Resultados da emulsificação (%) da fermentação das condições do planejamento fatorial 22 em 150 rpm por 96h a 28°C com 20 discos do fungo <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040).....	56
Tabela 10 - Resultados da emulsificação (%) da fermentação das condições do planejamento fatorial 22 em 150 rpm por 96h a 28°C com 40 discos do fungo <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1040).....	59

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais aplicações do biossurfactantes em escala industrial .....	32
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência nacional de petróleo, gás natural e biocombustíveis
BDA	Ágar Batata Dextrose
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológica
CMC	Concentração Micelar Crítica
DCPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
FAO	Food and agricultural organization
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
MEOR	Recuperação Avançada de Petróleo
TS	Tensão superficial
UCP	Universidade Católica de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 Fungos filamentosos .....	18
3.2 Penicillium .....	20
3.3 Metabólitos secundários .....	22
3.4 Surfactante .....	24
3.4.1 CLASSIFICAÇÃO DOS SURFACTANTES .....	25
3.5 Biossurfactantes .....	26
3.5.1 BIOSURFACTANTES PROPRIEDADES E APLICAÇÕES .....	30
3.5.2 RECUPERAÇÕES DE PETRÓLEO .....	33
3.5.3 BIOSURFACTANTES NO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO .....	34
3.6 Concentração micelar crítica (cmc) .....	35
3.7 Resíduos agroindustriais .....	36
3.7.1 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO .....	37
3.7.2 SORO DE LEITE .....	38
3.7.3 ÓLEO PÓS- FRITURA .....	39
3.7.4 MILHOCINA .....	40
3.8 Bioteroração de petroderivados .....	41
3.9 Método colorimétrico .....	42
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>43</b>
4.1 Microrganismo e manutenção .....	43
4.2 Resíduos agroindustriais/substratos .....	43
4.3 Planejamento fatorial .....	43
4.4 Produção do biossurfactante .....	45
4.4.1 TENSÃO SUPERFICIAL .....	46
4.4.2 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (IE <sub>24%</sub> ) .....	46
4.5 Biodegradação de óleo lubrificante .....	46
4.5.1 MÉTODO COLORIMÉTRICO .....	46
4.5.2 MONTAGEM DOS ENSAIOS .....	47
4.5.3 MEDIDAS QUALITATIVAS .....	48
4.6 Teste de dispersão de petroderivados .....	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
5.1 Tensão superficial .....	49

5.2 Índice de emulsificação .....	56
5.3 Deterioração de petroderivados .....	60
5.3.1 TESTE QUALITATIVO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DE MOTOR QUEIMADO (LUB).....	60
5.4 Testes de dispersão .....	62
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>7 SUGESTÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os petroderivados exercem grande influência no modo de vida da sociedade atual, pois, o advento e a ascensão da indústria petrolífera possibilitaram grandes avanços em escala industrial, revolucionando setores das indústrias de alimentação, transporte, materiais de limpeza e com a contribuição na descoberta de novas substâncias.

A crescente demanda por petróleo, ocasionou a emissão de uma grande quantidade de hidrocarbonetos por meio do processo de extração, transporte, manuseio, transformação em novas substâncias e uso. Segundo dados da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o Brasil teve recorde de produção de petróleo (2,94 milhões de barris/dia) em 2020, isso corresponde a um aumento de 5,22% em relação ao ano de 2019 e 52,71% em 2010 (ANP, 2021).

O petróleo e seus derivados geram impactos ambientais, os quais podem afetar diretamente as propriedades físicas, químicas e mecânicas do solo, das águas superficiais e subterrâneas. Esses compostos hidrofóbicos apresentam efeitos adversos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares dos organismos vivos, dessa forma, prejudicando os ecossistemas marinho e terrestre. Entre os métodos empregados para tratar áreas contaminadas por substâncias hidrofóbicas, que pode ser aplicado por apresentar viabilidade econômica, está o processo baseado na remediação ou biodegradação desses compostos (SHI et al, 2019).

Para o processo de remediação/degradação podem ser utilizados os surfactantes sintéticos, que são muito utilizados pelas indústrias farmacêuticas, indústrias de alimentos e petrolíferas. Essas substâncias sintéticas contêm porções hidrofílicas e hidrofóbicas em sua estrutura que se distribuem entre as fases fluidas, com diferentes polaridades e pontes de hidrogênio. Tal propriedade possibilita uma ampla variedade de aplicações de interesse industrial (SARKAR, et al 2020).

Os tensoativos sintéticos são convencionalmente utilizados em diversos processos industriais, porém, apresentam problemas relacionados à sua toxicidade e recalcitrância, desse modo, a legislação ambiental combinada com a preocupação ambiental tem buscado desenvolver surfactantes de origem natural, produzidos por microrganismos, chamados biossurfactantes, como alternativa aos produtos existentes (SENA, 2014).

Dentre os problemas causados, em decorrência do petróleo e seus derivados destacam-se: a extração e os acidentes causados pelo petróleo, sejam estes, no solo ou na água, o desmatamento da área para extração, perfurações de poços, desastres ecológicos, impactos sobre os ecossistemas marinho e terrestre causando a extinção de espécies, aterramento de mananciais, descarte de águas residuais e incineração ou descarte de resíduos de petróleo em locais inadequados, entre outros (GOSSEN et al, 2006; SANTOS,2012).

Em caso de acidentes, envolvendo o derramamento de petróleo ou recuperação dele, são utilizados surfactantes sintéticos, os quais são largamente usados nas indústrias petrolíferas, no processamento de limpeza e no processo de recuperação de óleo nos reservatórios. Contudo, esses apresentam desvantagem quando comparados aos biossurfactantes, pois os surfactantes são tóxicos, não biodegradáveis, implicam na redução da tensão superficial da água, diminuindo a sua taxa de evaporação, aumentando a solubilidade de compostos orgânicos presentes nos corpos hídricos, entre outros (NITSCHKE E PASTORE, 2002).

Diante disso, vários estudos têm sido desenvolvidos, a fim de amenizar esses efeitos negativos, buscando formas alternativas eficientes e materiais de baixo custo, que gere o menor impacto possível ao meio ambiente. Uma das alternativas para a resolução dessa problemática, que vem sendo descrita na literatura, é o aproveitamento de rejeitos agroindustriais, como matéria prima, sendo aplicados a microrganismos, para a produção de biossurfactantes (EHRHARDT, 2015).

Em tratando-se de microrganismos, o planeta é constituído de uma grande variedade de espécies vivas, de dimensões microscópicas, as quais apresentam uma infinidade de formas diferentes de sobreviver. Esses, podem encontrar-se em qualquer tipo de ambiente da terra. Dentre essas espécies de seres vivos, destacam-se as bactérias, as leveduras e os fungos, que são organismos heterotróficos, espécies multicelulares ou unicelulares pertencentes ao Reino Fungi (SILVA e MALTA, 2016).

No que diz respeito aos fungos filamentosos, esses podem produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, durante a fase estacionária de crescimento, inclusive, moléculas tensoativas, as quais podem apresentar propriedades emulsificantes (NITSCHKE E PASTORE, 2002; GAUTAM et.al 2013,).

Dessa forma, os biossurfactantes, na sua maioria, são derivados de metabólitos secundários, compreendendo um grupo de moléculas anfipáticas,

apresentando características semelhantes aos surfactantes sintéticos. Essas biomoléculas tendem a se distribuir em interfaces, entre dois fluidos imiscíveis, diminuindo a tensão superficial da água (SPERB et al., 2015). Estas propriedades fazem destas biomoléculas uma ampla gama de aplicações industriais, como emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, detergência, solubilização e dispersão de fases. Dentre as principais vantagens dos biossurfactantes, em relação aos surfactantes sintéticos, destaca-se a baixa toxicidade e a elevada biodegradabilidade, estabilidade e funcionalidade às condições extremas de pH, temperatura e concentração de sais, sendo assim, uma excelente alternativa aplicada ao processo de remoção de compostos hidrofóbicos e metais pesados (GUDIÑA et al., 2015).

Nesse sentido, considerando a importância do tratamento de poluentes orgânicos, principalmente aqueles oriundos de petroderivados, bem como, os potenciais usos biotecnológicos dos microrganismos como o *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na produção de biomoléculas de interesse industrial, este trabalho buscou otimizar o processo de produção dessas biomoléculas, utilizando matéria-prima de baixo custo: o soro de leite, óleo pós-fritura e a milhocina. Objetivando a produção de biossurfactante e a biodeterioração de compostos orgânicos, além de reduzir os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado de resíduos agroindustriais.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

- Produzir um biossurfactante a partir de resíduos agroindustriais, com potencial de aplicação na deterioração de petroderivados, por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a habilidade de produção de biossurfactante pelo fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) utilizando resíduos agroindustriais soro de leite, óleo pós-fritura e milhocina;
- Avaliar e selecionar as melhores condições produzidas pelo planejamento fatorial de  $2^2$  em diferentes concentrações dos resíduos agroindústrias para proceder a otimização;
- Avaliar a capacidade tensoativa e emulsificante do biossurfactante produzido;
- Avaliar a eficiência do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na produção de biossurfactante;
- Avaliar a eficiência do biossurfactante produzido pelo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na biodeterioração de poluentes hidrofóbicos;
- Comparar o efeito da aplicação de surfactante químico e do biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na biodegradação de óleo usado.
- Validar os resultados através de métodos estatísticos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fungos filamentosos

Fungos são um dos grupos de organismo mais diversos do mundo, existem cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas. Atualmente, são conhecidas aproximadamente cerca de 120 mil espécies, o que corresponde 8% do total estimado, mas, apesar da grande diversidade existente, algumas espécies possuem distribuição limitada, sendo encontrados apenas em ambientes específicos. Essas espécies de microrganismos podem ser identificadas em qualquer substrato e ecossistema possível, e cada um apresenta uma característica diferente. Isso decorre por meio da reprodução desses microrganismos que pode ser teleomorfo (sexuada) e anamorfo (assexuada), (LIMA, 2015; ALMEIDA, 2015).

Os fungos, perante a sociedade, compreendem tanto aspectos positivos quanto aos negativos. Entretanto, a sua principal função na natureza é a de decomposição de compostos orgânicos. Assim, sendo essenciais no processo de reciclagem de nutrientes para o solo. Esses, também, são utilizados nas indústrias de alimentos, na formulação de ração animal, itens farmacêuticos, químicos, têxteis etc. Também são os principais responsáveis por causarem doenças em plantas, animais e nos seres humanos, além de trazerem prejuízos para o setor agrícola (LIMA, 2015)

Os fungos filamentosos mais encontrados são os dos gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pythium*, *Verticillium* e *Alternaria*. Esses microrganismos possuem a capacidade de secretar enzima para o meio ambiente, auxiliando na degradação de compostos químicos (MONTEIRO, 2012).

Embora o gênero *Penicillium* apresente muitas variações na sua coloração e no tamanho de suas colônias, demonstram bastante micélio vegetativo, são irregularmente ramificados, septados, hialino ou de cores vivas, nas quais algumas espécies apresentam cores marrons, azulada ou esverdeado, como afirma (MONTEIRO, 2012; OLIVEIRA et al., 2019). A figura 1, citada abaixo, apresenta o crescimento do fungo filamentoso *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) no meio de cultura Ágar batata Dextrose (BDA).

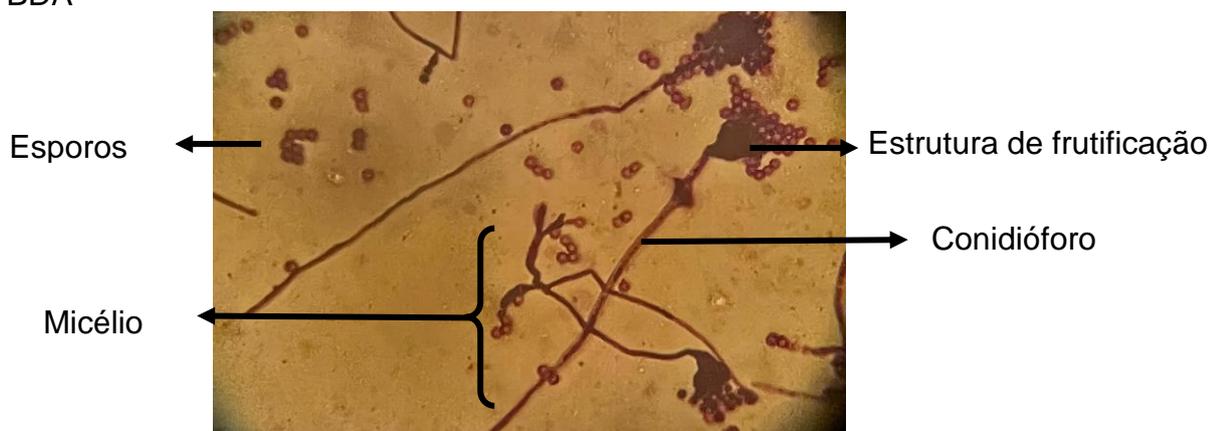
**Figura 1** - Identificação macroscópica do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) em meio BDA



**Fonte:** Autor (2021).

A estrutura básica dos fungos filamentosos é constituída de filamentos, esse denominadas de hifas, que em conjunto com outras hifas, formam o micélio. Esse apresenta duas funções distintas: a primeira é promover a fixação do fungo no substrato (micélio vegetativo), e a segunda função é promover a reprodução, através da produção de esporos (micélio reprodutivo). Ele ainda é responsável pelas características das colônias que formam, podendo ser cotonosos, úmidos e gelatinosos (ALMEIDA, 2015). A estrutura dos fungos é constituída de uma parede celular formada de quitina, glicanos e proteínas, sendo o ergosterol o principal constituinte da membrana plasmática (LIMA, 2015). A figura 2, apresentada abaixo, destaca a características microscópicas do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) crescida em meio BDA, apresentando as estruturas de frutificação, esporos, micélio e hifas.

**Figura 2** - Identificação microscópica do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) em meio BDA



Fonte: Autor (2021)

Dentre todas as espécies de fungos, destacam-se os fungos filamentosos, que são largamente utilizados na produção de alimentos, como, por exemplo, os produtos fermentados e bebidas alcoólicas. Também contribuem para indústria farmacêutica, fazendo-se presente no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, assim, atuam na atividade enzimática e na biotransformação. Devido a isso são de extrema importância biotecnológica, agrícola e ecológica, pois mantêm o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando no crescimento das plantas e na proteção contra inimigos, como outros microrganismos patogênicos. (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

### 3.2 *Penicillium*

Há mais de 200 anos que Link (1809) introduziu o gênero *Penicillium*, e descreveu três espécies *P. candidum*, *P. glaucum* e *P. expansum*. Desde então, mais de 1000 nomes foram introduzidos ao gênero. Muitos desses não são reconhecidos até hoje, devido a descrição incompleta pelos critérios modernos (SANTOS, 2016).

Em 1930 Thom compilou todas as espécies descritas até 1930, e considerou 300 espécies. Posteriormente, Raper e Thom, em 1949, aceitaram 137 espécies. No ano de 1979, Pitt descreveu 150 espécies, já Ramírez, em 1982, descreveu 252 espécies (incluindo as espécies descritas como *Eupenicillium*) (VISAGIE et al. 2014).

Os fungos pertencentes a esse grupo são frequentemente encontrados no solo e ambientes quentes. Algumas espécies têm uma grande importância na

indústria alimentícia, devido ao seu uso na produção de queijos, ou sua patogenicidade, que causam deterioração pós-colheita (MONTEIRO,2012). O gênero tem como característica a sua capacidade de produzir metabolitos secundários específicos, e podem conferir vantagens ecológicas importantes, tais como a eliminação de espécies microbianas concorrentes, e fonte de compostos bioativos importantes. Outro importante fato é o uso de penicilina, derivada de *P. chrysogenum*, como o primeiro antibiótico de largo espectro (TAKAHASHI et al, 2008).

A importância histórica da taxonomia do *Penicillium* em cepas isoladas de alimentos, solo e ambiente interno é compreensível dada a importância desses fungos como agentes de deterioração, produtores de micotoxinas e fontes de antibióticos. Grande parte da expansão do número de espécies do gênero *Penicillium* pode ser atribuída à revolução antibiótica e a facilidade com que o solo poderia ser coletado pelos viajantes e usado para isolar novas cepas ao retornar ao laboratório (VISAGIE et al., 2016).

A classificação de *Penicillium* tem evoluído bastante, desde a sua primeira descrição. Muitos micologistas utilizam critérios morfológicos de classificação, mas recentemente vem se utilizando outros novos critérios, entre eles, a produção de metabolitos secundários específicos, o que permite uma nova classificação das espécies (SIAHMOSHTEH et al., 2017).

O gênero *Penicillium* foi subdividido em quatro subgêneros, com base nas características culturais e morfológicas, considerando o arranjo dos conidióforos e conídios. Os subgêneros são os *Penicillium*, os quais apresentam conidióforo terverticilado, intensa esporulação, um bom crescimento em baixas temperaturas e pH. *Aspergiloides*, que apresentam conidióforo monoverticilado diretamente no final do conidióforo, com apenas um ponto de ramificação entre a cadeia de conídios. O *Furcatum*, apresenta conidióforo biverticilado tanto nas laterais como no final do estipe. O *Biverticillium*, é biverticulado (SAMSON et al, 2000; MONTEIRO, 2012)

O gênero *Penicillium* é conhecido por sua capacidade de produzir corantes de diversas cores. Essa sua capacidade é frequentemente comparada aos pigmentos obtidos por *Monascus*, com a vantagem de não haver a produção concomitante da micotoxina citrinina (MÉNDEZ et al., 2011).

