

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS VEGETAIS PARA A
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR FUNGOS
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

MICHELE ALVES SANCHES

MANAUS

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

MICHELE ALVES SANCHES

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS VEGETAIS PARA A
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR FUNGOS
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS

2016

MICHELE ALVES SANCHES

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS VEGETAIS PARA A
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR FUNGOS
ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque
Universidade do Estado do Amazonas-UEA

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S211u Sanches, Michele Alves
Utilização de resíduos vegetais para a produção de
biossurfactantes por fungos isolados de amostras de solo da região
Amazônica / Michele Alves Sanches. 2016
65 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Universidade Federal do
Amazonas.

1. Emulsificantes. 2. Fungos filamentosos. 3. Cascas. 4. Resíduos
vegetais. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

*Dedico este trabalho com todo amor
a minha mãe Sr^a Luíza Alves Sanches
e aos meus irmãos Wellington,
William e Mickon e aos meus avós
Maria Paulina Alves Sanches e
Nestor Pereira Sanches (in
memorian).*

AGRADECIMENTOS

Louvo a Deus por essas vidas...

Drº João Vicente Braga de Souza, que merecidamente é chamado de orientador, agradeço por cada ensinamento, conselhos, pela paciência e por todas as orientações. Admiro seu altruísmo, é fascinante!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo concessão da bolsa, subsídio a divulgação deste trabalho e pela estrutura para desenvolvimento do presente trabalho, respectivamente.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade e por todo suporte.

As examinadoras deste trabalho: Drª Karen Regina Carim da Costa Magalhães, Drª Patrícia Melchionna Albuquerque e Drª Ormezinda Celeste Cristo Fernandes por toda colaboração e críticas.

Aos colegas de turma, em especial a Suellen, Jaqueline, Ledjane e Jake&Túlio.

Como sou feliz em ter os “micomaníacos” em minha vida: Amanda Vasconcelos, Ana Cortez, Ana Karla, Alcina Farias, Alita Moura, Beatriz Pereira, Deisiane Passos, Diego Fernando, Diego Rayan, Eliana Santos, Elusiane Santos, Érica Simplício, Flávia Fernandes, Izabelle Noguchi, João Neto, Joyce Matsuda, Kátia Cruz, Luana Rocha, Luciana Aires, Luciane Fontão, Márcia Regina, Ralyvan Araújo, Rildo Lima, Roberto Moreira, Sandryelle, Silviane Pinheiro, Maria do Socorro, Tatiana Freitas, Thaís Karoline, Vitória Elizabeth e Walter Segundo.

À um grupo de amizade especial: Denise, Gaby, Hayssa, Hellen, Jaqueline, Klissiane, Lane, Mirna, Mylena, Silviane e Priscila.

À minha família, mãe Luiza, irmãos Wellington, Mickon e William, cunhada Maria José e amigas Cibele Wendolyne e Jéssica Varela.

...meu coração se enche de gratidão, porque nunca estive sozinha. Obrigada!

RESUMO

O homem tem a necessidade de misturar a água com substâncias insolúveis em suas atividades diárias e industriais. Os surfactantes, derivados de petróleo, têm sido utilizados com essa finalidade, no entanto, esses apresentam problemas quanto a sua toxicidade e biodegradabilidade. Os biossurfactantes de origem microbiana são uma alternativa para essa situação, porém, o seu custo de produção é alto, e em parte, devido aos substratos que são utilizados nos bioprocessos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a utilização de resíduos como substrato para produção de biossurfactantes por fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região Amazônica. Foram realizados bioprocessos com cinco isolados fúngicos sabidamente produtores de biossurfactantes, com a finalidade de investigar qual deles produziria em menor tempo. Em seguida, foi avaliada a possibilidade de utilização de resíduos (cascas de tucumã, pupunha, banana, cupuaçu e também o óleo pós-fritura) como substrato para o bioprocessos com o isolado selecionado. Os fatores que influenciam na produção do biossurfactante foram avaliados por planejamento fatorial. O fungo *Fusarium oxysporum* 87-2LIVI produziu altos níveis de biossurfactantes em três dias de bioprocessos. E também se destacou devido a alta produção de biossurfactante utilizando a casca de pupunha como substrato. O pH e extrato de levedura foram os fatores mais importantes relacionados a produção de biossurfactante por esse isolado. Desta forma, o presente trabalho demonstrou que isolados da espécie *F. oxysporum*, isolados de solo Amazônico, são potenciais produtores de surfactantes e que resíduos Amazônicos, em especial casca de pupunha, possui potencial para ser utilizado como substrato.

Palavras chave: Emulsificantes, Fungos filamentosos, Cascas, Resíduos vegetais

ABSTRACT

Human being has the need to mix water with insoluble substances in their daily and industrial activities. Surfactants derived from petroleum have been used for this purpose, however, they have problems such as their toxicity and biodegradability. Biosurfactants from microbial origin are an alternative to this, on the other hand, its production cost is high due to the substrates that are used in the bioprocesses. In this context, the aim of this study was to investigate the use of wastes as a substrate for the production of biosurfactants by filamentous fungi isolated from soil samples in Amazon region. Bioprocess were conducted with five known fungi isolates producers of biosurfactants in order to investigate which of them would produce in a shorter time. Then, we evaluated the possibility using wastes of peel from tucumã, peach palm, banana, cupuacu and also the post-fry oil as substrate for the bioprocess with the selected isolated. Factors that influence the production of biosurfactant were evaluated by factorial design. As a result, the fungus *Fusarium oxysporum* 87-2LIVI produced high levels of biosurfactants in three days of bioprocess. Moreover, this specie also showed highlight due to high biosurfactant production using peach palm peel as substract. The pH and yeast extract were the most important factors related to production of biosurfactant by this isolated. Thus, the present study showed isolated of *F. oxysporum* specie from Amazonian soil is potential producer of surfactants and also Amazon waste, particularly, peel of peach palm has the potential to be used as a bioprocess substrate for production of biosurfactant.

Key Words: Emulsifiers, Filamentous fungi, Peel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas de biossurfactantes tipo A – Glicolípídeo; B – Lipopeptídeo; C - Ácido graxo e D – Polimérico.....	17
Figura 2- Cascas dos frutos comuns da região Amazônica. A – tucumã; B – pupunha; C - cupuaçu e D - banana pacovan.....	24
Figura 3- Fluxograma dos procedimentos propostos pelo presente trabalho.....	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fungos filamentosos produtores de biossurfactantes com os tipos e local de isolamento.....	21
Quadro 2 - Resíduos utilizados como substrato para produção de biossurfactante por fungos filamentosos.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Níveis utilizados para concentração do substrato, fonte de nitrogênio, indutor, pH e agitação no planejamento experimental 2^5	32
Tabela 2 - Níveis utilizados para os fatores resíduo selecionado e extrato de levedura no planejamento experimental 2^2 com adição dos pontos axiais.....	33
Tabela 3 - Índice de emulsificação (E24%) do biossurfactante produzido pelos fungos filamentosos utilizando como substrato cinco resíduos e na presença somente do extrato de levedura. Resultado de média e de desvio padrão.....	43
Tabela 4 - Matriz com os números de experimento do planejamento fatorial 2^5 para produção de biossurfactante por <i>F. oxysporum</i> , sendo os fatores analisados: resíduo, extrato de levedura, pH, agitação e indutor. A variável de resposta deste experimento foi o índice de emulsificação E24%.....	44
Tabela 5 - Efeitos dos fatores sobre a produção de biossurfactante e o desvio padrão calculado no ponto central.....	45
Tabela 6 - Análise estatística do planejamento fatorial 2^5 pela ANOVA em um intervalo de 95% de confiança.....	46
Tabela 7 - Matriz com os números de experimento para o planejamento 2^2 para produção de biossurfactante por <i>F. oxysporum</i> , sendo os fatores analisados: casca de pupunha e extrato de levedura. A variável de resposta deste experimento foi o índice de emulsificação E24%.....	47
Tabela 8 - Efeitos dos fatores sobre a produção de biossurfactante e o desvio padrão calculados no ponto central.....	47
Tabela 9 - Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 com adição dos pontos centrais pela ANOVA em um intervalo de 95% de confiança.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAr	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
ITS	Espaço interno transcrito
NCBI	National Center for Biotechnology Information website
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
pb	Pares de base
RPM	Rotação por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Surfactantes.....	15
2.2	Biossurfactantes.....	15
	2.2.1 Classificação.....	15
2.3	Fungos produtores de biossurfactantes.....	20
2.4	Utilização de resíduos vegetais para a produção de biossurfactante.....	22
2.5	Influência nas condições de cultivo para a produção de biossurfactantes.....	25
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Geral.....	27
3.2	Específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Micro-organismos.....	29
4.2	Resíduos vegetais.....	29
4.3	Procedimentos.....	29
	4.3.1 Identificação das espécies produtoras de biossurfactantes.....	29
	4.3.2 Seleção do isolado mais produtivo.....	31
	4.3.3 Seleção dos resíduos vegetais.....	31
	4.3.4 Influência das condições de cultivo na produção de biossurfactante.....	32
4.4	Ensaio analítico.....	33
4.5	Análises estatísticas.....	34
5	RESULTADOS	35
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	APÊNDICE A.....	61
	APÊNDICE B.....	62
	APÊNDICE C.....	63
	APÊNDICE D.....	64

1 INTRODUÇÃO

O homem, no seu dia-a-dia, tem a necessidade de misturar a água com substâncias insolúveis, seja para a sua higiene (lavagens mediadas por detergentes), para o preparo de alimentos (sorvetes, cremes) e em diversos processos industriais. Os surfactantes sintéticos, derivados de petróleo, têm sido as substâncias convencionalmente usadas para formação dessas emulsões. Nos últimos anos, a literatura apresentou evidências sobre a toxicidade e baixa degradabilidade dos surfactantes sintéticos e no presente tem ocorrido uma busca por biosurfactantes, ou seja, surfactantes produzidos por micro-organismos, vegetais ou animais (BANAT *et al.*, 2014; NITSCHKE; COSTA, 2007; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

As indústrias que mais utilizam surfactantes são as de petróleo, produtos de limpeza, higiene corporal e cosmética (SHOEB *et al.*, 2013). Essas possuem interesse em substituir seus surfactantes convencionais por substâncias menos irritantes, menos tóxicas e mais biodegradáveis (LÉMERY *et al.*, 2015; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Além dessa demanda, a indústria também tem procurado surfactantes que apresentem atividades biológicas adicionais como antioxidante e antimicrobiana (NOGUEIRA *et al.*, 2011; ULLAH *et al.*, 2015).

Nesse sentido, os biosurfactantes apresentam-se como potencial alternativa para substituição dos surfactantes. Essas substâncias são metabólitos com propriedades tensoativa e emulsificante, produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, possuem grupamentos químicos diversos relacionados à fisiologia e função microbiana (HOMMEL, 1990). No entanto, o custo do bioprocessamento para produção dos biosurfactantes tem se apresentado como uma limitação importante, sendo que, trabalhos voltados a reduzir os custos dos substratos convencionais pelo uso de resíduos ou substratos mais baratos são importantes para produção de biosurfactantes em nível industrial (SILVA *et al.*, 2014; WAGHMODE *et*

al., 2014). No ano de 2014 Sena investigou a existência de fungos filamentosos produtores de biossurfactantes em amostras de solo da região Amazônica e concluiu que os fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* eram bons produtores dessas substâncias. A continuidade desse trabalho passa pela caracterização química desses biossurfactantes e pela tentativa da produção desses utilizando resíduos/substratos não onerosos, de forma a obter maior viabilidade econômica na produção desses surfactantes.

Alguns resíduos da região amazônica, devido a sua composição rica em carboidratos e/ou lipídeos podem ser investigados como substratos de bioprocessos entre eles: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), casca da pupunha (*Bactris gasipaes*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), casca de banana pacovã (*Musa* sp.) e óleo de cozinha. O potencial uso desses resíduos como substratos poderá reduzir os custos de produção de biossurfactantes, bem como, agregar valor a resíduos que atualmente apresentam-se como um desafio ambiental e de gerenciamento público.

A necessidade de produzir biossurfactantes e também de investigar resíduos que possam ser utilizados como substratos para essa produção sustentaram o presente estudo para produção de biossurfactante por fungos utilizando resíduos vegetais como substrato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Surfactantes

Os surfactantes são estruturas moleculares que possuem duas regiões distintas, sendo uma com afinidade por água (hidrofílica) e outra não solúvel em água, denominada de região hidrofóbica, sendo esta solúvel em solventes orgânicos e com afinidade por substâncias apolares (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Estes agem reduzindo a tensão superficial e na formação de micelas (OLIVEIRA; MEI, 2009).

