



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

**BIOPROSPECÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DA CAATINGA**

**SUMÉ- PB
2014**

RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI

**BIOPROSPECÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DA CAATINGA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Jean Cesar Farias de Queiroz

SUMÉ- PB

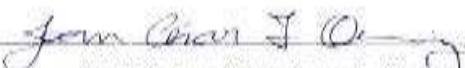
2014


RAYZA MORGANNA FARIAS CAVALCANTI


**BIOPROSPECÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS DA CAATINGA**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Jean César Farias de Queiroz
Orientador


Prof. Examinador 01 – Examinador Interno UATEC - CDSA
Dra. Glauciane Danusa Coelho


Prof. Examinador 02 – Examinador Externo CCBS - UFCCG
Dra. Mabel Calina de França Paz

Aprovada em 12 de setembro de 2014.

C376b Cavalcanti, Rayza Morganna Farias.

Bioprospecção de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos da caatinga. / Rayza Morganna Farias Cavalcanti. - Sumé - PB: [s.n], 2014.

49 f. il.

Orientador: Professor Dr. Jean Cesar Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Bioprocessos. 2. Caatinga. 3. Sumé. 4. Fungos. I. Título.

CDU: 60 (043.3)

Dedico este trabalho a Deus, responsável pelas minhas vitórias.
Ao meu pai Agnelo Filho, pelo exemplo de simplicidade e honestidade, a minha mãe Neuma
Farias, pelo amor incondicional e a minha irmã Natália Thaynã, por todo amor.
“Como é grande o meu amor por vocês.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente, me dando forças, mostrando os caminhos certos e por todas as vitórias concedidas;

Ao meu pai Agnelo Filho e a minha mãe Neuma Eliene, minha base, meu tudo, obrigada por cada momento de carinho, pelos conselhos, pelas renúncias, por ser quem vocês são, meu maior exemplo. Essa conquista é de vocês, os melhores pais do mundo;

À minha irmã Natália Thaynã, pela cumplicidade, confiança, amizade e amor, meu exemplo de garra e perseverança, sem você não sou nada;

À minha Suzynha, por toda alegria e carinho oferecido;

À família Aires e Nunes, por todo auxílio e confiança durante toda minha vida e principalmente nos últimos 5 anos, agradeço especialmente a Tia Marieta, pelo seu enorme carinho;

À minha segunda família, onde criei laços de amizade e amor. Obrigada Nathalia Nunes pelos 3 anos de convivência, pelos ensinamentos e momentos compartilhados. Agradeço especialmente a Camila Castro (Mila), uma irmã que Deus me deu de presente, na qual estive comigo em todos os momentos, aprendemos juntas, superamos juntas, rimos e choramos juntas. Jamais esquecerei de você;

Aos meus amigos Leandro Costa (Lelê) e Jucilene Pereira (Ju), pelos ensinamentos, paciência e companheirismo, sem vocês ao meu lado tudo seria mais difícil, criamos um laço que vai além da universidade e levarei comigo para sempre, vocês vão me fazer muita falta;

Aos amigos do projeto “Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga”, Rhyanne Freitas (Rhay), Raissa Mayane, Renally Barbosa e Breno Lino, meus amigos e companheiros de laboratório, as melhores conversas sempre foram com vocês;

Aos amigos do projeto “Prospecção de biossurfactantes de fungos filamentosos da Caatinga”, Denis Amorim, Renato Guimarães e principalmente a Dayse Pereira (Cabrita) pela sua dedicação, esforço e carinho com o projeto e monografia, este trabalho não seria o mesmo sem você, meu carinho será eterno;

À Alline Mayara, Amanda Mayana, Layanne Aires, por entenderem minha ausência e principalmente por manterem nossa amizade, apesar da distância. Os laços de sangue e amizade sempre vão nos unir.

A Hugo Britto (*in memoriam*), um irmão, um amigo, um anjo que sempre esteve e estará comigo;

A Felipe Douglas, por estar comigo desde segundo período, obrigada pelo companheirismo;

A Pablo Veronese, pelos conselhos, pela amizade e pela sua simples presença;

A Josenildo Oliveira (Taperoá), pelo amor e amizade, por contribuir para minha felicidade em Sumé;

A minha turma pioneira Bruna Riviane, Rhayanne Freitas, Dayse Pereira, Camila Castro, Jucilene Pereira, Leandro Costa, Renally Barbosa, Raíssa Mayane, Felipe Douglas e Neto Marreiro, as dificuldades foram inúmeras e nós resistimos, aqui tem um pedaço de cada um de vocês;

A Família de Rhayanne Freitas, D. Sônia e Seu Luciano e a família de Dayse Pereira, Seu Baú e D. Eliane, por todo o cuidado e carinho oferecido, vocês se fizeram pais e mães quando os meus não podiam estar presentes, fica registrado minha imensa gratidão.

Ao meu orientador, professor e amigo Jean Queiroz, pelos ensinamentos, confiança e por todos os conselhos, muito obrigada pelas oportunidades concedidas.

A professora Mabel Paz, pela atenção e colaboração.

A coordenação do Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, professora Fabiana Pimentel, por toda assistência;

Aos meus professores da UFCG que contribuíram para minha formação;

A cidade de Sumé por ter me acolhido como sua filha e pelos momentos vivenciados, já dizia Zé Ramalho: “Nas paredes da pedra encantada os segredos talhados por Sumé.”

*“Ela teimou e enfrentou
O mundo
Se rodopiando ao som
Dos bandolins”
(Oswaldo Montenegro)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido localizado na cidade de Sumé- PB onde foi realizada a coleta dos microorganismos.....	16
Figura 2: A) Fungos Filamentosos da Caatinga armazenados em meio BDA e ADM sob forma de coleção; B) Ativação dos fungos filamentosos da Caatinga no meio YEPD com ágar.....	18
Figura 3: Cultivo dos fungos filamentosos da Caatinga em meio líquido YEPD sob agitação orbital.....	19
Figura 4: A) Técnica de microcultivo para identificação dos fungos filamentosos da Caatinga produtores de biossurfactantes; B) Fungo CDSA17 armazenado em câmara úmida em placa de Petri para posterior identificação.....	23
Figura 5: Testes de Índice de Emulsificação dos espécimes CDSA17(D), CDSA71(B), CDSA54 (C), CDSA103(A) e CDSA109(E).....	26
Figura 6: Digrama de Pareto do espécime CDSA109.....	31
Figura 7: Diagrama de Pareto do espécime CDSA17.....	36
Figura 8: Digrama de Pareto do espécime CDSA54.....	37
Figura 9: Diagrama de Pareto do espécime CDSA71.....	38
Figura 10: Fungo CDSA17 identificado como sendo do gênero <i>Aspergillus</i> . A) Crescimento fúngico após 24 horas. B) Crescimento após 96 horas. C) Estruturas fúngicas com aumento de 40x.....	40
Figura 11: CDSA71 identificado como sendo do gênero <i>Aspergillus</i> . A) Imagem após 48 horas de cultivo; B) Crescimento após 96 horas. C) Estrutura fúngica obtida após 96 horas de cultivo.....	40
Figura12: A) CDSA109 em meio BDA incubado a 37°C por 96 horas; B) Fungo CDSA109 visualizada na lente 40x após 72 horas de cultivo.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais funções e aplicações comerciais dos biossurfactantes.....	12
Tabela 2: Composição do meio de cultura YEPD acrescido com ágar para ativação dos fungos filamentosos da Caatinga.....	17
Tabela 3: Composição do meio de cultura líquido YEPD para produção de biossurfactantes por fungos filamentosos da Caatinga.....	17
Tabela 4: Composição do meio de cultura BDA para identificação dos fungos filamentosos da Caatinga produtores de biossurfactantes.....	17
Tabela 5: Matriz das variáveis codificadas para o estudo das condições de produção de biossurfactantes por fungos filamentosos da Caatinga.....	23
Tabela 6: Resultados dos testes quantitativo (IE) e qualitativo (AE) realizados para verificar a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos da Caatinga.....	24
Tabela 7: Estabilidade dos biossurfactantes frente às temperaturas de 3°C e 60°C.....	27
Tabela 8: Índices de Emulsificação dos espécimes CDSA54, CDSA71 e CDSA109 frente às condições de temperatura e pH.....	30
Tabela 9: Determinação do efeito da concentração salina no IE	31
Tabela 10: Parâmetros Cinéticos determinados durante 96 horas do processo fermentativo para produção de biossurfactante pelo fungo CDSA109.....	33
Tabela 11: Resultado do planejamento fatorial 2 ² para determinar as melhores condições de cultivo na produção de biossurfactantes adotando como resposta o Índice de Emulsificação.....	35
Tabela 12: Estimativas de efeitos das variáveis, obtidas por meio do planejamento fatorial 2 ² dos espécimes CDSA17, CDSA54 e CDSA109.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA17 a 60°C	28
Gráfico 2: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA54 a 60°C.	28
Gráfico 3: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA71 a 60°C.....	28
Gráfico 4: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA109 a 60°C.....	28
Gráfico 5: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA17.....	29
Gráfico 6: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA54.....	29
Gráfico 7: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA71.....	29
Gráfico 8: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA109.....	29
Gráfico 9: Determinação da concentração celular (g/L) e Atividade de Emulsificação do espécime CDSA109 durante 96 horas do processo de fermentação.....	32
Gráfico 10: Variações do pH durante cultivo de 96 horas do fungo CDSA109 para produção de biossurfactantes.....	34

Abreviaturas

ADM – Ágar, Dextrose e Extrato de Malte;

AE – Atividade Emulsificante;

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

BDA – Batata, Dextrose e Ágar;

CDSA – Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido;

CMC – Concentração Micelar Crítica;

IE – Índice de Emulsificação;

mN/m – Mili Newton por metro;

pH – Potencial hidrogeniônico;

rpm – Rotação por minuto;

t_g - Tempo de geração (h).

TS –Tensão Superficial;

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande;

X – Concentração celular;

YEPD - Yeast Extract-Peptone-Dextrose;

μ_x - Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});

$\mu_{máx}$ - Velocidade específica máxima de crescimento celular;

RESUMO

O bioma Caatinga pode ser fonte para obtenção de metabólitos com características únicas, como os biossurfactantes, moléculas anfipáticas de origem microbiana capazes de reduzir a tensão superficial e emulsificar hidrocarbonetos. Este estudo teve como objetivo a bioprospecção de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos da Caatinga coletados no município de Sumé – PB, armazenados em forma de coleção no CDSA/UFCG, visando uma nova fonte para obtenção destes compostos. Nesta pesquisa, 11 fungos filamentosos foram avaliados em relação ao poder de ação emulsificante, no total 7 espécimes (63,63%) apresentaram resultados para Índice de Emulsificação (IE), estabilidade após 24 horas e Atividade de Emulsificação (AE), com destaque para os líquidos metabólicos produzidos pelos fungos CDSA17, CDSA54, CDSA71 e CDSA109 que também foram avaliados sob condições extremas de temperatura, pH e NaCl, apresentando maiores Índices de Emulsificação à temperatura de 60°C, pH 5,0 e 7,0 e concentração salina de 10%. O estudo cinético foi realizado com o fungo CDSA109, demonstrando uma correlação de 0,731 entre a concentração celular e Atividade de Emulsificação, com maior Atividade a partir de 72 horas, possivelmente, na fase estacionária de crescimento. No planejamento fatorial 2², em duplicata, analisando as variáveis agitação (100 e 200 rpm) e concentração de glicose (15 g/L e 25 g/L), os fungos filamentosos testados apresentaram diferentes comportamentos e maiores IE foram obtidos sob condições de 100 rpm e concentração de glicose de 15 g/L. Utilizando a técnica de microcultivo foi possível identificar os fungos CDSA17, CDSA71 e CDSA109 como pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Diante do exposto, é possível afirmar que os fungos filamentosos da Caatinga possuem potencial para produzir biossurfactantes.

Palavras-chave: Surfactantes, Biotecnologia, Índice de Emulsificação, Estabilidade da Emulsão.

ABSTRACT

The Caatinga biome may be a source for obtaining metabolites with unique features, such as biosurfactants of microbial origin, amphipathic molecules capable of reducing the surface tension and emulsify hydrocarbons. This study aimed to bioprospecting biosurfactants produced by Caatinga's filamentous fungi, collected in Sumé – PB city, stored in a collection at CDSA/UFCG, search for a new source for biosurfactant's obtaining. In this research, 11 filamentous fungi were evaluated in relation to emulsifier capacity, totaling seven specimens (63.63%) presented results for Emulsification Index (EI), stability after 24 hours and Emulsification Activity (EA), with emphasis for metabolic liquids produced by fungi CDSA17, CDSA54, CDSA71 and CDSA109 that were also evaluated under extreme conditions of temperature, pH and NaCl, with higher EI at temperature of 60°C, pH 5.0 and 7.0, and salt concentration 10%. The kinetic study was carried out with the fungus CDSA109, demonstrating a correlation of 0.731 between cell concentration and EI with higher activity at 72 hours, possibly in the stationary growth phase. In factorial design 2², in duplicate, analyzing variable of shaking (100 and 200 rpm) and glucose concentration (15 g/L and 25 g/L), tested filamentous fungi showed different behaviors and higher IE were obtained under conditions of 100 rpm and glucose concentration of 15 g/L. Using the microculture technique was possible to identify CDSA17, CDSA71 and CDSA109 as belong to *Aspergillus* genus. Agreed of overhead, it is clear that Caatinga's filamentous fungi have potential to produce biosurfactants.