*Penicillium* são microrganismos considerados GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo FDA (Federal Drug Administration), o que resulta em seu uso na

produção de queijos e medicamentos (MONTEIRO, 2012). As espécies de *Penicillium* têm sido extensamente estudadas, e desde a descoberta da penicilina até hoje, muitos metabólitos secundários com potencial farmacêutico já foram identificados (PETIT et al., 2009). Muitas espécies de *Penicillium* produzem substâncias que podem ser usadas como corantes, como o mitorubrinol, a mitorubrina, o mitorubrinal e o ácido mitorubrínico (SAMSON et al., 2011).

A espécie *Penicillium sclerotiorum* é incluída na seção Aspergilloides, devido a semelhança com o conidióforo do *Aspergillus*, além dessa espécie, estão incluídas as espécies: *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. lividum*, *P. thomii*, *P. spinulosum*, *P. implicatum*, *P. montanense* e *P. bilaiae*. (MONTEIRO, 2012). *Penicillium sclerotiorum*, pertence ainda a um complexo, chamado de “*Penicillium sclerotiorum*”, revisado por Rivera e Seifert (2011), através de análises morfológicas e filogenéticas de cinco regiões do DNA: genes  $\beta$ -tubulina (Bena), citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1), calmodulina (CMD), fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e da região ITS do Rdna. De acordo com os resultados obtidos os micologistas afirmam que se trata de um complexo formado por sete espécies: *P. sclerotiorum*, *P. guanacastense*, *P. mallochii*, *P. viticola*, *P. cainii*, *P. jacksoni*, e *P. johnkrugi*.

### 3.3 Metabólitos secundários

Metabólitos fúngicos são divididos em primários; que são os metabólitos essenciais para o crescimento e reprodução dos microrganismos, e secundários; que são os não essenciais para a vida celular, entretanto, são de grande importância para a biotecnologia (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016).

Um metabólito secundário fúngico é um composto químico produzido por um número limitado de espécies, e tem um poder de diferenciação elevado. É normal que espécies distintas de fungos tenham um ou mais metabólitos secundários em comum. Assim sendo, muitos metabólitos secundários são produzidos por fungos filogeneticamente muito diferentes. (FRISVAD et al., 2013)

Fungos filamentosos são conhecidos por produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, que tem um papel importante na diversidade e adaptação desses micro-organismos em vários nichos ecológicos. Há um grande interesse nesses metabólitos, devido ao seu potencial na biotecnologia, bem como no desenvolvimento de remédios, cosméticos e alimentos (TAKAHASHI et al, 2017).

Metabólitos secundários são estruturalmente moléculas heterogêneas de baixa massa molecular, e, apesar, de quimicamente diversificados, eles são produzidos por algumas vias Biosintética. Alguns desses metabólitos são micotoxinas prejudiciais, outras são utilizadas na medicina como remédios, e são eficientes para auxiliar no combate a doenças humanas. Às vezes, metabólitos benéficos e prejudiciais são produzidos pela mesma espécie. (BANANI et al., 2016).

As condições de cultivo são parâmetros críticos para a produção de metabólitos secundários por um microrganismo. Qualquer alteração no meio de cultura pode impactar a produção de certos compostos, como também influenciar no perfil geral de seus metabólitos secundários (VANDERMOLEN et al., 2013).

Sabendo que os microrganismos são capazes de modificarem suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com a condição nutricional a que são expostos, o rendimento de compostos bioativos, muitas vezes, pode ser substancialmente elevado pela otimização de alguns fatores físico-químicos como temperatura, salinidade, valor de pH, luz ou por modificações nos componentes do meio, presença de precursores ou inibidores (COSTA, 2016).

Os metabólitos secundários necessitam de condições específicas para sua produção e sua biossíntese está sujeita a diversos meios reguladores como temperatura, luminosidade e fontes de carbono e nitrogênio. Em condições laboratoriais normais muitos genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos podem mostrar pouca expressão e, conseqüentemente, reduzir a produção de metabólitos secundários específicos ao ponto de não serem detectáveis (VANDERMOLEN et al., 2013; COSTA., 2016).

A produção de metabólitos secundários depende, intrinsecamente, das espécies de microrganismos, de seus nutrientes e das condições de cultura. Qualquer alteração afeta diretamente a quantidade e qualidade da produção desses metabólitos (GOBBO-NETO et al., 2007).

Os fungos nos processos biotecnológicos, apresentam potencial para a fabricação de bebidas alcoólicas e alimentos fermentados, contribui para a indústria farmacêutica, na formulação de novos medicamentos, atuam nas atividades enzimáticas, produzindo enzimas de interesse industrial e na biotransformação de materiais, possuem grande importância na agricultura e na ecologia, pois mantem o equilíbrio do ambiente, consumindo restos de matéria orgânica, auxiliam na degradação de substâncias tóxicas e no crescimentos de plantas, e atualmente vem

sendo estudados nos processos de biorremediação de solos e águas contaminadas por petroderivados (ABREU et al, 2015; SOARES et al, 2011).

### 3.4 Surfactante

Os surfactantes originam-se dos derivados do petróleo, e seu nome advém da expressão “*surface active agent*” cujo significado é agente de superfície. São compostos químicos que atuam diretamente na superfície e na interface dos líquidos, formando um filme molecular promovendo, dessa forma, a redução da tensão superficial (CAVALCANTE, 2014).

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, que possuem duas extremidades, uma hidrofóbica constituída frequentemente por hidrocarboneto de cadeias alifáticas, grupos policíclicos ou aromáticos, no qual interagem com substância apolares, a essa extremidade da molécula dá-se o nome de cauda, e uma parte hidrofílica, no qual pode ser classificada como iônica, não-iônica, neutra ou anfótera. Devido a essas características estruturais, essas moléculas podem alterar as propriedades superficiais e interfaciais de diferentes fases seja sólido, líquido ou gasoso, permitindo, desse modo, se dispersar ou misturar na forma de emulsões em água ou outro líquido (BARROS et al., 2007; DURVAL, 2017; ROVINA, 2018).

A parte apolar da molécula é responsável pelas propriedades dos surfactantes, que dependendo da estrutura molecular, pode apresentar propriedades de adsorção, formação de micelas, dispersão ou agregação de sólidos, formação de macro e/ou microemulsões, ação espumante ou antiespumante, solubilidade, molhabilidade ou detergência (VALPUESTA, 2008). Figura 3, logo abaixo, mostra o esquema de adsorção das moléculas de surfactantes na interface ar-líquido.

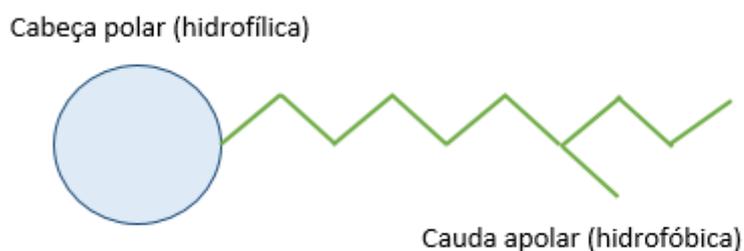
**Figura 3** - Esquema do processo de adsorção com moléculas tensoativas: (a) a maioria das cadeias hidrofóbicas apresenta característica linear, (b) múltiplas cadeias hidrocarbônicas.



Fonte: Mayer, (2000).

Abaixo, a figura 4 mostra de forma geral a estrutura de um surfactante/tensoativo, no qual contém em sua estrutura uma parte hidrofóbica (apolar) e outra hidrofílica (polar). Devido as suas características estruturais, essas moléculas têm a capacidade de se distribuir nas interfaces fluidas de substâncias imiscíveis alterando suas propriedades e reduzindo a tensão superficial dos mesmos (NITSCHKE e PASTORE, 2002; SILVA et al, 2015).

**Figura 4** - Estrutura de um surfactante (tensoativo)



**Fonte:** Silva et al., (2015)

A maioria dos surfactantes comerciais produzidos no mundo, são derivados do petróleo. Essa classe de tensoativos representa uma das mais importantes classes de produtos químicos industriais em volume de produção. A produção e o uso no mundo são crescentes, estima-se que no ano de 2015 o mercado atingiu a marca de 30,65 bilhões de dólares sendo os EUA, a China, a Europa Ocidental e a Ásia os responsáveis pela maior taxa de consumo de surfactantes (ROVINA, 2018).

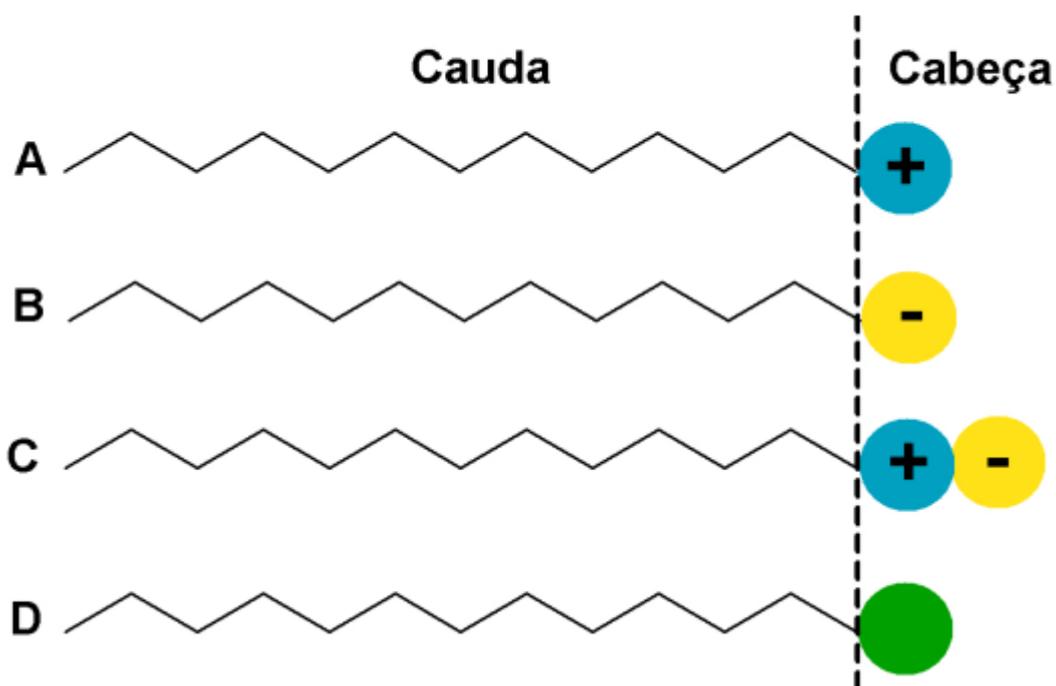
Essas substâncias tensoativas apresentam algumas desvantagens, quando comparadas com os biosurfactantes, principalmente, no que refere-se à biodegradação, a alta toxicidade, aumento da solubilidade de compostos orgânicos nos corpos hídricos, ao aumento de espumas na superfície deles, o qual prejudica o processo de fotossíntese, a redução da solubilidade do oxigênio, causando a morte de microrganismos, peixes e plantas aquáticas (FELIPE e DIAS, 2016).

### 3.4.1 Classificação dos surfactantes

A porção polar dessas substâncias contém átomos que apresentam cargas, que pode classificar-se como catiônico (carga positiva), aniônico (negativa), não iônico (neutra) e anfótero ou Zwitteriônico (possui ambas as cargas), esta última,

podendo se comportar como ácido ou base, a depender do pH do meio (DALTIM, 2011). A porção polar dessas substâncias pode conferir maior ou menor solubilidade da molécula em água (QUINTELA, 2018). A figura 5, mostra a representação da classificação desses surfactantes.

**Figura 5** - Representação esquemática dos surfactantes sintéticos



a. catiônico, b. aniônico, c. anfótero, d. não iônico

Fonte: Felipe et al., (2016)

### 3.5 Biossurfactantes

A busca pelo desenvolvimento tecnológico possibilitou grandes avanços na sociedade. Entretanto, trouxe impactos ambientais negativos para os ecossistemas aquáticos e terrestres, os poluentes mais comuns são os hidrocarbonetos, inseticidas, fungicidas, clorofórmios, gases de efeito estufa, entre outros. Esses contaminantes são tóxicos, pois, através da chuva, por exemplo, esses compostos são absorvidos pelos animais e vegetais, que compõem uma das bases alimentares dos seres humanos. Essa intoxicação ocorre pela acumulação desses compostos no organismo causando efeitos adversos. A princípio, foram utilizados surfactantes sintéticos para remover esses contaminantes, porém, essas moléculas sintéticas

apresentam toxicidade significativa no meio ambiente, além disso, são dificilmente degradados por microrganismo (JIMOH; LIN, 2019).

Nesse contexto, a preocupação ambiental combinada com a legislação de controle ambiental, têm buscado alternativas de desenvolvimento de surfactantes de origem microbiana, para os problemas existentes. Além disso, os microrganismos têm maior facilidade de processar os compostos de origem natural, ocorrendo, dessa forma a biodegradação, do que os compostos sintéticos (SANTOS et al., 2016; ROCHA E SILVA et al., 2019).

Os biossurfactantes ou tensoativos compreendem um grupo de moléculas anfipáticas, constituídas estruturalmente de uma porção polar solúvel em água e outra apolar, que geralmente é um hidrocarboneto, insolúvel em água, porém, solúvel em lipídeos (DESAI; BANAT et al., 2010; SOARES, 2015). Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas), a micro-organismos (glicolípido) e, até mesmo, no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais.

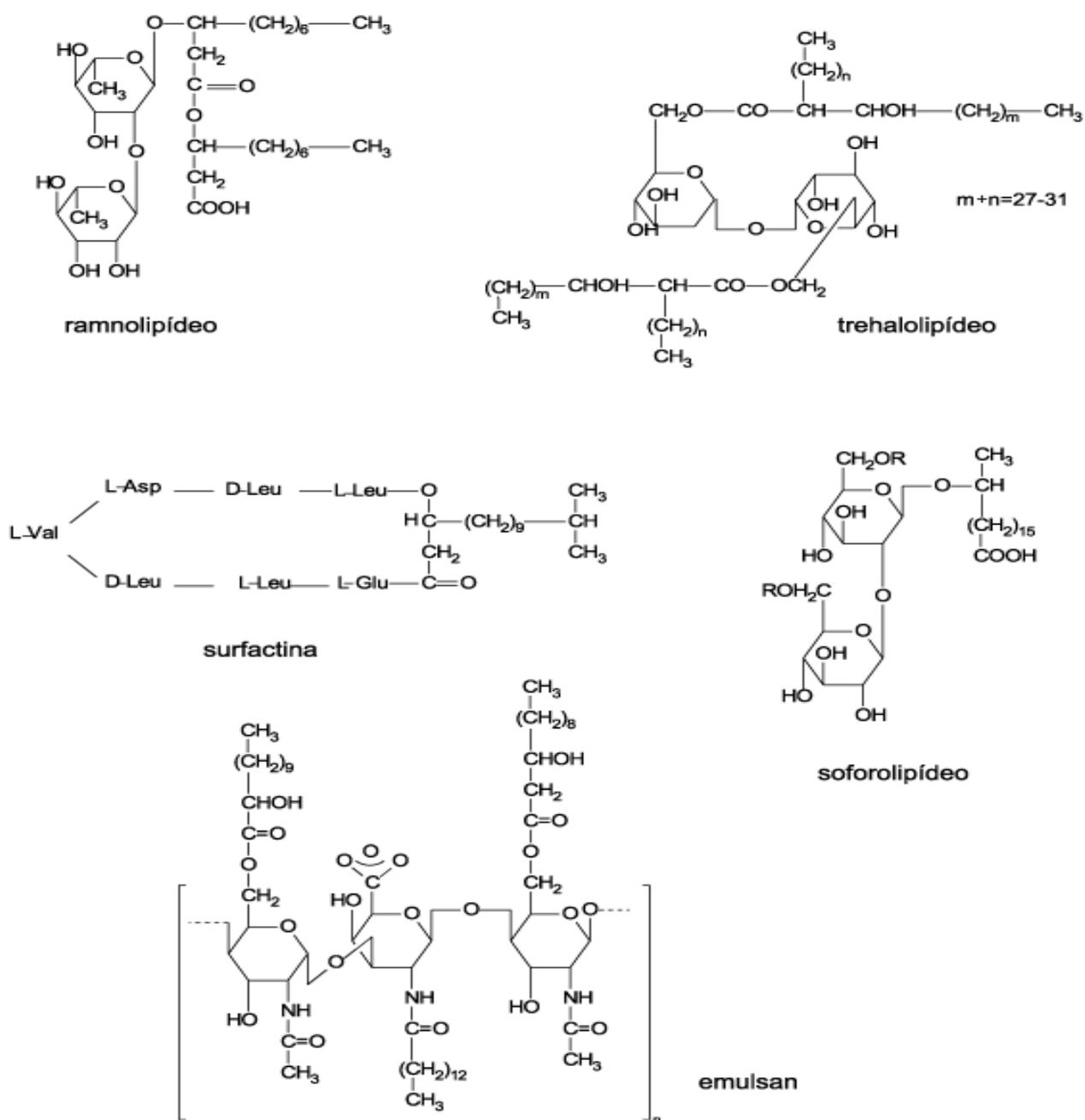
Nessa conjuntura, os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e interfacial, e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos ou leveduras (ARAUJO et al., 2013).

Surfactantes naturais são compostos tensoativos que podem ser sintetizados por vários microrganismos (bactéria, leveduras e fungos filamentosos), e têm atraído grande interesse por apresentar vantagens sobre os surfactantes químicos, ou seja, por possuírem um desempenho semelhante ou melhor e apresentar menor impacto ao meio ambiente, devido a sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (PEREIRA et al., 2013).