Tradicionalmente, os surfactantes são produzidos por reações químicas orgânicas de matérias-primas derivadas do petróleo (VAZ *et al.* 2012). Eles são classificados de acordo com a cabeça hidrofílica, como: aniônico, catiônico, não-aniônico ou anfotéricos. Os mais utilizados são o lauril sulfato de sódio (dodecil sulfato de sódio) e lauril sulfato de amônio nos setores de limpeza e cosméticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

Porém em razão da citotoxicidade (LÉMERY *et al.*, 2015), baixa biodegradabilidade (BRYCKI; WALIGÓRSKA, 2014) aumento da consciência ambiental e a ênfase em uma sociedade sustentável, os surfactantes naturais produzidos pelas células vivas recebem mais atenção, em comparação com os tensoativos químicos sintéticos (MUKHERJEE; DAS, 2010).

2.2 Biosurfactantes

Os biosurfactantes são metabólitos produzidos de uma unidade viva (bactérias, fungos, plantas, animais e o ser humano) que possuem as propriedades surfactantes

(BOGNOLO, 1999). Eles são uma classe de substâncias promissora e interessante, porque são baseados em recursos renováveis, sustentáveis e biodegradáveis (HENKEL *et al.* 2012).

Inicialmente, os estudos foram direcionados para biorremediação, porém ainda há desafios para entender a interação do biossurfactante, micro-organismo e poluente (LAWNICZAK; MARECIK, 2013). No estudo de Marti *et al.* (2014), foi realizada a produção e caracterização dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos, eles se tornam atraentes quando comparado com os surfactantes sintéticos, pois apresentam melhor atividade interfacial na recuperação de petróleo.

Ainda ganham destaque nas aplicações biomédicas e terapêuticas que ainda precisam ser exploradas (RODRIGUES *et al.*, 2006). As aplicações são extensas de acordo com as diversas classificações estruturais dos biossurfactantes, como a atividade antitumoral de amplo espectro, isso ocorre em virtude da capacidade de interação com membranas celulares (GUDIÑA *et al.*, 2013) e atividades antimicrobiana e bacteriostática (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013).

2.2.1 Classificação

Ao contrário de surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados principalmente pela sua composição química e sua origem microbiana (DESAI; BANAT, 1997). As principais classes incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos/lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos (baixo peso molecular) e surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (alto peso molecular) (ROSENBERG E RON 1999; NITSCHKE; PASTORE, 2002) (Figura 1).

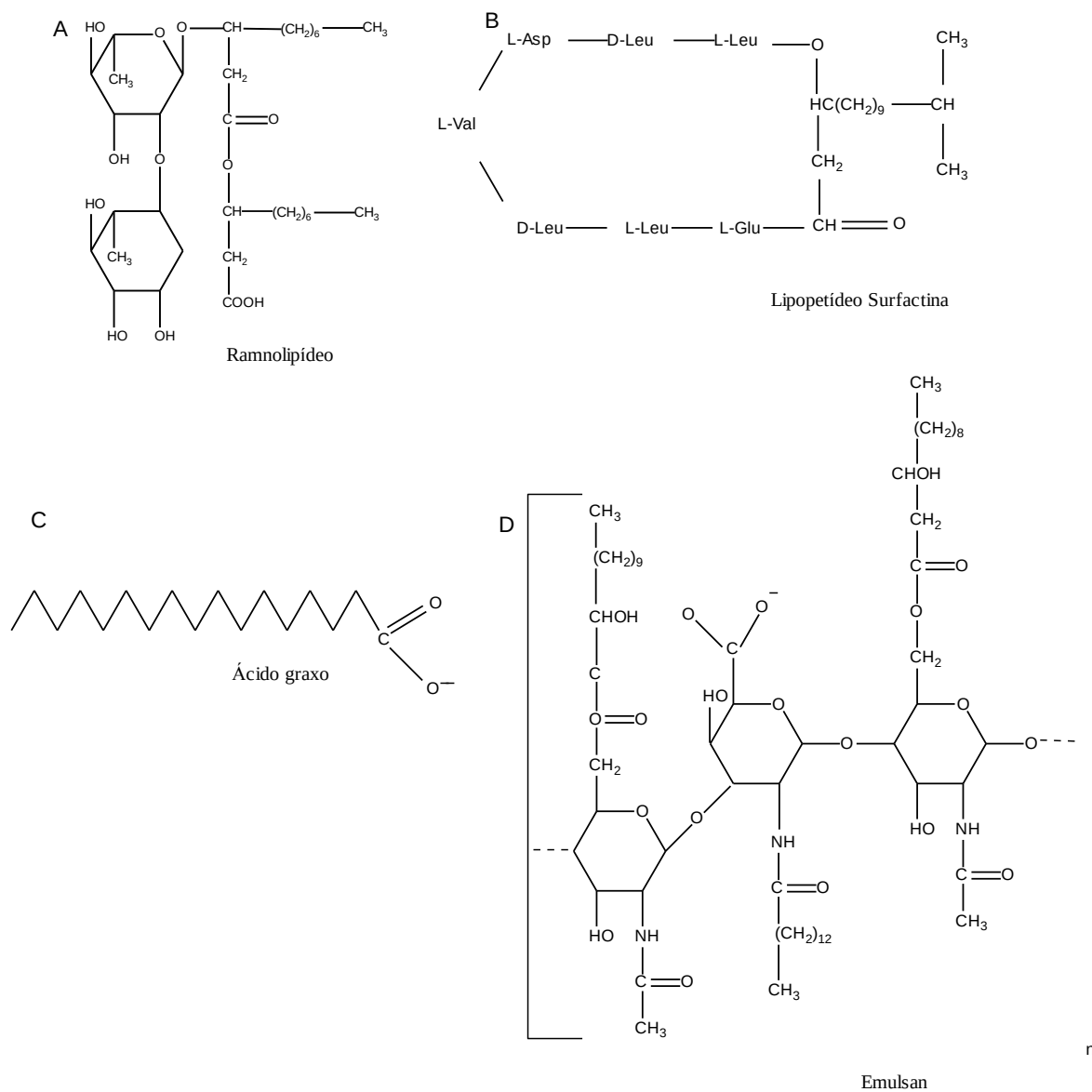


Figura 1 – Estruturas químicas de biosurfactantes tipo A – Glicolípideo; B – Lipopeptídeo; C - Ácido graxo e D – Polimérico.

*Estruturas desenhadas com o auxílio do programa Cetramax ChemicPen

Os glicolípídeos são os biosurfactantes mais conhecidos, pois são encontrados nas membranas de bactérias, fungos e plantas. O grupo é composto por soforolípídeos, ramnolípídeos e trealolípídeos.

Os soforolípídeos foram descritos no início dos anos 1960 por Gorin e colaboradores quando observaram a produção desse composto pela levedura *Torulopsis magnoliae* (GORIN;

SPENCER; TULLOCH, 1961). Eles são, provavelmente, um dos mais promissores biossurfactantes, pois são produzidos por cepas de leveduras não patogênicas, essa classe tem baixa produção de emulsão, no entanto possuem propriedades de redução da tensão superficial mesmo em temperaturas elevadas e alta concentração de sal (BOGAERT; ZHANG, 2011).

Os ramnolipídeos da classe dos glicolipídeos, são compostos que possuem na sua estrutura ramnose ligada em β – hidroxidecanoico (DESAI; BANAT, 1997). Essa classe é produzida pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, porém já existe uma busca para se ter alternativas na produção dos ramnolipídeos, em razão da cepa produtora ser patogênica (HENKEL *et al.* 2012).

O terceiro glicolipídeo é denominado de trealolipídeo, que é produzido por Actinobactérias como *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Tsukamurella* e *Rhodococcus*, porém o uso fica limitado porque essas bactérias estão relacionadas com a patogenicidade e alta toxicidade (KUYUKINA *et al.* 2014). Assim, os estudos para descobertas de novas cepas prosseguem. White *et al.* (2013) identificaram uma cepa marinha de *Rhodococcus* que produz especificamente o trealolipídeo na presença de substratos de petróleo e hidrocarbonetos imiscíveis, os autores são perspectivos em sugerir uma melhor abordagem do estudo para aumentar a produção e melhorá-la, com o intuito de facilitar o processo e o aceite comercial.

As bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* são as que geralmente produzem os lipopeptídeos, essa classe apresenta a capacidade de recuperar petróleo (VARADAVENKATESAN; MURTY, 2013) e também possui propriedades de interesse farmacêutico, como atividade antiviral (DONIO *et al.*, 2013).

Algumas bactérias e leveduras produzem os ácidos graxos, fosfolipídeos e lipídeos durante o crescimento em *n*-alcanos (DESAI; BANAT, 1997). A principal bactéria produtora

dessa classe pertence ao gênero *Bacillus*, os ácidos graxos ramificados constituem 60% dos ácidos graxos totais (KANEDA, 1967). Algumas espécies como *B. mojavensis* e *B. subtilis* produzem lipopeptídeos que quando associados com ácidos graxos na sua composição melhoram a atividade biotensoativa (YOUSSEF; DUNCAN, 2005).

Os biossurfactantes poliméricos descritos são aqueles que possuem diversos grupos químicos na sua composição, como o liposan produzido pela *Candida lipolytica* que é composto de aproximadamente 83% de carboidratos e 17% de proteína. Por meio das digestões ácida e enzimática revelou-se que a porção de carboidrato é um heteropolissacarídeo que consiste em glicose, galactose, galactosamina, e ácido galacturônico (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985).

Algumas bactérias apresentam na sua membrana a capacidade de degradarem hidrocarbonetos, isso ocorre mediante a produção de vesículas que fazem a captação para a célula, sendo por si só classificadas como biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O *Acinetobacter* produz vesículas que se ligam ao hexano na forma de microemulsão, sendo caracterizada como uma partícula rica em lipopolissacarídeo e fosfolipídeo (KAPPELI; FINNERTY, 1979).

Os biossurfactantes apresentam diversidade na sua classificação, mas segundo Shoeb *et al.* (2013), há também espaço para a busca de compostos ainda mais novos para ampliar o espectro de propriedades e aplicações específicas dos biossurfactantes. Até o presente momento, duas classes de biossurfactantes são atualmente consideradas de relevância industrial e econômica: glicolipídeos e lipopeptídeos, ambos os biossurfactantes são de baixo peso molecular (GEYS *et al.*, 2014).

Bodour *et al.* (2004) identificaram uma nova classe de biossurfactante, a qual foi denominada de flavolipídeo, produzido por uma cepa *Flavobacteria*, segundo os autores a classe tem potencial para a utilização nas áreas biotecnológica e industrial. Gudiña *et al.*

(2015) caracterizaram um novo bioemulsificante oligosacarídeo-lipídico de baixo peso molecular produzido por uma cepa de *Paenibacillus*, ou seja os compostos com propriedades tensoativas e emulsificantes produzidos por micro-organismos estão atraindo um interesse acentuado por suas potenciais vantagens em comparações com os sintéticos.

2.3 Fungos produtores de biosurfactantes

Os fungos produzem diversos compostos de baixa massa molecular durante o bioprocesso, denominados de metabólitos secundários. Os fungos filamentosos especificamente têm sido conhecidos em razão da produção de uma enorme variedade destes compostos, sendo que a produção ocorre na fase estacionária (RON; ROSENBERG, 2001). Os biosurfactantes na sua maioria são produzidos por bactérias, porém nos últimos anos, estudos foram realizados observando os fungos como potenciais produtores de biosurfactantes (Quadro 1). Os fungos filamentosos são promissores em razão da capacidade metabólica para geração de diversos bioprodutos e o uso de subtratos para seu cultivo (HAWKSWORTH, 1985). Eles produzem diversos metabólitos que possuem atividade antimicrobiana, enzimática, pigmentos e surfactantes que são de interesse industrial.

Fungo	Tipo de Biossurfactante	Origem	Referência
<i>Aspergillus flavus</i>	-	Solo contaminado com óleo diesel	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2014)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	Solo	(CASTIGLIONI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Glicolípídeo	Solo	(KANNAHI; SHERLEY, 2012)
<i>Aspergillus ustus</i> MSF3	Glicoproteína	Esponja marinha <i>Fasciospongia cavernosa</i>	(KIRAN <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	L9	Planta <i>Lilium lancifolium</i>	(KIM; PARK, 2014)
<i>Cladosporium resinae</i>	Cladosan	Combustível de avião	(MURIEL <i>et al.</i> , 1996)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Biossurfactante polimérico	Solo da Caatinga	(SILVA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Curvularia lunata</i> IM 2901	Biossurfactante polimérico	Coleção	(PARASZKIEWICZ; KANWAL, 2002)
<i>Exophiala dermatitidis</i> SK80	Monoglicerídeos	Solo	(CHIEWPATTANAKUL <i>et al.</i> , 2010)
<i>Fusarium</i> SP BS-8	Lipopeptídeo	Solo	(QAZI <i>et al.</i> , 2014)
<i>Mucor circinelloides</i> UCP69	-	Coleção	(ACIOLY <i>et al.</i> , 2012)
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNP5	Lipopeptídeo	Solo	(GAUTAM <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium citrinum</i>	Glicolípídeo	-	(CAMARGO-DE-MORAIS <i>et al.</i> , 2003)
<i>Penicillium</i> sp	-	Solo	(LUNA-VELASCO <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pleorotus djamor</i>	-	-	(VELIOGLU; OZTURK UREK, 2015)
<i>Pleorotus ostreatus</i>	-	-	(VELIOGLU; UREK, 2015)
<i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 0402	-	Coleção	(SILVA <i>et al.</i> , 2012)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Lipoproteína	Solo	(MATHUR <i>et al.</i> , 2010)
<i>Trichoderma</i> sp.	-	Efluente	(COLLA <i>et al.</i> , 2012)

Quadro 1 – Fungos filamentosos produtores de biossurfactantes com os tipos e local de isolamento

2.4 Utilização de resíduos vegetais para a produção de biossurfactante

O valor comercial do biossurfactante está associado ao seu custo de produção, e por isso estratégias têm sido investigadas com a finalidade de torná-lo mais competitivo frente aos surfactantes convencionais. O uso de substratos de baixo custo nos bioprocessos pode reduzir os custos das matérias-primas inicialmente envolvidas no processo (MAKKAR *et al.* 2011; SAHARAN *et al.* 2012).