Keywords: Surfactants, Biotechnology, Emulsification Index, Emulsion Stability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 OBJETIVOS	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
3.1 A BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA: FERRAMENTAS PARA INOVAÇÃO ...	6
3.2 O BIOMA CAATINGA E SUA POTENCIALIDADE BIOTECNOLÓGICA.....	6
3.3 SURFACTANTES	8
3.4 BIOSSURFACTANTES	9
3.4.1 Propriedades	10
3.4.2 Aplicações	11
3.4.3 Produção de Biossurfactantes.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 MICRORGANISMOS	16
4.2 MEIOS DE CULTURA	17
4.2.1 Meio para ativação dos fungos filamentosos.....	17
4.2.2 Meio líquido para produção de biossurfactantes	17
4.2.3 Meio para identificação dos fungos filamentosos	17
4.3 ATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	18
4.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	18
4.4.1 Pré-inóculo	18
4.4.2 Condições de Cultivo	18
4.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOSSURFACTANTES.....	19
4.5.1 Índice de Emulsificação (IE).....	19
4.5.2 Estabilidade da emulsão.....	20
4.5.3 Atividade de Emulsificação.....	20
4.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE TEMPERATURA, pH E SALINIDADE SOBRE A ATIVIDADE DO BIOSSURFACTANTE.....	20

4.6.1 Estabilidade térmica	20
4.6.2 Estabilidade ao pH	20
4.6.3 Estabilidade frente à temperatura e pH	21
4.6.4 Estabilidade à concentração salina	21
4.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	21
4.7.1 Determinação da biomassa	22
4.7.2 Determinação do pH	22
4.8 PLANEJAMENTO FATORIAL	22
4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES UTILIZANDO A TÉCNICA DE MICROCULTIVO	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES	24
5.2 EFEITO DA TEMPERATURA, pH E SALINIDADE SOBRE A ATIVIDADE DO BIOSSURFACTANTE	27
5.2.1 Estabilidade térmica	27
5.2.2 Estabilidade ao pH	29
5.2.3 Estabilidade a temperatura e pH	30
5.2.4 Estabilidade a NaCl	31
5.3 PARÂMETROS CINÉTICOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES	32
5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL 2²	34
5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES	39
6 CONCLUSÕES	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O surgimento da biotecnologia promoveu o desenvolvimento de novos produtos baseados na capacidade de síntese dos microrganismos, impulsionando inúmeras pesquisas, gerando fonte de desenvolvimento social e econômico. Em ambientes pouco explorado, a biotecnologia aliada com a bioprospecção são ferramentas para exploração sustentável dos recursos biológicos visando atender a crescente demanda por produtos naturais, tais ambientes, como o Bioma Caatinga, podem ser fontes de diversidade biológica com potencial para processos biotecnológicos, devido as condições extremas nas quais os microrganismos estão adaptados, como espectro de pH, salinidade, temperatura e nutrientes (SANTOS, 2008).

Dentre os compostos de origem microbiana um grupo de substâncias tem despertado interesse, os surfactantes biológicos ou biossurfactantes, tornando a perspectiva do cultivo e a descoberta de microrganismos com potencial para produção desses compostos de interesse público (DANTAS *et al.*, 2010) pelas inúmeras aplicações em nível industrial, econômico e ambiental. Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, constituindo um grupo de agentes que atua nas superfícies por meio da capacidade em reduzir a tensão superficial e interfacial dos líquidos, atuando na interface das emulsões, sendo utilizados para aumentar a capacidade de emulsificação, a interação água/óleo e acelerar a degradação de hidrocarbonetos por microrganismos (SANTANA; SILVA; ALMEIDA, 2009). Devido às novas legislações de controle do meio ambiente, aliado com o crescimento da preocupação ambiental, os surfactantes químicos, sintetizados a partir de derivados de petróleo, estão sendo substituídos por surfactantes biológicos, pelas inúmeras vantagens apresentadas, como baixa toxicidade, biodegradabilidade, eficiência em valores extremos de pH, temperatura e salinidades (DESAI; BANAT, 1997).

Para produção de biossurfactantes as condições são determinadas de acordo com os microrganismos e com os substratos utilizados. Atualmente, a maioria dos estudos se refere à produção por bactérias e leveduras nas mais diferentes condições, com poucas pesquisas voltadas para fungos filamentosos, tornando-se necessários estudos visando à exploração sustentável desses microrganismos para obtenção de biossurfactantes.

Deste modo, tendo em vista a diversidade biológica presente no bioma Caatinga e as vantagens ambientais dos biossurfactantes em relação aos surfactantes sintéticos, o presente trabalho foi desenvolvido visando à exploração biotecnológica da microbiota da Caatinga para

produção de biossurfactantes por fungos filamentosos como uma nova fonte para obtenção destes compostos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a bioprospecção de biossurfactantes provenientes de fungos filamentosos isolados do Bioma Caatinga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar fungos filamentosos da Caatinga com potencial para produzir biossurfactante;
- Avaliar a produção de biossurfactante por meio do parâmetro emulsificação por meio de análises quantitativa e qualitativa;
- Determinar o efeito quanto a diferentes faixas de temperatura, pH e concentração salina na atividade do biossurfactante produzido;
- Fazer estudo cinético do processo fermentativo para produção de biossurfactante;
- Determinar as melhores condições de agitação e concentração de glicose para síntese de biossurfactantes;
- Identificar os fungos filamentosos com potencial para produzir biossurfactantes por meio da técnica de microcultivo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA: FERRAMENTAS PARA INOVAÇÃO

A biotecnologia integra um conjunto de técnicas que utilizam substâncias vivas (ou parte delas) para modificar ou fabricar um bem (BUENO, 2008), com base na busca de recursos biológicos industrialmente exploráveis que possam, então, ser implementados em grande escala por uma ampla gama de setores industriais (PEIXOTO, 2008). Estas técnicas permitem extrair valor econômico da biodiversidade por meio do uso de serviços e funções da biodiversidade e da prospecção (SACCARO JUNIOR, 2011).

Nesse contexto, a bioprospecção pode ser definida como um método que consiste em explorar e investigar recursos provenientes da fauna e da flora, a fim de identificar princípios ativos (TRIGUEIRO, 2006) através da busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos e recursos genéticos, visando inovação de produtos e processos que tenham potencial econômico (SACCARO JUNIOR, 2011). De acordo com Trigueiro (2006), a biotecnologia e a biodiversidade estão relacionadas com a bioprospecção e com os setores industriais, instituições de pesquisas públicas e privadas, a sociedade desde de grupos locais a comunidades indígenas e agricultores, consumidores, ambientalistas, governos nacional e internacional, envolvendo aspectos econômicos, sociais, políticos e ambientais.

O desenvolvimento da biotecnologia aliada à prospecção permitiu observar a importância da diversidade biológica para o desenvolvimento dos mais variados produtos e ambientes poucos explorados podem ser uma nova fonte para exploração sustentável em busca de inovação tecnológica.

3.2 O BIOMA CAATINGA E SUA POTENCIALIDADE BIOTECNOLÓGICA

O bioma Caatinga, de acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004), abrange cerca de dez estados brasileiros estendendo-se pela totalidade do estado do Ceará e mais da metade da Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte, Alagoas e Sergipe, além dos estados de Minas Gerais e do Maranhão, em menores proporções. Caracterizado por possuir condições ambientais diferenciadas com altas temperaturas, médias anuais entre 25°C e 30°C, este bioma possui diferentes disponibilidades de nutrientes de acordo com os tipos de solos encontrados e disponibilidade hídrica baixa (GARIGLIO *et al.*, 2010). É o único bioma exclusivamente brasileiro e apesar de sua

biodiversidade ainda ser muito mal conhecida é a mais diversa do que qualquer outro bioma o qual esteja exposto às mesmas condições de clima e de solo (SILVA *et al.*, 2003). Considerado também, como o menos protegido e o terceiro bioma brasileiro mais modificado pelas atividades humanas, ultrapassando apenas a Mata Atlântica e o Cerrado, estima-se que 45,3% da área total já estejam alteradas (KILL, 2013) devido à intensificação da atividade antrópica ocasionando, geralmente, uma redução na biodiversidade de organismos do solo e, conseqüentemente, de atividades essenciais para o bom funcionamento do ecossistema (ARAÚJO, 2008). Assim, torna-se emergente o estabelecimento de programas que tenham como alvo soluções de questões relativas à produção, à exploração sustentável e à conservação da biodiversidade da Caatinga (REGO JUNIOR *et al.*, 2011).

A exploração da diversidade genética e metabólica dos microrganismos visando à obtenção de produtos biotecnológicos, tais como a produção de antibióticos, de alimentos, tratamento de resíduos e controle biológico de pragas (CANHOS; MANFIO, 2001) existe desde a Antiguidade, porém a diversidade microbiana e o seu potencial biotecnológico ainda são poucos explorados na Caatinga e ambientes desse tipo, podem representar a descoberta de novas drogas ou novos compostos de interesse (GARCIA, 2011). De acordo com Grisi (2011), no semiárido do Nordeste brasileiro é possível encontrar microrganismos com características peculiares, devido às condições inóspitas do ambiente e espera-se que microrganismos, já adaptados a essas condições, sejam interessantes nos processos biotecnológicos industriais (SIMÕES, 2006), por produzirem substâncias capazes de contribuir com a saúde humana e o meio ambiente, havendo a necessidade de estudos sobre a diversidade microbiana local para conhecimentos de novas espécies de interesse biotecnológico.

Os fungos merecem destaque pela sua importância nos diversos ambientes, estando entre os principais responsáveis pela ciclagem de nutrientes, sobretudo nos ecossistemas florestais (MAIA *et al.*, 2005), atuando como decompositores e produtores de metabólitos (SILVA; LINS, 2008). Nas indústrias, vêm adquirindo status de destaque para vários tipos de aplicações (SOARES *et al.*, 2010) pela ampla utilização como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteróides (BRAGA; DESTÉFANO; MESSIAS, 1999). Atualmente, estudos estão sendo realizados com os fungos do bioma Caatinga, por meio da busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e/ou ambiental (SILVA; LINS, 2008). Dentre esses compostos,

os surfactantes biológicos tem se destacado como metabólito com inúmeras propriedades e aplicações industriais, porém estudos avaliando a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos ainda são escassos (GARCIA, 2011).

3.3 SURFACTANTES

Os surfactantes são compostos químicos sintéticos com ampla aplicação em diversos setores industriais, uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos (GOUVEIA *et al.*, 2003). Segundo Holmberg e colaboradores (2002), surfactante é derivado da expressão “*surface active agent*”, designado como um agente ativo de superfície, um composto com capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Por serem moléculas anfipáticas, constituídas por uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar), na qual a porção apolar é comumente uma cadeia hidrocarbonada e a porção polar pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (DESAI; BANAT, 1997), os surfactantes tendem a se localizar nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), formando um filme molecular, ordenado nas interfaces, o que promove a redução da tensão interfacial e superficial (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Quando adicionados aos líquidos os surfactantes aumentam a capacidade de espalhamento e de umectação por meio da redução da tensão superficial (ROCHA, 2007). Dentre outras propriedades, as que merecem destaque pelas aplicações industriais são: aumento da adsorção de moléculas, formação de micelas, formação de macro e microemulsões, aumento da dispersão ou agregação de sólidos (CIAPINA, 2008), sendo geralmente utilizados para resolver problemas de solubilidade, modificar as propriedades de algumas superfícies e aplicações como agentes emulsionantes, agentes dispersantes (COSTA, 2011), agentes molhantes, lubrificantes, espumante e detergência (ROSSMANN, 2008). De acordo com Rahman e Gakpe (2008), cerca de 54% dos surfactantes são usados nos detergentes, 13% como auxiliares na indústria têxtil e de papel, 10% em processos químicos diversos, 10% em cosméticos e produtos farmacêuticos, 3% na indústria de alimentos, 2% na agricultura e 8% em outras aplicações distintas, como na biorremediação. A maioria desses compostos é derivada do petróleo e pode apresentar alta toxicidade e baixa biodegradabilidade, possuindo eficiência somente em faixas pequenas de pH e temperatura (MARIANO, 2006). Como a produção de surfactantes gera subprodutos danosos ao meio ambiente (GARCIA, 2011), o aumento da preocupação ambiental e das novas legislações de

controle de meio ambiente acarretou a procura por surfactantes biológicos como alternativa para produtos já existentes (BUENO; SILVA; GARCIA- CRUZ, 2010).

3.4 BIOSSURFACTANTES

Estudos relacionados aos biossurfactantes iniciaram-se em 1960 e sua utilização se estendeu nas últimas décadas especialmente em indústrias farmacêuticas, alimentícias e refinarias (SANTOS, 2013), devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos, como também seu papel na recuperação de ecossistemas (MARIANO, 2006).

Biossurfactantes são biopolímeros de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante (CARVALHO, 2006). A Tensão Superficial (TS) é definida como a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos, que diminui quando a concentração de biossurfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo formação de micelas. A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC) que corresponde à mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao mínimo (RUFINO, 2006). De acordo com Santos (2008), os biossurfactantes atuam também como emulsificantes, por serem compostos que contribuem para aumentar a estabilidade da emulsão devido à sua estrutura molecular anfipática.

Esses compostos consistem de subprodutos metabólicos produzidos extra ou intracelularmente por bactérias, fungos filamentosos, leveduras (SOUSA, 2011) e algumas algas (DELLAGNEZZE, 2010) quando cultivados em meio contendo fonte de carbono hidrocarbonada, como frações de petróleo e óleos vegetais ou, algumas vezes, fonte de carbono hidrofílica, como açúcares (ACCORSSINI, 2010). Evidências indicam que são produzidos em grande quantidade por microrganismos isolados do solo, água marinha, de sedimentos do mar e áreas contaminadas por óleo (BARROS *et al.*, 2007). Dentre os organismos produtores de biossurfactantes, as bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter* e as leveduras do gênero *Candida* são as mais estudadas e relatadas na literatura, sendo escasso o estudo com fungos filamentosos.

Em termos estruturais, em geral, os biossurfactantes possuem uma estrutura constituída na sua porção hidrofílica de aminoácidos ou peptídeos, mono, di- ou polissacarídeos ou ácidos carboxílicos e na porção hidrofóbica formada por ácidos graxos

saturados ou insaturados (DESAI; BANAT, 1997). Devido a essa estrutura anfipática, essas moléculas tendem a se aglomerar e formar pequenas estruturas que reduzem a tensão superficial até um nível crítico (DELLAGNEZZE, 2010). Classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana (ARAÚJO; FREIRE, 2013), os biossurfactantes podem ser divididos em duas classes principais: os de baixo peso molecular que podem eficientemente reduzir as tensões superficial e interfacial, incluem os lipopeptídeos, glicolipídeos e proteínas, e os de alto peso molecular composto por polímeros anfipáticos e polifílicos que usualmente apresentam maior eficiência para o estabelecimento de emulsões, incluem os polissacarídeos, lipopolissacarídeos ou lipoproteínas (CERQUEIRA, 2007; BANAT *et al.*, 2010; DELLAGNEZZE, 2010).

Considerando a grande diversidade de microrganismos produtores e de substratos utilizados, espera-se que as classes de biossurfactantes apresentem propriedades e funções fisiológicas diferentes (PIRRÔLO, 2006). As funções mais frequentemente mencionadas na literatura são a emulsificação e a solubilização de compostos insolúveis em água (ex. hidrocarbonetos), facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (FRANCY *et al.*, 1991), transporte de hidrocarbonetos, regulação da aderência-liberação da célula a superfícies possibilitando a colonização microbiana em nichos ecológicos, visando aderir ou se desligar de um determinado local, de acordo com sua atividade antibiótica e necessidade (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CIAPINA, 2008). Sabe-se que os biossurfactantes exercem influência sobre a sobrevivência de microrganismos por estar relacionado com a sua mobilidade, movimentação, deslizamento e desprendimento de superfícies (BEZERRA, 2012), assim como pode ser usado como proteção contra o ressecamento (ORTEGA-MORALES *et al.*, 2007).