Essas biomoléculas são classificadas conforme a composição química e a origem microbiana. Entretanto, alguns autores os classificam de acordo com o peso molecular (OLIVEIRA et al., 2015), diferentemente dos surfactantes químicos que são classificados de acordo com seus grupos polares da região hidrofílica da molécula. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolípídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolípídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (ARAUJO et al., 2013).

Os biossurfactantes apresentam estruturas químicas comuns: uma porção lipofílica, composta por uma cadeia de hidrocarboneto de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidroxí, fosfato, carboxilato ou carboidrato (NITSCHKE e PASTORE., 2002). Adiante, a figura 6, mostra algumas estruturas químicas de alguns dos principais biossurfactantes.

**Figura 6** - Estruturas químicas de alguns dos principais biossurfactantes



Fonte: Nitschke et al., (2002).

A tabela 1, mostra os principais microrganismos produtores de biossurfactantes e o tipo de biomolécula produzida.

**Tabela 1** - Principais classes de biossurfactantes e microrganismo envolvidos.

<b>Tipos de biossurfactantes</b>	<b>Microrganismo</b>
<b>Glicolipídios</b>	
- Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola, T. apícola</i>
- Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis,</i> <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídios e lipoproteínas</b>	
- Peptídeo-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Sufactina	<i>Serratia marcescens</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b>	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
- 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>
<b>Surfactantes particulados</b>	
- Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- Células	Várias bactérias

Os biossurfactantes de alto peso molecular incluem os polissacarídeos, as proteínas, as lipoproteínas e os lipopolissacarídios, enquanto os biossurfactantes de baixo peso molecular englobam glicolipídios, os fosfolipídios e os lipolipídios (NOGUEIRA, 2019). A tabela 2, a seguir, mostra a classificação dos biossurfactantes de acordo com o peso molecular.

**Tabela 2** - Classificação em relação ao peso molecular dos biossurfactantes

<b>Baixo peso molecular</b>	<b>Alto peso molecular</b>
Glicolipídeos	Polimérico
Lipopeptídeos	Lipoproteínas
Ácidos Graxos	Particulados

**Fonte:** Adaptado (ROVINA, 2018)

A atividade superficial desses biotensoativos pode resultar em ação antimicrobiana, propriedade que está também aplicável nos setores alimentício e farmacêutico. Além disso, na área ambiental estes compostos são utilizados como auxiliares em processos de biorremediação de resíduos oleosos e metais tóxicos em solos e efluentes (RODRIGUES et al., 2015).

Algumas peculiaridades dos biossurfactantes são influenciadas pela tensão superficial como a emulsão, ação detergente, formação de micelas e solubilidade. Essas características consolidam a capacidade da dispersão de óleos em biossurfactantes e os ratificam como produtos biotecnológicos essenciais no controle dos desastres petrolíferos (BRASILEIRO et al., 2015). Eles também possuem potencial em aplicação na agricultura, em matéria-prima para cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes, higiene pessoal e processamento de alimentos, entre outros (PEREIRA et al, 2013; OLIVEIRA et al,2015).

### **3.5.1 Biossurfactantes propriedades e aplicações**

Os surfactantes naturais têm uma grande diversidade de aplicação nas indústrias de petróleo, alimentos, bebidas, cosméticos, têxteis, tintas, farmacêutica, mineração, celulose e nanotecnologia. Entretanto, o principal uso comercial dos biossurfactantes são as indústrias petrolíferas, pois utiliza-os, principalmente, para a recuperação dos resíduos de óleos em tanques de armazenamentos, limpeza de derramamentos de óleos e biorremediação de solo e água (SANTOS et al., 2016).

Os Biossurfactantes possuem uma alta capacidade de remover composto petroderivados do meio ambiente, diminuindo, assim, os impactos ambientais. Dessa forma, eles surgem como uma alternativa para diminuir os efeitos causados pelo uso de surfactantes, apresentando uma maior taxa da redução da tensão superficial, baixa toxicidade, alta especificidade e estabilidade em condições extremas de pH e temperatura, uma boa biodegradabilidade, biorremediação ambiental, principalmente na recuperação aprimorada de óleo (MEOR) e no tratamento de derramamento de petróleo (IBUKUN et al., 2018; SHOEB et al., 2013).

Apesar de existir uma grande variedade química de biossurfactantes, todos eles possuem algumas propriedades que são comuns, dentre as quais destacam-se a atividade superficial e interfacial, tolerância a variações de temperaturas, pH, força iônica, são substância produzidas por substratos renováveis, apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis, entre outras propriedades, afirma (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Assim, como os surfactantes sintéticos, os surfactantes naturais são moléculas anfipáticas, que apresentam uma grande variedade de atividade de superfície possibilitando a solubilização de substratos hidrofóbicos e várias propriedades funcionais tais como formação de espuma, separação de fases, redução da viscosidade, emulsificação, umectação, limpeza entre outras atividades funcionais aplicadas a diversas área do conhecimento (MENDONÇA et al., 2021). Essas características estão dispostas no quadro 1, mostrando as principais aplicações comerciais dos biossurfactantes, bem como as funções e o campo de aplicação. O quadro 1, sintetiza as principais aplicações dos biossurfactantes em escala industrial.

**Quadro 1 - Principais aplicações do biossurfactantes em escala industrial**

	<b>Aplicação</b>	<b>Função dos Biossurfactantes</b>	<b>Referência</b>
<b>Meio Ambiente</b>	Biorremediação; Operações de limpezas de derramamento de óleos;	Emulsificação de óleos, detergência, espalhamento, formação de espumas, inibição de corrosão de óleos combustíveis em equipamentos, lavagem de solos.	SILVA et al. (2014)
<b>Petróleo</b>	Recuperação avançada do óleo; desemulsificação.	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, desemulsificação de emulsões oleosas, solubilização de óleos, redução da viscosidade, dispersão de óleos, umidificação de superfícies sólidas,	SOUZA; VESSONI-PENNA; OLIVEIRA (2014)
<b>Mineração</b>	Operação de remoção de metais pesados; remediação de solos; flotação.	Umidificação e formação de espumas, coletores e espumantes, remoção de íons metálicos de soluções aquosas, solos e sedimentos, sequestradores de metais pesados, dispersão, inibição de corrosão de óleos.	SARUBBO et al (2015)
<b>Alimentos</b>	Emulsificação e desemulsificação; ingrediente funcional.	Solubilização de odores de óleos, controle de consistência, emulsificação, agente umectante, dispersante, detergente, espumante, espessante.	CAMPOS et al (2013);
<b>Medicina</b>	Microbiologia; farmácia; ações terapêuticas.	Agentes antiadesivos, antifúngicos, antibacteriano, antivírus, vacinas, moléculas imunomoduladoras.	DEMAIN (2000); LOPES (2011);
<b>Agricultura</b>	Biocontrole; Fertilizantes;	Agentes umectantes, dispersão, suspensão de pesticidas e fertilizantes em pó, emulsificação de soluções de pesticidas, eliminação de patógenos de plantas e para aumentar a biodisponibilidade de nutrientes para a planta associada a micróbios benéficos.	SACHDEV et al (2013);
<b>Cosméticos</b>	Saúde e produtos de beleza	Agentes de emulsificação, agentes espumantes, de solubilização, umectante, limpadores, agentes	VIJAYAKUMAR; SARAVANAN (2015);
<b>Limpeza industrial</b>	Detergência	Detergentes e sanitizantes para lavanderias, agentes umectantes e de dispersão, inibidores de corrosão.	VIJAYAKUMAR; SARAVANAN (2015)
<b>Nanotecnologia</b>	Síntese de nanopartículas	Emulsificação, estabilização.	MULLIGAN (2009);

**Fonte:** Adaptado (DE ALMEIDA et al, 2016)

A utilização de surfactantes para processos industriais é baseada no tipo de carga da molécula, no seu comportamento físico-químico, na adsorção e a

solubilidade. Esses são os critérios que determinam a eficiência de um tensoativo. Já, as características dos biossurfactantes que os torna possível sua utilização nos processos industriais são as propriedades físicas e químicas, redução da tensão superficial e a estabilidade de emulsões formadas (FILHO, 2021).

Apesar das grandes vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes químicos, ainda há obstáculos econômicos para o processo de produção em larga escala e para seu custo de produção. Nas últimas décadas concentraram-se em minimizar custos de produção, a fim de aumentar a sua utilização em pesquisas (NITSCHKE et al., 2011).

Outra desvantagem na utilização dos biossurfactantes é em decorrência do baixo rendimento de produção, visando a aplicação em escala industrial e, por consequência, o custo envolvido. Contudo, alguns estudos têm sido desenvolvidos, voltados para a otimização da produção de surfactantes naturais, utilizando-se materiais de baixo custo, os quais apresentem em sua composição carbono e nitrogênio. Dentre esses, destacam-se os resíduos agroindustriais como a milhocina, soro de leite, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de arroz, manipueira, melaço, óleos residuais etc. (SILVA ALENCAR et al., 2020).

Entretanto, estudos têm comprovado a eficiência do emprego de microrganismo na síntese de biotensoativos com propriedade emulsificante. Sobrinho et al., (2007), relata o uso da levedura *Candida sphaerica* suplementada com milhocina e resíduo de óleos vegetais, no qual, obteve a redução da tensão do meio para 26 m.N/m com um rendimento de 4,5 g/L de tensoativo após 6 dias de cultivo. Pereira et al., (2017), utilizando fungos Amazônicos UEA-115 e UEA-105 em meio líquido acrescido de óleo de soja, relata que foi extraído 1,80 g/L e 0,64 g/L de moléculas tensoativas respectivamente, após 30 dias de cultivo, obtendo 62,41% de índice de emulsificação para o fungo que obteve maior concentração de moléculas tensoativas.

### **3.5.2 recuperações de petróleo**

Durante o processo de extração do petróleo bruto, são adotadas algumas tecnologias almejando a recuperação máxima do petróleo dos poços de extração. Para isso, são utilizados os métodos convencionais ou primários, que usam a pressão natural dos reservatórios para conduzir o óleo e o gás para o local de produção e, nesse processo, consegue-se recuperar de 5 a 20% do óleo original do

local. Esse método depende da energia interna dos reservatórios, das características das rochas e das propriedades dos fluidos hidrofóbicos (QUINTELA, 2018).

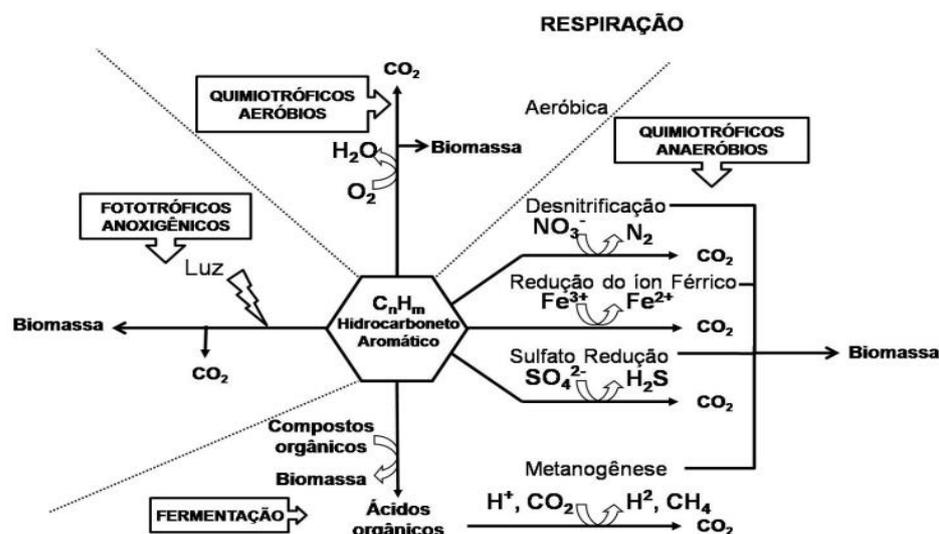
Os resíduos de petróleo preso nas rochas representam cerca de 50% a 65% de óleo retidos por força de capilaridade (fenômeno de atração ou repulsão no qual se observa o contato entre um fluido e um sólido fazendo com que suba ou desça, conforme molhe ou não a parede no qual se encontram), bem como pela tensão interfacial entre o hidrocarboneto e as fases aquosas. Dessa maneira, são empregados os biossurfactantes a fim de reduzir a tensão interfacial entre óleo/água e óleo/rocha, o que leva a redução das forças capilares, a qual é a principal força que impede o movimento do óleo pelos poros da rocha (SANTOS et al., 2016).

### **3.5.3 Biossurfactantes no processo de biorremediação**

O processo de biorremediação é uma tecnologia que emprega o uso de microrganismo com a finalidade de remover, minimizar ou deixar a níveis aceitáveis os contaminantes presentes no solo ou na água, reduzindo os danos causados ao meio ambiente, seja por meio do derramamento acidentais de petróleo ou por compostos inorgânicos, exigindo, desse modo, tratamento imediato (MORAIS e ABUD, 2012).

Esse processo, baseia-se na degradação do poluente através da ação de microrganismo, que metabolizam os compostos orgânicos para obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento, transformando-os em dióxido de carbono, água e biomassa. Com isso, tornam-se ecologicamente viáveis, de alta eficiência e de baixo custo no processo de remoção de compostos hidrofóbicos diminuindo, dessa forma, os impactos gerados ao meio ambiente (MACIEL, 2013). Esse processo de biodegradação pode ocorrer na presença ou na ausência de oxigênio como, apresentado na figura 7, logo abaixo.

**Figura 7 - Processo de biodegradação por microrganismo**



Fonte: Wetler-Tonini et al., (2010).

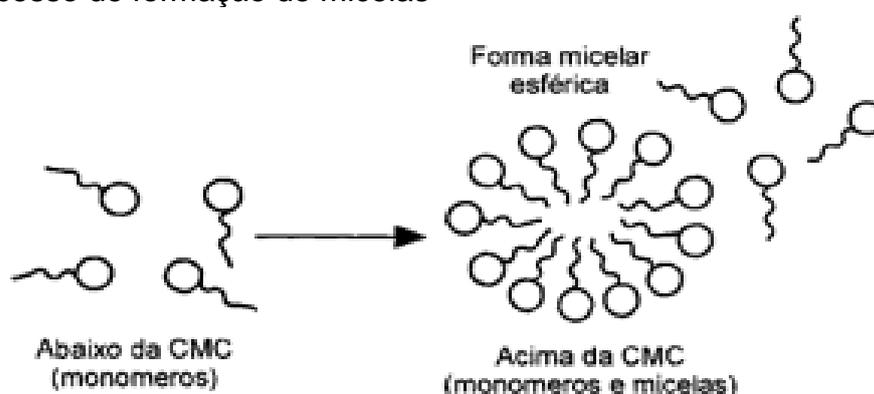
Diante disso, a utilização de biossurfactantes aplicados ao processo de biorremediação, tem se tornado um método promissor, favorecendo o melhoramento dos tratamentos, sobretudo, os relacionados aos contaminantes petroderivados, pois aumentam as áreas da superfície de compostos insolúveis conduzindo, dessa maneira, um aumento da mobilidade e a disponibilidade de hidrocarbonetos. Além disso, o contato com a superfície da molécula/célula aumenta a hidrofobicidade da superfície, possibilitando que os substratos hidrofóbicos se associem-se com mais facilidade, favorecendo a remoção dessas substâncias oleosas (DECESARO et al., 2015).

### 3.6 Concentração micelar crítica (CMC)

A adição de um tensoativo a uma solução altera as propriedades na superfície e na interface dos líquidos, reduzindo a tensão superficial entre outras propriedades (RODRIGUES et al., 2015). Em soluções diluídas, as moléculas dos tensoativos encontram-se dispersas, enquanto, que em soluções mais concentradas elas tendem a formar agregados de moléculas tensoativas. Isso ocorre devido a diminuição da área de contato entre as partes hidrofóbicas das moléculas do tensoativo e da água, dando origem as micelas, as quais podem apresentar formas esféricas com algumas dezenas a centenas de monômeros (RIZZATTI e ZANETTE, 2009; COSTA, 2014).

A concentração micelar crítica é alcançada em um pequeno intervalo de concentração, podendo ser detectada pela variância brusca, produzida em determinadas propriedades físico-química da solução, em função da concentração do tensoativo, tais como viscosidade, capacidade de solubilização de soluto, tensão superficial, espalhamento da luz, pressão osmótica, e a condutividade elétrica. O processo de formação de agregados é mostrado na figura 8, mostrada abaixo, (SANTOS et al., 2007; MANIASSO, 2001; RODRIGUES, 2015).

**Figura 8** - Processo de formação de micelas



**Fonte:** Maniasso., (2001)

As micelas formadas são agregadas por monômeros com porções hidrofílicas posicionadas na parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas na parte interna. Essas conformações dos agregados dependem do tipo de solução na qual estão inseridos, por exemplo, se a solução for apolar o contrário será observado, a porção hidrofílica fica na parte interna, enquanto a porção apolar permanece interagindo na parte externa da molécula (FILHO, 2021).

A forma da micela é uma configuração das moléculas do tensoativo que possibilita melhor estabilidade em solventes com polaridades diferentes. A parte hidrofobia, composta por uma cadeia de carbonos, não é responsável pela caracterização da molécula anfifílica, ela influencia na concentração micelar crítica (CMC) (SANTOS et al., 2007; LIMA, 2014).