Com o aumento da produção agrícola-industrial nos últimos anos, houve consequentemente o aumento dos resíduos provenientes destes, como óleo de petróleo, farelo de arroz, trigo, feijão, soja, café, resíduos de coco, bagaços de cana, entre outros (WAGHMODE *et al.* 2014).

Conforme estudo de Sobrinho *et al.* (2008), os resíduos podem não somente fornecer as fontes de carbono e nitrogênio, mas também elementos minerais para a produção de biossurfactante, visto que a suplementação com fontes de carbono nem sempre será necessária. Castiglioni *et al.* (2009) demonstraram um aumento significativo na produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* sem a suplementação das fontes de carbono obtidas de óleo de soja e diesel, portanto sendo uma alternativa prática e econômica na síntese da substância. Por outro lado, a bactéria *Halobacteriaceae archaeon* produz biossurfactante utilizando a casca de banana como a única fonte de carbono (CHOOKLIN *et al.*, 2014). Assim, a seleção dos resíduos deve suprir as condições necessárias para o crescimento do micro-organismo a ser estudado.

No Brasil estudos foram realizados utilizando resíduos vegetais como substrato. A casca de farelo de arroz e milhocina são resíduos utilizados em bioprocessos para obtenção de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos (SILVA *et al.*, 2014; ACIOLY *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; CASTIGLIONI *et al.*, 2009), outro resíduo estudado é o óleo de

soja pós-fritura. No Quadro 2 estão descritos os resíduos utilizados como substrato para produção de biossurfactante por fungos filamentosos.

Fungo	Tipos de resíduos	Referência
<i>Aspergillus flavus</i>	Farelo de trigo/ 4% de óleo de soja	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2014)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Casca de farelo de arroz suplementado com óleo de soja e óleo diesel	(CASTIGLIONI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	2% de óleo em bruto, óleo de oliva, óleo de amendoim e óleo de coco	(KANNAHI; SHERLEY, 2012)
<i>Cladosporium resinae</i>	Querosene de aviação, óleo diesel, querosene, parafina	(MURIEL <i>et al.</i> , 1996)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Milhocina e resíduos de óleo de soja	(SILVA <i>et al.</i> , 2014)
<i>Exophiala dermatitidis</i>	Óleo de soja, óleo de milho e óleo de palma	(CHIEWPATTANAKUL <i>et al.</i> , 2010)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Resíduos de graxa, óleo de cozinha usado, óleo de soja	(GAUTAM <i>et al.</i> , 2014)
<i>Penicillium citrinum</i>	Azeite de oliva, hexadecano ou óleo diesel	(CAMARGO-DE-MORAIS <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Óleo de semente de girassol	(VELIOGLU; UREK, 2015)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Óleo de soja	(MATHUR <i>et al.</i> , 2010)

Quadro 2 – Resíduos utilizados como substrato para produção de biossurfactante por fungos filamentosos

Resíduos vegetais da Região Amazônica como casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) e casca de banana (*Musa*) (Figura 2) são pouco relatados na literatura. Eles são utilizados para produção de fungos comestíveis *Lentinula edodes*, cujas cascas de tucumã, cupuaçu e banana servem como substrato (AGUIAR *et al.*, 2011), a casca de tucumã também é utilizada em forma de farinha para suplementar o meio para o cultivo de *Pycnoporus sanguineus* na produção de biossurfactante (NOGUEIRA JÚNIOR *et al.* 2012).

Esses resíduos podem ser promissores substratos para produção de biossurfactante em baixo custo, a casca de tucumã tem o teor lipídico em torno de 17% e concentrações de elementos minerais de: Ca: $61,4 \pm 6,2$ mg%, $58,2 \pm 13,5$ mg%; Na: $2,6 \pm 0,3$ mg%, $3,6 \pm 0,2$ mg%; K: $795,3 \pm 20,2$ mg%, $1113,6 \pm 51,8$ mg%; Fe: $1,4 \pm 0,2$ mg%, $2,4 \pm 0,2$ mg%; Zn: $0,5 \pm 0,05$ mg%, $0,6 \pm 0,01$ mg%; Se: $4,0 \pm 0,9$ µg%, $13,9 \pm 2,4$ µg%; Br: $642,1 \pm 1,8$ µ%, $236,2 \pm 5,7$ µg% (YUYAMA *et al.* 2005). A casca de cupuaçu *in natura* possui 45,1% de carbono; 5,84% de hidrogênio e 0,84% de nitrogênio (SANTOS *et al.*, 2004). Os resíduos desses frutos têm em comum o aspecto oleaginoso, assim podem ser ótimos substratos para os fungos produtores de biossurfactante.



Figura 2 – Cascas dos frutos comuns da região Amazônica. A – tucumã; B – pupunha; C - cupuaçu e D - banana pacovan

2.5 Influência das condições de cultivo para a produção de biossurfactante fúngico

O desenvolvimento de bioprocessos eficientes e padronizados com êxito depende da otimização das condições de cultivo e processos de recuperação de baixo custo (SAHARAN *et al.*, 2012). Alguns fatores avaliados são o pH, temperatura, salinidade, fontes de carbono, fontes de hidrogênio e metal. Cada parâmetro deve ser adequado ao micro-organismo utilizado no bioprocesso, pois influenciarão no crescimento e produção dos metabólitos no mesmo.

O fungo *Aspergillus ustus* tem a sua produção máxima nas seguintes condições: pH 7, temperatura a 20 °C, concentração de sal a 3%, glicose e extrato de levedura como fonte de carbono e fontes de nitrogênio, respectivamente. Por meio de análise de superfície de resposta baseada na proporção de carbono e nitrogênio pode-se verificar que a fonte de carbono aumenta o rendimento, embora no estudo a utilização do óleo de oliva, óleo vegetal e querosene não foram satisfatórios (KIRAN *et al.*, 2009).

Cada micro-organismo tem suas necessidades para produzir o metabólito, por isso é necessário fazer um delineamento fatorial para investigar as melhores condições. O *Aspergillus flavus* melhora seu rendimento quando se utiliza farelo de trigo e casca de arroz como componentes do meio de cultivo, Rodrigues *et al.* (2014) demonstraram que é possível a produção do emulsificante sem a adição de fontes de nitrogênio, somente suplementado com 4% de óleo de soja, para essa espécie, não sendo necessárias alterações nas condições ambientais, assim permanecendo o cultivo na temperatura a 30 °C por 8 dias.

Outra espécie, o *A. niger* não tem bom rendimento em substratos de resíduos como óleo bruto, óleo de oliva, óleo de amendoim e óleo de coco, embora o bioprocesso seja otimizado com um agitador operando a 120 rpm/min, cujo processo pode influenciar no crescimento de produção da substância (KANNAHI; SHERLEY, 2012).

Alguns fungos filamentosos apresentam aprimoramento para a produção de biossurfactante, como o *Penicillium chrysogenum* onde verificou-se o rendimento quando avaliado os fatores de bioprocessos: substratos para fonte de carbono; fontes de nitrogênio; razão C/N; sistema de solventes e pH (GAUTAM *et al.*, 2014), outro como o gênero *Fusarium* sabe-se que produz a substância em meio contendo uma média de sais minerais suplementado com 2% de óleo de soja, nas condições de 30 °C de temperatura e 150 rpm/min no agitador (QAZI *et al.*, 2014), por outro lado o gênero *Trichoderma* não tem descrição referente as condições de melhoramento e utilização de resíduos como substrato na produção destas substâncias.

Nas condições experimentais é observada que o resíduo utilizado como substrato pode ser a própria fonte de isolamento do micro-organismo (LUNA-VELASCO *et al.*, 2005), os experimentos podem ser realizados em escalas desde a utilização de frascos até biorreatores (CAMARGO-DE-MORAIS *et al.*, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a utilização de resíduos vegetais como substrato para produção de biossurfactantes por fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica

3.2 Específicos

- Identificar em nível de espécie isolados fúngicos do solo pertencentes à coleção de micro-organismos do INPA sabidamente produtores de biossurfactantes.
- Estudar quais dos isolados apresenta uma produtividade de biossurfactante mais adequada para os bioprocessos industriais.
- Avaliar a possibilidade de utilização de resíduos vegetais (casca de tucumã, pupunha, banana, cupuaçu e óleo pós-fritura) produzidos nas feiras da cidade de Manaus para a produção do biossurfactante pelo isolado selecionado.
- Investigar fatores de bioprocessos (resíduo, extrato de levedura, pH, indutor e agitação) envolvidos na produção do biossurfactante pelo isolado selecionado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo possuiu etapas que estão descritas no fluxograma a seguir:

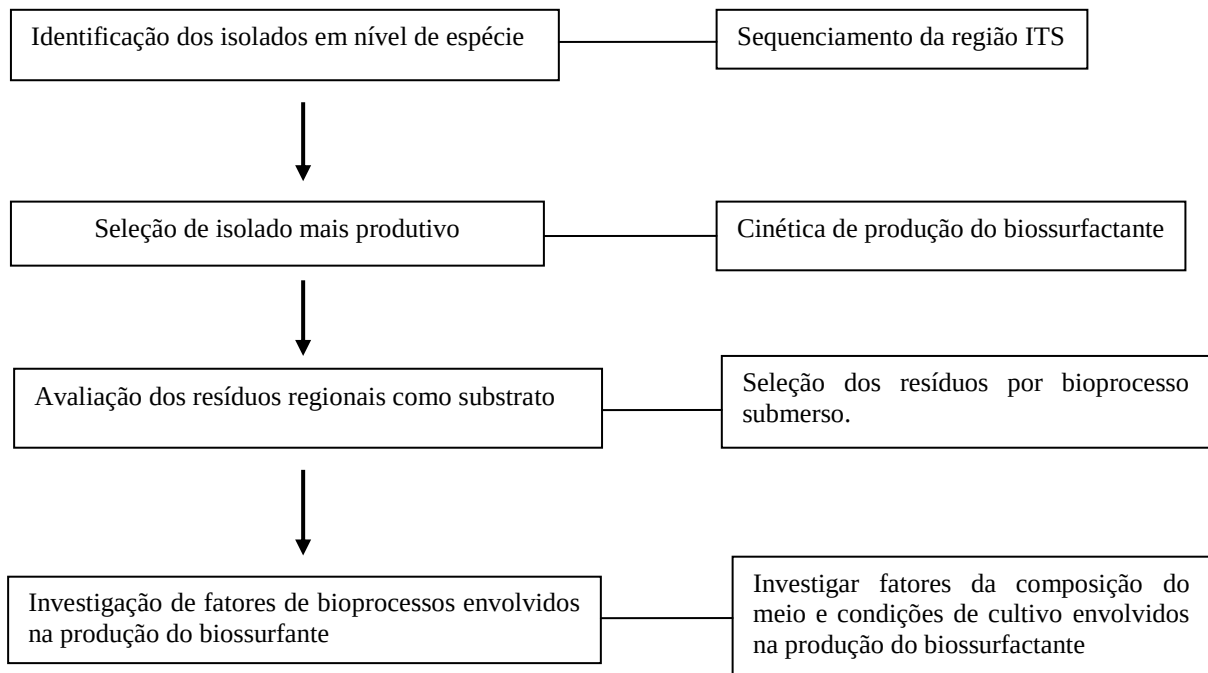


Figura 3 - Fluxograma dos procedimentos propostos pelo presente trabalho

4.1 Micro-organismos

No presente estudo foram utilizados cinco fungos filamentosos selecionados por Senna (2014) como bons produtores de biossurfactantes. Os isolados investigados foram *Penicillium* 8-2CC, *Fusarium* 86-2LV27, *Fusarium* 85-2RV34, *Trichoderma* 91-2BVR31 e *Fusarium* 87-2LIVI. Esses fungos pertencem a micoteca do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde as suas sub-culturas estão conservadas sob óleo, sob água e a -70 °C. O acesso desses isolados foi autorizado pelo CGEN - Processo nº 010344/2013-6.