3.4.1 Propriedades

O potencial de aplicação dos agentes ativos de superfícies produzidos a partir de microrganismos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial (COLLA; COSTA, 2003). Um número crescente de investigações relativas às propriedades funcionais dos biossurfactantes os coloca como produtos de origem biotecnológica de real importância quanto às variadas aplicações (BARROS *et al.*, 2007). No entanto, ainda não são competitivos em relação aos

surfactantes químicos quanto à utilização em larga escala, devido ao alto custo, baixos rendimentos dos processos de produção e de recuperação e purificação (RODRIGUES, 2011).

A maioria dos biossurfactantes apresenta algumas propriedades comuns, apesar da sua diversidade de composição química. De acordo com Nitschke e Pastore (2002), essas propriedades são:

- Atividade superficial e interfacial: produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactantes quando comparados com os surfactantes sintéticos;
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas;
- Biodegradabilidade: são facilmente degradáveis na água e no solo;
- Baixa toxicidade: como são moléculas naturais, comprovadamente, não causam danos aos seres vivos estruturalmente mais complexos (plantas e animais) (CARA, 2009).
- Especificidade: como os biossurfactantes são formados por moléculas complexas com grupos funcionais específicos possuem atuação específica, isto é de interesse no uso em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos (CIAPINA, 2008);
- Disponibilidade: podem ser produzidos a partir de matérias-primas largamente disponíveis e de resíduos industriais (SILVA, 2012).

Além dessas propriedades, os biossurfactantes podem sofrer modificações físicas e na sua estrutura química através de manipulações genéticas, biológicas ou químicas, permitindo o desenvolvimento de novos produtos para atender necessidades específicas (NITSCHKE; PASTORE, 2003).

3.4.2 Aplicações

Os biossurfactantes apresentam diferentes estruturas químicas e propriedades surfactantes fazendo com que apresentem diferentes funções naturais com diferentes aplicações (Tabela 1), assim um grupo de surfactantes pode ter vantagem em uma aplicação específica e outros sejam mais apropriados em outras aplicações (BARBOSA; GONDIM; PAZ, 2007). As principais aplicações relacionam-se com a indústria petrolífera, na recuperação melhorada do petróleo e limpeza de reservatórios (PIRÔLLO, 2006), de acordo com Colla e Costa (2003), os métodos de limpeza baseiam-se na formação de emulsões concentradas de óleo em água por meio de agentes de superfície, com posterior bombeamento

da emulsão formada, seguida da quebra desta emulsão e recolhimento do óleo. Na biorremediação são utilizados em ambientes contaminados, tornando os poluentes biodisponíveis à sua biodegradação (ACCORSINI, 2010), os biossurfactantes podem substituir o tratamento com ácidos, álcalis, complexantes e solventes solúveis em água para remoção dos metais pesados de solos contaminados e também utilizados no processo de biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (PHA) com quatro ou mais anéis aromáticos (COLLA; COSTA, 2003).

Tabela 1: Principais funções e aplicações comerciais dos biossurfactantes.

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

Fonte: BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000 adaptado por NITSCHKE; PASTORE, 2002.

Essas moléculas apresentam grande variedade de outras aplicações, que incluem atividades voltadas para a agricultura, indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (DELLAGNEZZE, 2010). Na agricultura são usadas nas formulações de herbicidas e pesticidas, aumentando o efeito de agentes de biocontrole (PACHECO, 2008). As indústrias de cosméticos e saúde utilizam grandes quantidades de biossurfactantes em uma significativa variedade de produtos, como agentes emulsificantes, espumantes, solubilizantes, agentes umidificantes e de limpeza (BEZERRA, 2012).

Na saúde são amplamente utilizados em vários produtos na indústria de medicamentos por necessitar de biossurfactantes na sua composição (RUFINO, 2006), podem ser empregados nos compostos de antibióticos, por possuírem a capacidade de romper a

membrana celular dos microrganismos promovendo sua morte (CARLI, 2006). Um dos biossurfactantes mais conhecidos é a surfactina por possuir aplicações farmacêuticas como inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana e antifúngica, atividade antiviral e antitumoral (NITSCHKE; PASTORE, 2002; BARROS *et al.*, 2007).

São utilizados na indústria alimentícia como emulsificantes no processamento de matérias-primas (NITSCHKE; PASTORE, 2002), com capacidade de promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados, influencia na textura e vida de prateleira de produtos contendo amido e melhora a consistência e textura de produtos à base de gorduras (BARROS *et al.*, 2007). Segundo Araújo e Freire (2013), nessas indústrias estudos estão sendo realizados sobre a utilização dos biossurfactantes como inibidores da adesão de microrganismos e inibição da formação de biofilmes, com previsões de que futuramente poderão suprir a necessidade do uso de produtos sintéticos ou diminuir as concentrações utilizadas atualmente.

3.4.3 Produção de Biossurfactantes

Durante alguns anos a produção de biossurfactantes por vários microrganismos tem sido estudada extensivamente, dando origem a uma série de estudos relacionados à sua produção, tipos e propriedades (PACHECO, 2008), sendo de fundamental importância também o desenvolvimento de estratégias que permitam a produção e conseqüentemente aplicação dos biossurfactantes em escala industrial (SOBRINHO, 2007).

Otimizações de condições de biorreação, a fim de aumentar a eficiência de produção e diminuir o custo do produto final, tem resultado em crescimentos significativos no campo de fabricação de biossurfactantes, fazendo-os mais atrativos comercialmente (PEIXOTO, 2008). De acordo com Cerqueira (2007), o desenvolvimento de processos baratos e materiais de baixo custo auxiliam para redução do custo total de produção de biossurfactantes, devido a isto estão sendo desenvolvidos estudos voltados para condições de nutrientes e substratos, alguns resultados obtidos estão permitindo a obtenção de meios e condições de cultivo que proporcionem melhores qualidades nos produtos obtidos e aumento nas produções (BORGES, 2011), assim como redução do custo total de produção. Porém, estabelecer um modelo padrão para a produção dessas moléculas torna-se difícil devido as suas estruturas heterogêneas, cuja

composição depende da cultura microbiana, das condições nutricionais e ambientais empregadas para seu cultivo (LIMA, 2007).

Modificações da composição do meio de cultura podem causar alterações da estrutura dos biossurfactantes e, conseqüentemente, das suas propriedades (ROSSMANN, 2008). Alguns microrganismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, variando desde carboidratos até hidrocarbonetos. Sendo assim a composição e as características desses compostos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, como também pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008). Atualmente, diversos estudos são realizados utilizando fontes de carbono de origem hidrofílica (açúcares), hidrocarbonetos ou resíduos agroindustriais, para produção por leveduras Sarubbo e colaboradores (2001), demonstraram que uma maior Atividade de Emulsificação foi obtida utilizando glicose.

A produção de biossurfactantes envolve processos fermentativos considerados mais brandos do que os processos químicos tradicionalmente envolvidos na produção de surfactantes químicos. De acordo com Pérez-Armendáriz e colaboradores (2013), a produção depende de fatores físico-químicos (aeração, pH, substrato, salinidade) e sua avaliação dependerá de fatores cinéticos (consumo de substrato, a formação de produto e produção de biomassa). Dentre os parâmetros envolvidos, a temperatura é um dos mais importantes na regulação de atividades microbianas em ambientes naturais, pois influencia diretamente a resposta de microrganismos por seus efeitos na taxa de crescimento, atividade enzimática, composição celular, produção de metabólitos e requerimentos nutricionais (CERQUEIRA, 2007), assim como tem sido evidenciado que o pH do meio de cultivo afeta o crescimento do microrganismo e a produção de biossurfactantes.

De acordo com Fontes e colaboradores (2008), a agitação é também um parâmetro importante por promover uma melhor aeração do meio auxiliando na dispersão de nutrientes, favorecendo também o crescimento de microrganismos aeróbios. Cerqueira (2007) estudou a influência das variáveis pH e salinidade na produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em meio sólido e concluiu que o fungo filamentososo mostrou capacidade de produção de biossurfactante nos diferentes meios sólidos, apresentando maior estabilidade quando mantido em pH 7,0, salinidade 16,5%. Krepsky (2004), verificou que o aumento da salinidade influenciou na Tensão Superficial em dois consórcios bacterianos

testados para produção de biossurfactantes. Ao realizar um estudo sobre as condições de cultivo para síntese desses biopolímeros por *Pseudomonas aeruginosa*, Bezerra (2012), concluiu que parâmetros como temperatura, agitação e razão de aeração têm efeitos significativos para reduzir a TS, diferentemente da fonte de carbono, que de acordo com as análises, não é considerada significativa. Deste modo, o controle e a otimização dessas condições operacionais são considerados essenciais para o sucesso de ampliação de escala, podendo tornar os surfactantes biológicos economicamente competitivos em relação aos surfactantes químicos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008).

A eficiência dos biossurfactantes pode ser determinada, segundo Desai e Banat (1997), medindo a redução superficial e interfacial, usando para isso um tensiômetro e como critério a habilidade dos biossurfactantes em reduzir a Tensão Superficial abaixo de 40 mN.m⁻¹, outro parâmetro é a Concentração Micelar Crítica, definida pela solubilidade de um biossurfactante dentro de uma fase aquosa, determinando a sua eficácia. A formação e estabilidade de emulsão também podem ser utilizadas como medidas para verificar a produção e eficiência dos biossurfactantes, a emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa em gotículas microscópicas em outra fase líquida, expressando à capacidade dos biossurfactantes produzidos de emulsificar hidrocarbonetos (BEZERRA, 2012), essa capacidade geralmente é determinada pelo Índice de Emulsificação (IE), estabilidade após 24 horas e Atividade de Emulsificação (AE) (PINTO, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do CDSA/UFCG. Os processos fermentativos foram conduzidos em incubador rotatório (*Shaker*) e todos os materiais e meios de cultura utilizados foram devidamente autoclavados a 121 °C, 1atm, por 20 minutos.

4.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos empregados para o estudo fazem parte da coleção de Fungos Filamentosos da Caatinga do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – CDSA da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG (Figura 1), desenvolvida pelo grupo de trabalho do Prof. Dr. Jean César F. Queiroz. A coleção possui 117 fungos filamentosos, neste estudo foram utilizados 11 espécimes selecionados aleatoriamente, denominados como CDSA06, CDSA17, CDSA20, CDSA43, CDSA50, CDSA54, CDSA71, CDSA74, CDSA103, CDSA107 e CDSA109 (Figura 2), adquiridos a partir de sucessivas coletas de fungos no solo e folhas de plantas do Bioma Caatinga no município de Sumé-PB, armazenados em vidro âmbar de 20 mL contendo 10 mL de meio de cultura inclinado composto por Batata, Dextrose e Ágar (BDA) ou vidro âmbar de 30 mL contendo 15 mL de meio de cultura inclinado composto por Ágar, Dextrose e Extrato de Malte (ADM), mantidos sob refrigeração, a 4 °C.

Figura 1: Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido localizado na cidade de Sumé- PB onde foi realizada a coleta dos microrganismos.



Fonte: Google Maps.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio para ativação dos fungos filamentosos

O meio YEPD (Extrato de Levedura, Peptona e Glicose) acrescido com ágar (Tabela 2) foi utilizado para ativação dos microrganismos (CASAL *et al.*, 2004). O meio foi distribuído em Erlenmeyers de 500 mL, com pH ajustado em 6,8, utilizando o ácido clorídrico (HCl).

Tabela 2: Composição do meio de cultura YEPD acrescido com ágar para ativação dos fungos filamentosos da Caatinga.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	05,00
Peptona	20,00
Glicose	20,00
Ágar	05,00

4.2.2 Meio líquido para produção de biossurfactantes

Para cultivo dos fungos visando à produção de biossurfactantes foi utilizado o meio de cultura YEPD (Tabela 3), distribuído em Erlenmeyers de 500 mL com pH ajustado em 6,8.

Tabela 3: Composição do meio de cultura líquido YEPD para produção de biossurfactantes por fungos filamentosos da Caatinga.

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	05,00
Peptona	20,00
Glicose	20,00

4.2.3 Meio para identificação dos fungos filamentosos

O meio BDA (Batata, Glicose e Ágar) foi utilizado para identificação dos fungos com possível potencial para produzir biossurfactantes. O meio de cultura semi-sólido foi distribuído em Erlenmeyer de 500 mL com pH ajustado em 6,8, utilizando o Hidróxido de Sódio (NaOH).

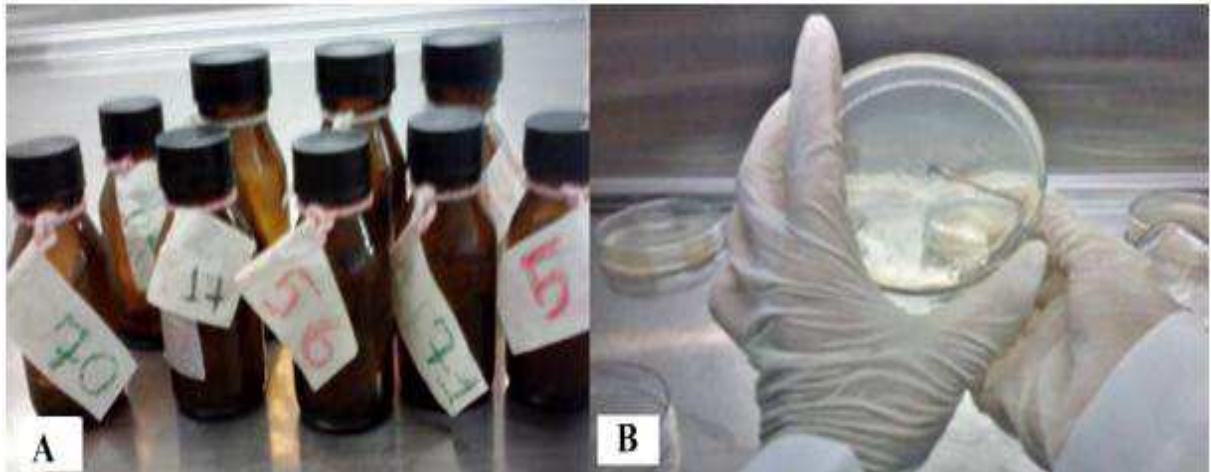
Tabela 4: Composição do meio de cultura BDA para identificação dos fungos filamentosos da Caatinga produtores de biossurfactantes.

Componentes	Concentração (g/L)
Batata	100,00
Glicose	20,00
Ágar	05,00

4.3 ATIVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos armazenados em forma de coleção foram ativados por repique em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura YEPD acrescido de ágar (Figura 2) e incubados a 37°C, por 72 horas.

Figura 2: A) Fungos Filamentosos da Caatinga armazenados em meio BDA e ADM sob forma de coleção; B) Ativação dos fungos filamentosos da Caatinga no meio YEPD com ágar.