### 3.7 Resíduos agroindustriais

A agroindústria e a indústria de alimentos são as maiores produtoras de resíduos sólidos e líquidos, esses quando descartados no meio ambiente de forma inadequada ocasionam a poluição de recursos hídricos e infertilidade do solo

(GUEDES et al., 2021). O Brasil apresenta um crescimento acentuado no desenvolvimento do agronegócio, o que ocasiona um acúmulo de resíduos. Nesse contexto, a estimativa de crescimento mundial é de 1,3 bilhão de toneladas de rejeitos agroindustriais por ano, desses 1/3 dos alimentos destinados para a alimentação é desperdiçado como resíduos oriundos do processamento, transporte, armazenamento, ou o próprio desperdício alimentar (SILVA ALENCAR et al., 2020).

Os resíduos agroindustriais compreendem uma diversidade de origens, seja restos de matéria orgânica; advindas de indústrias pesqueiras, ou resíduos produzidos pelas indústrias voltadas para produtos do campo, gerando um acúmulo de resíduos como palha de arroz, palha milho, cana-de-açúcar, soro do leite, milhocina, manipueira, resto de alimentos, óleos residuais, cascas de frutas entre outros (FURLAN et al., 2018).

Esses resíduos vêm sendo estudados como fonte de nutrientes, fornecendo carbono e nitrogênio para o meio de cultura, diminuindo o custo de produção e os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado (ASSIS et al., 2014; LIMA, 2014). O aproveitamento desses materiais possibilita a redução dos impactos ambientais causados pelo acúmulo e outros problemas correlacionados, além disso, consegue-se reduzir os custos de produção das indústrias, desse modo, esses materiais apresentam um alto valor agregado como subprodutos com alto potencial de biomassa e nutrientes, sendo convertidos pela biotecnologia em produtos de interesse industrial (SILVA ALENCAR et al., 2020; GUEDES et al., 2021).

### **3.7.1 Substratos para produção**

Em uma constante busca por melhorias na agroindústria e na tentativa de reduzir os impactos gerados pelas indústrias, pesquisas são realizadas em busca de mudanças através de novas políticas ambientais. Em consequência, a utilização de subprodutos industriais tem-se tornado importante para a economia e o meio ambiente, uma vez que evitam possíveis impactos ambientais. Estudos vêm sendo realizados acerca da utilização dos resíduos agroindustriais para crescimento de microrganismos e recuperação de biomassa em diversas áreas da biotecnologia, como saúde, agricultura, energia e meio ambiente (ZANOTTO, 2011).

Quando se utiliza resíduos agroindustriais como substratos para a obtenção de biossurfactantes e pigmentos, o custo de produção e o volume de compostos a ser despejado no meio ambiente são menores. Assim, o impacto ambiental da

indústria torna-se menor e, além disso, há a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados (MULLIGAN, 2009; ACCORSINI et al., 2012; LIMA, 2014).

A produção agroindustrial sempre gera algum tipo de descarte, seja de forma sólida, líquida ou gasosa. A geração de resíduos tem altos valores na demanda biológica de oxigênio e pode chegar a causar diferentes problemas, tais como o custo de coleta, eliminação, tratamento e perda de matérias-primas valiosas. A conscientização da poluição ambiental resulta na recuperação de diversos produtos valiosos e utilizáveis, que antes eram considerados resíduos. Os descartes agroindustriais são gerados durante o processamento industrial de produtos de diferentes indústrias da agricultura (COSTA FILHO et al., 2017).

Os produtos derivados das atividades agrícolas incluem palha, caule, folhas, casca, leguminosas, bagaço, grãos gastos, dentre muitos outros, que são produzidos ao longo do tempo. Devido à grande disponibilidade e à sua composição rica em compostos que podem ser utilizados em outros processos, há um grande interesse na reutilização do descarte, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (PANESAR et al., 2015).

A biotecnologia microbiológica tem criado novas possibilidades para a utilização do descarte produzido, contribuindo para o desenvolvimento de produtos de valor agregado. A utilização de descarte agroindustrial na fermentação para desenvolvimento de novos produtos pode ser efetiva em termos de redução de custos e da poluição ambiental. Nos últimos anos, no que diz respeito às matérias-primas e aos subprodutos agroindustriais, têm-se proposto como fontes alternativas de carboidratos de baixo custo para a produção de metabólitos microbianos, com o objetivo de minimizar também os problemas ambientais e os problemas relacionados ao seu descarte. (PANESAR; KAUR; PANESAR; 2015).

### **3.7.2 Soro de leite**

O leite é um alimento que apresenta um alto valor biológico, pois é constituído de uma grande variedade de nutrientes tais como, proteínas, lipídios, glicídios, sais minerais e vitaminas. O soro de leite é a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação convencional de queijos, considerado um efluente residual que pode acarretar graves problemas ambientais associados ao seu alto teor de matéria orgânica (BRASIL et al., 2015). Em torno de 90 a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, o qual contém

aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e, principalmente, lactose (ALVES et al., 2014; LUPKI et al., 2019).

As proteínas presentes no soro de leite apresentam propriedades tecnológicas interessantes como: solubilidade, emulsificação, gelatinização e capacidade de reter água. Além disso, têm função antimicrobiana e antioxidante. Devido a sua rica constituição nutricional, o soro de leite pode acarretar graves problemas quando descartado de forma incorreta no ambiente (LUPKI et al., 2019).

As indústrias produtoras de derivados de leite têm enfrentado grandes problemas com os resíduos gerados em sua produção. Segundo a FAO (*Food and agricultural organization*), a produção de queijo compreende um dos principais produtos agrícolas do mundo, estima-se que para cada quilo de queijo produzido, a indústria de laticínios gere nove quilos de subproduto com alta concentração de matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2013; LOURENCINI, 2014).

O soro do leite contém de 4 a 6g de proteínas por litro, e são de 15 a 20% (m/m) da proteína total contida no leite, este valor está relacionado com a produção de soro ácido (pH<5) ou soro doce (pH 6-7) e o tipo de queijo (PELEGRINE; CARRASQUEIRA, 2008). Nesse sentido, diversos estudos acerca da obtenção de bioprodutos foram realizados utilizando esse resíduo como meio de cultivo alternativo. Murador et al., (2020), avaliaram a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase em pH 6,6 a 37°C utilizando o soro de leite, ela é responsável pela elaboração de leite e derivados com baixo teor ou zero lactose.

### **3.7.3 Óleo Pós- Fritura**

O principal problema na utilização de resíduos em processos biotecnológicos está relacionado à seleção de substrato, de modo que contenha um balanço correto de nutrientes, permitindo o desenvolvimento celular, como também, a produção de insumo de grande interesse (NISTCHKE e PASTORE, 2011). Dentre os substratos, os óleos vegetais extraídos de sementes de várias plantas por meio de processamentos industriais, são refinados sem perder a cor, sabor, e odor original (JORGE et al., 2005).

Assim, a crescente utilização de óleos comestíveis para preparação de produtos fritos tem levado a um controle mais rigoroso dos óleos de fritura, uma vez que óleos e gorduras aquecidos e altamente oxidados podem apresentar substâncias potencialmente tóxicas. Entre os principais riscos à saúde envolvidos no

consumo dessas substâncias pode-se citar a pré-disposição à arteriosclerose e a ação mutagênica ou carcinogênica (SANIBAL et al., 2002).

Durante o processo de fritura, óleos e gorduras estão expostos à ação da umidade proveniente do alimento responsável pela alteração hidrolítica, o oxigênio do ar que entra na massa de óleo através da superfície do recipiente possibilitando a alteração oxidativa e a elevada temperatura em que ocorre a operação, por volta de 180°C, que provoca alteração térmica. Estes fatores contribuem para reduzir a qualidade do óleo e modificar sua estrutura, especialmente, a composição em ácidos graxos, observando-se diferenças entre o grau de insaturação (FREIRE et al., 2013).

O óleo comestível usado largamente nas residências, indústrias de alimentos e comércios é uma substância insolúvel em água que descartado de forma inadequada resulta em danos ambientais, por apresentar uma densidade menor que a água, esse resíduo cria na superfície do líquido uma barreira que dificulta a passagem da luz e oxigênio causando prejuízos a vida aquática. No solo, causa problemas de impermeabilidade, dificultando o escoamento da água das chuvas e o acesso aos nutrientes necessários para a sobrevivência da fauna e flora do local contaminado (SALES, 2017).

#### **3.7.4 Milhocina**

A substituição de substâncias sintéticas por resíduos agroindustriais para o fornecimento de carbono e nitrogênio como a milhocina, óleo pós-fritura entre outros, tem sido bastante estudado, contribuindo, favoravelmente, para os custos de produção de metabolitos secundários, reduzido, os resíduos no meio ambiente sem um tratamento adequado (LIMA et al., 2017).

De acordo com Lins (2019) e Farias (2015), a milhocina ou água de maceração de milho é subproduto agroindustrial gerado por via úmida do milho para a fabricação da farinha de milho, que apresenta baixo custo de obtenção e está amplamente disponível. Esse resíduo gerado possui em sua composição carboidratos e aminoácidos livres, o que a torna é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para o cultivo de microrganismo possuindo cerca de 21% a 45% de proteínas, 20% a 26% de ácido lático e inúmeros processos fermentativos de alta eficiência.

### 3.8 Bioterioração de Petroderivados

Os produtos derivados de petróleo são disseminados pelo mundo todo e seu uso intenso está associado à descarga de hidrocarbonetos no meio ambiente. A contaminação ambiental por derivados de petróleo tem sido alvo de diversos estudos há pelo menos quatro décadas, devido a esses compostos apresentarem substâncias como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são moléculas aromáticas recalcitrante que apresenta toxicidade relativa aos seres vivos, além de possuírem características mutagênicas e carcinogênica (CAVALCANTI, 2015). Por apresentar uma grande diversidade estrutural e possuírem cadeia longa, constituída de 20 ou mais átomos de carbono, esses compostos presentes no petróleo e derivados, tornam-se um obstáculo quando associados ao processo de biorremediação (OLIVEIRA et al., 2014).

Para Aichberger et al., (2005), há três pré-requisitos necessários à biorremediação: a primeira, está relacionada com a disponibilidade de compostos que servirão como fonte de nutrição aos microrganismos biodegradadores, a segunda, diz respeito a quantidade de microrganismos presente no ambiente e, por último, o nível de atividade desses microrganismos. Bidoia et al., (2010) complementa, ainda, que a temperatura, o pH, a aeração, a matriz orgânica e os nutrientes, constituem em fatores ambientais moduladores dos processos de biodegradação.

Todavia, muitas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos possuem a capacidade de degradar hidrocarbonetos, aumentando sua biodisponibilidade pela diminuição da tensão superficial por meio da produção de biosurfactante, ampliando, desse modo, o campo de aplicação biotecnológica por apresentar características favoráveis ao desenvolvimento de diversos produtos industriais (NIESCHER, et al., 2006; ABREU et al., 2015).

É importante salientar que métodos viáveis na geração de dados associados à biodegradação são fundamentais à elaboração de referências, quanto à biodegradabilidade de determinadas substâncias. Ao mesmo tempo, estudos sobre hidrocarbonetos de petróleo podem fornecer subsídios para as tomadas de decisão estratégicas na escolha da técnica de biorremediação mais adequada Bidoia et al., (2010). Desse modo, muitas técnicas já foram estudadas e se demonstram-se capazes de avaliar com precisão o potencial dos microrganismos em degradar

substâncias hidrofóbicas, estando incluso o método colorimétrico (HANSON, et al., 1993).

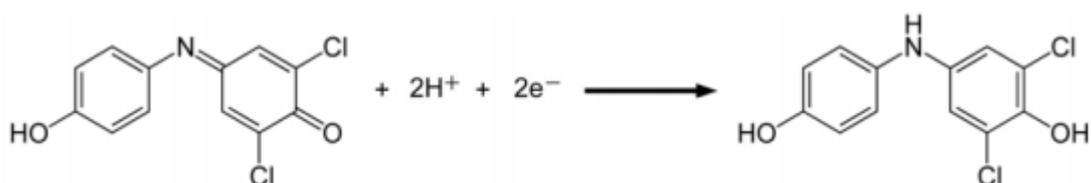
### 3.9 Método colorimétrico

Os compostos orgânicos, ao serem metabolizados pelos microrganismos no meio ambiente, passam por um processo de oxirredução, onde a principal via de obtenção de energia é a respiração. Nos processos aeróbicos, o oxigênio é o aceptor de elétrons e nos processos anaeróbicos são utilizados outros tipos de aceptores como, por exemplo, nitratos e sulfatos (QUITERIO, 2017).

Esse método é baseado na substituição desses aceptores por um mediador sintético, o 2,6-diclorofenol-indofenol ( $C_{12}H_7NCl_2O_2$ ) ou DCPIP, o qual apresenta coloração azul quando oxidado e incolor na sua forma reduzida (BIDOIA et al., 2010), devido as alterações na coloração, essas mudanças de cor podem ser monitoradas por um espectrofotômetro, avaliando, dessa forma, as alterações no valor de absorvância do indicador no comprimento de onda de 600 nm (QUITERIO, 2017).

A mudança de cor é devido à mudança na estrutura da molécula do DCPIP. O átomo de nitrogênio no centro da molécula é o aceptor de elétrons, onde ocorre a mudança da ligação dupla entre nitrogênio e carbono para uma ligação simples, esse processo é mostrado na figura 9.

**Figura 9** - Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol como aceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula.



Fonte: Bidoia et al., (2010)

Sendo assim, a redução causa a mudança da cor azul para incolor. Esta mudança, no entanto, pode ser usada em uma série de reações em que ocorram trocas de elétrons como a biodegradação de compostos (BIDOIA et al., 2010).

## 4 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Núcleo e pesquisa de extensão em Alimentos (NUPEA/CCT/UEPB) do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba Juntamente com o Laboratório de Núcleo de pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB/UNICAP) da Universidade Católica de Pernambuco.

### 4.1 Microrganismo e manutenção

O fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) foi isolado do solo do semiárido do Estado de Pernambuco, mantido no banco de Cultura do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco e registrado no World Federation Culture Collection- WFCC. As culturas foram mantidas em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) a 5 °C.

### 4.2 Resíduos agroindustriais/Substratos

Na formulação dos meios de produção foram utilizados os resíduos agroindustriais milhocina (proveniente do beneficiamento do milho, Cabo-PE), Soro de Leite (coletado em uma indústria de laticínios, Barra de Santana) e Óleo pós-fritura (proveniente de uma padaria, Barra de Santana).

### 4.3 Planejamento Fatorial

Buscando a menor redução da tensão superficial, utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactante, tendo como variável resposta a tensão superficial (m.N/m) e os substratos como variáveis independentes, foram utilizados dois planejamentos fatoriais  $2^2$ . O primeiro experimento, foi dividido em duas fases (fase I, e fase II). Na fase I, ocorreu a fermentação utilizando o soro de leite no modo estático e rotacionado (150 rpm), e na fase II, a milhocina foi fermentada sob rotação de 150 rpm, variando o volume da milhocina e do óleo pós-fritura, e em ambas as fases, a fermentação ocorreu sob temperatura ambiente, por um tempo de 96h e inoculados com 20 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), os volumes utilizados nesse primeiro planejamento estão apresentados na tabela 3, abaixo. No segundo experimento, foram utilizados os mesmos resíduos

agroindústrias, variando apenas os volumes desses substratos, o tempo de fermentação (144h) e a quantidade de discos do fungo (40 discos), sob agitação de 150 rpm e temperatura ambiente. A tabela 4, mostra o volume utilizado de cada substrato. As análises e as interpretações dos resultados foram realizadas usando o programa STATISTIC versão 6.0.

**Tabela 3** – Experimento 1: volume máximo e mínimo das variáveis independentes (soro de leite, óleo pós-fritura e milhocina)

Fase I: Modo estático e rotacionado a 150 rpm, 96h, 20 discos do fungo e temperatura ambiente

VOLUME DOS SUBSTRATOS			
VARIAVEL INDEPENDENTE	-1	0	+1
Soro de leite	5 mL	7,5 mL	10 mL
Óleo pós fritura	2 mL	4,5 mL	7 mL

Fonte: autor

Fase II: Modo sob rotação de 150 rpm, 96h, 20 discos do fungo e temperatura ambiente

VOLUME DOS SUBSTRATOS			
VARIAVEL INDEPENDENTE	-1	0	+1
Milhocina	10 mL	15 mL	20 mL
Óleo pós fritura	5 mL	7,5 mL	10 mL

Fonte: autor.

**Tabela 4** – Experimento 2: volume máximo e mínimo das variáveis independentes (soro de leite, óleo pós-fritura e milhocina, sob rotação de 150 rpm, 96h, 40 discos do fungo e temperatura ambiente)

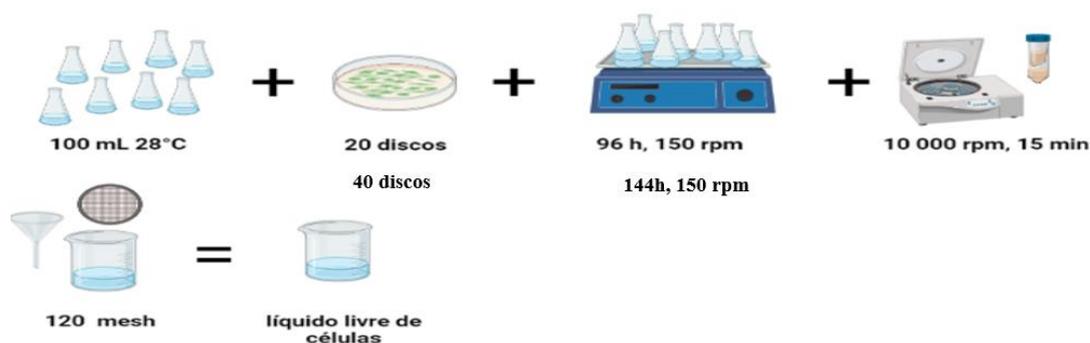
VOLUME DOS SUBSTRATOS			
VARIAVEL INDEPENDENTE	-1	0	+1
Soro de leite / Milhocina	5 mL	10 mL	15 mL
Óleo pós fritura	1 mL	2 mL	3 mL

Fonte: autor.