4.2 Resíduos vegetais

Os resíduos vegetais casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), casca de pupunha (*Bactris gasipaes*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), casca de banana pacovan (*Musa* sp.) e óleo pós-fritura foram obtidos no período de dezembro 2014 a março de 2015 nas feiras abertas. Estes foram lavados em água corrente (quando necessário) e em seguida armazenados a -20 °C. O óleo foi mantido à temperatura ambiente.

4.3 Procedimentos

4.3.1 Identificação das espécies produtoras de biossurfactantes

Senna (2014) realizou a bioprospecção de fungos de solo para a produção de biossurfactantes, nesse estudo a autora destacou 5 isolados como excelentes produtores. No entanto, a mesma não realizou a identificação em nível de espécie desses isolados. No presente trabalho os isolados selecionados foram submetidos a identificação pela técnica de

PCR da região ITS do DNAr, seguida por sequenciamento. Para tanto foram realizadas as seguintes etapas:

a) O DNA fúngico foi extraído do micélio utilizando o Kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen Sciences Inc., Valencia CA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida amplificadas as regiões do DNAr ITS (Espaço interno transcrito).

b) Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos fungos foi utilizada a mistura das seguintes soluções: 22,5 µL água Milli Q, 5,0 µL de tampão para PCR, 2,0 µL MgCl₂, 5,0 µL dNTPs, 5,0 µL *Primer ITS 1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (WHITE *et al.*, 1990) 5,0 µL *Primer ITS 4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0,5 µL Taq Polimerase (Platinum, Invitrogen) e 5,0µL DNA fúngico, na qual cada reação teve o volume final de 50 µL.

c) As reações foram realizadas em termociclador (Modelo Super Cycler™ SC-200, Kyratec) programado para efetuar uma desnaturação inicial (5 minutos a 94 °C), seguido de 40 ciclos, sendo que cada ciclo é composto de uma etapa de desnaturação (30 segundos a 94 °C), uma etapa de pareamento (30 segundos a 53 °C) e uma etapa de alongamento (60 segundos a 72 °C) e por fim uma etapa de extensão final (10 minutos a 72 °C) (WHITE *et al.*, 1990). Uma alíquota de 8µL dos *amplicons* foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x. O gel foi corado com *Syber Green SYBR® Safe* (Invitrogen) para visualização de um fragmento de aproximadamente 1000 pb.

d) Os produtos de PCR foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Sciences Inc., Valencia CA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye® (Applied Biosystem), usando os *primers ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As sequências genômicas fornecidas pelo sequenciador foram analisadas pelo programa BLASTn contra a base de dados National Center for

Biotechnology Information website (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sendo somente aceitas as identificações com pelo menos 98% de similaridade. As sequências destes grupos foram alinhadas juntamente com as sequências do GenBank em software de programa ClustalW na MEGA 6 (TAMURA *et al.* 2011).

4.3.2 Seleção do isolado mais produtivo

O bioprocesso foi realizado em Erlenmeyers (150 mL). O volume obtido baseado na concentração foi colocado em 25 mL de meio de cultivo constituído de 40 g/L de óleo de soja (Soya®) e 10 g/L de extrato de levedura (Bacto Yeast Extract® BD) em pH 6 ± 2 , o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C/15 min. Para o inóculo, realizou-se uma suspensão de esporos para contagem na câmara de Neubauer (Improved L.Optik) a fim de obter a concentração de 1×10^4 cél/mL. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente 25 ± 2 °C durante 21 dias sob agitação de 100 rpm. Os parâmetros índice de emulsificação e produção de biomassa foram avaliados a cada 72 h, a fim de descrever a cinética desses.

4.3.3 Seleção dos resíduos vegetais

Realizou-se inicialmente uma triagem para seleção dos resíduos vegetais: casca de tucumã, casca de pupunha, casca de cupuaçu, casca de banana e óleo pós-fritura. O meio consistiu de 10 g/L de extrato de levedura e 40 g/L do resíduo (quando sólido triturado a fragmento $< 3\text{mm}$). Também foi realizado o 1) controle positivo de produção (Extrato de levedura-10g/L e óleo de soja-40g/L); 2) crescimento somente na presença de extrato de levedura. O bioprocesso foi realizado em condição similar a descrita no item anterior (4.3.2) e o índice de emulsificação foi a variável de resposta desse grupo de experimentos.

4.3.4 Influência das condições de cultivo na produção de biossurfactante

Por meio de um experimento multivariado, foi avaliada a influência dos fatores: [resíduo selecionado] (item 4.3.3), [óleo de soja], [extrato de levedura], [pH] e [agitação] na produção de biossurfactante. As condições experimentais foram similares às descritas anteriormente (item 4.3.2).

As influências destas variáveis foram estudadas de acordo com um planejamento experimental 2^5 simples com objetivo de identificar os fatores com influência estatística (BARROS NETO *et al.*, 1995). Foram realizados 32 experimentos, com três repetições no ponto central. Um modelo matemático foi determinado para a utilização da metodologia de superfície de resposta e as repetições no ponto central foram utilizadas para o cálculo do erro experimental. Os níveis dos fatores estudados estão mostrados na Tabela 1.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Resíduo selecionado (g/L)*	11,72	40	68,28
Extrato de levedura (g/L)	2,929	10	17,071
pH	1,47	5	8,53
Agitação orbital (rpm)	29,29	100	170,71
Óleo de soja (g/L)	11,72	40	68,28

*Resíduo selecionado no item 4.3.3.

Tabela 1- Níveis utilizados para concentração do substrato, fonte de nitrogênio, pH, agitação e indutor no planejamento experimental 2^5 para a produção de biossurfactante pelo fungo selecionado.

Um segundo grupo de experimentos foi realizado para investigar o efeito quadrático dos fatores [resíduo] e [extrato de levedura] por meio de um planejamento fatorial 2^2 com adição dos pontos axiais (Tabela 2).

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Resíduo selecionado*	0	11,72	40	68,28	80
Extrato de levedura	0	2,929	10	17,071	20

*Resíduo selecionado no item 4.3.3.

Tabela 2- Níveis utilizados para os fatores resíduo selecionado e extrato de levedura no planejamento experimental 2² com adição dos pontos axiais.

4.4 Ensaios Analíticos

Índice de emulsificação E24 (%)

Teste de índice de emulsificação (E24) técnica descrita por Cameron e colaboradores (1988), adaptado por Kiran *et al.* (2009), no qual são misturados 2 mL do caldo livre de células por filtração com 2 mL de uma fonte de hidrocarboneto, neste estudo foi utilizado o Tolueno. A solução foi agitada no máximo por 2 minutos constantes em agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix). Após 24 horas, a proporção da emulsão formada foi comparada com o volume total de hidrocarboneto com o caldo. A atividade de emulsificação foi comparada com surfactante padrão Dodecil sulfato de sódio (SDS), sendo o índice de emulsificação calculado pela seguinte fórmula:

$$E24 = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$$

Produção de biomassa (g/L)

O valor o crescimento micelial foi monitorado a cada 72 horas, durante os 21 dias conforme descrito na cinética (item 4.3.2). Para estimar a biomassa utilizou-se a técnica de peso seco. A massa micelial foi filtrada em papel filtro quantitativo 12,5 cm Ø com poros de

28 µm (Quanti®) previamente secado e anotado o peso inicial, em seguida ambos foram secados na estufa a 100 °C por 24 h., sendo a biomassa estabelecida pela diferença do peso final (f) pelo peso inicial (i).

$$\text{Biomassa} = \text{peso (f)} - \text{peso (i)}$$

4.5 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e calculada a média e desvio padrão. Quando necessário realizou-se ensaios de análise de variância para determinar a diferença estatística entre os experimentos. Especificamente os experimentos de planejamento fatorial foram desenvolvidos utilizando o programa CHEMOFACE e analisados com auxílio dos softwares STATGRAPHICS versão 6.0 e também no STATISTICA versão 5.0.

5 RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho encontram-se expostos na forma de artigo, o qual será submetido à revista *Process Biochemistry*. Logo, apresentam-se nesta dissertação com a formatação exigida pela revista, porém aqui, na língua portuguesa.

Utilização de resíduos vegetais para produção de biossurfactante por fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica.

Michele Alves Sanches^a, Ralyvan Araújo^b, Ana Cláudia Alves Cortez^c, João Vicente Braga de Souza^c

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Avenida Rodrigo Otávio, Amazonas-Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade do Estado do Amazonas. Avenida Darcy Vargas, Amazonas, Brasil.

^c Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-971 Amazonas, Brasil.

RESUMO

O homem tem a necessidade de misturar a água com substâncias insolúveis em suas atividades diárias e industriais. Os surfactantes, derivados de petróleo, tem sido utilizados com essa finalidade, no entanto, esses apresentam problemas quanto a sua toxicidade e biodegradabilidade. Os biossurfactantes de origem microbiana são uma alternativa para essa situação, porém, o seu custo de produção é alto e em parte devido aos substratos que são utilizados nos bioprocessos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a utilização de resíduos como substrato para produção de biossurfactantes por fungos filamentosos isolados de amostras de solo da região Amazônica. Foram realizados bioprocessos com cinco isolados fúngicos sabidamente produtores de biossurfactantes, com a finalidade de investigar qual deles produzia em menor tempo. Em seguida, foi avaliada a possibilidade de utilização de resíduos (casca de tucumã, pupunha, banana, cupuaçu e também o óleo pós-fritura) como substrato para o bioprocessos com o isolado selecionado. Os fatores que influenciam na produção do biossurfactante foram avaliados por planejamento fatorial. O fungo *F. oxysporum* 87-2LIVI produziu altos níveis de biossurfactantes em três dias de bioprocessos. Esse isolado também se destacou devido a alta produção de biossurfactante utilizando a casca de pupunha como substrato. O pH e [extrato de levedura] foram os fatores mais importantes relacionados a produção de biossurfactante por esse isolado. Desta forma, o presente trabalho demonstrou que isolados da espécie *F. oxysporum*, isolados de solo amazônico, são potenciais produtores de surfactantes e que resíduos amazônicos, em especial casca de pupunha, possui potencial para ser utilizado como substrato.

Palavras chave: Emulsificantes, Fungos filamentosos, Cascas

Introdução

O homem, no seu dia-a-dia, tem a necessidade de misturar a água com substâncias insolúveis, seja para a sua higiene (lavagens mediadas por detergentes), para o preparo de alimentos (sorvetes, cremes) e em diversos processos industriais. Os surfactantes sintéticos, derivados de petróleo, tem sido as substâncias convencionalmente usadas para formação dessas emulsões. Nos últimos anos, a literatura apresentou evidências sobre a toxicidade e baixa degradabilidade dos surfactantes sintéticos e no presente tem ocorrido uma busca por biossurfactantes, ou seja, surfactantes produzidos por micro-organismos, vegetais ou animais [1-3].

As indústrias que mais utilizam surfactantes são as de petróleo, produtos de limpeza, higiene corporal e cosmética [4]. Essas possuem interesse em substituir seus surfactantes convencionais por substâncias menos irritantes, menos tóxicas e mais biodegradáveis [3,5]. Além dessa demanda, a indústria também tem procurado surfactantes que apresentem atividades biológicas adicionais como antioxidante e antimicrobiana [6,7].

Nesse sentido, os biossurfactantes apresentam-se como potencial alternativa para substituição dos surfactantes. Essas substâncias são metabólitos com propriedades tensoativa e emulsificante, produzidas por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, possuem grupamentos químicos diversos relacionados à fisiologia e função microbiana [8]. No entanto, o custo do bioprocessamento para produção dos biossurfactantes tem se apresentado como uma limitação importante, sendo que, trabalhos voltados a reduzir os custos dos substratos convencionais pelo uso de resíduos ou substratos mais baratos são importantes para produção de biossurfactantes em nível industrial [9,10]. No ano de 2014, Sena [11] investigou a existência de fungos filamentosos produtores de biossurfactantes em amostras de solo da região amazônica e concluiu que os fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* eram bons produtores dessas substâncias. A continuidade desse trabalho passa pela tentativa da produção desses utilizando resíduos/substratos não onerosos, de forma a obter maior viabilidade econômica na produção desses surfactantes.

Alguns resíduos da região Amazônica, devido a sua composição rica em carboidratos e/ou lipídeos podem ser investigados como substratos de bioprocessos entre eles: casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer), casca da pupunha (*Bactris gasipaes*), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum), casca de banana pacovã (*Musa*) e óleo de cozinha pós-fritura. O potencial uso desses resíduos como substratos poderá reduzir os custos de produção de biossurfactantes, bem como, agregar valor a resíduos que atualmente

apresentam-se como um desafio ambiental e de gerenciamento público. O objetivo deste estudo foi produzir biossurfactante por fungos isolados de solo da região Amazônica utilizando resíduos vegetais como substrato.