4.4 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

4.4.1 Pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado a partir dos esporos fúngicos que cresceram nas placas de Petri. Inicialmente, os microrganismos foram incubados *overnight* no meio de cultura líquido YEPD sob agitação orbital a 150 rpm, a 37 °C, em seguida 1 mL do pré-inóculo foi transferido para um novo cultivo visando a produção de biossurfactantes.

4.4.2 Condições de Cultivo

Os fungos foram cultivados em meio líquido para avaliação da produção de biossurfactantes. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50 mL do meio YEPD e 1mL do pré-inóculo. Os frascos foram incubados sob agitação orbital a 150 rpm por 96 horas, a temperatura de 37°C (Figura 3), seguindo a metodologia descrita por Paz e colaboradores (2006).

Figura 3: Cultivo dos fungos filamentosos da Caatinga em meio líquido YEPD sob agitação orbital.



Após o período de incubação, os frascos foram submetidos à filtração a vácuo em papel de filtro com poro de 0,25 μm . A biomassa obtida foi seca em estufa a 70°C por 24 horas (BEZERRA, 2012), o líquido metabólico foi utilizado para estimar da produção de biossurfactante (PAZ *et al.*, 2006), por meio do Índice e Atividade de Emulsificação.

4.5 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOSSURFACTANTES

Os líquidos metabólicos livres de células foram submetidos à análise de Índice de Emulsificação (teste quantitativo) e Atividade de Emulsificação (teste qualitativo).

4.5.1 Índice de Emulsificação (IE)

O Índice de Emulsificação foi determinado seguindo o método descrito por Cooper e Paddock (1984), em tubos de ensaio, com tampa de rosca, foi adicionado 2 mL de líquido metabólico e 1 mL de querosene, em seguida, homogeneizado por agitação em vórtex por 2 minutos a temperatura ambiente (25 °C). Os testes foram realizados em duplicata e após 2 minutos a leitura foi realizada pela medição da altura da emulsão formada (BARBOSA; GONDIM; PAZ, 2007). O Índice foi calculado por meio da Equação 1:

$$\text{Índice da emulsão}(\%) = \frac{H_e}{H_t} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

He: altura da emulsão;

Ht: altura total do líquido.

4.5.2 Estabilidade da emulsão

Os tubos de ensaio contendo a emulsão foram mantidos em temperatura ambiente e após 24 horas foi verificada a estabilidade da emulsão formada (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

4.5.3 Atividade de Emulsificação

A Atividade de Emulsificação foi determinada segundo Cirigliano e Carman (1984), utilizando 2 ml do líquido metabólico, 2 ml de tampão acetato de sódio 0.1M (pH 3.0) e 1 ml de querosene. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos, seguido de repouso por 10 minutos, logo após, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando água destilada e querosene como “branco” da amostra. O resultado foi expresso em Unidade de Atividade de Emulsificação (UAE), de acordo com a Equação 2, que corresponde à leitura da absorvância multiplicada pela diluição (PAZ *et al.*, 2006).

$$UAE = Abs \times 2 \quad (2)$$

Onde:

UAE = Unidade de Atividade de Emulsificação;

Abs = Absorvância;

4.6 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE TEMPERATURA, pH E SALINIDADE SOBRE A ATIVIDADE DO BIOSSURFACTANTE

4.6.1 Estabilidade térmica

A estabilidade dos biossurfactantes foi avaliada segundo metodologia descrita por Silva (2013), os líquidos metabólicos livres de células foram mantidos nas temperaturas de 3°C e 60°C por 10 minutos. Após tratamento térmico, cada solução foi resfriada até temperatura ambiente para medição do IE. A melhor temperatura foi estudada verificando a cada 20 minutos estabilidade da emulsão, a partir do IE, até o período de 60 minutos.

4.6.2 Estabilidade ao pH

Para determinar o efeito do pH no Índice de Emulsificação o pH do líquido metabólico contendo o biossurfactante foi ajustado para 5,0; 7,0 e 9,0 (CERQUEIRA, 2007),

utilizando a base hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl). Após 30 minutos, foi determinado o IE.

4.6.3 Estabilidade frente à temperatura e pH

Os líquidos metabólicos foram analisados frente às variáveis temperatura (3°C e 60°C) e pH (5,0; 9,0) para determinar quais fatores são significativos para aumentar o Índice de Emulsificação. Os resultados foram analisados por meio da ferramenta Diagrama de Pareto, utilizando o software *Statistica 7.0*.

4.6.4 Estabilidade à concentração salina

Os biossurfactantes presentes nos líquidos metabólicos livres de células foram avaliados quanto a estabilidade da emulsão frente à concentração de 5% e 10% de NaCl. Após 30 minutos de incubação, foi determinado o IE.

4.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos velocidade instantânea máxima de crescimento celular (r_x), velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_x) e tempo de geração (t_g) foram determinados segundo Schmidell e colaboradores (2001), por meio das Equações 3, 4 e 5.

$$r_x = \frac{dX}{dT} \quad (3)$$

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dT} \quad (4)$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (5)$$

Onde:

dX = variação do número de células (g/L);

dT = variação do tempo (h);

r_x = velocidade instantânea de crescimento celular (g/L.h);

μ_x = velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹);

X = concentração celular (g/L);

t_g = tempo de geração (h);

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹).

A produção de biossurfactantes foi determinada utilizando como parâmetro a Atividade de Emulsificação (PINTO; MARTINS; COSTA, 2009). A relação concentração celular e Atividade de Emulsificação foi analisada a partir da Correlação de Pearson, utilizando o software *Origin* 8.0.

4.7.1 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi realizada pelo do método descrito por Bueno, Silva e Garcia-Cruz (2010). A biomassa obtida por filtração a vácuo foi armazenada na estufa a 70°C, por 24 h, logo após, submetida à dessecador por 15 minutos e pesada.

A biomassa foi determinada calculando a diferença do peso do papel filtro com células ($Peso_2$) e sem células ($Peso_1$), de acordo com a Equação 6. A curva de crescimento foi obtida durante um tempo de fermentação de 96 horas por meio do peso seco das células presentes num determinado volume de cultura.

$$X = Peso_2 - Peso_1 \quad (6)$$

4.7.2 Determinação do pH

Foi verificado o pH a partir do caldo fermentado após cada período de fermentação (OLIVEIRA, 2010).

4.8 PLANEJAMENTO FATORIAL

Um planejamento fatorial 2^2 , em duplicata, foi realizado com os fungos filamentosos da Caatinga que apresentaram potencial para produção de biossurfactantes, visando determinar as melhores condições por meio dos fatores: agitação e concentração de glicose no meio YEPD (BEZERRA, 2012), como parâmetro quantitativo adotou-se o Índice de Emulsificação.

A matriz do planejamento com os valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 encontra-se na Tabela 5. As análises dos resultados foram realizadas com o auxílio do programa *Statistica*, versão 7.0, utilizando a ferramenta Diagrama de Pareto e estimativa dos efeitos.

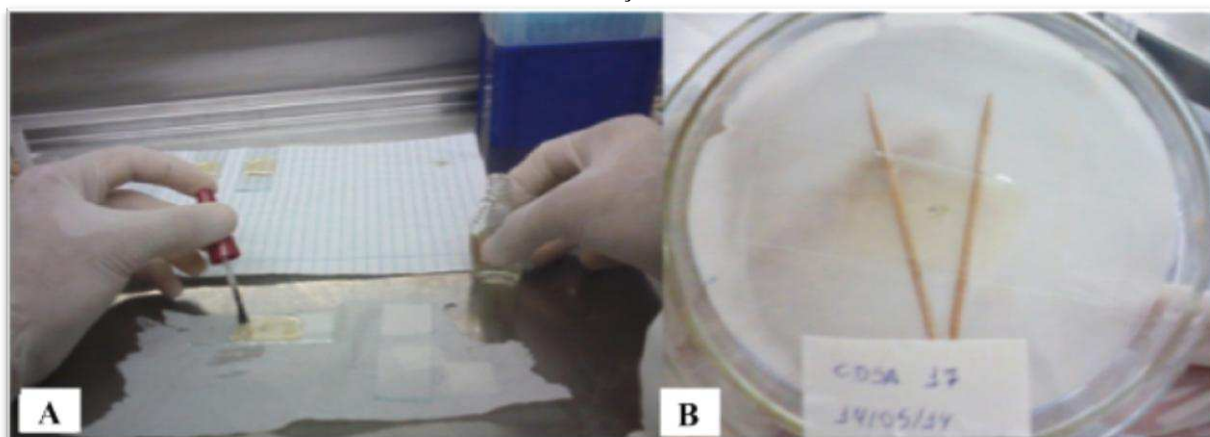
Tabela 5: Matriz das variáveis codificadas para o estudo das condições de produção de biossurfactantes por fungos filamentosos da Caatinga.

Nível	Agitação (rpm)	Concentração de Glicose (g/L)
- 1	100	15
+ 1	200	25

4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES UTILIZANDO A TÉCNICA DE MICROCULTIVO

Os fungos que produziram biossurfactantes foram identificados por meio do estudo das diferentes estruturas fúngicas, seguindo os métodos descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Na lâmina sobre um suporte foi adicionado 1 mL do meio BDA, em seguida, o esporo fúngico foi inoculado e a lamínula depositada, utilizando um esmalte base para selar 3 lados da lamínula. As lâminas foram colocadas sob papel filtro úmido (câmara úmida) para evitar a dessecação do meio de cultura durante o crescimento dos fungos, logo após, armazenadas em placa de Petri, a 37°C (Figura 4). A cada 24 horas a cultura era visualizada em microscópio até o período de 96 horas, tempo necessário para observar o desenvolvimento de hifas. Os resultados obtidos foram comparados com os encontrados na literatura.

Figura 4: A) Técnica de microcultivo para identificação dos fungos filamentosos da Caatinga produtores de biossurfactantes; B) Fungo CDSA17 armazenado em câmara úmida em placa de Petri para posterior identificação.



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTORES DE BIOCOSURFACTANTES

A partir de 11 espécimes da coleção de fungos filamentosos do CDSA isolados do solo e folhas de plantas do bioma Caatinga, sete (63,63%) apresentaram potencial para produção de biossurfactantes, de acordo com os dados da Atividade de Emulsificação apresentados na Tabela 6. A seleção dos microrganismos produtores de biossurfactantes foi realizada utilizando como parâmetro a capacidade de surfactantes emulsificar hidrocarbonetos, a partir de testes quantitativos e qualitativos. Foi oferecido para os fungos um meio de cultura rico em fonte de carbono (glicose), de nitrogênio (peptona) e vitaminas (extrato de levedura) como forma de ofertar as melhores fontes de nutrientes e condições especiais de crescimento, de acordo com a literatura, identificando o potencial de produção de biossurfactantes pelos microrganismos da coleção.

Tabela 6: Resultados dos testes quantitativos (IE) e qualitativos (AE) realizados para verificar a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos da Caatinga.

Fungos	Índice de Emulsificação (%)	Estabilidade (%)	Atividade de Emulsificação (540 nm)	Biomassa (g)
CDSA06	0	0	0	0,189
CDSA17	26,47	22,04	0,983	0,422
CDSA20	29,43	13,19	*	0,437
CDSA43	13,26	05,88	*	0,462
CDSA50	22,22	14,71	0,074	0,653
CDSA54	25,82	14,96	1,189	0,551
CDSA71	25,00	16,17	0,991	0,432
CDSA74	29,21	23,01	0,117	0,572
CDSA103	17,64	14,70	0,300	0,569
CDSA107	0	0	0	0,484
CDSA109	24,28	21,43	0,503	0,508

Legenda: *Os líquidos metabólicos não foram testados por não apresentarem estabilidade >50%.

Testes quantitativos e qualitativos, em duplicata, foram realizados após 96 horas de fermentação, conduzida em processo descontínuo, para indicar a produção de biossurfactantes. Os resultados apresentados na Tabela 6 correspondem às médias obtidas. O Índice de Emulsificação (IE) e estabilidade da emulsão, após 24 horas, foram utilizados para determinar a capacidade do biossurfactante em formar emulsões. As emulsões que mantiveram 50% de estabilidade após 24 horas foram então, submetidas ao teste qualitativo de Atividade de Emulsificação (AE). Os fungos filamentosos que apresentaram IE,

estabilidade após 24 horas e Atividade de Emulsificação foram, então, considerados como potenciais produtores de biossurfactantes.

De acordo com a Tabela 6, apenas os líquidos metabólicos dos fungos CDSA06 e CDSA107 não apresentaram formação de emulsão, não sendo possível realizar os testes de estabilidade e AE, os CDSA20 e CDSA43 foram capazes de formar emulsão na duplicata, porém não mantiveram estabilidade acima de 50% após 24 horas, parâmetro também utilizado para avaliar a atividade superficial dos surfactantes (OLIVEIRA, 2010), devido a isto, não foram submetidos ao teste de AE. De acordo com Sobrinho (2007), os líquidos metabólicos que não formaram emulsão ou foram incapazes de estabilizar as gotículas microscópicas podem ter sido influenciadas pelo hidrocarboneto, neste caso o querosene, utilizado para os testes de emulsificação. Os demais apresentaram estabilidade variando de 56-88%, com destaque para o CDSA17 e CDSA109, que apresentaram estabilidade acima de 83 e 88%, respectivamente. Os biossurfactantes presentes nos líquidos metabólicos dos espécimes CDSA17, CDSA54, CDSA71, CDSA109 (Figura 5) merecem destaque por apresentarem Índice de Emulsificação e estabilidade superiores aos demais, indicando a habilidade do biossurfactante para formar emulsão e permanecer sem mudanças sob condições específicas de tempo e temperatura, como também Atividade de Emulsificação, demonstrando a capacidade emulsificante e o grau de emulsificação dado para uma determinada quantidade de biossurfactante.

Neste estudo, o biossurfactante não foi isolado ou purificado, os valores de IE e AE foram determinados com relação aos líquidos metabólicos, tais resultados podem aumentar após as etapas de recuperação e purificação. Por apresentarem essa capacidade de formar emulsões, essas substâncias tendem a apresentar importância na composição de produtos de vários setores da indústria, como cosméticos, alimentos e ainda detergentes ou agentes de limpeza.

A emulsão formada do espécime CDSA17 foi mantida sob refrigeração a 4°C, por 90 dias, foi observado que após esse período o IE mostrou estável mantendo-se IE de 22,04% (Tabela 6) com 100% de estabilidade. O espécime CDSA109 também manteve a emulsão estável após 30 dias quando mantido sob temperatura ambiente, apresentando índice de 20,58%, mantendo estabilidade acima de 96%.

Figura 5: Testes de Índice de Emulsificação dos espécimes CDSA103 (A), CDSA71 (B), CDSA54 (C), CDSA17(D), e CDSA109(E).



Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que há uma relação com a formação de biossurfactantes com uma maior concentração de biomassa, os fungos que não apresentaram produção de biossurfactantes (CDSA06 e CDSA107) possuem menor massa do que aqueles que produziram (CDSA50, CDSA71, CDSA103 e CDSA109). Para demonstrar essa relação foi realizada a cinética do processo fermentativo (Tópico 5.3).