#### 4.4 Produção do Biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizado de acordo com o planejamento experimental descrito no item (4.3). A produção de biossurfactante ocorreu por fermentação em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL de solução do meio agroindustrial, cujos volumes estão apresentados nas tabelas 3 (fase I e II) e tabela 4 e aferidos com água destilada. No primeiro experimento, a fermentação ocorreu com a inoculação de 20 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), por um tempo de 96h, à 28°C sob agitação orbital de 150 rpm e no modo estático para o resíduo agroindustrial, soro de leite (fase I). A fermentação utilizando a milhocina, como substrato, ocorreu com 20 discos do mesmo fungo, por um tempo de 96h, à 28°C sob agitação orbital de 150 rpm (fase II). Para o segundo experimento, foram utilizados 40 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), incubados a 28°C durante 144h, sob agitação orbital de 150 rpm, utilizando os resíduos agroindustriais: soro de leite, óleo pós-fritura e milhocina. A biomassa produzida foi separada do líquido metabólico por centrifugação a 10.000 rpm por 15 min e em seguida filtrada (nylon silkscreen 120 mesh). A partir do líquido metabólico livre de células, foram determinadas as tensões superficiais, os índices de emulsificação e verificado o potencial de biodeterioração de petroderivados, adaptado (PEREIRA et al., 2017). A figura 10, apresentada abaixo, mostra o processo de produção do biossurfactante e a separação do líquido metabólico livre de células da biomassa.

**Figura 10** - Processo de produção de biossurfactante



Fonte: autor.

#### 4.4.1 Tensão superficial

A tensão superficial em ambos os ensaios foi determinada pelo método da gota, utilizando uma bureta graduada de 50 mL suspensa com ajuda de um suporte para a contagem de 20 gotas em um béquer de 100 mL para determinar o peso e o raio dessa gota e, assim obter o fator de correção correspondente, (BEHRING et al., 2004). A tensão superficial pode ser determinada pela lei de Tate através da equação 1.

(Eq.1)

$$\gamma = \frac{m \cdot g}{2\pi \cdot r \cdot f} = \frac{V \cdot \rho \cdot g}{2\pi \cdot r \cdot f}$$

#### 4.4.2 Índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>)

Para determinação do índice (E<sub>24</sub>), foi realizado em todos as condições do planejamento experimental utilizando para cada condição diferentes substratos tais como: óleo de coco, óleo de soja e óleo pós-fritura. Para a determinação do índice de emulsificação foram utilizados 2 mL de líquido metabólico e 1 mL dos diferentes substratos. O material foi homogeneizado em *vórtex* por 2 minutos a 25° C. Após 24 h, as leituras foram realizadas medindo em porcentagem a altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido, adaptado (Cooper e Goldenberg, (1987), através da equação 2.

(Eq.2)

$$(E_{24} \%) = H_e \times 100 / H_t,$$

Onde: H<sub>e</sub> = altura da emulsão; H<sub>t</sub> = altura total do líquido.

### 4.5 Biodegradação de óleo Lubrificante

#### 4.5.1 Método colorimétrico

A colorimetria utilizando o indicador DCPIP será utilizada para verificar o potencial de degradação do *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), e a comparação da velocidade de degradação do óleo lubrificante automotivo usado pela aplicação de surfactante químico comercial e do biosurfactante. Esse método colorimétrico foi realizado segundo Hanson et al. (1993) e Bidoia et al. (2010), com adaptações. Os

resultados consideram a alteração da coloração do meio e as leituras de absorbância. De acordo com a equação 3, ao longo do tempo de incubação por 96h. (Eq 3)

$$AA\% = \frac{100 - (Abs amostra - Abs branco)}{(Abs controle - Abs branco)}$$

#### 4.5.2 Montagem dos ensaios

A composição dos ensaios colorimétricos está apresentada na tabela 5. Na montagem dos ensaios colorimétricos, foram utilizadas as seguintes substâncias: (I) meio salino Bushnell-Hass - BH; (II) solução do indicador - DCPIP; (III) DCPIP e detergente comercial (Sc); (IV) inóculo de *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) - In; (V) detergente comercial e inóculo (VI) Lubrificante; (VII) lubrificante e detergente comercial; (VIII) lubrificante e inóculo e (IX) lubrificante, inóculo e detergente comercial, e (X) lubrificante, inóculo e biossurfactante.

**Tabela 5** - Composição dos ensaios colorimétricos

Ensaio	Sigla	Composição	Volume					
			Meio BH (mL)	DCPIP (µL)	Óleo Lub (µL)	Inóculo (µL)	Sc/Bsf (µL)	Água (µL)
1	BR	BH	7,5	-	-	-	-	900
2	CM. DCPIP	BH+DCPIP	7,5	400	-	-	-	500
5	CIn	BH+DCPIP+In	7,5	400	-	200	-	300
8	Lub + In	BH+DCPIP+Lub +In	7,5	400	50	200	-	250
9	Lub+ In+Sc	BH+DCPIP+Lub+ In +Sc	7,5	400	50	200	250	-
10	Lub+Bsf	BH+DCPIP+Lub+ In +Bsf	7,5	400	50	200	250	

Branco (BR), Controle do Meio (CM), Controle Inóculo (CIn), lubrificante e Inóculo (Lub +In), lubrificante, inoculo e surfactante comercial (Lub +In+SC) e lubrificante, biossurfactante e inoculo (Lub+In+Bsf).

**Fonte:** adaptado (Hanson et al, 2013).

É importar ressaltar que todo material utilizado na montagem dos ensaios foram autoclavados, com exceção de “In” e “Lub”. O monitoramento da

biodegradação foi realizado até o total de 48h. A análise foi realizada por medidas qualitativas.

#### **4.5.3 Medidas qualitativas**

A análise qualitativa monitorou a alteração de coloração dos meios contendo o indicador redox DCPIP de azul para incolor nos diferentes ensaios. Esta avaliação foi feita por meio de registro fotográfico contendo as imagens. Os registros fotográficos seguiram o mesmo padrão de iluminação e ordenação dos tubos e foram realizados a cada coleta de dados. Diferenciando os ensaios pela presença ou não de surfactante químico e o inóculo contendo o biosurfactante. A ordem dos tubos em todas as imagens obtidas em função do tempo segue abaixo (da esquerda para à direita).

#### **4.6 Teste de dispersão de petroderivados**

A capacidade de dispersão ou agregação de manchas de petróleo foram simuladas no laboratório, contaminando-se amostras de água com óleo de motor queimado. Os testes foram conduzidos pela adição do líquido metabólico livre de células (da melhor condição apresentada), de acordo com o planejamento experimental, (Youssef et al., 2004).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Tensão superficial

A Tabela 6, apresenta os resultados das condições de fermentação descrito no item (4.3), para a fase I, utilizando 20 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) nas condições rotacional a 150 rpm, por 96h e em estado estático, ambos à 28°C.

**Tabela 6** - Resultados da Tensão superficial (TS) da fermentação em agitação 150 rpm e estático por 96h a temperatura ambiente por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040).

Condições	Soro de leite	Óleo pós-fritura	TS (mN/m) 150 rpm	TS (mN/m) Estático
1	-1	-1	111,71	75,10
2	+1	-1	96,37	89,56
3	-1	+1	117,74	88,60
4	+1	+1	115,78	96,31
5	0	0	97,30	70,81
6	0	0	96,30	72,81
7	0	0	97,15	70,78
8	0	0	96,15	71,41

**Concentrações:** soro de leite 5 mL (-1), 7,5 mL (0), 10 mL (+1); óleo pós-fritura 2 mL (-1), 4,5 mL (0), 7 mL (+1).

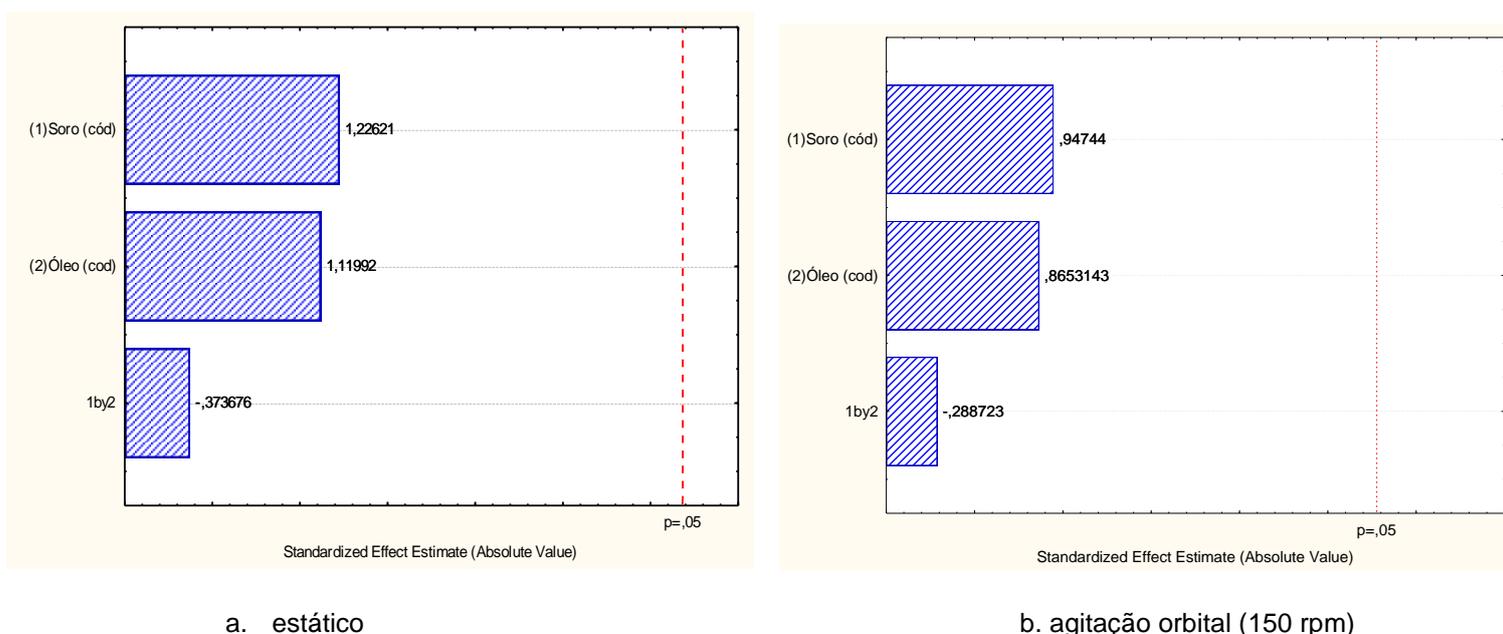
**Fonte:** autor.

De acordo com os resultados da tabela 6, o fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), nas condições do planejamento fatorial de 2<sup>2</sup>, utilizando o soro de leite, como parâmetro de análise na produção de biossurfactante e entre as condições analisadas, não apresentou redução da tensão superficial e nem a produção significativa de biossurfactante, apenas contribuiu com o aumento das tensões superficiais que ficou acima do esperado, apresentando tensões próximas e até mesmo superior à da água que é de 72,71 m.N/m. A menor tensão superficial foi de 70,48, m.N/m na condição 5, em estado estático do ponto central, o que nos sugere uma redução da tensão superficial muito pequena, porém, pouco significativa estatisticamente. Contudo, o aumento da tensão superficial está relacionado com as forças de coesão das moléculas, fazendo com ocorra o aumento da tensão superficial e, conseqüentemente, uma menor molhabilidade, maior viscosidade, e maior hidrofobicidade, entre outros.

Portanto, diante dos resultados apresentados na fase I, utilizando o soro de leite e óleo pós-fritura, sob agitação orbital e em modo estático, esperava-se obter reduções superficiais em torno de 40 m.N/m ou tensões próximas obtidas por bactérias, pois essa classe de microrganismos é conhecida por serem produtoras de biossurfactante. De acordo com Sobrinho (2007) e Fontes et al., (2008), os microrganismos conseguem reduzir a tensão superficial a índices bem inferiores. Entretanto, além do microrganismo, a produção de moléculas tensoativas depende de diversos fatores, tais como o tipo de substrato, temperatura, pH etc.

Com a finalidade de obter uma análise mais detalhada da eficiência na redução da tensão superficial através da interação das variáveis (soro de leite e óleo pós-fritura), foi feito o diagrama de Pareto, figura 11, que apresentam a fermentação por 96h no estado estático e a 150 rpm, respectivamente. Verifica-se que não houve uma interação significativa entre as variáveis independentes para a variável resposta tensão superficial (m.N/m), com nível de confiança de 95% em ambos os experimentos nas condições realizadas.

**Figura 11** - Diagrama de Pareto para avaliação da Tensão superficial na produção de biossurfactante utilizando 20 discos do *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) no modo estático e rotacionado por 96h e 28°C.



Fonte: autor.

De acordo com os diagramas apresentados acima, observa-se que a interação entre os resíduos utilizados contribuiu favoravelmente, para a redução da tensão superficial, porém, essa contribuição é insignificante estatisticamente.

A análise da interação da milhocina com o óleo pós-fritura inoculado com 20 disco da cepa utilizada, é mostrada na tabela 7 abaixo. De acordo com os resultados apresentados, seguindo as concentrações determinada pelo planejamento fatorial  $2^2$  (tabela 3, fase II). Observou-se que não houve diferença significativa entre as condições estudadas no ponto central.

**Tabela 7** - Resultados da Tensão superficial (TS m.N/m) da fermentação em agitação 150 rpm por 96h a temperatura ambiente por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040).

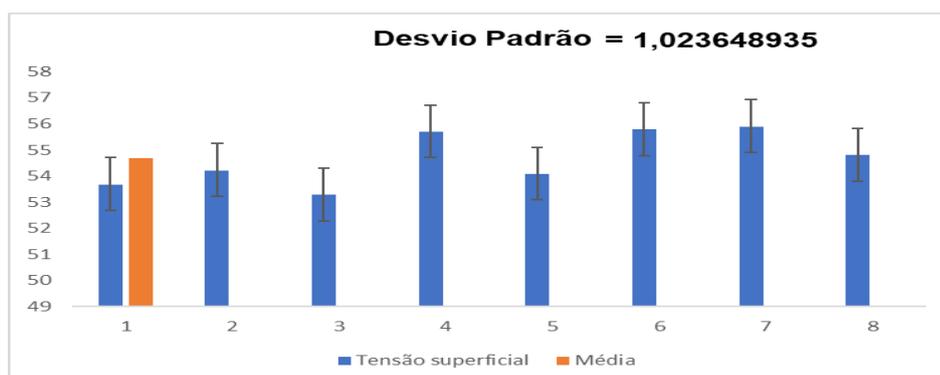
Condições	Milhocina	Óleo pós-fritura	TS (m.N/m)
1	-1	-1	53,68
2	-1	+1	54,22
3	+1	-1	53,27
4	+1	+1	55,70
5	0	0	54,08
6	0	0	55,79
7	0	0	55,90
8	0	0	54,80

**Concentrações:** Milhocina 10 mL (-1), 15 mL (0), 20 mL (+1); Óleo pós-fritura 5 mL (-1), 7,5 mL (0), 10 mL (+1).

Fonte: autor.

A partir dos dados apresentados na tabela acima, foi determinado o desvio padrão com a finalidade de verificar o grau de proximidade dos valores da tensão superficial dos ensaios, esses dados são apresentados na figura 12, abaixo.

**Figura 12** - Desvio padrão da milhocina



Fonte: autor.

Objetivando resultados melhores, outros ensaios foram realizados variando as concentrações das substâncias utilizadas nos ensaios anteriores. Seguindo o planejamento experimental 2<sup>2</sup>, com dez ensaios e dois pontos centrais, com um tempo de fermentação de 144h, inoculado com 40 disco do fungo. A tabela 8, mostra os resultados da tensão superficial da milhocina e do soro de leite, sob as mesmas condições do planejamento experimental 2<sup>2</sup>, a 150 rpm por 144h, apresentados na tabela 4 acima.

**Tabela 8** - Resultados da Tensão superficial (TS) da fermentação da milhocina e do soro de leite sob agitação 150 rpm por 144h a temperatura ambiente utilizando o fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP) 1040.

Condições	Milhocina/soro de leite	Óleo pós-fritura	TS (mN/m) milhocina	Ts (m.N/m) Soro de leite
1	-1	-1	56,61	77,02
2	-1	+1	42,77	71,52
3	+1	-1	51,76	71,55
4	+1	+1	56,64	70,02
5	-1	0	49,59	64,94
6	+1	0	53,56	66,06
7	0	-1	51,72	69,31
8	0	+1	44,56	69,31
9	0	0	45,19	84,42
10	0	0	46,95	82,90

**Concentrações:** Milhocina/soro de leite 5 mL (-1), 10 mL (0), 15 mL (+1); Óleo pós-fritura 1 mL (-1), 2mL (0), 3 mL (+1).