2. Materiais e métodos

2.1 Micro-organismos

No presente estudo foram utilizados cinco fungos filamentosos isolados de solo Amazônico, selecionados por Sena *et al.* [11] como produtores de biossurfactantes. Os isolados investigados foram *Penicillium* 8-2CC, *Fusarium* 85-2RV34, *Fusarium* 86-2LV27, *Fusarium* 87-2LIVI e *Trichoderma* 91-2BVR31. Esses fungos pertencem a micoteca do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde as suas sub-culturas estão conservadas sob óleo, sob água e a -70 °C. O acesso desses isolados foi autorizado pelo CGEN - Processo nº 010344/2013-6.

2.2 Identificação molecular dos fungos de solo

O DNA fúngico foi extraído do micélio utilizando o Kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen Sciences Inc., Valencia CA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foram amplificadas as regiões do DNAr ITS (Espaço interno transcrito). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Sciences Inc., Valencia CA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o sequenciador, usando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As sequências genômicas fornecidas pelo sequenciador foram analisadas pelo programa BLASTn frente a base de dados National Center for Biotechnology Information website (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sendo somente aceitas as identificações com pelo menos 98% de similaridade. As sequências destes grupos foram alinhadas juntamente com as sequências do GenBank em software de programa ClustalW na MEGA6 [12].

2.3 Cinética de crescimento e produção de biossurfactante

O bioprocesso foi realizado em Erlenmeyers (125 mL). O volume obtido baseado na concentração foi colocado em 25 mL de meio de cultivo, constituído de 40 g/L de óleo de soja (Soya®) e 10 g/L de extrato de levedura (Bacto Yeast Extract® BD) [1], o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C/15 min. Para o inóculo, realizou-se uma suspensão de esporos em solução salina (0,85%) para contagem na câmara de Neubauer (Improved L.Optik) a fim de obter a concentração de 1×10^4 cél/mL. Os frascos foram incubados sob agitação orbital por 100 rpm durante 21 dias em temperatura ambiente (25 ± 2 °C). As variáveis índice de emulsificação e produção de biomassa foram avaliados a cada 72 horas, a fim de estudar as suas cinéticas.

2.4 Seleção dos resíduos como substrato para os fungos

Foi realizada a seleção dos resíduos vegetais: casca de tucumã, casca de pupunha, casca de cupuaçu, casca de banana e óleo pós-fritura. O meio consistiu de 10 g/L de extrato de levedura e 40 g/L do resíduo (quando sólido triturado a fragmento < 3 mm). Também foi realizado: a) controle positivo de produção: Extrato de levedura (10g/L) e óleo de soja (40g/L) e b) crescimento somente na presença de extrato de levedura (40g/L). O bioprocesso foi realizado em condição similar a descrita no item anterior (2.3). A variável de resposta desse grupo de experimentos foi o índice de emulsificação.

2.5 Influência das condições de cultivo na produção de biossurfactante

Por meio de um experimento multivariado, foi avaliada a influência dos fatores: [resíduo selecionado] (item 2.4), [óleo de soja], [extrato de levedura], [pH] e [agitação] na produção de biossurfactante. As condições experimentais foram similares às descritas anteriormente (item 2.3).

As influências destas variáveis foram estudadas de acordo com um planejamento experimental 2^5 simples com objetivo de identificar os fatores com influência estatística [13]. Foram realizados 32 experimentos, com três repetições no ponto central. Um modelo matemático foi determinado para a utilização da metodologia de superfície de resposta e as repetições no ponto central foram utilizadas para o cálculo do erro experimental. Os níveis dos fatores estudados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Níveis utilizados para concentração do substrato, fonte de nitrogênio, pH, agitação e indutor no planejamento experimental 2^5 para a produção de biossurfactante pelo fungo selecionado.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Resíduo selecionado (g/L)*	11,72	40	68,28
Extrato de levedura (g/L)	2,929	10	17,071
pH	1,47	5	8,53
Agitação orbital (rpm)	29,29	100	170,71
Óleo de soja (g/L)	11,72	40	68,28

*Resíduo selecionado no item 4.3.3.

Um segundo grupo de experimentos foi realizado para investigar o efeito quadrático dos fatores [resíduo] e [extrato de levedura] por meio de um planejamento fatorial 2^2 com adição dos pontos axiais (Tabela 2).

Tabela 2- Níveis utilizados para os fatores resíduo selecionado e extrato de levedura no planejamento experimental 2^2 com adição dos pontos axiais.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Resíduo selecionado*	0	11,72	40	68,28	80
Extrato de levedura	0	2,929	10	17,071	20

*Resíduo selecionado no item 4.3.3.

2.5 Ensaios analíticos

Índice de emulsificação (E24)

Teste de índice de emulsificação (E24) técnica descrita por Cooper e Goldenberg [14], adaptado por Kiran *et al.* [15], no qual foi misturado 2 mL do caldo livre de células por filtração com 2 mL de uma fonte de hidrocarboneto em um tubo de vidro 16X150mm de rosca, neste estudo foi utilizado o Tolueno, a solução foi agitada no máximo por 2 minutos constantes em agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix®). Após 24 horas, a proporção da

emulsão formada foi comparada com o volume total de hidrocarboneto adicionado. A atividade de emulsificação foi comparada com surfactante padrão Dodecil sulfato de sódio (SDS), sendo o índice de emulsificação calculado pela seguinte fórmula:

$$E24 = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$$

Produção de biomassa (g/L)

A biomassa foi estimada utilizando a técnica de peso seco. A massa micelial foi filtrada em papel filtro quantitativo 12,5 cm Ø com poros de 28 µm (Quanty®) que foi inicialmente secado em estufa a 100 °C por 24h e anotado o peso inicial dele, o papel com a massa micelial foram secados nas mesmas condições anteriormente. O valor do crescimento micelial foi monitorado a cada 72 horas, durante os 21 dias, sendo estabelecido pela diferença do peso final (f) pelo peso inicial (i).

$$\text{Biomassa} = \text{peso (f)} - \text{peso (i)}$$

2.6 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e calculadas a média e desvio padrão. Quando necessário foram realizados ensaios de análise de variância para determinar a diferença estatística entre experimentos. Especificamente os experimentos de planejamento fatorial foram desenvolvidos no programa CHEMOFACE e analisados com auxílio dos softwares STATGRAPHICS versão 6.0 e também no STATISTICA versão 5.0.

3. Resultados

3.1 Identificação das espécies produtoras de biossurfactantes

Com a finalidade de identificar em nível de espécie os isolados fúngicos utilizados no presente trabalho, foi realizada a PCR e sequenciamento da região ITS do DNAr desses micro-organismos. Os isolados *Penicillium* spp. 8-2CC e *Trichoderma* spp. 91-2BVR31 não puderam ser identificados conclusivamente (produtos de amplificação não adequados). Todos

os fungos do gênero *Fusarium* (85-2RV34, 86-2LV27 e 87-2LIVI) foram identificados como pertencentes a espécie *Fusarium oxysporum*. Na Figura 1 pode ser observada a análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança.

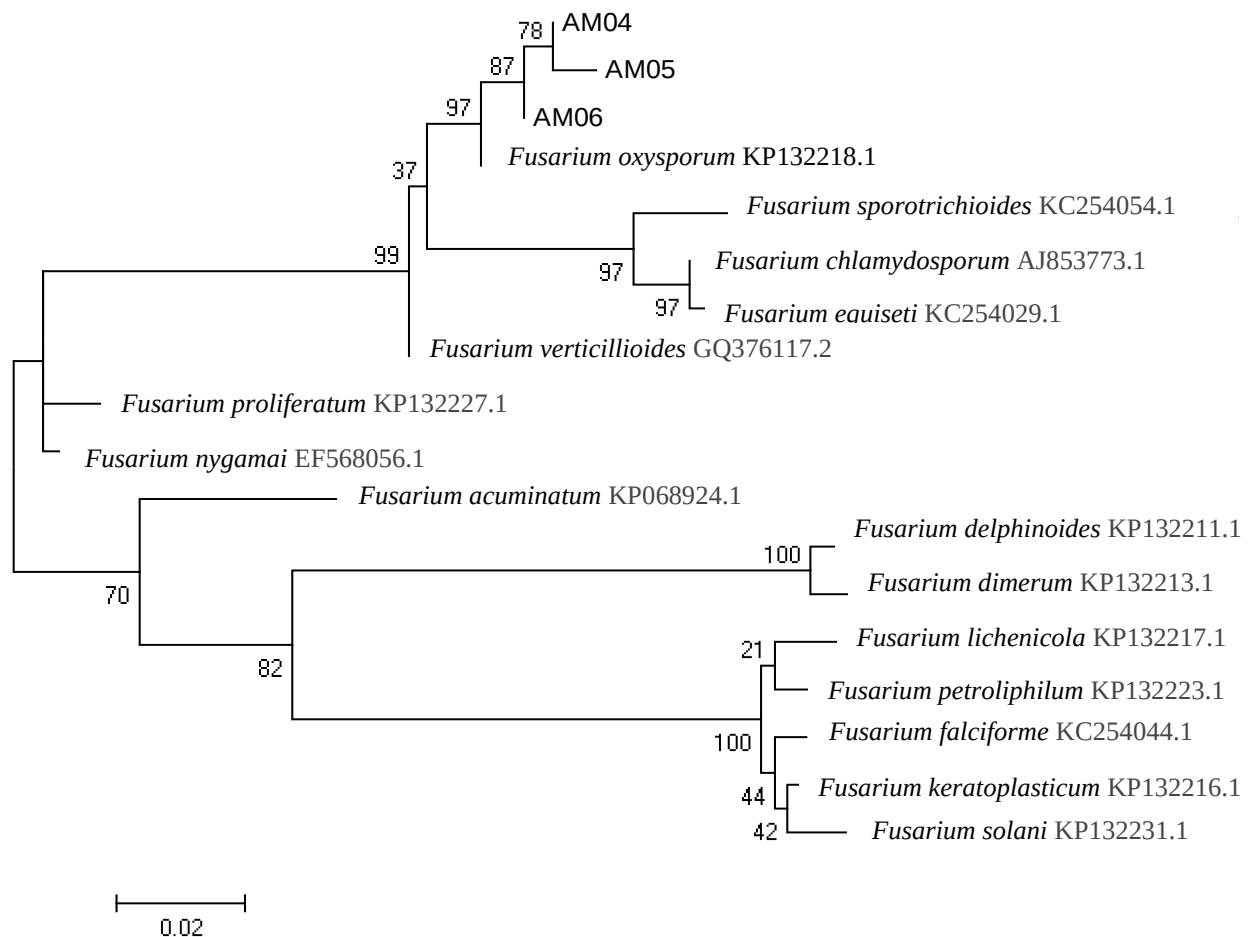


Figura 1- Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança. A análise envolveu 18 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que contêm lacunas e dados em falta foram eliminados. As análises foram realizadas em MEGA6. Sendo *Fusarium* 85-2RV34 (AM 04), *Fusarium* 86-2LV27 (AM 05) e *Fusarium*-87 2LIVI (AM 06).

3.2 Cinética do bioprocesso com os fungos filamentosos

Com o objetivo de investigar a cinética da produção de biosurfactante e do crescimento microbiano, os cinco isolados foram cultivados em meio contendo extrato de levedura e óleo de soja. O isolado *F. oxysporum* 87-2LIVI apresentou o maior índice de emulsificação ($50\% \pm 0,1$) em 72 h de bioprocesso, momento em que o fungo iniciou sua fase estacionária de crescimento (Figura 2).