Garcia (2011), ao estudar a atividade lipídica de alguns fungos filamentosos isolados da costa brasileira obteve resultados negativos para produção de biossurfactantes quando analisado por meio da capacidade emulsificante, nenhum dos extratos isolados formou emulsão nos ensaios, apesar das condições extremas de concentração salina do ambiente. Atualmente, diversos estudos com microrganismos marinhos estão sendo realizados por ser um ambiente pouco explorado e rico em biodiversidade, para produção de biossurfactantes são estudados devido a alta concentração salina que estão submetidos, porém estudos utilizando fungos filamentosos são escassos, sendo as bactérias as mais relatadas na literatura. Segundo Sousa e colaboradores (2012), cerca de 57% da área total da Caatinga ocorre salinização do solo, neste trabalho, a região onde os fungos foram coletados além de possuir altas concentrações salinas, também possui temperatura elevada em torno de 27 °C, umidade de 50% e pH ligeiramente alcalino, o que de acordo com Souto e Colaboradores (2008), proporciona nos períodos de seca uma maior taxa de crescimento. Estas características qualificam esse ambiente como inóspito, apresentando condições extremas de habitat e como a produção de biossurfactantes está associada à sobrevivência dos microrganismos e proteção contra o ressecamento, o Bioma Caatinga pode ter favorecido para que os fungos filamentosos

CDSA17, CDSA50, CDSA54, CDSA71, CDSA74, CDSA103 e CDSA109 produzissem biossurfactantes nas condições expostas.

5.2 EFEITO DA TEMPERATURA, pH E SALINIDADE SOBRE A ATIVIDADE DO BIOSSURFACTANTE

Algumas propriedades que os biossurfactantes apresentam os caracterizam como potenciais insumos em processos industriais, processos estes associados a condições extremas, sendo necessária uma avaliação da estabilidade desses biossurfactantes (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008) diante de variações de temperatura, pH e salinidade. Devido a isto, os biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos da Caatinga foram submetidos a testes, em duplicata, para verificar a estabilidade da emulsão frente a temperaturas diferentes por 10 minutos (Tabela 7), a faixas de pH de 5,0, 7,0 e 9,0 e concentração salina de 5 e 10%, por meio da análise dos líquidos metabólicos livre de células dos espécimes que apresentaram maior porcentagem de IE, estabilidade a temperatura ambiente e AE.

5.2.1 Estabilidade térmica

Os testes realizados com os líquidos metabólicos dos espécimes CDSA17, CDSA54, CDSA71 e CDSA109 indicaram que quando submetidos a extremos de temperatura (baixa e alta) os Índices de Emulsificação apresentaram maior resultado quando comparados com os testes realizados em temperatura ambiente (25°C) (Tabela 6), com o CDSA17, CDSA71 e CDSA109 apresentando IE superior quando submetidos a 60°C, com aumento em torno de 3%. Os resultados apresentados demonstram que os biossurfactantes presentes nos líquidos metabólicos livres de células são estáveis a diferentes temperaturas e que em alta temperatura o Índice de Emulsificação tende a sofrer acréscimos, resultado também encontrado por Bezerra (2012), quando analisou as temperaturas de 50°C, 60°C e 70°C para estabilidade dos biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas aerugiona*, em que a maior Tensão Superficial foi obtida com a temperatura máxima.

Tabela 7: Estabilidade dos biossurfactantes frente às temperaturas de 3°C e 60°C.

Fungos	Índice de Emulsificação (%)	
	3°C	60°C
CDSA17	25,71	29,41
CDSA54	28,57	22,86
CDSA71	26,47	30,00
CDSA109	19,44	21,87

Um estudo foi realizado com a temperatura de 60°C nos instantes de 20, 40 e 60 minutos para analisar o comportamento da estabilidade da emulsão produzida pelos biossurfactantes em diferentes instantes de tempo.

Gráfico 1: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA17 a 60°C.

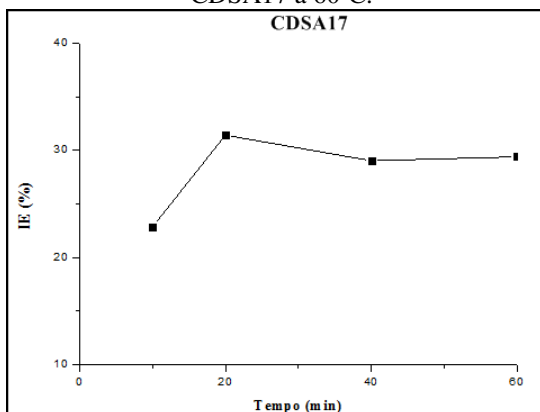


Gráfico 2: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA54 a 60°C.

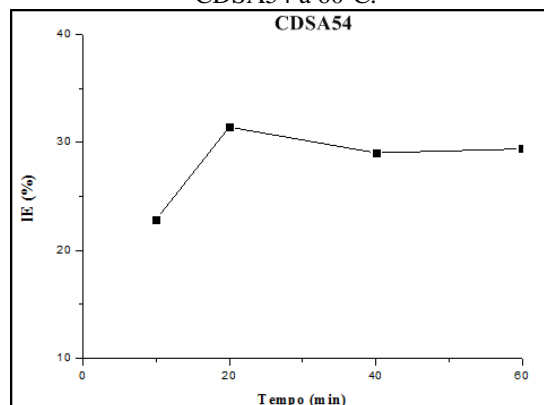


Gráfico 3: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA71 a 60°C.

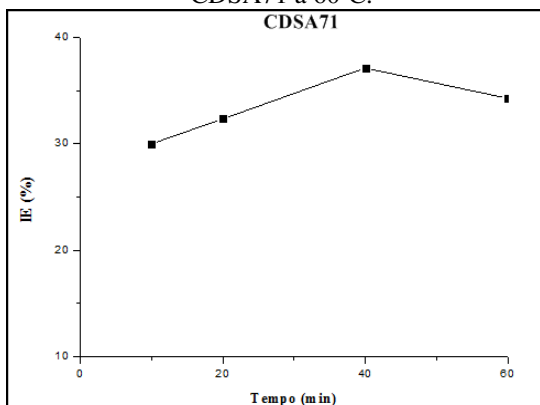
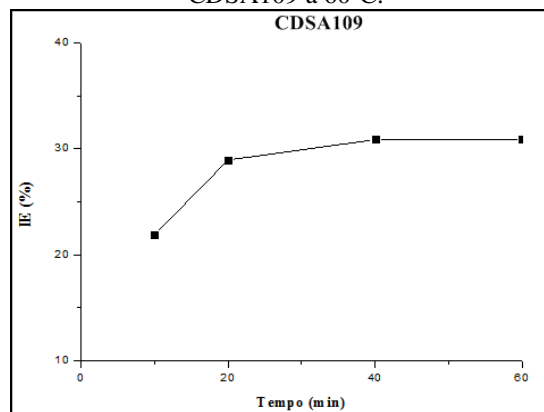


Gráfico 4: Estabilidade da emulsão do espécime CDSA109 a 60°C.



De acordo com os Gráficos 1, 2, 3 e 4, é possível observar que os valores de IE da maioria dos espécimes não tiveram variação significativa ao longo do tempo quando foi submetido ao tratamento a 60°C, apenas o CDSA54 (Gráfico 2) e o CDSA71 (Gráfico 3) apresentaram pequenas oscilações. O IE do espécime CDSA17 (Gráfico 1) aumentou após 20 minutos de exposição ao tratamento térmico, já o IE do espécime CDSA109 (Gráfico 4) aumentou gradativamente após 10 minutos, em seguida, manteve-se com pouca variação. Os resultados demonstram a capacidade dos biossurfactantes em manterem-se estáveis em alta temperatura por um determinado período de tempo, podendo indicar uma possível utilização em indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos, indústrias onde o aquecimento para se atingir a esterilização é de primordial importância (KHOPADE *et al.*, 2011).

5.2.2 Estabilidade ao pH

Os resultados encontrados demonstram que os Índices de Emulsificação obtidos na escala de pH 5,0 e 7,0 foram próximos aos teste padrão (Tabela 6), sofrendo pequenas oscilações em alguns casos, no pH básico foi observado que os IE tenderam a diminuir.

Gráfico 5: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA17.

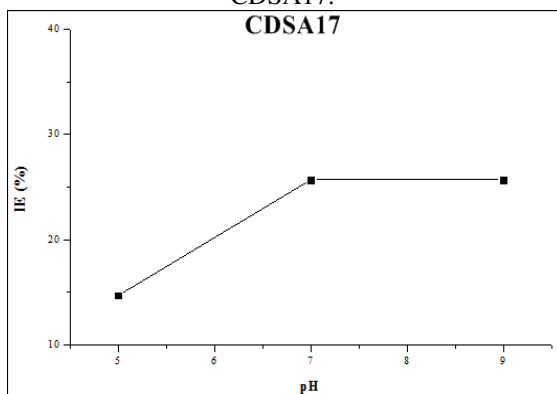


Gráfico 6: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA54.

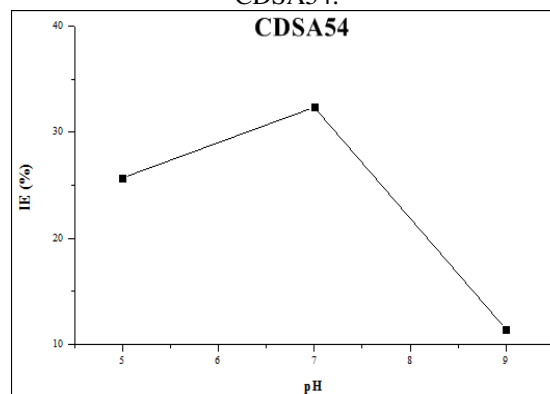


Gráfico 7: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA71.

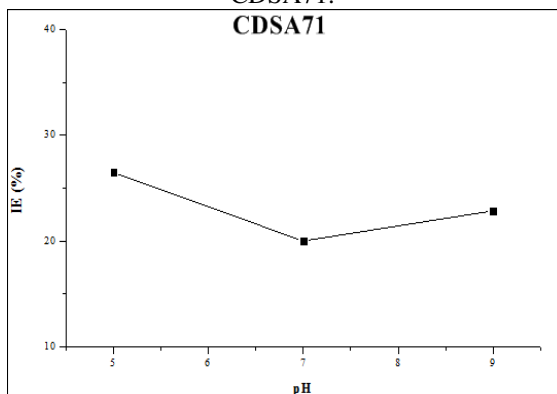
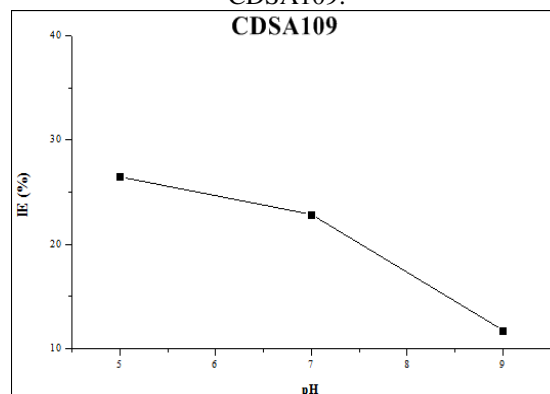


Gráfico 8: Efeito do pH sobre o IE do espécime CDSA109.



De acordo com o Gráfico 5, a estabilidade da emulsão do espécime CDSA17 apresentou um comportamento diferente dos demais, foi estável na faixa de pH 7,0 e 9,0, com valores próximos ao teste padrão, porém apresentou uma redução no pH ácido (5,0). As emulsões dos espécimes CDSA54 e CDSA109 (Gráfico 6 e 8) apresentaram IE reduzido no pH básico, com o CDSA54 obtendo maior IE na neutralidade (32,35%) e o CDSA71 e CDSA109 com valores de IE maior no pH ácido, de 26,47% . Apenas a emulsão do CDSA71 (Gráfico 7) manteve-se estável em todas as faixas de pH com valores próximos ao teste padrão (Tabela 6).

A partir dos Gráficos 5, 6, 7 e 8, é possível observar que os biossurfactantes presentes nos líquidos metabólicos apresentaram estabilidade no pH 7,0 com Índice de

Emulsificação em torno de 20 a 32,5%. Resultados semelhantes a este estudo foram observados por Cerqueira (2007), porém analisando a Atividade de Emulsificação, ao estudar a estabilidade do biossurfactante produzido por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido, os extratos quando submetidos a pH 5,0 proporcionaram uma maior AE quando comparados aos ensaios utilizando pH 9,0, com o biossurfactante apresentando também maior estabilidade no pH 7,0.

5.2.3 Estabilidade a temperatura e pH

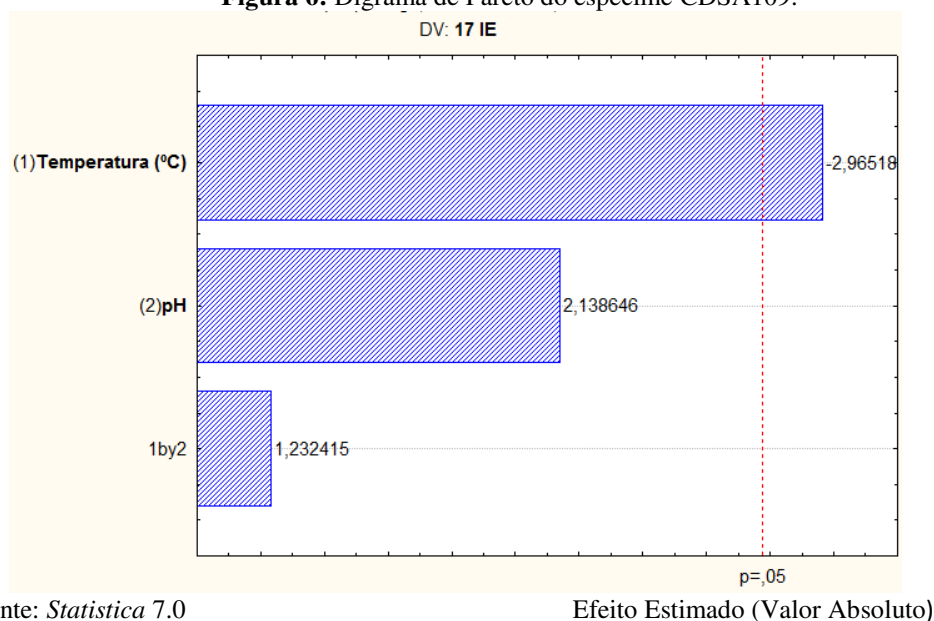
Os líquidos metabólicos livres de células obtidos a partir dos espécimes CDSA17, CDSA54, CDSA71 e CDSA109 foram testados quanto a estabilidade da emulsão em condições de temperatura e pH para observar o comportamento do IE quando submetidos a duas estas variáveis. Para esta análise, o líquido metabólico do espécime CDSA17 não apresentou formação de emulsão em nenhum dos ensaios, assim como os líquidos metabólicos obtidos a partir dos CDSA54 e CDSA71 não formaram emulsão em algumas condições, sendo necessária a repetição dos testes.