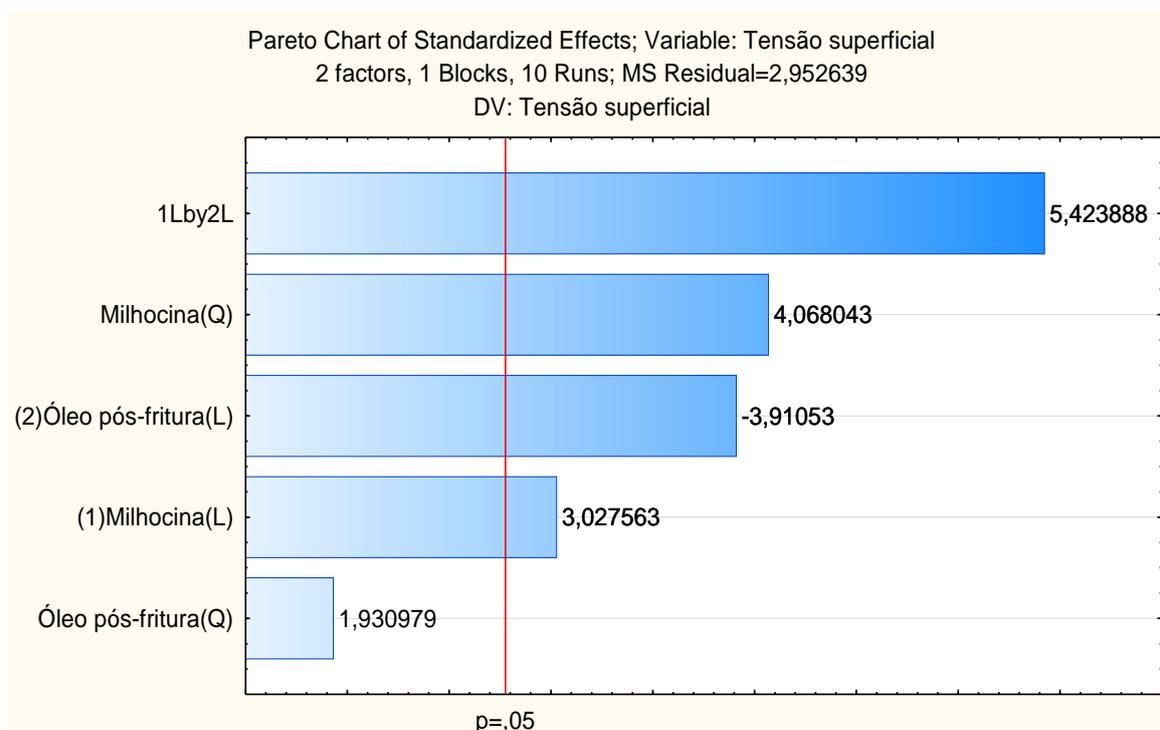
**Fonte:** autor.

Nos dados apresentados na tabela 8, observa-se que a menor condição obtida foi na condição 2 (5% de milhocina e 3% de óleo pós-fritura), reduzindo a tensão superficial da água de 72 m.N/m para 42,77 m.N/m. Com isso, observa-se que o resíduo soro de leite em todos os ensaios, apresentou sempre as maiores tensões superficiais, indicando que para o fungo utilizado sob essas condições, ele não apresenta condições favoráveis para a produção de metabolitos secundários, em consequência, a milhocina se mostrou mais favorável nutricionalmente para essa finalidade.

A figura 13, mostra a análise estatística representada pelo diagrama de Pareto, utilizado para avaliar as concentrações dos substratos, milhocina e óleo pós-fritura, e suas interações na redução da tensão superficial. Tendo como variável

dependente a tensão superficial, e a milhocina e o óleo pós-fritura, como variáveis independentes.

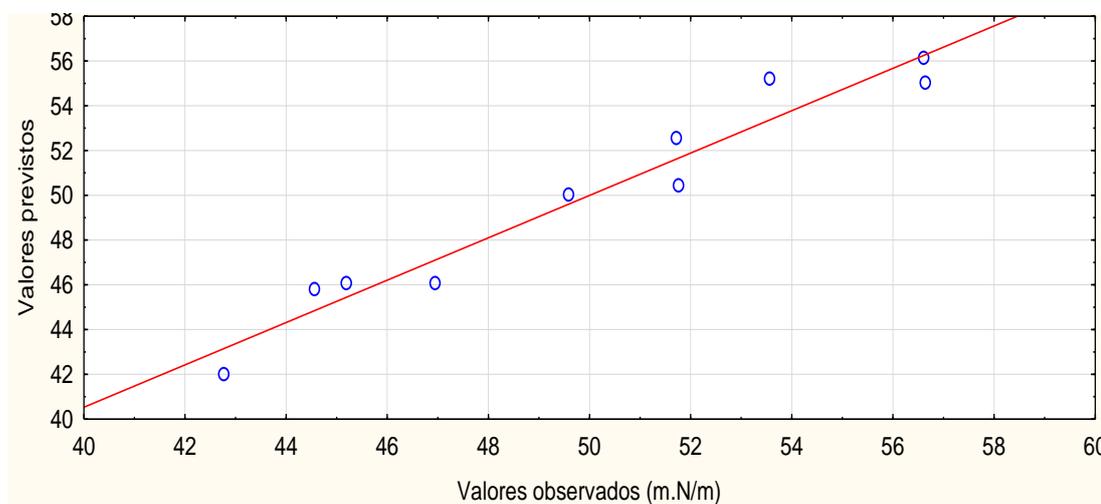
**Figura 13** - Diagrama de Pareto para a variável resposta tensão superficial



Fonte: autor.

O diagrama apresentado acima, mostra que, o óleo pós-fritura foi o que mais contribuiu para a redução da variável dependente, observa-se ainda, que as interações dos substratos e, entre eles, foram significativas para o nível de confiança de 95% dentro das condições experimentais. Entretanto, com exceção do óleo residual, essas interações contribuíram positivamente para o aumento da tensão superficial. De acordo com a figura 14, apresenta logo abaixo, os valores experimentais obtidos com os substratos milhocina e óleo pós-fritura, tendo como variável resposta a tensão superficial, mostrou-se próximo do ajuste do modelo linear, indicando que os dados obtidos para esse experimento, estiveram próximos dos valores previsto em todos os ensaios analisados, além disso, o modelo de regressão linear obteve um alto coeficiente de determinação ( $R^2= 0,946$ ), indicando que 94,6% da variação do processo foi explicado pelas variáveis independentes.

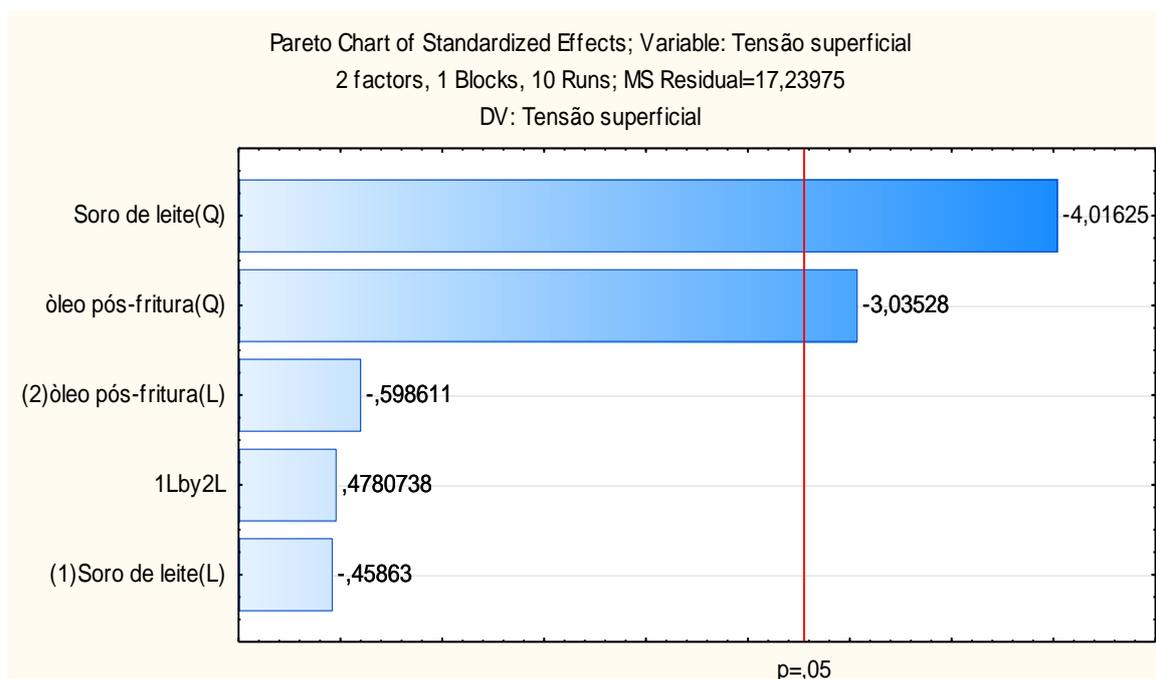
**Figura 14** - Valores previstos e experimentais da tensão superficial de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$  aplicados ao biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* (UCP) 1040.



**Fonte:** autor

A figura 15 abaixo, apresenta o diagrama de Pareto e o resultado da interação do soro de leite e o óleo pós-fritura, tendo como variável dependente a tensão superficial, sob as mesmas condições do planejamento experimental  $2^2$ , apresentado na tabela 4. Os resultados apresentados, foram significativos, entretanto, o soro de leite e óleo pós-fritura, contribuiu para a redução da tensão superficial, mas esses resultados significativos não foram observados experimentalmente e a interação entre esses dois substratos não foi favorável estatisticamente para a redução da variável analisada, contribuindo dessa forma para o aumento da tensão superficial.

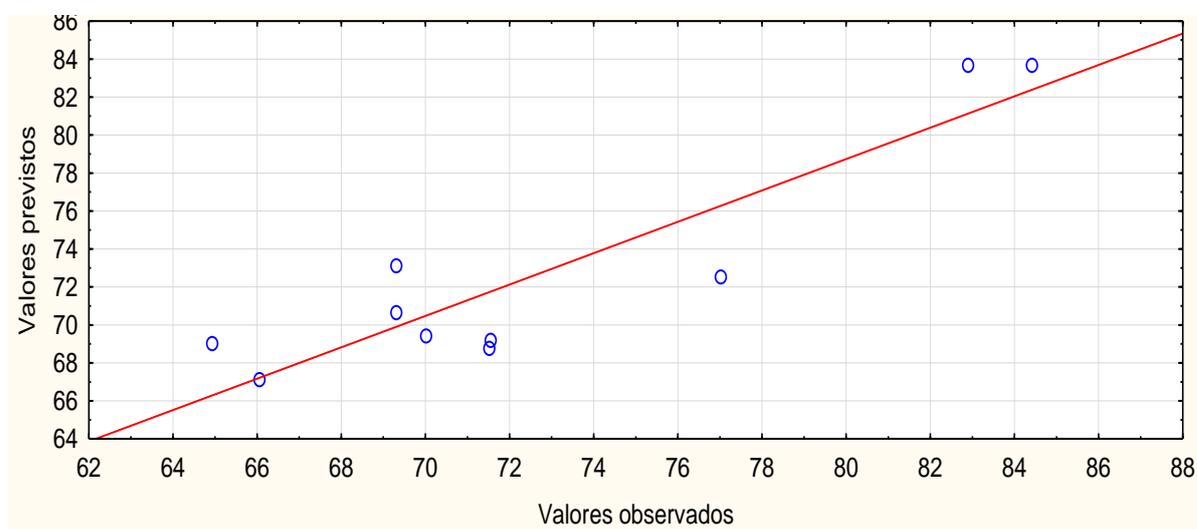
**Figura 15** - Diagrama de Pareto para a variável resposta tensão superficial



Fonte: autor.

O modelo de regressão linear apresentado abaixo (figura 16), para os substratos soro de leite e óleo pós-fritura, mostrou que a maioria dos dados obtidos em todas as condições analisadas não se ajustaram ao modelo linear com um coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,8264$ ).

**Figura 16** - Valores previstos e experimentais da tensão superficial de acordo com o planejamento fatorial 22 aplicados ao biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* (UCP) 1040.



Fonte: autor

## 5.2 Índice de Emulsificação

Os Bioemulssificantes são caracterizados pela formação de macro e micro emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água, ou água em hidrocarbonetos. Para tanto, neste trabalho observou-se índices de emulsificação significativa na utilização de alguns ensaios da milhocina, inoculada com 40 discos do fungo. Entretanto, a utilização da melhor condição, ficou abaixo de 50%, devido à formação de emulsões entre as duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade, líquido metabólico livre de células (polar) e hidrocarboneto (apolar).

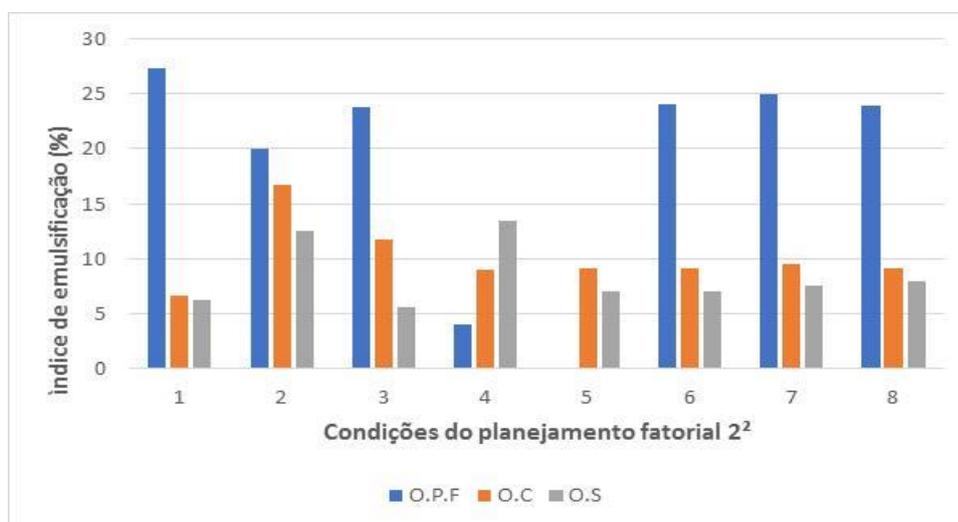
O índice de emulsificação avaliado, refere-se ao valor quantitativo da emulsão produzida pelo biossurfactante presente no líquido metabólico, e quanto maior esse valor, mais estável será a emulsão formada, o que não foi observado na maioria das condições experimentais analisadas. As análises de índice de emulsificação, foram verificadas de acordo com o planejamento estatístico de  $2^2$ , para o experimento utilizando o resíduo agroindustrial milhocina e o óleo pós-fritura. Esses valores estão representados na tabela 9, e em gráfico (Figura 17). Os dados comparativos entre os diferentes tipos de óleos (pós fritura, óleo de coco e soja) para o experimento da milhocina com 20 disco do fungo.

**Tabela 9** - Resultados da emulsificação (%) da fermentação das condições do planejamento fatorial  $2^2$  em 150 rpm por 96h a 28°C com 20 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040).

Índice de emulsificação (%)			
Condições	Óleo pós fritura	Óleo de coco	Óleo de soja
1	27,3	6,7	6,3
2	20,0	16,7	12,5
3	23,8	11,8	5,6
4	4,0	9,0	13,4
5	24,0	9,1	7,0
6	24,0	9,1	7,0
7	24,9	9,5	7,5
8	23,9	9,1	8,0

Fonte: Autor.

**Figura 17** - Gráfico comparativo dos Índice de Emulsificação (96 horas, 28°C,150 rpm, com 20 discos)



Fonte: Autor.

A figura acima, mostra que as emulsões ficaram abaixo de 50% em todos os ensaios, porém, o óleo pós-fritura foi o que apresentou os maiores índices de emulsificação para este planejamento fatorial de  $2^2$ . A condição 1 (10% de milhocina e 5% de óleo pós-fritura), obteve o maior índice de emulsificação cerca de 27,3% com 96h de fermentação, 28°C, sob agitação de 150 rpm, como mostra a Figura 17.

Velioglu e Urek (2015) utilizando *Pleurotus sajor-caju* em cultivo sólido, alcançaram um valor de índice de emulsificação sobre óleo de soja de 54,55% após 16 dias de fermentação. Velioglu e Urek (2015), cultivando *Pleurotus ostreatus* em cultivo submerso, obtiveram valor máximo de índice de emulsificação sobre óleo de soja de 60% após 13 dias de fermentação. Esses valores são superiores ao encontrado no presente trabalho, quando utilizado a melhor condição, porém esses índices de emulsificação foram alcançados em maior tempo de cultivo se comparado com o obtido nesse trabalho, que foi de 96h. esse resultado da emulsificação da melhor condição é mostrado na figura 18, abaixo.

**Figura 18** - Índice de emulsificação da condição 1 do Planejamento fatorial  $2^2$  (10% de milhocina e 5% de óleo pós-fritura) 96 dias de fermentação, 28°C, 150 rpm.