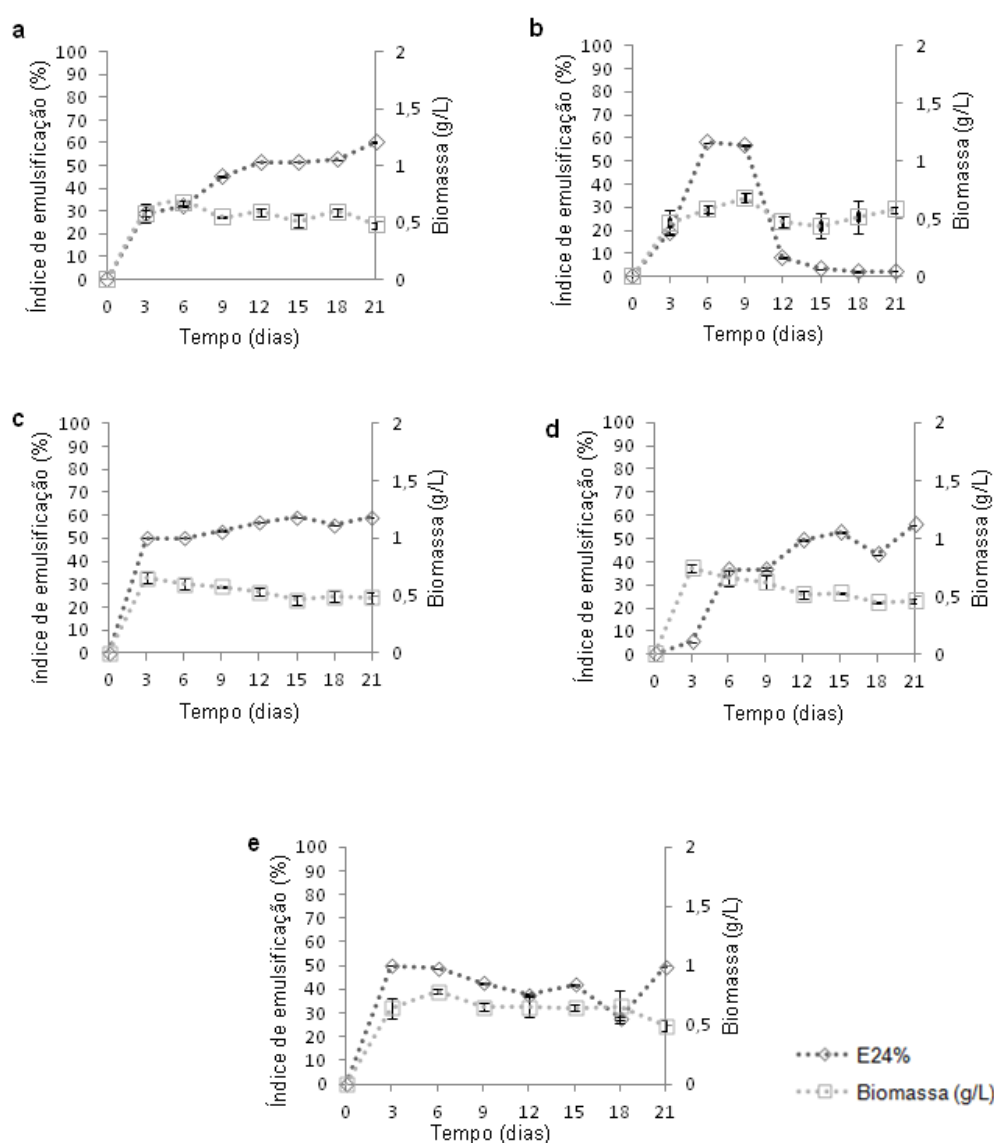


Figura 2 – Produção de biosurfactantes (índice de emulsificação-E24%) e crescimento microbiano (g/L) em 21 dias de bioprocesso com os fungos filamentosos a) *Trichoderma* spp. 91-2BVR31 b) *Penicillium* spp. 8-2CC c) *Fusarium* spp. 85-2RV34 d) *Fusarium* spp. 86-2LV27 e) *Fusarium* spp. 87-2LIVI em meio contendo extrato de levedura e óleo de soja.

3.3 Seleção dos resíduos como substrato para o fungo produzir o biossurfactante

Foi investigada a possibilidade de utilizar resíduos regionais como substrato, para tanto foram realizados bioprocessos utilizando cascas (tucumã, pupunha, cupuaçu e banana) e óleo de soja pós-fritura como substrato. Todos os fungos produziram biossurfactante em todos os resíduos, assim como somente na presença de extrato de levedura, exceto *F. oxysporum* 86-2LV27. O maior índice de emulsificação ($64,34 \pm 1$ %) foi obtido pelo fungo *F. oxysporum* 85-2RV34, no entanto, o isolado selecionado para as demais etapas do trabalho foi o fungo *F. oxysporum* 87-2LIVI pela produção mais rápida (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de emulsificação (E24%) do biossurfactante produzido pelos fungos filamentosos utilizando como substrato cinco resíduos e na presença somente do extrato de levedura. Resultado de média e de desvio padrão.

Fungo	Tempo (dias)	E24 (%)						
		Controle positivo*	Casca de Pupunha	Casca de Tucumã	Casca de Cupuaçu	Casca de Banana	Óleo pós-fritura	Extrato de levedura
<i>Trichoderma</i> 91-2BVR31	12	$53,76 \pm 2$	$62,76 \pm 7$	$51,61 \pm 0$	$54,73 \pm 2$	$51,04 \pm 4$	$9,37 \pm 6$	$6,38 \pm 0$
<i>F.oxysporum</i> 87-2LIVI	3	$62,13 \pm 3$	$56,38 \pm 2$	$51,08 \pm 1$	$32,96 \pm 10$	$41,94 \pm 3$	$44,25 \pm 6$	$39,38 \pm 2$
<i>Penicillium</i> 8-2CC	9	34 ± 3	59 ± 2	21 ± 5	21 ± 11	43 ± 11	45 ± 2	17 ± 6
<i>F. oxysporum</i> 86-2LV27	15	48 ± 4	49 ± 4	52 ± 6	14 ± 2	43 ± 3	14 ± 8	0
<i>F. oxysporum</i> 85-2RV34	15	$61,82 \pm 3$	$64,34 \pm 1$	$59,37 \pm 0$	$56,25 \pm 3$	$57,29 \pm 4$	$59,97 \pm 2$	$56,25 \pm 3$

SDS 90%

*Meio composto de extrato de levedura e óleo de soja

3.4 Influência dos fatores de bioprocessos na produção de biossurfactante pela linhagem *F. oxysporum* 87-2LIVI

Bioprocessos foram realizados de acordo com um planejamento fatorial 2^5 , com a finalidade de investigar a influência dos fatores: casca de pupunha, extrato de levedura, pH, agitação e indutor na produção de biossurfactante por *F.oxysporum* 87-2LIVI. Observa-se que os valores de índice de emulsificação variaram de 0 a 60% conforme a interação dos fatores estudados (Tabela 4), demonstrando a importante influência dos fatores investigados.

Tabela 4 - Matriz com os números de experimento do planejamento fatorial 2^5 para produção de biossurfactante por *F. oxysporum* 87-2IVI, sendo os fatores analisados: resíduo, extrato de levedura, pH, agitação e indutor. A variável de resposta deste experimento foi o índice de emulsificação E24%.

Nº de experimentos	Resíduo	Extrato de levedura	pH	Agitação	Indutor	E24 (%)
1	11,72	2,92	1,47	29,29	11,72	0,0
2	11,72	2,92	1,47	29,29	68,28	0,0
3	11,72	2,92	1,47	170,71	11,72	0,0
4	11,72	2,92	1,47	170,71	68,28	0,0
5	11,72	2,92	8,53	29,29	11,72	50,0
6	11,72	2,92	8,53	29,29	68,28	35,5
7	11,72	2,92	8,53	170,71	11,72	9,7
8	11,72	2,92	8,53	170,71	68,28	0,0
9	11,72	17,07	1,47	29,29	11,72	16,1
10	11,72	17,07	1,47	29,29	68,28	19,4
11	11,72	17,07	1,47	170,71	11,72	0,0
12	11,72	17,07	1,47	170,71	68,28	0,0
13	11,72	17,07	8,53	29,29	11,72	40,6
14	11,72	17,07	8,53	29,29	68,28	48,4
15	11,72	17,07	8,53	170,71	11,72	54,8
16	11,72	17,07	8,53	170,71	68,28	60,0
17	68,28	2,92	1,47	29,29	11,72	25,8
18	68,28	2,92	1,47	29,29	68,28	0,0
19	68,28	2,92	1,47	170,71	11,72	0,0
20	68,28	2,92	1,47	170,71	68,28	16,1
21	68,28	2,92	8,53	29,29	11,72	54,8
22	68,28	2,92	8,53	29,29	68,28	51,6
23	68,28	2,92	8,53	170,71	11,72	9,7
24	68,28	2,92	8,53	170,71	68,28	9,7
25	68,28	17,07	1,47	29,29	11,72	41,9
26	68,28	17,07	1,47	29,29	68,28	0,0
27	68,28	17,07	1,47	170,71	11,72	9,7
28	68,28	17,07	1,47	170,71	68,28	54,8
29	68,28	17,07	8,53	29,29	11,72	51,6
30	68,28	17,07	8,53	29,29	68,28	51,6
31	68,28	17,07	8,53	170,71	11,72	48,4
32	68,28	17,07	8,53	170,71	68,28	50,0
33	40	10	5	100	40	48,4
34	40	10	5	100	40	58,1
35	40	10	5	100	40	51,6

Os efeitos principais e suas respectivas interações calculadas a partir dos dados da Tabela 4 são apresentados na Tabela 5 e representados graficamente na Figura 3. Os erros padrão (σ) dos efeitos foram calculados a partir das replicatas do ponto central (Tabela 4). Segundo Barros Neto [13], ao nível de 95% de confiança, somente são considerados significativos os efeitos, em módulo, cujos valores forem maiores que “ $t_v \times \sigma$ ”, onde t_v é o valor do teste t para v graus de liberdade. O valor do teste t para 2 graus de liberdade (t_2), ao nível de 95% de confiança é 4,313 na tabela de distribuição t-student.

Tabela 5 – Efeitos dos fatores sobre a produção de biossurfactante e o desvio padrão calculado no ponto central.

(Média)	27,6657 +/- 0,835464
A: Casca de pupunha	8,825 +/- 1,7475*
B: Extrato de levedura	17,775 +/- 1,7475*
C: pH	27,6625 +/- 1,7475*
D: Agitação	-10,275 +/- 1,7475*
E: Óleo de soja	- 1,0 +/- 1,7475
BD	11,2875 +/- 1,7475*
CD	-7,45 +/- 1,7475
DE	8,2875 +/- 1,7475*

*valores estatisticamente significativos $p < 0,05$.

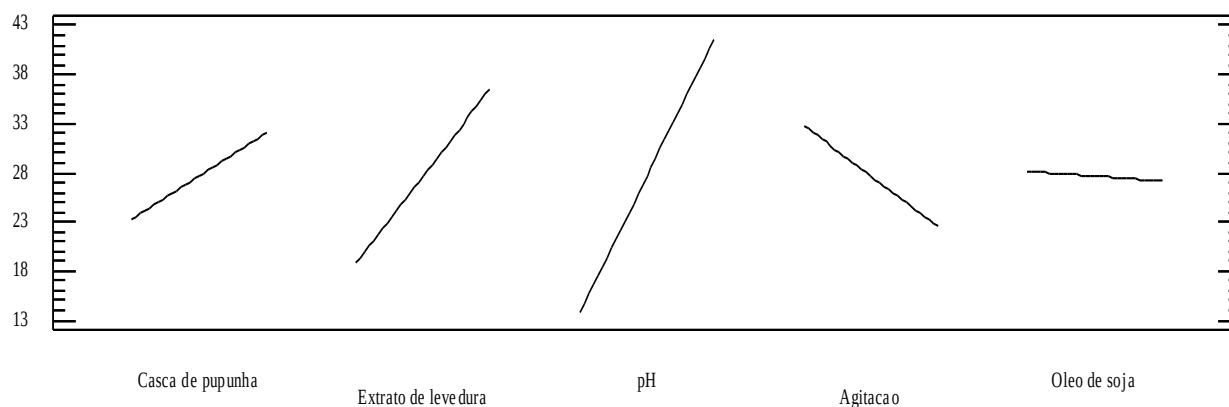


Figura 3 – Efeitos principais da casca de pupunha, extrato de levedura, pH, agitação e óleo de soja na variável de resposta índice de emulsificação.

Os fatores Casca de pupunha (A), Extrato de levedura (B), pH (C), Agitação (D) e a interação BD e DE apresentaram significância estatística. Considerando-se esses efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tabela 5 e esse é descrito a na Equação 1.

$$Y = 9,35221 + 0,156029*A + 0,128123*B + 5,41055*C - 0,193804*D - 0,224901*E + 0,0112877*B*D - 0,0149235*C*D + 0,00207221*D*E \text{ (Equação 1)}$$

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para validação do modelo matemático descrito na Equação 1 (Tabela 6). Esse modelo matemático não apresentou regressão significativa (65,09%) e apresentou falta de ajuste significativa.

Tabela 6 – Análise estatística do planejamento fatorial 2^5 pela ANOVA em um intervalo de 95% de confiança.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
A: Casca de pupunha	623,045	1	623,045	25,50	0,0370
B: Extrato de levedura	2527,6	1	2527,6	103,46	0,0095
C: pH	6121,71	1	6121,71	250,58	0,0040
D: Agitação	844,605	1	844,605	34,57	0,0277
E: Óleo de soja	8,0	1	8,0	0,33	0,6249
BD	1019,26	1	1019,26	41,72	0,0231
CD	444,02	1	444,02	18,18	0,0509
DE	549,461	1	549,461	22,49	0,0417
Falta de ajuste	6288,37	24	262,015	10,73	0,0887
Erro puro	48,86	2	24,43		
Total (corr)	18474,9	34			

$R^2 = 65,69\%$

R^2 (ajustado para g.l.) = 55,14%

Para avaliar a influência quadrática dos fatores [casca de pupunha] e [extrato de levedura], um segundo grupo de experimentos foi realizado de acordo com um planejamento fatorial 2^2 com adição dos pontos axiais. Os demais fatores como pH, agitação e óleo de soja tiveram os mesmos valores do ponto central do experimento anterior. A resposta variou de 3,22 a 58,06% (Tabela 7).