Tabela 8: Índices de Emulsificação dos espécimes CDSA54, CDSA71 e CDSA109 frente às condições de temperatura e pH.

T (°C)	pH	Índice de Emulsificação (%)		
		CDSA54	CDSA71	CDSA109
03,0	5,0	0	0	20,52
60,0	5,0	21,21	20,34	13,41
03,0	9,0	29,41	0	22,05
60,0	9,0	32,35	20,00	19,12

Como o líquido metabólico do espécime CDSA109 apresentou IE em todos os ensaios foi realizada uma análise no software *Statistica 7.0*, usando a ferramenta Diagrama de Pareto, que permite indicar quais os parâmetros e interações tem influências significativas sobre o IE, dentro de um limite de confiança de 95%. Neste estudo, os testes foram realizados em duplicata, os resultados apresentados na Tabela 8 referem-se às médias obtidas.

De acordo com a Figura 6, a temperatura é o fator que influencia significativamente o IE no nível de 95% de confiança, exercendo mais domínio para aumentar ou diminuir o Índice de Emulsificação, com o p da variável em torno de 0,043, considerado significativo.

Figura 6: Digrama de Pareto do espécime CDSA109.

5.2.4 Estabilidade a NaCl

De acordo com Nitschke e Pastore (2002), os biossurfactantes suportam concentrações de até 10% de NaCl, enquanto que concentrações salinas de 2 a 3% são suficientes para inativar os surfactantes químicos. Devido a isto, foram testados os líquidos metabólicos dos espécimes em relação ao comportamento do IE em concentrações de 5% e 10% de salinidade (Tabela 9).

Tabela 9: Determinação do efeito da concentração salina no IE.

Fungos	Índice de Emulsificação (%)	
	NaCl 5%	NaCl 10%
CDSA17	0	15,15
CDSA54	23,53	14,29
CDSA71	0	20,00
CDSA109	0	16,17

Os resultados apresentados na Tabela 9 sugerem que os biossurfactantes presentes nos líquidos metabólicos do CDSA17, CDSA71 e CDSA109 não foram estáveis na concentração de 5% de NaCl, porém formaram emulsão na concentração de 10%, com IE inferiores ao teste padrão. Para melhor interpretação são necessários novos testes com as duas concentrações.

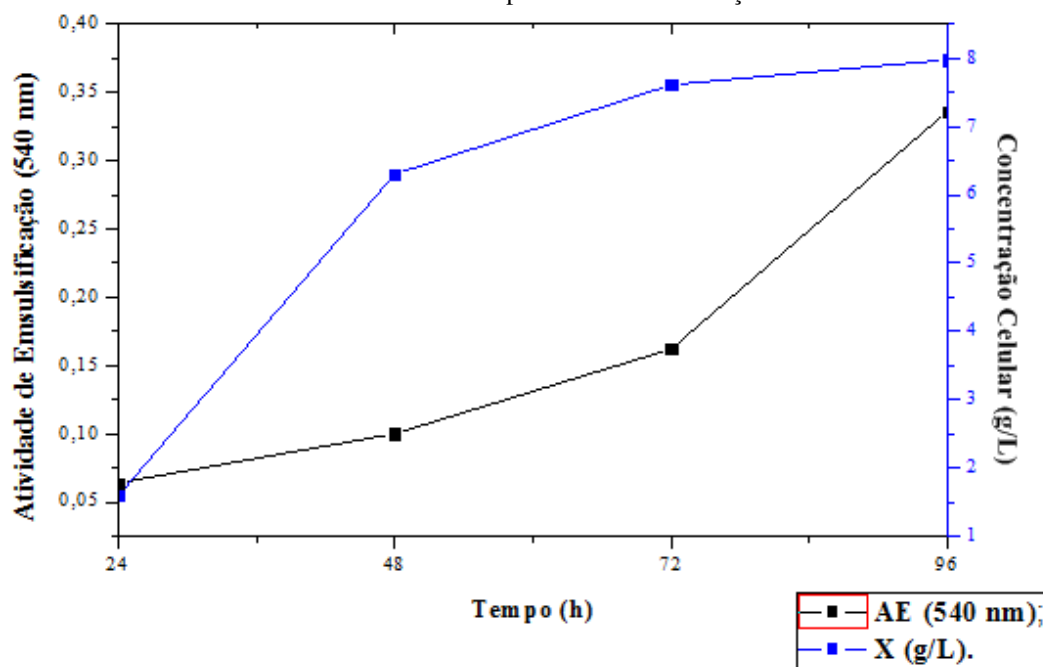
Apenas o líquido metabólico produzido pelo CDSA54 apresentou Índices de Emulsificação nas duas concentrações, com IE maior (23,53%) na salinidade de 5%,

demonstrando que a emulsão do CDSA54 é mais estável na concentração de 5%, mas que ainda possui capacidade emulsificante na concentração de 10% de NaCl.

5.3 PARÂMETROS CINÉTICOS PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Os parâmetros cinéticos foram determinados com o fungo CDSA109 que apresentou desempenho em relação à IE, estabilidade e Atividade de Emulsificação. Um pré-inóculo foi realizado e após 12 horas de cultivo transferiu-se 1 mL para cada frasco correspondente a um ponto, com as amostras sendo removidas a cada 24 horas para determinação da concentração celular (g/L) e AE (UAE). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Gráfico 9: Determinação da concentração celular (g/L) e Atividade de Emulsificação do espécime CDSA109 durante 96 horas do processo de fermentação.



De acordo com o Gráfico 9, as máximas Atividades de Emulsificação foram obtidas nos instantes de 72 e 96 horas de fermentação, no início da fase estacionária, apresentando AE de 0,162 e 0,336 UAE, quando o crescimento microbiano também obteve uma maior concentração celular, de 7,610 e 7,976 g/L, respectivamente. É possível observar que o crescimento celular é proporcional a produção de biossurfactante que, por sua vez, está relacionada à Atividade de Emulsificação. Para indicar isto, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, utilizando o software *Origin 8*, obtendo um grau 0,731 de relação linear entre as duas variáveis, demonstrando uma correlação positiva forte entre a concentração celular e AE, indicando que a produção de biossurfactantes neste espécime está associada parcialmente ao crescimento, sendo as biomoléculas produzidas a partir de 72 horas

de cultivo, provavelmente, na fase estacionária. Resultado também obtido por Pinto (2008), ao estudar a produção de biossurfactantes fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais, em que o fungo *Aspergillus fumigatus* apresentou os maiores IE e TS durante a fase estacionária, com crescimento associado à produção de biossurfactantes.

Também é possível observar, Gráfico 9, que não houve a fase de adaptação do microrganismo no meio de cultivo, apresentando crescimento acelerado nas primeiras horas, com velocidades instantânea e específica máximas nos instantes entre 24 e 48 horas na fase exponencial de crescimento e com tempo de geração em torno de 5 a 6 horas (Tabela 10), tempo necessário para que uma célula se duplique. Estes resultados podem ser explicados devido ao pré-inóculo realizado e ao meio oferecido (YEPD) com nutrientes como a glicose (fonte de carbono), peptona (fonte de nitrogênio), vitaminas (extrato de levedura) e a agitação de 150 rpm que também pode ter favorecido para promover uma melhor aeração do meio, auxiliando na disseminação de nutrientes. Após 48 horas ocorreu uma desaceleração, incidindo uma redução nas velocidades instantâneas e específicas de crescimento, iniciando a fase estacionária no instante de 72 horas.

Tabela 10: Parâmetros Cinéticos determinados durante 96 horas do processo fermentativo para produção de biossurfactante pelo fungo CDSA109.

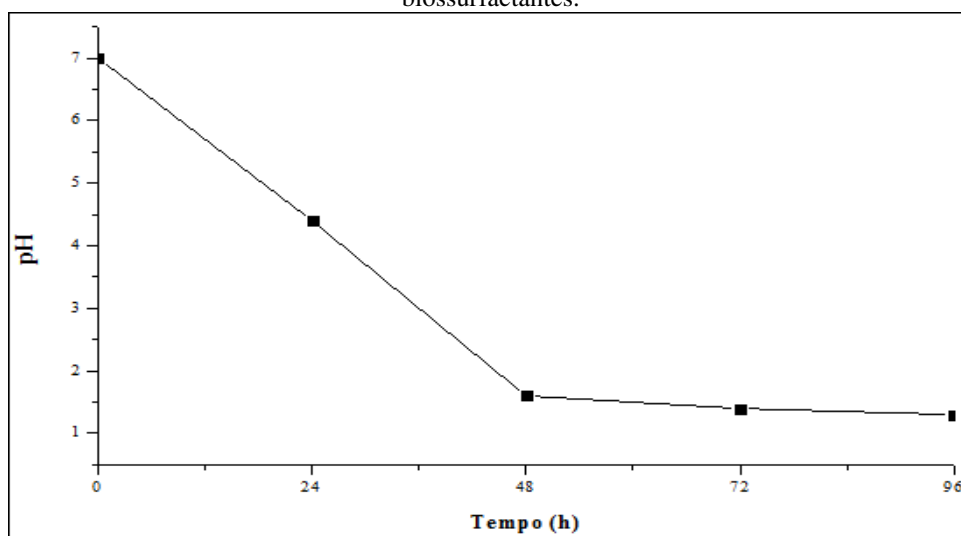
Parâmetros Cinéticos	CDSA109
$r_{Xmáx}(g/Lh)$	0,196
$\mu_{Xmáx}(h^{-1})$	0,123
tg (h)	5,635

Legenda: $r_{Xmáx}$: velocidade instantânea máxima de crescimento; $\mu_{Xmáx}$: velocidade específica máxima de crescimento; tg: tempo de geração.

Durante o crescimento microbiano alguns microrganismos modificam o pH do meio de cultivo, devido a isto o pH do fungo CDSA109 foi verificado a cada 24 horas do processo fermentativo. O Gráfico 10 apresenta o comportamento do pH em função do tempo, os resultados demonstram que ocorreu uma variação ao longo da fermentação em relação ao pH inicial de 7,0, tornando-se ácido após 24 horas do inóculo e logo após 48 horas com faixas extremas de acidez, mantendo-se parcialmente constante até o período de 96 horas. Segundo Souto e Colaboradores (2008), o pH alcalino favorece para o crescimento dos fungos da Caatinga e variações também podem indicar a produção de metabólitos, neste caso a redução do pH durante o crescimento celular ocorreu de acordo com o aumento da produção de biossurfactantes, em que a máxima concentração celular e AE foram obtidas quando o pH

atingiu o seu menor valor, de 1,3. Porém, o pH extremo alcalino não estimula a produção de biossurfactantes, de acordo com Sobrinho (2007), a extrema acidez do meio é um parâmetro relacionado a reduzida produção de biossurfactantes, sendo apenas um indicador do acúmulo de biomassa e metabólito. Deste modo, considerando que o pH não foi controlado ao longo da fermentação e que este sofreu alterações a partir das 24 horas de cultivo, é possível que seu controle contribua para obtenção de uma maior eficiência na síntese de biossurfactante. Pirrôlo (2006), ao estudar a produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos analisou a variação do pH no meio com fontes de carbono como o querosene, encontrando resultados para pH ligeiramente alcalino em todos os experimentos. Bednarski e colaboradores (2004), obtiveram maiores resultados de produção de biossurfactantes pela levedura *Candida apicola* no meio líquido com pH estabelecido em torno de 5,5 utilizando como substrato resíduo industrial.

Gráfico 10: Variações do pH durante cultivo de 96 horas do espécime CDSA109 para produção de biossurfactantes.



5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL 2²

Um planejamento fatorial 2² foi realizado com os fungos filamentosos CDSA17, CDSA54 e CDSA71 para estudar o efeito conjunto dos fatores agitação (100; 200 rpm) e concentração de glicose (15; 25 g/L) no meio de cultura YEPD sobre a variável resposta Índice de Emulsificação, visando determinar, deste modo, quais fatores e interações podem acarretar a uma otimização do processo. Os testes foram realizados em duplicata, após 96 horas do processo fermentativo, totalizando 8 ensaios para cada fungo (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado do planejamento fatorial 2² para determinar as melhores condições de cultivo na produção de biossurfactantes adotando como resposta o Índice de Emulsificação.

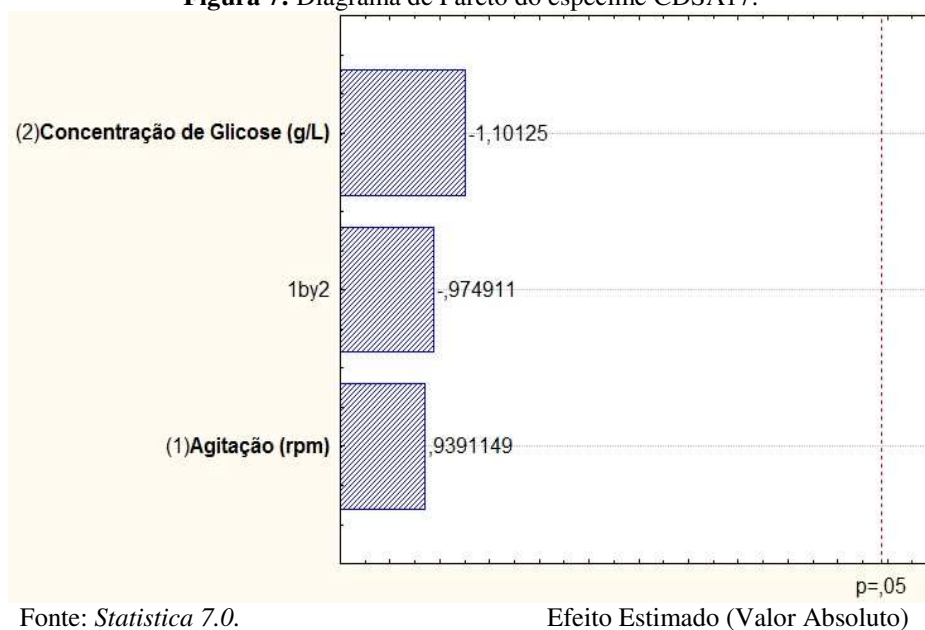
Ensaio	Variáveis		Resposta		
			CDSA17	CDSA54	CDSA71
	Agitação (rpm)	Concentração de Glicose (g/L)	Índice de Emulsificação (%)		
1	-	-	9,09	26,47	29,41
2	+	-	17,65	18,18	23,53
3	-	+	14,71	25,71	18,18
4	+	+	11,77	21,21	22,12
5	-	-	17,65	30,30	26,47
6	+	-	18,18	18,75	20,59
7	-	+	11,43	25,71	21,21
8	+	+	14,20	18,18	23,55

É possível observar na Tabela 11, que os espécimes testados apresentaram Índice de Emulsificação nas condições de cultivo expostas, porém o fungo CDSA17 obteve as menores respostas, com IE inferiores ao teste padrão (Tabela 6), redução até de 17% (Ensaio 1) e nos ensaios com maior concentração de substrato o IE tendeu a menores valores. Os espécimes CDSA54 e CDSA71 produziram os maiores Índices de Emulsificação nas condições de 100 rpm e concentração de glicose de 15 g/L (Ensaio 5), apresentando IE superior ao teste padrão.