**Fonte:** Autor.

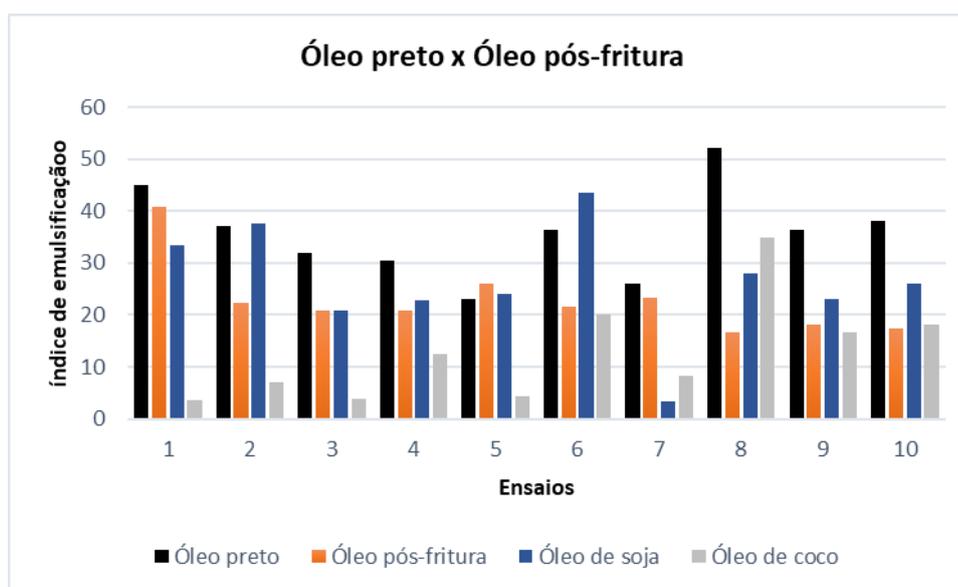
Os índices de emulsificação também foram obtidos com os dados da tabela 10, utilizando apenas a milhocina para os testes, por ter obtidos os melhores resultados experimentais. Para essas análises, ao invés de utilizar apenas a melhor condição, buscou-se verificar, qual ou quais das condições, obteria o(s) melhor(es) índice(s) de emulsificação para os diferentes tipos de óleos: óleo de motor queimado, óleo pós-fritura, óleo de soja e óleo de coco. Esses valores estão dispostos na tabela 10, e representado por gráfico (figura 19).

**Tabela 10** - Resultados da emulsificação (%) da fermentação das condições do planejamento fatorial  $2^2$  em 150 rpm por 144h a 28°C com 40 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040).

Índice de emulsificação (%)				
Condições	Óleo pós fritura	Óleo de coco	Óleo de soja	Óleo queimado
1	40,7	3,57	33,5	45
2	22,2	7,1	37,5	37
3	20,8	3,7	20,8	32
4	20,8	12,5	22,7	30,4
5	26	4,2	24,13	23
6	21,7	20	43,5	36,4
7	23,3	8,3	3,3	26,1
8	16,7	34,8	28	52,2
9	18,2	16,7	23,1	36,4
10	17,4	18,2	26	38,1

Fonte: autor.

**Figura 19** - Gráfico dos índices de emulsificação de todos os ensaios, utilizando 40 discos do fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040).

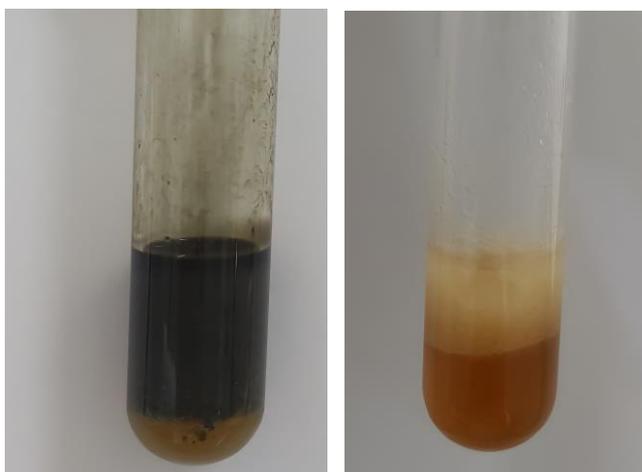


Fonte: autor.

Na figura 19 apresentada acima, observa-se uma varância nos índices de emulsificação dos diferentes tipos de ensaios, a condição 1, apresentou o melhor

índice de emulsificação para o óleo pós-fritura (40,7%), a condição 8, com índice de emulsificação para o óleo de motor queimado de 52,2%, o óleo de soja e o óleo de coco, apresentaram os melhores índices, respectivamente, na condição 6 e 8, com 43,5% e 34,8%. Esses índices de emulsificação, obtidos no último experimento com algumas otimizações, corrobora com o potencial de produção de biomoléculas por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040), desde que ajustados os parâmetros das concentrações e substratos apropriados. A figura 20 abaixo, mostra os índices de emulsificação para o óleo de motor queimado e óleo residual pós-fritura, respectivamente.

**Figura 20** - Índice de emulsificação óleo queimado e óleo pós-fritura de diferentes ensaios.



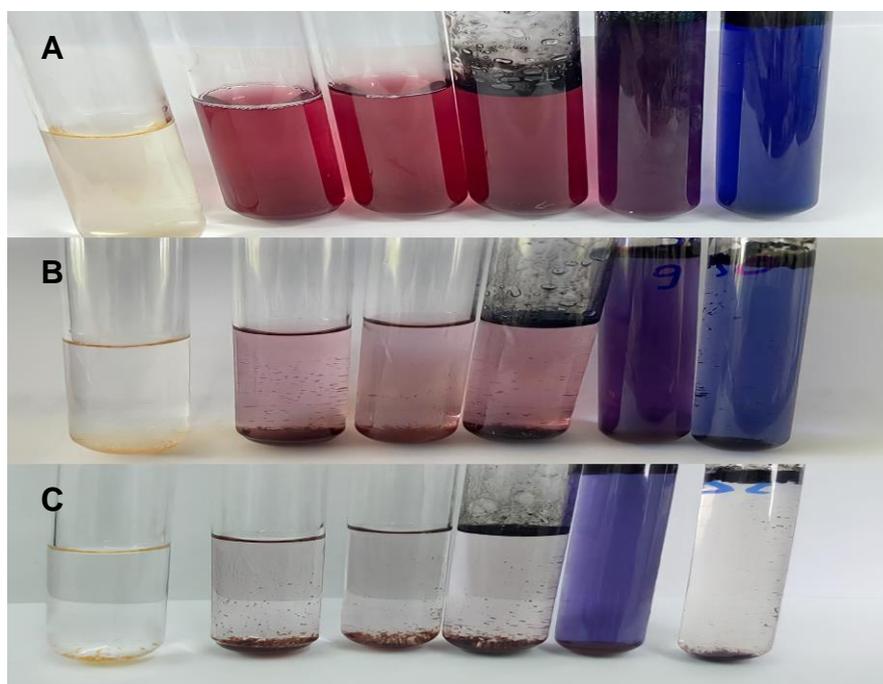
Fonte: autor.

### 5.3 Deterioração de petroderivados

#### 5.3.1 Teste qualitativo do potencial de biodegradação do óleo de motor queimado (Lub)

De acordo com a tabela 5 (composição dos ensaios colorimétricos), os ensaios foram registrados através de fotografias e realizadas as análises qualitativas do método colorimétrico por meio de fotografias. Esses registros fotográficos estão apresentados na figura 21, da esquerda para à direita.

**Figura 21** - Registros fotográficos realizados na análise qualitativa do método colorimétrico dos ensaios 1, 2, 5, 8, 9, 10 da tabela 3, (A) Adição do DCPIP, (B) registro fotográficos em 24h, (C) registro fotográficos em 48h.



Fonte: autor.

O método colorimétrico com o indicador redox DCPIP é consolidado e empregado em diversos trabalhos, pela simples análise do tempo de descoloração, auxiliando na identificação de microrganismo com capacidade de biodegradar compostos hidrofóbicos, pois ao se incorporar ao meio de cultura na presença de hidrocarbonetos, o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol, é possível verificar de forma indireta, se o microrganismo possui capacidade de utilizar os compostos hidrofóbicos como fonte de energia, através da mudança de coloração do azul, forma oxidada, para incolor, forma reduzido. Para isso, ele atua como receptor de elétrons nas reações oxirredução por microrganismo, na presença de hidrocarbonetos, onde os elétrons envolvidos nas reações químicas são transferidos para aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato, reduzindo, dessa forma, o tamanho das moléculas dos contaminantes e facilitando sua biodegradação (ROCHA, 2011).

Contudo, observa-se de forma qualitativa na figura 21, acima, que o teste colorimétrico comprovou a capacidade do *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na biodegradação do óleo de motor queimado, através da mudança da coloração apresentados nos ensaios 8 e 10, contendo o inóculo e o biossurfactante presente no líquido metabólico, respectivamente. O ensaio 9, contendo surfactante comercial na presença do inóculo, também apresentou uma descoloração, entretanto,

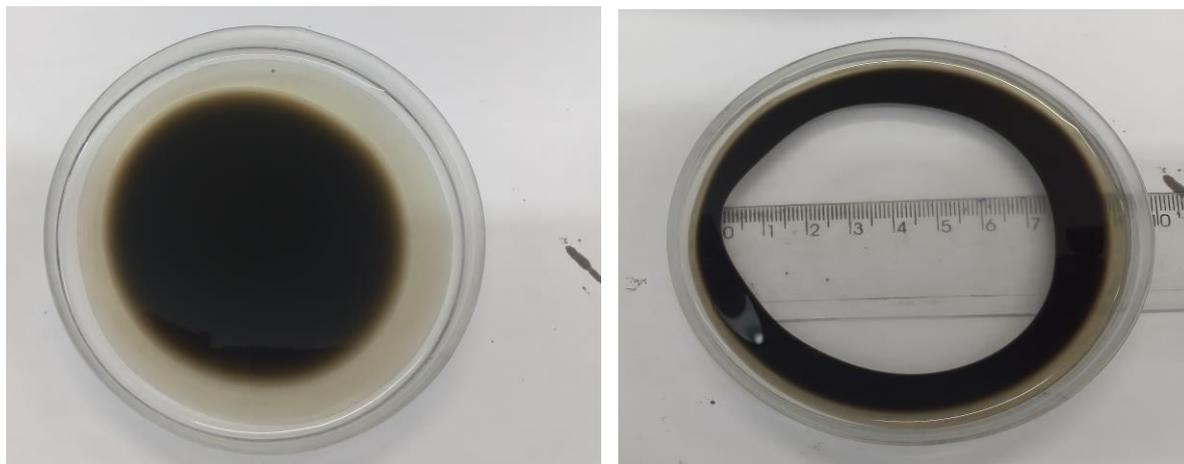
observou-se uma leve ação inibitória acerca do potencial microbiano em metabolizar o óleo de motor queimado, essas mudanças na coloração corroboram com o método colorimétrico utilizado, indicando que o fungo apresenta potencial de degradar substâncias hidrofóbicas como, por exemplo, o óleo automotivo queimado. Sendo assim, o ensaio 10, foi o que mais houve descoloração no tempo de 48h de acordo com a análise qualitativa.

Essa técnica foi desenvolvida por Hanson et al., (1993), e desde então, tem sido utilizada em diversos trabalhos com a finalidade de identificar microrganismos capazes de biodegradar substâncias hidrofóbicas, como por exemplo, Souza et al., (2010), avaliaram a capacidade de microrganismo de biodegradação de uma determinada área contaminada por gasolina comercial; Mariano et al., (2008), avaliaram a velocidade de biodegradação de diferentes compostos estabelecendo o tempo final de alteração da cor do meio de azul para incolor; Rocha et al., (2015), verificou a habilidade do consórcio de dez fungos filamentos na degradação de hidrocarbonetos de petróleo, verificando-se a oxidação em todas as amostras; Varjani et al., (2016), utilizaram o indicador redox DCPIP para avaliar o potencial da linhagem *Pseudomonas aeuriginosa* NCIM 5514 na biodegradação de petróleo bruto, obtendo resultados positivos com o método; Kronbauer et al., (2017), avaliaram dois consórcios de microrganismo na remediação de solo contaminados por óleo diesel, para isso, analisaram o potencial desses microrganismo de biodegradar por meio do indicador DCPIP. Neste sentido, os resultados apresentados acima revelam a importância de se realizar o monitoramento da biodegradação por medidas qualitativas.

#### **5.4 testes de dispersão**

Os testes de dispersão foram realizados utilizando a melhor condição da milhocina (condição 2: 5% de milhocina, 3% de óleo pós-fritura), de acordo com o planejamento fatorial  $2^2$ , para a realização dos testes foram utilizados 0,1 mL do líquido metabólico. A figura 22, apresenta o resultado da dispersão da menor tensão superficial obtida no método do peso da gota.

**Figura 22** - Dispersão obtida por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040)



Fonte: autor

Ao ser adicionado 0,1 mL do líquido metabólico livre de células em cima da mancha de óleo, observa-se que houve uma dispersão do óleo de motor queimado de aproximadamente 7,5 cm ( $44,18 \text{ cm}^2$ ) corroborando com o cálculo da tensão superficial obtido com o método do peso d'gota (tabela 8), de acordo com a metodologia (BEHRING et al, 2004), constatando que o *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) nessas condições experimentais foi capaz de produzir biomoléculas com propriedades tensoativas.

## 6 CONCLUSÃO

- O *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) utilizado na pesquisa, mostrou-se capaz de produzir biomoléculas de interesse industrial.
- A produção de biossurfactante por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) mostrou-se mais eficiente na condição 2, utilizando a milhocina e o óleo pós-fritura com uma redução de 72 m.N/m para 42,77 m.N/m.
- O tensoativo produzindo apresentou propriedades emulsificante e dispersante para compostos hidrofóbicos, principalmente para petroderivados, podendo auxiliar na biodegradação desses compostos no meio ambiente.
- O maior índice de emulsificação foi obtido na condição 8 (52,2%), para o óleo lubrificante de motor queimado.

- O biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) apresentou boa dispersão meio líquido (7,5 diâmetros ou 44,18 cm<sup>2</sup> de área de dispersão do óleo).
- O fungo *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) apresentou potencial em biodegradar compostos orgânicos de acordo com o método colorimétrico empregado na literatura.

## 7 SUGESTÕES

- Repetir os resíduos agroindustriais (soro de leite, milhocina e óleo pós-fritura) para otimização dos resultados nas variáveis respostas, tensão superficial (m.N/m) e índice de emulsificação (%) com o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com quatro pontos centrais;
- Utilizar outros resíduos agroindústrias como a manipueira, vinhaça, cascas de frutas, entre outros.
- Fazer a comparação na produção de biossurfactante com diferentes resíduos agroindústrias e selecionar os resíduos agroindustriais que melhor contribuir para a produção de biomolécula de interesse.
- Avaliar a forma de fermentação e fazer o comparativo entre o modo estático e rotacionado e selecionar a melhor forma que favoreça a produção de biossurfactante.
- Calcular a tensão superficial pelo método do peso da gota ou pelo método do anel de Du Nouy, antes e depois do processo de fermentação.
- Fazer uma curva de calibração utilizando o indicador redox DCPIP para observar a biodegradação de forma qualitativa.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. **Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review** - Vol.21, nº 1, pp.55-59 (Jan – Mar 2015).

ACCORSINI, F.R.; MUTTON, M.J.R.; LEMOS, E.G.M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Braz. J. Microbiol.**, v. 43, n.1, p. 116-125, 2012.

AKILANDESWARI, P; PRADEEP, B.V. Exploration of industrially importante pigments from soil fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015.

ALMEIDA, M.V.A. Identificação de fungos filamentosos presentes em um biorreator de resíduos sólidos urbanos. 2015. 65f. Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais, (Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), **Programa de Pós-Universidade Federal de Campina Grande** - Paraíba - Brasil, 2015.

ALVES, M.P; MOREIRA, R.O; JUNIOR, P.H.R; MARTINS, M.C.F; PERRONE, I.T; CARVALHO, A. F. Soro de leite: Tecnologias para o processamento de coprutos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 69, n. 3, p. 212-226, mai/jun, 2014.

ANP (Agência nacional de petróleo, gás natural e biocombustível. Disponível em: [https://www.gov.br/anp/ptbr/canais\\_atendimento/imprensa/noticiascomunicados/producao-de-petroleo-e-gas-teve-recorde-em-2020-e-aumentou-52-71-em-relacao-a-2010](https://www.gov.br/anp/ptbr/canais_atendimento/imprensa/noticiascomunicados/producao-de-petroleo-e-gas-teve-recorde-em-2020-e-aumentou-52-71-em-relacao-a-2010). Acesso: 27/12/2021.

ARAÚJO, L.V; FREIRE, D.M.G; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, autobiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, Vol. 36, No. 6, 848-858, 2013.

ASSIS, D.J; COSTA, L.A.S; CAMPOS, M.I; SOUZA, C.O; DRUZIAN, J.I; NUNES, I.L; PADILHA, F.F. Influência da Natureza do Rejeito Agroindustrial Fermentado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* nas Propriedades das Gomas Xantana Resultantes. **Polímeros**, vol. 24, n. 2, p. 176-183, 2014

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

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 2008.

BEHRING, J.L; LUCAS, M; MACAHDO, C; BARCELLOS, I.V. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da cmc de surfactantes no ensino da química. **Quim. Nova**, Vol. 27, No. 3, 492-495, 2004.

BIDOIA, E.D, MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Méndez-Vilas (Ed.), p: 1277-1288. 2010.

BRASIL, R.B; NICOLAU, E.S; CABRAL, J. F; SILVA, M.A.P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal** 25 (2): 71-80, 2015.

BRASILEIRO, P.P.F; BRITO, J.G.M; de FREITAS, B.G; AMORIM, H.S; FERREIRA, I.N.S; de LUNA, J.M; RUFINO, R.D; SARUBBO, L.A; dos SANTOS, V.A. Conservação das propriedades tensoativas entre os biossurfactantes produzidos por *cândida sphaerica* e *cândida lipolytica*. **COBEQ- XX Congresso brasileiro de engenharia química**. 19 a 22 de outubro de 2015- Florianópolis- SC.