Tabela 7 - Matriz com os números de experimento para o planejamento 2^2 para produção de biossurfactante por *F. oxysporum*, sendo os fatores analisados: casca de pupunha e extrato de levedura. A variável de resposta deste experimento foi o índice de emulsificação E24%.

Nº de experimentos	Casca de pupunha	Extrato de levedura	E24%
1	68,28	17,07	22,58
2	40	0	9,67
3	0	10	58,06
4	68,28	2,93	12,5
5	40	10	31,25
6	40	10	45,16
7	80	10	45,16
8	11,72	17,07	58,06
9	40	20	3,22
10	11,72	2	48,38
11	40	10	48,38

Os fatores lineares Casca de pupunha (A) e Extrato de levedura (B) e os fatores quadráticos Casca de pupunha (A^2) e Extrato de levedura (B^2) apresentaram significância estatística (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeitos dos fatores sobre a produção de biossurfactante e o desvio padrão calculados no ponto central.

Média	46,6828 +/- 0,935685
A:Casca de pupunha	-22,4047 +/- 1,14597*
B:Extrato de levedura	2,65862 +/- 1,14597
AA	8,10558 +/- 1,36398*
AB	0,201584 +/- 1,62095
BB	-37,0557 +/- 1,36398*

*fatores com efeitos estatisticamente significativos $p < 0,05$.

Considerando-se somente efeitos estatisticamente significativos, um modelo linear foi ajustado com os dados da Tabela 7 e esse é descrito a na Equação 2.

$$Y = 31,6952 - 0,801342 * A + 7,59913 * B + 0,00506599 * A^2 - 0,370557 * B^2 \text{ (Equação 2)}$$

Análise de variância (ANOVA) foi realizada para validação do modelo matemático descrito na Equação 2 (Tabela 9). Esse modelo matemático apresentou regressão de 86,61%.

Tabela 9– Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 com adição dos pontos centrais pela ANOVA em um intervalo de 95% de confiança

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	Valor de p
A: Casca de pupunha	1003,94	1	1003,94	382,23	0,0026
B: Extrato de levedura	14,1365	1	14,1365	5,38	0,1461
AA	95,7538	1	95,7538	35,31	0,0272
AB	0,0406364	1	0,0406364	0,02	0,9124
BB	1938,53	1	1938,53	738,06	0,0014
Falta de ajuste	537,697	3	179,232	68,24	0,0145
Erro puro	5,25304	2	2,62652		
Total	4057,76	10			

$R^2 = 86,6195\%$

R^2 (ajustado para g.l = 73,2389 %

Para representar os resultados contidos no modelo (equação 2) foi feita uma superfície de resposta (Fig. 4). A superfície de resposta demonstrou que as concentrações ótimas para a máxima produção de biossurfactantes foram: 10 g/L de Extrato de Levedura e 0 g/L de casca de pupunha.

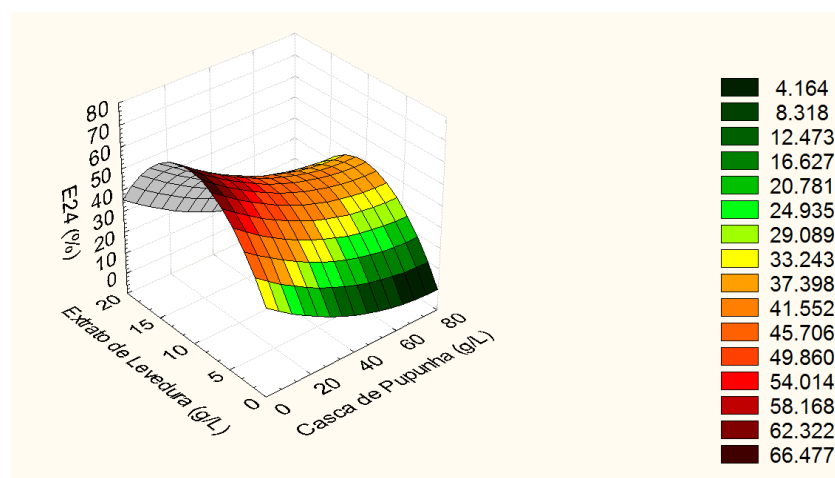


Figura 4 – Superfície de resposta da combinação da casca de pupunha e extrato de levedura na variável de resposta índice de emulsificação

4 Discussão

O propósito deste estudo foi investigar o potencial de resíduos como substrato na produção de biossurfactante por fungos. Inicialmente, foi investigado o perfil cinético de crescimento dos fungos selecionados e a produção de biossurfactante, o fungo *Fusarium oxysporum* 87- 2LIVI destacou-se pela produção em apenas três dias ($E_{24} = 50 \pm 0,1\%$). Em seguida, foram avaliados os resíduos como substrato. Embora todos os resíduos tenham se apresentado como ótimas alternativas de substrato, a casca de pupunha foi o resíduo no qual os fungos apresentaram os maiores índices de emulsificação. Cinco fatores relacionados à produção (resíduo, extrato de levedura, pH, agitação e indutor) foram avaliados, demonstrou-se que o pH foi o fator com maior influência estatística na produção. No segundo planejamento, os fatores casca de pupunha e extrato de levedura tiveram suas concentrações otimizadas.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar a produção de biossurfactante pelo fungo *F. oxysporum*. A literatura apresenta dois estudos que demonstram o potencial desse gênero para produção de biossurfactante [16,17]. Esses estudos demonstraram a capacidade desse gênero de produzir biossurfactante do tipo lipopeptídeo (*Fusarium* sp. BS-8) [16] e o biossurfactante enamida (*Fusarium proliferatum*) [17].

Nas condições experimentais, a produção dos biossurfactantes pelos cinco isolados investigados esteve positivamente relacionada com o crescimento fúngico. Trabalhos da literatura apresentam fungos que possuem esse comportamento de produção do biossurfactante similar a de um metabólito primário, como por exemplo, *Syncephalastrum racemosum* [18] *Curvularia lunata* [19] mas também apresenta trabalhos com fungos *Pleorotus djamor* [20] e *Pleorotus ostreatus* [21] em que os isolados produzem os biossurfactantes como metabólitos secundários.

A utilização das cascas dos frutos cupuaçu, tucumã, pupunha e banana demonstraram ser alternativas de substratos para produção de biossurfactantes. A casca do tucumã já havia sido destacada para cultivo de cogumelo [22]. Outros estudos direcionam para a produção de energia como a casca de cupuaçu sendo aproveitada como insumo energético em processo de bioconversão [23]. Outras cascas foram descritas na literatura como substratos. Especificamente, foram estudadas as cascas de frutas como laranja [24], banana [25,26], maçã [27] e abacaxi [28] como substratos para a produção de biossurfactante. No presente estudo, a casca de pupunha destacou-se como substrato para os isolados fúngicos. Esse desempenho pode ser respondido pela sua composição: lipídeos (18,5%), proteínas (5%) e carboidratos

(69,1%) [29]. O uso de substratos prepara um caminho para um processo de produção de custo efetivo mais barato [1] e cria a expectativa da criação de um banco de dados para substratos [30]. Assim, este trabalho destaca a utilização dos resíduos como potencial substrato para a produção de biossurfactante.

A produção da substância não depende exclusivamente do micro-organismo estudado, depende das condições do meio no qual está sendo cultivado e as condições externas como pH, agitação, temperatura e o tempo do bioprocessamento [8,31]. Os resultados do planejamento fatorial utilizado no presente trabalho indicaram que os fatores pH e extrato de levedura influenciaram mais significativamente a produção do biossurfactante. O *F. oxysporum* teve melhor produção com $\text{pH} > 5$, ou seja, o fungo demonstra preferência por meios alcalinos, assim como o fungo *Fusarium* BS-8 que obteve a máxima produção em pH 7, conforme o autor, as condições extremas de pH inibem a produção do biossurfactante e essa variação confere mudanças qualitativas e quantitativas [16].

O extrato de levedura é uma fonte de nitrogênio utilizada no meio para produção de biossurfactante pelo gênero *Fusarium* [16,17]. Estudo descrito por Sorensen *et al.* [32] demonstra o efeito do extrato de levedura na produção de metabólitos por fungos filamentosos e enfatiza a necessidade da utilização da mesma marca nos experimentos repetidos. Este estudo destaca a produção de biossurfactante somente na presença do extrato de levedura. O extrato de levedura contém elementos proteicos e ácidos nucleicos que por si só pode fornecer a fonte nitrogênio ou carbono exigido pelo micro-organismo para a biossíntese do produto metabólico [33]. Vale ressaltar que, nas condições experimentais, o extrato de levedura, isoladamente, demonstrou ser adequado para produção de biossurfactantes pela maioria dos isolados investigados.

Os dados gerados neste estudo foram baseados no resultado do índice de emulsificação, que foi a variável selecionada para a detecção da substância, sendo assim uma limitação tendo em vista que a literatura descreve outros métodos de detecção e avaliação do biossurfactante como concentração micelar crítica [34], tensão superficial [35], teste de hemólise [36], teste de deslocamento de óleo [37] atividade de emulsificação água-óleo/óleo-água [38] e determinação iônica [39], estes testes também auxiliam no direcionamento da aplicação do biossurfactante produzido. Outro fator limitante do presente estudo é desconhecer a composição do biossurfactante produzido pelos fungos investigados.

Conclui-se, que: a) os fungos filamentosos isolados de solo da região Amazônica, destacando-se pela primeira vez a espécie *F. oxysporum*, apresentam potencial produção de biossurfactantes. b) resíduos vegetais podem ser utilizados como substratos nos bioprocessos,

destacando-se as cascas de pupunha como melhor resíduo. Dentre os fungos, o que obteve maior destaque para a produção foi *F.oxysporum* 87 - 2LIVI, incluindo assim sua potencialidade de produzir emulsão neste presente estudo. Diante deste estudo é possível em trabalhos futuros realizar processos *downstream* estudando purificação e caracterização da substância, outras formas de bioprocessos, como fermentação em estado sólido utilizando os resíduos vegetais, estudos para aumento da escala de produção, avaliação toxicológica e testes de estabilidade tendo em vista a aplicação biotecnológica e finalmente a avaliação em campo.

Referências bibliográficas

- [1] I.M. Banat, S.K. Satpute, S.S. Cameotra, R. Patil, N. V Nyayanit, Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 697. doi:10.3389/fmicb.2014.00697.
- [2] M. Nitschke, S. Costa, Biosurfactants in food industry, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 252–259. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.002.
- [3] M. Nitschke, M. Pastore, Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações, *Quim. Nova.* 25 (2002) 772–776.
- [4] E. Shoeb, F. Akhlaq, U. Badar, J. Akhter, S. Imtiaz, Classification and industrial applications of biosurfactants, *Acad. Res. Int.* 4 (2013) 243–252.
- [5] E. Lémery, S. Briançon, Y. Chevalier, C. Bordes, T. Oddos, A. Gohier, et al., Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 469 (2015) 166–179. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.01.019.
- [6] I. Ullah, A. Shah, A. Badshah, N.A. Shah, R. Tabor, Surface, aggregation properties and antimicrobial activity of four novel thiourea-based non-ionic surfactants, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 464 (2015) 104–109. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.10.002.
- [7] D.R. Nogueira, M. Mitjans, M.R. Infante, M.P. Vinardell, Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications., *Int. J. Pharm.* 420 (2011) 51–8. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.020.
- [8] R.K. Hommel, Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms, *Biodegradation.* 1 (1990) 107–119.
- [9] N.R.A. Silva, M.A.C. Luna, A.L.C.M.A. Santiago, L.O. Franco, G.K.B. Silva, P.M. Souza, et al., Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil., *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 15377–95. doi:10.3390/ijms150915377.