Para análises dos resultados foi utilizado o software *Statistica 7.0*, fazendo uso da ferramenta Diagrama de Pareto, que permite indicar quais os parâmetros e interações têm influências significativas sobre a variável resposta considerada, assim como os valores dos efeitos de cada variável e os modelos estatísticos dos experimentos.

Para o CDSA17, observa-se por meio do Diagrama de Pareto (Figura 7), que dentro do limite de confiança de 95% nenhuma variável influenciou significativamente para produção de biossurfactantes pelo fungo filamentoso. Na Tabela 12, é possível observar os efeitos das variáveis na resposta e quais são os fatores significativos ($p < 0,05$). Nota-se que todos os fatores e a interação possuem $p > 0,05$, com o sinal negativo do efeito de concentração de glicose indicando que quando há uma diminuição para 15 g/L aumenta o IE em torno de 2,615%.

Figura 7: Diagrama de Pareto do espécime CDSA17.



A equação ajustada para síntese de biossurfactantes pelo fungo CDSA17 pode ser representada pela Equação 7:

$$Y_{17} = 14,335 + 1,115X_1 - 1,307X_2 - 1,157X_1X_2 \quad (7)$$

Em que Y_{17} representa o Índice de Emulsificação (%); X_1 a variável agitação (rpm) e X_2 a concentração de glicose no meio de cultura (g/L). Os valores negativos das variáveis X_2 e da interação X_1X_2 representam que os menores valores de concentração de glicose e da interação agitação e concentração de glicose promovem maiores Índice de Emulsificação. O coeficiente de determinação (R^2) obtido mostra que cerca de 43,22% do modelo estático se ajusta aos dados experimentais (Equação 7). Quanto mais próximo ao valor 1 melhor é o ajuste do modelo estatístico, deste modo é necessário realizar mais ensaios com esse fungo, a fim de elevar o coeficiente de determinação.

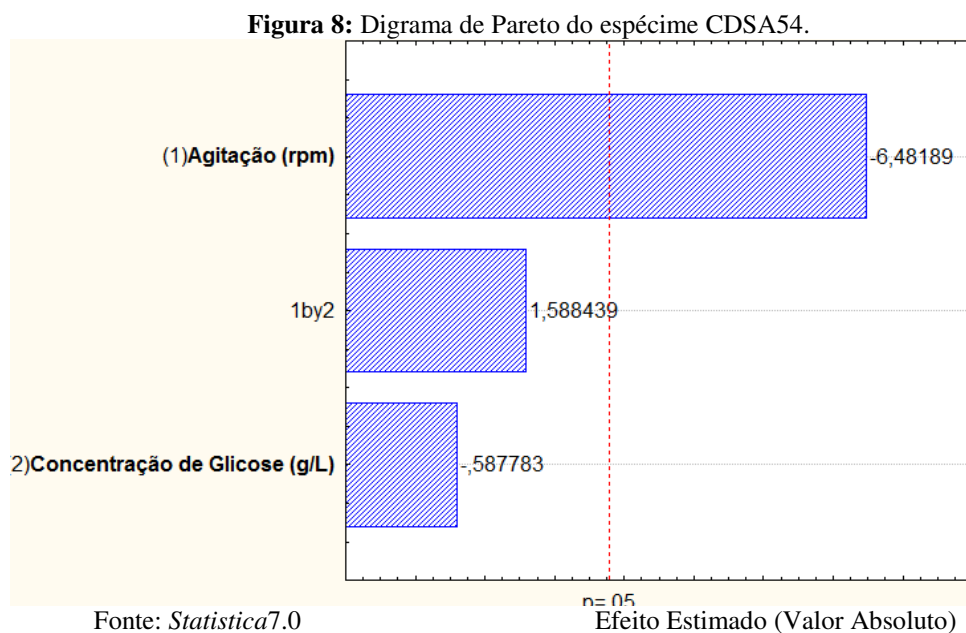
Tabela 12: Estimativas de efeitos das variáveis, obtidas por meio do planejamento fatorial 2^2 dos espécimes CDSA17, CDSA54 e CDSA109.

Variáveis	CDSA17		CDSA54		CDSA71	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Agitação (rpm)	2, 230	0,400	- 7, 9675	0,003*	-1, 370	0,363
Concentração de Glicose (g/L)	-2, 615	0,333	-0, 7225	-0,588	-3, 735	0,049*
Agitação (rpm)*Concentração de Glicose (g/L)	-2, 315	0,348	1, 9525	1,588	4, 510	0,028*

Legenda: * p significativo.

Na análise dos resultados para o fungo CDSA54, de acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 8), apenas a variável agitação, no limite de confiança de 95%, influenciou no IE, com o sinal negativo representando que quando a velocidade diminui aumenta o Índice de Emulsificação, podendo, então, a velocidade de agitação ser um parâmetro importante para otimização da produção desses biopolímeros pelo fungo CDSA54. Resultado semelhante foi obtido por Bezerra (2012), com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, em que a agitação de 100 rpm favoreceu para reduzir a TS, com a fonte de carbono não exercendo efeito significativo na síntese de biossurfactantes, assim como neste estudo.

De acordo com a Tabela 12, é possível observar que quando a agitação diminui de 200 rpm para 100 rpm influencia cerca de 8% no Índice de Emulsificação, o mesmo acontece para a concentração de glicose, quando diminui de 25 g/L para 15 g/L os valores de IE tendem a aumentar, exercendo influência cerca de 1% na resposta. Porém, apenas o fator agitação é considerado estatisticamente significativo com $p < 0,05$.

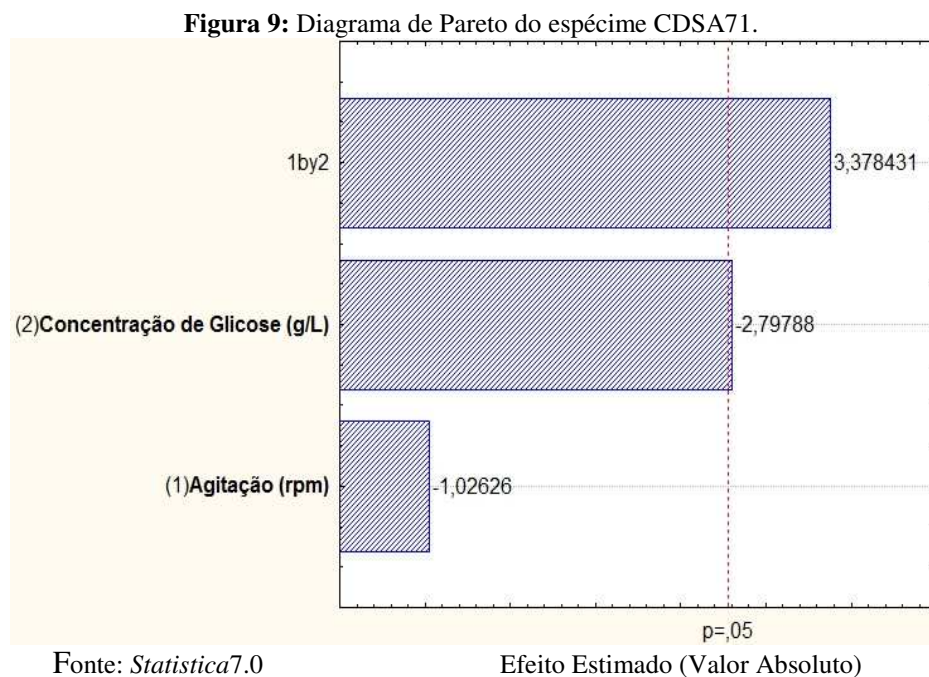


A equação ajustada para Índice de Emulsificação (Y_{54}) associada à produção de biossurfactantes pelo CDSA54, pode ser representada pela Equação 8:

$$Y_{54} = 23,064 - 3,984X_1 - 0,361X_2 + 0,976X_1X_2 \quad (8)$$

Em que Y_{54} representa o Índice de Emulsificação (%); X_1 a variável agitação (rpm) e X_2 a concentração de glicose no meio de cultura (g/L). O coeficiente de determinação (R^2) de 92% mostra que o modelo estatístico se ajusta aos dados experimentais (Equação 8). Este valor é considerado satisfatório, por ser próximo a 1.

De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 9), para o fungo CDSA71 duas variáveis foram significativas, à interação entre os dois fatores e a concentração de glicose, no nível de confiança de 95%. Na Tabela 12, é possível observar que a agitação exerceu influência de 1,37% para aumentar o IE quando tinha a velocidade reduzida, o mesmo comportamento foi observado para redução da concentração de glicose com efeito de 3,735% no IE, comportamento diferente para interação, os valores máximos de agitação (200 rpm) e concentração de glicose (25 g/L) exerceu efeito de 4,51% para elevar a resposta.



O modelo estatístico obtido para este experimento é representado na Equação 9. O coeficiente de determinação (R^2) de 83,54% também foi considerado satisfatório.

$$Y_{71} = 23,132 - 0,685X_1 - 1,867X_2 + 2,255X_1X_2 \quad (9)$$

É possível observar que os três fungos filamentosos estudados se comportaram diferentes frente às condições de cultivo expostas, não havendo uma tendência para uma variável ser significativa em todos os casos, porém apesar da concentração de substrato não ter sido significativa, seu efeito apresentou sinal negativo para todos os fungos filamentosos estudados, possivelmente indicando que uma maior concentração de glicose é desfavorável para valores maiores IE, resultado também encontrado por Bueno (2008), ao estudar bactérias produtoras de biossurfactantes concluiu que concentrações baixas de sacarose promovem uma melhor produção de biossurfactantes. Para os fungos CDSA54 e CDSA71 a agitação também apresentou efeito com sinal negativo, logo, uma velocidade de rotação de 100 rpm é

considerada melhor para síntese de biossurfactantes por esses microrganismos filamentosos, associada, neste caso, ao parâmetro IE. De acordo com Schmidell (2001), isto pode ser explicado devido o fato de que o aumento da velocidade de rotação pode provocar um efeito de cisalhamento na parede celular, diminuindo a produção de biossurfactante.

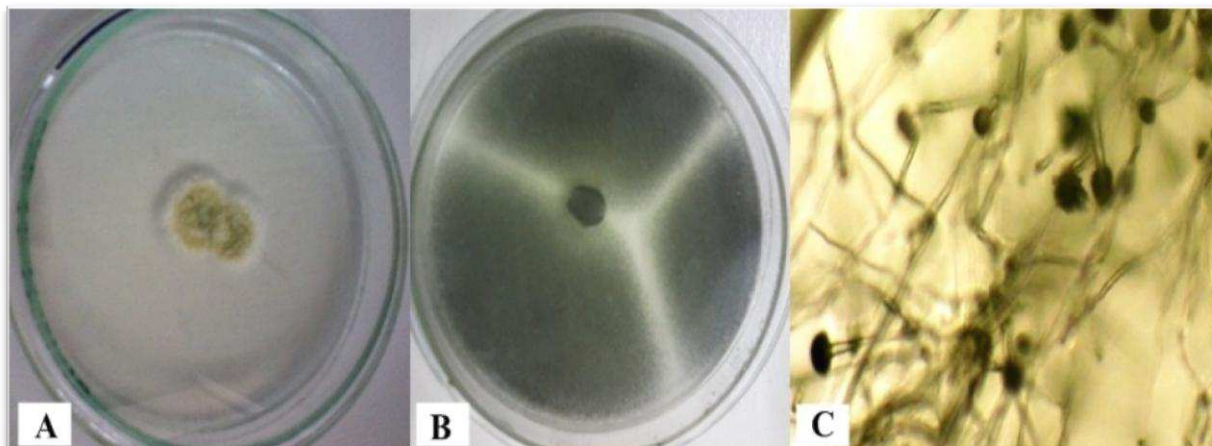
Deste modo, a identificação dos microrganismos CDSA17, CDSA54 e CDSA71 torna-se importante como uma alternativa para explicar os diferentes comportamentos nas condições de cultivo estudadas.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

A identificação das culturas de fungos produtores de biossurfactantes (CDSA17, CDSA71 e CDSA109) foi realizada utilizando a técnica de microcultivo, onde as lâminas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 40x, permitindo um estudo detalhado das diferentes estruturas fúngicas e a disposição destas ao longo das hifas. O fungo CDSA54 não apresentou crescimento nas lâminas, não sendo possível a identificação. As características macro e microscópicas, assim como as estruturas reprodutivas de cada cultura filamentosa isolada, foram comparadas com as descritas na literatura por Quadros (2008), Bisognin (2012) e Monteiro (2012).

Os fungos filamentosos CDSA17, CDSA71 e CDSA109 possuem características macro e microscópicas semelhantes as do gênero *Aspergillus*, com colônias filamentosas e micélio inicialmente branco, com coloração variando ao longo do crescimento, de acordo com a espécie. Segundo Quadros (2008) e Bisognin (2012), este gênero apresenta conídios globosos e ornamentados que se formam de forma radial na ponta da fiálide reta e solitária, em torno de uma vesícula (Figura 12). Os conidióforos se desenvolveram rapidamente em microcultivo, como pode ser observado na Figura 10.

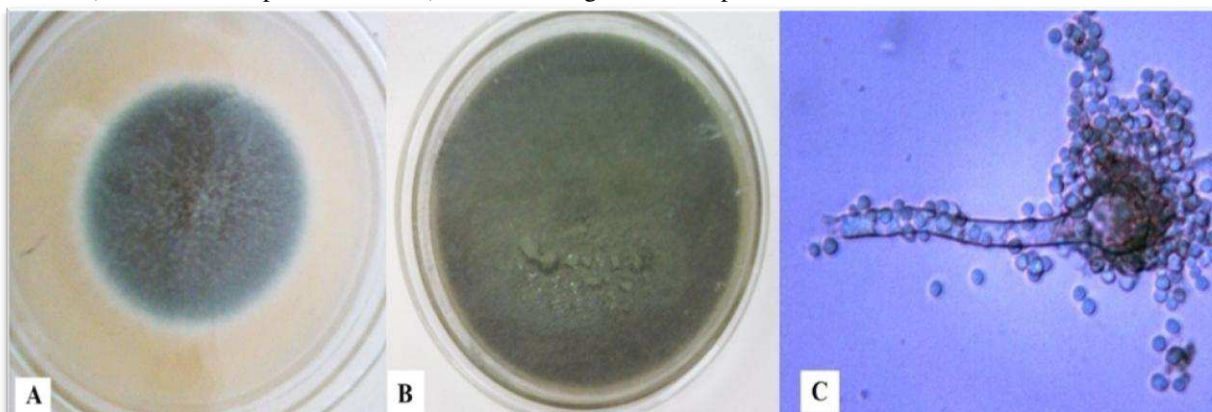
Figura 10: Fungo CDSA17 identificado como sendo do gênero *Aspergillus*. A) Crescimento fúngico após 24 horas. B) Crescimento após 96 horas. C) Estruturas fúngicas com aumento de 40x.