CAVALCANTI, R.M.F. Bioprospecção de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos da caatinga. Trabalho de conclusão de curso. **Universidade Federal da Paraíba**, 2014.

CAVALCANTI, R.F.N. Análise secretômica de *Aspergillus terreus* durante a biodegradação de antraceno. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Pernambuco**. 2015.

COOPER, D.G; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active agentes from two *Bacillus Species*. **Applied and environmental microbiology**. p. 224-229, 1987.

COSTA, O. M.M.M. Observação de segunda micelização de micelas invertidas de AOT induzida por 2-etilhexanoato de cobalto (II). Trabalho de conclusão de curso. **Universidade Estadual da Paraíba**, 2014.

COSTA FILHO, D.V; SILVA, A.J; SILVA, P.A.P; SOUSA, F.C. Aproveitamento de resíduos agroindustriais na elaboração de subprodutos. **II congresso internacional das ciências agrárias – COINTER-PDVAGRO**, 2017.

COSTA, K. O. da. Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Phomopsis sp.* Extraído da *Bauhinia variegata* para produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante. Dissertação (Mestrado), curso de ciências farmacêuticas. **Faculdade de Ciências da Saúde- Universidade de Brasília**. 2016.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedade e aplicações. São Paulo: Blücher, p.321, 2011.

DE ALMEIDA, D.G; DA SILVA, R.C.F.S; LUNA, J.M; RUFINO, R.D; SANTOS, V.A; BANAT, I.M; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in microbiology**. v.7, n.1718, 2016.

DECESARO, A; BERTICELLI, R; MAGRO, F.G; COLLA, L.M. Biossurfactantes em Processos de Biorremediação. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol. 17, nº 1, Jan/Jun 2015.

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, n.18, p.499-514, 2000.

DURVAL, I.J.B. Estudo de um biossurfactante produzido por espécies de *Bacillus* isolados da água do mar e seu potencial para biorremediação de derramamento de petróleo. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, 2017.

EHRHARDT, D.D. Produção de biossurfactantes por *Bacillus Subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato. Dissertação (mestrado). **Faculdade de engenharia química, Campinas- SP**. 2015.

FELIPE, L.O.; DIAS, S.C. Surfactantes sintéticos e Biossurfactantes: Vantagens e desvantagens. **Química. nova escola**. – São Paulo-SP, BR, Vol. 39, Nº 3, p. 228-236, Agosto 2016.

FILHO, A.A.P.S. Aplicação da *Eichhornia Crassipes* no tratamento de ambientes contaminados por petroderivados. Dissertação de mestrado. **Universidade Católica de Pernambuco**. Recife, 2021.

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

FURLAN, F.L.; FILHO, N.C.; CONSOLIN, M.F.B.; GONÇALVES, M.S.; VALDERRAMA, P.; GENENA, A.K. Use of agricultural and agroindustrial residues as alternative. **Revista Interdisciplinar de Ciências Aplicadas**. vol. 13 n. 2, e2181 - Taubaté 2018.

FREIRE, P.C.M; MANCINI-FILHO, J. FERREIRA, T.A.P.C. Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de frituras por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. **Revista de nutrição**, n.26, p.353-368. 2013.

FRISVAD J.C., YILMAZ N., THRANE U., RASMUSSEN K.B., HOUBRAKEN J3. SAMSON R.A. 2013. *Talaromyces atrovirens*, a new species efficiently producing industrially relevant red pigments. **PloS one**, 8 (12): 84102.

GAUTAM, R.K; MUDHOO, A.; LOFRANO, G; CHATTOPADHYAYA, M.C. Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent modification and activation methods and adsorbent regeneration. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2013.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.

GOSSEN, L.P; VELICHKINA, L.M. Environmental Problems of the Oil-and-Gas Industry. Petroleum Chemistry. **Instituto de Química do Petróleo, Divisão Siberiana, Academia Russa de Ciências**. 2006, Vol. 46, No. 2, p. 67-72, 2006.

GUEDES, E.H.S.; SANTOS, A.L.; IBIAPINA, A.; AGUIAR, A.O.; SOARES, C.M. S.; substrato para a produção de lipases microbiana: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2. 2021.

Hanson, KG, Desai, JD & Desai, AJ. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnol Tech** 7, 745-748 (1993). <https://doi.org/10.1007/BF00152624>

HOUBRAKEN, J; SAMSON, R.A. Phygeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology** n. 70, p. 1-51, 2011.

IBUKUN O, O.; THRING, R.W. The Role of Biosurfactants in the Continued Drive for Environmental Sustainability. **Sustainability**, 10, 4817, 2018.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: a new fronteir for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.184, p.109607, 2019.

JORGE, N; SOARES, B.B.P; LUNARDI, V.M; MALACRIDA, C.R. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química nova**, v.28, n. 6, p.947-951. 2005.

KRONBAUER, M.L; LOPEZ, D.A.R; BEE, A; BOETCCHER, V. Uso da bioaugmentação para remediação de solos contaminados por óleo diesel. **Congresso ABES FENASAN**, 2017.

LIMA, R.A. Produção de biossurfactante, coenzima q10 e lipídeos poliinsaturados ( $\omega 3$  e  $\omega 6$ ) por amostras de *candida glabrata* (UCP 1002 e 1556) utilizando resíduos agroindustriais. Tese (doutorado) – **Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas**, Ciências Biológicas, 2014.

LIMA, D.P. Avaliação do uso do sistema de código de barras de DNA para a identificação de fungos potencialmente micotoxigênicos isolados de milho e derivados. Dissertação de mestrado. **Fundação Oswaldo Cruz**, 2015.

LIMA, M.C; SILVA, T.C.D.M; SOUZA, A.F; LUNA, M.A.C; ANDRADE, R.F.S; SILVA, C.A.A; OKADA, K. Produção simultânea de biomassa e lipídeos utilizando meios contendo resíduos agroindustriais por *Mucor subtilíssimus* (UCP/WFCC 1262), *Cunninghamella echinulata* (UCP/WFCC 1299) e *Rhizopus microsporus* (UCP/WFCC 1304) isolado do solo da Caatinga de Pernambuco. **Engevista**. V. 19, n. 5, p.1417-1430. 2017.

LINK. **Letters in applied microbiology**. 35, 272-275, 1809.

LINS, A.B. Produção de bioemulsificante por *Rhodotorula mucilaginosa* UCP 1551 através da bioeconomia circular utilizando substratos renováveis. Dissertação (mestrado). Desenvolvimento de processos ambientais, **Universidade Católica de Pernambuco**, 2019.

LOURENCINI, L.S.F. Uso do soro de leite para a obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC e de biossurfactantes. Dissertação de mestrado. **Universidade De São Paulo**. 2014.

LUPKI, F.B; DIAS, P.A; SILVA; M.R; MORAIS, H.A. Efeito do PH nas propriedades tecnológicas de concentrado proteico de soro de leite. **Brasilian journal of development**. Curitiba, v.5, n.11, p. 23036-23059. Novembro de 2019.

MACIEL, J.M. Estudo comparativo da degradação de óleo diesel por culturas isoladas e em consórcio. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Pernambuco**. 2013.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 1, 87-93, 2001.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - A review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.

MAYER, R.M. SOBERON-CHAVEZ, G. **Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potencial applications**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.54, p. 625-633, 2000.

MARIANO, A.P; ANGELIS, D.F; BONOTTO, D.M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Revista engenharia sanitária ambiental**, v.12, n.3, p.296-304, 2008.

MENDONÇA, R.S.; SÀ, A.V.P.; ROSENDO, L.A.; DOS SANTOS, R.A.; MARQUES, N.S.A.A.; SOUZA, A.F.; RODRÍGUEZ, D.M.; TAKAKI, G.M.C. Produção de biossurfactante e lipídios por uma nova cepa de *Absidia cylindrospora* UCP 1301 isolada de solo de Caatinga de baixo custo subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, Curitiba, v.7, n.1, p. 8300-8313 jan. 2021.

MÉNDEZ, A; PÉREZ, C; MONTAÑÉZ, J.C; MARTÍNEZ, G; AGUILAR, C.N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**. 12(12):961-968, 2011.

MONTEIRO, M.C.P. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal de Lavras - MG**. 2012.

MORAIS, R. K. S; ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **SCIENTIA PLENA**. VOL. 8, NUM. 10, 2012.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2009.

MURADOR, G.K; BOSSO, A; SUGUIMOTO, H, H; MORIOKA, L.R.I. Produção de  $\beta$ -galactosidase Através da *Saccharomyces fragilis* Cultivada em Soro de Queijo. **Ensaio**, v. 24, n. 4, p. 337-342, 2020.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002.

NITSCHKE, M; SIDDHARTHA, G.V.A.O; COSTA, J.C. Rhamnolipids and PHAS: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest. **Elsevier – Process Biochemical**, p, 621-630. 2011.

NIESCHER. S, WRAY, V., LANG, S., KASCHABEK, S.R., SCHLÖMANN, M. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 70: p. 605–611. 2006.

NOGUEIRA, I. B. Conversão de resíduo agroindustrial na produção de bioemulsificante por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 e aplicação na remoção de poluente hidrofóbico. Dissertação (Mestrado) - **Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica**. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

OLIVEIRA, D.W.F; BEZERRA, D.P; DE FRANÇA, I.W. L; SANTOS, B.N; MELO, V.M.M; GONÇALVES, L.R.B. Avaliação da produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus sp*, isoladas de solos de manguezal. **COBEQ- XX Congresso brasileiro de engenharia química**. 19 a 22 de outubro de 2014- Florianópolis- SC.

OLIVEIRA, L. M. ; LOPES, P. R. M. ; BIDOIA, E. D. ; CONTIERO, J. Biodegradação de óleo lubrificante automotivo usado pela aplicação de surfactante químico e biossurfactante produzido por *pseudomonas aeruginosa*. **Revista Academica Oswaldo Cruz** , v. 1, p. Versao On Line, 2014.

OLIVEIRA, L.A; JESUS, M.A; JACKISCH MATSUURA, A.B; GASPAROTTO, L; OLIVEIRA, J.G.S; LIMA-NETO, R.G; ROCHA, L.C. Conhecimento, conservação e uso de fungos. **Editora do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**, 2019.

PANEASAR, R; KAUR, S; PANEASAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Revista Elsevier- Science Direct**, p. 70-76. 2015.

PEREIRA, J.F.B.; GUDIÑA, E.J.; COSTA, R.; VOTORINO, R.; TEIXEIRA, J.A.; COUTINHO, J.A.P.; RODRIGEUS, L.R. Optimization and Characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Elsevier**, v. 111, p. 259-268, 2013.

PEREIRA, D.D.F; DUVOISIN JR, S; ALBUQUERQUE, P.M.O estudo da produção de biossurfactantes por fungos Amazônicos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**. V.03, n.04, p.0688-0695, 2017.

PELEGRINE, D.H.G; CARRASQUEIRA, R.L. Aproveitamento das proteínas do soro do leite no enriquecimento nutricional de sucos vitaminados. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, Vol.10 nº 1, p.104-114. Jan/Jun 2008.

QUINTELA, B.C.S.F. Biotecnologia aplicada á recuperação avançada de petróleo: Injeção de biossurfactantes. Tese de doutorado. **Universidade Federal do Ceará**. 2018.

QUITERIO, G.M. Avaliação da biodegradação da mistura Diesel/Biodiesel. Tese de doutorado. **Universidade Estadual Paulista**. 2017.

ROCHA, S.D; CASTRO, L.M; SOUZA, J.R.S; OLIVEIRA, T.C.S. Aplicação de teste de biodegradabilidade para seleção de consórcio fúngico promissor na degradação de hidrocarbonetos de petróleo. **COBEQIC- XI Congresso brasileiro de engenharia química em iniciação científica** – Unicamp, Campinas-SP, 19 a 22 de julho de 2015.

ROCHA E SILVA, N.M.P. et al. Natural Surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, p.1-15, 2019.

ROCHA, M.F. A. Biodegradação de biodiesel de algodão em ambiente aquático. Dissertação (mestrado). **Universidade Federal de Pernambuco**. 2011.

RODRIGUES, L.R. Microbial surfactants: Fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors, **Journal of Colloid and Interface Science**, v.449, p.304-316, 2015.

ROVINA, F. Produção de biossurfactantes por *bacillus subtilis* utilizando resíduos do processamento da casca da laranja e sua aplicação na remoção de óleo em solo contaminado. Dissertação (Mestrado) **Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas**. Curso de Mestrado em Engenharia Química, 2018.

RIZZATTI, I.M; ZANETTE, D.R. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: Uma nova aplicação metodológica para o ensino de química. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 2, 518-521, 2009.

SALES, P. S. C de. Produção de Lipase por *Cunninghamella echinulata* utilizando meios contendo resíduos agroindustriais. - **Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica**. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.

SANIBAL, E.A.A; FIHO, J.M. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Foods ingred**, v.18, p.64, 2002.

SANTOS, P.V. Impactos ambientais causados pela perfuração de petróleo. **Caderno de graduação, Ciências exatas e tecnologias**. Sergipe. V.1, n.15, p. 153-163, 2012.

SANTOS, P.N. Produção simultânea de biossurfactante e lipídeos por *Penicillium spinulosum* (UCP 1347). Dissertação (mestrado). **Universidade Católica de Pernambuco**, Recife. 2016.

SANTOS, D.K.F; RUFINO, R.D; LUNA, J.M; SANTOS, V.A SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.401-430, 2016.

SANTOS, F.K.G.S.; ALVES, J.V.A.; DANTAS, T.N.C. Determinação da concentração micelar crítica de tensoativos obtidos a partir de óleos vegetais para uso na recuperação avançada de petróleo. In: **4º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás (PDPETRO)**, 2007.

SARKAR, S; MAITRA, A; BANERJEE, S; THOI, V.S; DAWLATY, J.M. Electric Fields at metal-surfactant interfaces: a combined vibrational spectroscopy and capacitance study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.124, n. 7, p. 1311-1321, 2020.

SARUBBO, L.A.; ROCHA JR, R.B.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n.8, p. 707–723. 2015.

SENA, H.H. Produção de biossurfactante por fungos isolados do solo Amazônico. Dissertação (mestrado). Curso de Ciências farmacêutica. **Universidade Federal do Amazonas**. 2014.

SHI, K; XUE, J; XIAO, X; QIAO, Y; WU, Y; GAO, Y. Mechanism of degrading petroleum hydrocarbons by compound manrine petroleum-degrading bacteria: surface adsorption, cell uptake, and biodegradation. **Energy & Fuels**, v.33, n.11, p.11373-11379, 2019.

SIAHMOSHTEH, F; SICILIANO, I; BANANI, H; HAMIDI-ESFAHANI, Z; RAZZAGHI-ABYANEH, M; GULLINO, M.L; SPADARO, D. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *amyloliquefaciens* in the control os *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. **International Journal of Food Microbiology** 254, p.47–53, 2017.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**. Recife, v. 2, n. 3, p. 49-66, Jul 2016.

SILVA, L.A.; FERREIRA, Y.K.; PRADO, A.A.O.S.; SILVA, D.P.; RUZENE, D.S. Perspectivas e aplicações de agentes surfactantes. **Anais do VII Simpósio de Engenharia de Produção de Sergipe**, 2015.

SILVA ALENCAR, V.N; BATISTA, J.M.S; NASCIMENTO, T.P; CUNHA, M.N.C; LEITE, A.C.L. Resíduo agroindustriais: Uma alternativa promissora e sustentável na

produção de enzimas por microrganismos. **Congresso internacional da agroindústria**, 2020.

SOARES, I.A; FLORES, A.C; MENDONÇA, M.M; BARCELOS, R.P; BARONI, S. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.2, p.341-350, abr./jun., 2011.

SOBRINHO, H.B.S. Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Dissertação (mestrado), **Universidade católica de Pernambuco**, 2007.

SOUZA, D. B De; BRITO, G.C.B; VASCINCELOS, F.C.W; BRAGA, L. C. Estudo de microrganismos presentes em uma área contaminada por gasolina comercial. – **Revista de estudos ambientais (Online)**, [s. l.], v. 12, ed. 2, p. 38-46, jul./ 2010.

SHOEB, E; AKHLAQ, F.; BADAR, U.; AKHTER, J.; IMTIAZ, S. Classification and industrial applications of biosurfactants. **Academic Research International**. Vol.4, n. 3, 2013.

TAKAHASHI, J. A; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química nova**, v. 31, n.7, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHASHI, J.A; LIMA, G.S; dos SANTOS, G.F; LYRA, F.H; da SILVA HUGHES, A.F; GONÇALVES, F.A.G. Fungos filamentosos e química: Velhos conhecidos, novos aliados. **Revista virtual de química**. V.9, n.6, 2017.

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. (2016) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.006>

VALPUESTA, R. R. F. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus Subtilis* a partir de matéria-prima renovável e de baixo custo. Dissertação (Mestrado). **Escola da Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro**. 2008.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C., et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. 78, 343–371, 2014.

VISAGIE, C.M; RENAUD, J.B; BURGESS, K.M.N; MALLOCH, D.W; CLARK, D; KETCH,L;URB,M; LOUIS-SEIZE, G; ASSABGUI, R; SUMARAH,M.W; SEIFERT, K.A. Fifteen new species of *Penicillium*. **Persoonia** – Volume 36, 2016.

WETLER-TONINI, R.M.C; REZENDE, C.E; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v.14, p. 1010-1020, 2010.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by

diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods, United States of American**, v. 56, p. 339-47, 2004.

ZANOTTO, C. Caracterização de resíduo da indústria de beneficiamento de milho. Dissertação (Mestrado), **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Pato Branco, Paraná, Brasil. 2011.

---