Fonte: Foto C por Jucilene Pereira.

Os fungos filamentosos CDSA17 e CDSA71 foram identificados como pertencentes ao gênero *Aspergillus*, apresentando características macroscópicas inicialmente de cor branca-amarelada passando para alaranjado e em seguida mantendo-se verde (Figura 10), com aspectos aveludados. As características microscópicas do fungo CDSA17 foram observadas a partir de 24 horas de cultivo, apresentando conidióforos que se desenvolveram rapidamente, de aparência liso e longo. As imagens macroscópicas do fungo CDSA71 foram obtidas após 48 e 96 horas de cultivo e a imagem microscópica após 96 horas, apresentando esporulação, como pode ser observado na Figura 11.

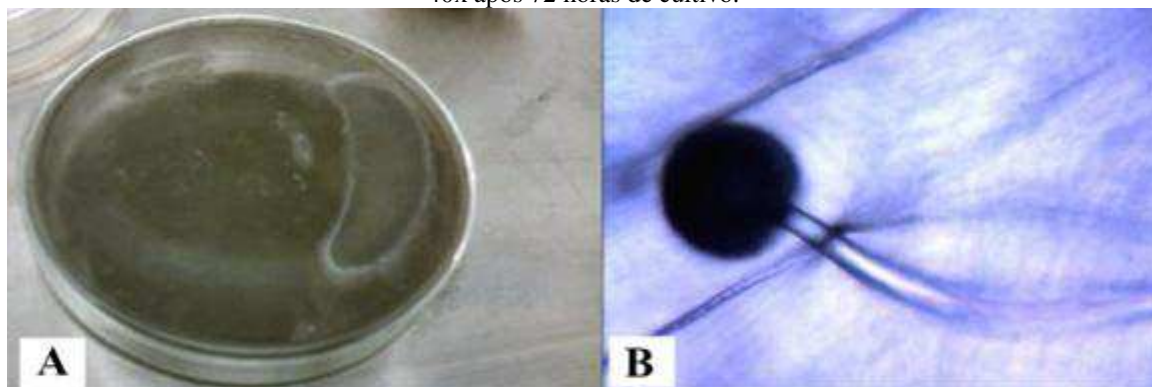
Figura 11: CDSA71 identificado como sendo do gênero *Aspergillus*. A) Imagem após 48 horas de cultivo; B) Crescimento após 96 horas. C) Estrutura fúngica obtida após 96 horas de cultivo.



Fonte: Foto A) Rhyanne Freitas; C) Leandro Costa.

O fungo CDSA109 também foi identificado como sendo do gênero *Aspergillus*, porém apresentando características macro e microscópicas diferentes dos outros fungos identificados. A coloração é de aparência acinzentada e a estrutura microscópica possui conidióforos com formato e tamanho diferentes dos demais.

Figura 12: A) CDSA109 em meio BDA incubado a 37°C por 96 horas; B) Fungo CDSA109 visualizado na lente 40x após 72 horas de cultivo.



Fonte: Foto B) Leandro Costa.

O gênero *Aspergillus* atualmente compreende mais de 260 espécies encontradas na natureza em solos e em plantas, com abundância nas regiões de climas tropicais e subtropicais (MONTEIRO, 2012). Como ser observado nas Figuras 11, 12 e 13 estas espécimes apresentam características semelhantes e algumas diferenças, podendo então ser de espécies diferentes. Deste modo, a técnica de microcultivo permitiu a identificação dos fungos filamentosos, porém novos estudos devem ser realizados para uma análise mais profunda, como técnicas moleculares.

Na literatura é reportado o potencial que algumas espécies de *Aspergillus* possuem em produzir biossurfactantes, como nos estudos realizados por Cerqueira (2007), em que o fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* mostrou habilidade de produção de biossurfactante nos diferentes meios sólidos, Pinto (2008) relatou a alta capacidade emulsificante do fungo *Aspergillus fumigatus* também em meio sólido. Os demais estudos relatados na literatura também foram desenvolvidos com o mesmo microrganismo, analisando parâmetros com capacidade emulsificante e TS.

6 CONCLUSÕES

- Dentre os espécimes avaliados, os denominados como CDSA17, CDSA50, CDSA54, CDSA71, CDSA74, CDSA103 e CDSA109 são capazes de produzir biossurfactantes sob as condições de cultivo testadas;
- Os biossurfactantes produzidos pelos espécimes CDSA17, CDSA54, CDSA71 e CDSA109 são estáveis em temperaturas de 3 e 60°C, em pH 5,0 e 7,0 e concentração salina de 10%, podendo ser aplicado em condições extremas;
- Os biossurfactantes produzidos pelos espécimes CDSA17, CDSA54, CDSA71 e CDSA109 são estáveis quanto à emulsão por 60 minutos à temperatura de 60°C;
- Existe uma correlação linear de 0,731 entre a biomassa do fungo com a produção de biossurfactante, sendo este produzido a partir de 72 horas de cultivo;
- Para produção de biossurfactante o espécime CDSA17 deve ser cultivado sob condições de 150 rpm e 20 g/L de glicose, para o CDSA54 e CDSA71 as melhores condições são de 100 rpm e 15g/L de glicose;
- Os espécimes CDSA17, CDSA71 e CDSA109 foram identificados como fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono.** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e Identificação dos Fungos de Importância Médica.** Módulo VII. p. 1- 24, 2004.

ARAÚJO, F. S. **Potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em seis sistemas de uso do solo, na região nordeste do semi-árido do Brasil.** 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2008.

ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 848- 858, 2013.

BANAT, I. M. *et.al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARBOSA, A. P. A.; GONDIM, A. L. N.; PAZ, M. C. F. Remoção do corante preto pirazol por *Pseudomonas aeruginosa*. In: **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, João Pessoa, 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, v. 28. n. 4, p 979-985, 2008.

BARROS, F.F.C. *et al.* Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BEDNARSKI, W. *et al.* Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource Techonology**, v. 95, n. 1, p. 15- 18, 2004.

BEZERRA, M. S. **Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029 – GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono.** 2012. 114 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BORGES, W. S. **Aproveitamento de efluente gorduroso gerado por abatedouro e frigorífico para produção de biossurfactante.** 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BISOGNIN, R. P. **Análise do potencial microbiano de uma biopilha nabiorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos.** 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012.

BRAGA, G. U. L.; DESTÉFANO, R. H. R.; MESSIAS, C. L. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 107-113, 1999.

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

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: Isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo.** 2008. 89 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2008.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia.** 2001. Disponível em: http://www.faecpr.edu.br/site/documentos/recursos_microbiologicos_biotecnologia.pdf
Acesso em: 20 fevereiro 2014.

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

CARLI, I. C. **Síntese de ésteres derivados de carboidratos com propriedades surfactantes utilizando lípases imobilizadas em suporte sólido.** 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

CARVALHO, T. V. **Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo.** 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CASAL, M. *et al.* **Métodos convencionais em microbiologia.** Manual de Laboratório. 2004. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2241/1/U1.pdf>>
Acesso em: 5 novembro 2013.

CERQUEIRA, V. S. **Produção de biossurfactante e lipase por *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido e avaliação da biorremediação em derrames de óleos e derivados.** 2007. 139 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

CIAPINA, E. M. P. **Produção de biossurfactante por *Rhodococcus erythropolis* em biorreator de bancada e avaliação do seu efeito na biodegradação de borra oleosa da indústria do petróleo.** 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

CIRIGLIANO, M .C; CARMAN, G.M. Isolation of a emulsifier from a *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48.p.747-750, 1984.

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

COOPER, D.G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n 1, p. 173-176, 1984.

COSTA, P. B. A. **Síntese e propriedades de surfactantes di-aniónicos interação com iões trivalentes**. 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2011.

DANTAS, M. D. A. *et al.* Bioprospecção de procariotos produtores de biossurfactantes em manguezais da bacia petrolífera potiguar. *In: 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira Para o Progresso da Ciência*, Natal, 2010.

DELLAGNEZZE, B.M. **Bioprospecção de genes envolvidos na síntese de biossurfactantes a partir da microbiota de reservatórios de petróleo**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

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

FRANCY, D.S. *et al.* Emulsification of hydrocarbons by surface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 237 – 246, 1991.

GARCIA, A. K. **Avaliação da atividade lipolítica de fungos filamentosos da costa brasileira**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GARIGLIO, M; A. *et al.* **Uso Sustentável e Conservação dos Recursos Florestais da Caatinga**. 368 f. Serviço Florestal Brasileiro. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2010.

GOOGLE MAPS. Disponível em:
<<https://www.google.com.br/maps/place/Centro+de+Desenvolvimento+Sustent%C3%A1vel+do+Semi%C3%A1rido/@-7.6643747,-36.9098565,312m/data=!3m1!1e3!4m2!3m1!1s0x7a8ea76f800927d:0x31aae076bdc68b2e>>
Acesso em: 10 de Junho de 2014.

GOUVEIA, E. R. *et al.* Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n 30, p. 39 – 45, 2003.

GRISI, T.C. S. L. **Diversidade de bactéria e Archaea do solo do Cariri paraibano e prospecção de celulasas e xilanasas em clones metagênicos e isolados bacterianos**. 2011. 213 f. Tese (Doutorado em Recursos Naturais)- Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAN, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. West Sussex, England, 2002. 544 p.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística– IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso: 04 de fevereiro de 2014.

KHOPADEA, A. *et al.* Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311-318, 2011.

KILL, L. H. P. Árvore do conhecimento bioma caatinga. **Agência Embrapa de Informação Tecnológica**, 2013. Disponível: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/cont000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html> Acesso em: 09 janeiro de 2014.

KREPSKY, N. **Produção de biossurfactantes por consórcios bacterianos hidrocarbonoclasticos**. 2004. 139 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Marinha) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

LIMA, C. J. B. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual**. 2007. 168 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

MAIA, L. C. *et al.* Ministério do Meio Ambiente. **Diversidade Biológica e Conservação da Floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco**. Brasília, 2005. 106 p.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2006.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em solos preservados do cerrado**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Lavras, 2012.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais. Avaliação de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biossurfactantes por *Bacillus*. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, p 63- 67, 2003.

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

OLIVEIRA, D. W. F. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

ORTEGA-MORALES B.O. *et al.* Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 254-64, 2007.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos.** 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PAZ, M. C. F. *et al.* Influência de cloreto de sódio e de cobre na produção de biomassa e biossurfactante por uma nova amostra de *Geobacillus tearothermophilus* UCP 986. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, n. 1, p. 56-64, 2006.

PEIXOTO, R. M. **Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes.** 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PÉREZ-ARMENDÁRIZ, B. *et al.* Emulsification of Hydrocarbons Using Biosurfactant Producing Strains Isolated from Contaminated Soil in Puebla, Mexico. Chapter 2. **Biodegradation – Engineering and Technology**: 2013, p. 25- 45.

PINTO, M. H. **Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais.** 2008. 129 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2104-2108, 2009.

PIRRÔLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

QUADROS, M. E. **Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: parâmetros físico-químicos e microbiológicos.** 2008. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

RAHMAN, P.K.S.M; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants. **Biotechnology**, Middlesbrough, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

REGO JUNIOR, N. O. *et al.* Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

ROCHA, M. V. P. **Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional.** 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

RODRIGUES, C. **Seleção de fungos produtores de lipases a partir de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental.** 2011.195 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melão e manipueira.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

RUFINO, R. D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*.** 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biologia dos Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SACCARO JUNIOR, N. L. **Desafios da bioprospecção no Brasil.** Texto para Discussão 1569. Brasília, 2011.

SANTANA, C. P.; SILVA, F. L. H.; ALMEIDA, M. M. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando como substrato o fruto da palma forrageira. *In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, Minas Gerais, 2009.

SANTOS, D. K. F. **Utilização de gordura animal e resíduo agroindustrial como substrato de baixo custo para produção de biossurfactante com potencial de aplicação na área ambiental.** 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013.

SANTOS, L. V. **Emulsificantes – modo de ação e utilização nos alimentos.** 2008. 39 f. Trabalho acadêmico (Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

SANTOS, S. C. **Prospecção de Linhagens Bacterianas Produtoras de Biossurfactantes com Potencial Biotecnológico no Semi-Árido Baiano.** 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2008.

SARUBBO, L.A.; MARCAL, M.C., NEVES, M.L.C. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 95, p. 59-67, 2001.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial.** Volume 2: Engenharia Bioquímica. Editora Edgard Blucher Ltda. Cap 6. Cinética de processos fermentativos, p. 93 – 122, 2001.

SILVA, J. M. C. *et al.* **Biodiversidade da CAATINGA: áreas e ações prioritárias para a conservação.** Ministério do Meio Ambiente. Universidade Federal de Pernambuco, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da UFPE. EMBRAPA Semi-Árido. Brasília, 2003, p. 7- 44.

SILVA, M. D. S. **Produção de biossurfactantes por leveduras isoladas do pólen apícola de *Melopona sminigra merrilae* da região do baixo Amazonas –AM.** 2013 67 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2013.

SILVA, N. A.; LINS, C. E. L. Fungos filamentosos em solo de caatinga: diversidade e atividade enzimática. *In: XVI Congresso de iniciação científica UFPE*, Pernambuco, 2008.

SILVA, R. C. F. S. **Resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo.** 2012. 149 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2012.

SIMÕES, M. L. G. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga.** 2006. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

SOBRINHO, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica*.** 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SOUSA, F. Q. *et al.* Crescimento e respostas fisiológicas de espécies arbóreas em solo salinizado tratado com corretivos. **Rev. bras. eng. agríc. Ambient**, Campina Grande, v.16, n.2, 2012.

SOUSA, M. **Bioconversão do glicerol para produção de biossurfactantes: aplicação no preparo de emulsões.** 2011. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SOUTO, P. C. *et al.* Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semi-árido da Paraíba. **Revista Brasileira Ciência Solo**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 151-160, 2008.

TRIGUEIRO, M. G. S. **Bioprospeção: uma nova fronteira da sociedade.** Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <xa.yimg.com/kq/groups/23196723/.../name/artigo+Michelangelo.pdf> Acesso em: 8 março 2014.