- [10] S. Waghmode, C. Kulkarni, S. Sneha, P. Sursawant, C. Velhal, Low cost production of biosurfactant from different substrates and their comparative study with commercially available chemical surfactant, *Int. J. Sci. Technol. Res.* 3 (2014) 146–149.
- [11] H.H. Sena, *Produção de biossurfactantes por fungos Isolados da Floresta Amazônica*, Universidade Federal do Amazonas, 2014.
- [12] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0., *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–9. doi:10.1093/molbev/mst197.
- [13] B.. BARROS NETO, I.S. SCARMINIO, R.E. BRUNS, *Planejamento e otimização de experimentos*, Campinas, 1995.
- [14] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface-active agents from two *Bacillus* species, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 224–229.
- [15] G.S. Kiran, T. a Hema, R. Gandhimathi, J. Selvin, T.A. Thomas, T. Rajeetha Ravji, et al., Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3., *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 73 (2009) 250–6. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.05.025.
- [16] M.A. Qazi, T. Kanwal, M. Jadoon, S. Ahmed, Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil, in: M.M. Domach (Ed.), *Biotechnol. Prog.*, 2014: pp. 1065–1075.
- [17] G. Bhardwaj, S.S. Cameotra, H.K. Chopra, Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran, *RSC Adv.* 5 (2015) 54783–54792. doi:10.1039/C5RA08017G.
- [18] C. Mathur, R. Prakash, A. Ali, J. Kaur, S.S. Cameotra, N.T. Prakash, Emulsification and hydrolysis of oil by *Syncephalastrum racemosum*, *Def. Sci. J.* 60 (2010) 251–254.
- [19] K. Paraszkiwicz, A. Kanwal, J. Długóński, Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization, *J. Biotechnol.* 92 (2002) 287–294.
- [20] Z. Velioglu, R. Ozturk Urek, Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation., *J. Biosci. Bioeng.* 120 (2015) 526–31. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.03.007.
- [21] Z. Velioglu, R.O. Urek, Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems, *Turkish J. Biol.* 39 (2015) 160–166. doi:10.3906/biy-1406-44.
- [22] B. De Aguiar, L. Vieira, S. Campos, M. De Carvalho, D.A. Mi-, M. Teixeira, et al., *Redalyc.Uso de resíduos de madeiras e frutos da amazônia para o cultivo in vitro do cogumelo comestível shiitake*, (2013).

- [23] E.C.S. Santos, R.C.R. Souza, O. Seye, J. Lau, K.T. de Freitas, Aproveitamento da casca do cupuaçuzeiro para a produção de energia, Encontro Energ. No Meio Rural. (2004) 1–8. <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022004000100015&lng=en&nrm=abn> (accessed April 03, 2015).
- [24] S. George, K. Jayachandran, Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source., Appl. Biochem. Biotechnol. 158 (2009) 694–705. doi:10.1007/s12010-008-8337-6.
- [25] K. Saisa-Ard, S. Maneerat, A. Saimmai, Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates, J. Biotechnol. Comput. Biol. Bionanotechnol. 94 (2013) 275–284.
- [26] C.S. Chooklin, S. Maneerat, A. Saimmai, Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65., Appl. Biochem. Biotechnol. 173 (2014) 624–45. doi:10.1007/s12010-014-0870-x.
- [27] L.M. Acioly, A. Barbosa da Silveira, M. Anjos, G.K. Silva, M. Leite, K. Okada, et al., Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel, vegetable oil and corn steep liquor as substrate, in: A. Mendez-Vilas (Ed.), Microbes Appl. Res. – Curr. Adv. Challenges, World Scie, 2012: pp. 344–347.
- [28] F.C.G. Almeida, T.A. de L. Silva, I. Garrard, L.A. Sarubbo, G.M. Campos-Takaki, E.B. Tambourgi, Optimization and Evaluation of Biosurfactant Produced by *Pantoea* sp. Using Pineapple Peel Residue, Vegetable Fat and Corn Steep Liquor, J. Chem. Chem. Eng. 9 (2015) 269–279. doi:10.17265/1934-7375/2015.04.005.
- [29] V.A. De Almeida, M.F. da Silva, G. da C. Pontes, H.F. da S. Silva, J.P. Lopes, L.K.O. Yuyama, et al., Avaliação nutricional e sensorial de pães enriquecido com a farinha da casca da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), CEPLAC. (2003) 4–7.
- [30] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, I.M. Banat, Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production., AMB Express. 1 (2011) 5. doi:10.1186/2191-0855-1-5.
- [31] F. Md, Biosurfactant: Production and Application, J. Pet. Environ. Biotechnol. 03 (2012) 1–5. doi:10.4172/2157-7463.1000124.
- [32] J.L. Sørensen, T.E. Sondergaard, The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*., Int. J. Food Microbiol. 170 (2014) 55–60. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.024.
- [33] M.A. Qazi, Z.A. Malik, G.D. Qureshi, A. Hameed, S. Ahmed, Yeast extract as the most preferable substrate for optimized biosurfactant production by rhlB gene positive *Pseudomonas putida* SOL-10 isolate, J. Bioremediation Biodegrad. 04 (2013). doi:10.4172/2155-6199.1000204.

- [34] P. Das, X.-P. Yang, L.Z. Ma, Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity., *Front. Microbiol.* 5 (2014) 696. doi:10.3389/fmicb.2014.00696.
- [35] R.D. Rufino, J.M. de Luna, G.M. de Campos Takaki, L.A. Sarubbo, Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988, *Electron. J. Biotechnol.* 17 (2014) 34–38. doi:10.1016/j.ejbt.2013.12.006.
- [36] C. Mulligan, D. Cooper, R. Neufeld, Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons, *J. Ferment. Technol.* 4 (1984) 311–314.
- [37] M. Morikawa, Y. Hirata, T. Imanaka, A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants, *Biochim. Biophys.* 1488 (2000) 211–218.
- [38] S. Navon-Venezia, Z. Zosim, A. Gottlieb, R. Legmann, S. Carmell, E. Ron, et al., Alasan , a New Bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3240–3244.
- [39] J. Carel, V. Oss, Specifically Impermeable Precipitate Membranes Formed through Double Diffusion in Gels : Behavior with Complex Forming and with Simple Systems, *J. Colloid Interface Sci.* 27 (1968) 684–690.

6 CONCLUSÃO

- Os fungos do gênero *Fusarium* isolados de solo Amazônico produtores de biossurfactantes foram identificados como *F. oxysporum*.
- Dentre os cinco isolados selecionados, o *F. oxysporum* 87-2LIVI produziu maior quantidade de biossurfactante em menor tempo comparado aos demais isolados.
- Os resíduos vegetais (casca de tucumã, pupunha, banana, cupuaçu e óleo pós-fritura) são potenciais substratos para os fungos filamentosos para produção de biossurfactante, destacando-se a casca de pupunha.
- Os fatores de bioprocessos pH e concentração extrato de levedura exerceram influência na produção de biossurfactante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLY, L. M. L. *et al.* Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel, vegetable oil and corn steep liquor as substrate. **Microbes in applied research: Current advances and challenges**, p. 344, 2012.
- AGUIAR, L.V.B. *et al.* Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* em meios de cultivo à base de diferentes substratos orgânicos. **Interciência**, v. 36, n. 3, p. 205–210, 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 299 p. 1995.
- BANAT, I. M. *et al.* Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. December, p. 697, jan. 2014.
- BODOUR, A. A. *et al.* Structure and characterization of *Flavolipids*, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 1, p. 114–120, 2004.
- BOGAERT, V.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, abr. 2011.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1-2, p. 41–52, jul. 1999.
- BRYCKI, B.; WALIGÓRSKA, M.; SZULC, A. The biodegradation of monomeric and dimeric alkylammonium surfactants. **Journal of hazardous materials**, v. 280, p. 797–815, 15 set. 2014.
- CAMARGO-DE-MORAIS, M. M. *et al.* Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 191–194, 2003.
- CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420–5, jun. 1988.
- CASTIGLIONI, G. L. *et al.* Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 292–295, 2009.
- CHIEWPATTANAKUL, P. *et al.* Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1664–1671, 2010.
- CHOOKLIN, C. S.; MANEERAT, S.; SAIMMAI, A. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 2, p. 624–45, maio 2014.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan , a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846–850, 1985.

COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. L. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2012

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, mar. 1997.

DONIO, M. B. S. *et al.* Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 6, n. 11, p. 876–83, nov. 2013.

GAUTAM, G. *et al.* A cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 06, 2014.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current opinion in biotechnology**, v. 30C, p. 66–72, 1 jul. 2014.

GORIN, P. A. .; SPENCER, J. F. .; TULLOCH, A. . Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 6199, p. 846–855, 1961

GUDIÑA, E. J. *et al.* Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–75, dez. 2013.

GUDIÑA, E. J. *et al.* Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 14, 31 jan. 2015.

HAWKSWORTH, D. . Fungus culture collections as a biotechnological resource. In: **Biotechnology and genetic engineering reviews**. Uk: Commonwealth Mycological Institute, 1985. p. 417–453.

HENKEL, M. *et al.* Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207–1219, ago. 2012.

HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. **Biodegradation**, v. 1, n. 1971, p. 107–119, 1990.

NOGUEIRA JÚNIOR, J. B. B. N. *et al.* **Produção de biossurfactantes por fungos amazônicos em meio suplementado da farinha da casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer)**. XXI ALAM. Anais. Sbm, 2012.

KANEDA, T. Fatty acids in the genus *Bacillus* I. iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 3, p. 894–903, 1967.

KANNAHI, M.; SHERLEY, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas putida* and *Aspergillus niger* from oil contaminated site. **International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 37–42, 2012.

KAPPELI, O.; FINNERTY, W. . Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **Journal of Bacteriology**, v. 140, n. 2, p. 707–712, 1979.

KIM, J. S.; PARK, N. H.; KIM, C. G. **Biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans***. Korea, February, 4, , 2014.

KIRAN, G. S. *et al.* Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250–6, 15 out. 2009.

KUYUKINA, M. *et al.* Trehalolipid biosurfactants from *Rhodococcus ruber* with anti-adhesive and immunomodulatory activities. **New Biotechnology**, v. 31, n. July, p. S54, jul. 2014.

LAWNICZAK, L.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2327–39, mar. 2013.

LÉMERY, E. *et al.* Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.

LUNA-VELASCO, M. A. *et al.* Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 310–314, mar. 2007.

LUNA-VELASCO, M. A.; ESPARZA-GARCÍA, F. J.; SALAZAR-MONTOYA, J. A. **Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de un biosurfactante y remoción de fenantreno por *Penicillium* sp.** VI Congreso de La Sociedad Cubana de Bioingeniería. **Anais**, Habana, 2005.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 138–142, jan. 2013.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 5, jan. 2011.

MARTI, M. E. *et al.* Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and microbial technology**, v. 55, p. 31–9, 5 fev. 2014.

MATHUR, C. *et al.* Emulsification and hydrolysis of oil by *Syncephalastrum racemosum*. **Defence Science Journal**, v. 60, n. 3, p. 251–254, 2010.

MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Microbial surfactants and their potential applications: an overview. In: SEN, R. (Ed.). **Biosurfactants - Advances in experimental medicine and biology**. 672. ed. New York: Springer science, 2010. v. 672p. 54–60.

MURIEL, J. M. *et al.* Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 235–240, 1996.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. Biosurfactants in food industry. **Trends in food science & technology**, v. 18, p. 252–259, 2007.

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

NOGUEIRA, D. R. *et al.* Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. **International journal of pharmaceutics**, v. 420, n. 1, p. 51–8, 25 nov. 2011.

OLIVEIRA, J. M. DE; MEI, L. H. I. Surfactantes reativos não-iônicos em polimerização em emulsão de látex de acetato de vinila - vinil neodecanoato: Influência nas propriedades de barreira à água. v. 19, p. 22–30, 2009.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DŁUGÓŃSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 287–294, 2002.

QAZI, M. A. *et al.* Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. In: DOMACH, M. M. (Ed.). **Biotechnology Progress**. 2014. p. 1065–1075.

RODRIGUES, E. F. *et al.* Produção de compostos com propriedades emulsificantes por *Aspergillus flavus* utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 16, n. 1, p. 75–93, 2014.

RODRIGUES, L. *et al.* Biosurfactants : potential applications in medicine. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. February, p. 609–618, 2006.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. In: **Environmental microbiology**. Blackwell ed. 2001. v. 3p. 229–236.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : fermentation , current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, p. 1–14, 2012.

SANTOS, E. C. S. *et al.* Aproveitamento da casca do cupuaçuzeiro para a produção de energia. Disponível em: <http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_ar>. **Encontro de Energia no meio rural**. 2004. Acesso em: 3 abr. 2015.

SHOEB, E. *et al.* Classification and industrial applications of biosurfactants. **Academic Research International**, v. 4, n. 3, p. 243–252, 2013.

SILVA, N. R. A. *et al.* Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377–95, jan. 2014.

SENA, H. H. **Produção de biosurfactantes por fungos Isolados da Floresta Amazônica**. [Dissertação de Mestrado] Universidade Federal do Amazonas, 2014.

SOBRINHO, H. B. S. *et al.* Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912–917, set. 2008.

ULLAH, I. *et al.* Surface, aggregation properties and antimicrobial activity of four novel thiourea-based non-ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 464, p. 104–109, jan. 2015.

VARADAVENKATESAN, T.; MURTY, V. R. Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus* sp. and its applicability to enhanced oil recovery. **ISRN microbiology**, v. 2013, p. 621519, jan. 2013.

VAZ, D. A. *et al.* Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 89, p. 167–74, 1 jan. 2012.

VELIOGLU, Z.; UREK, R. O. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, p. 160–166, 2015.

VELIOGLU, Z.; OZTURK UREK, R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 526–31, nov. 2015.

WAGHMODE, S. *et al.* Low cost production of biosurfactant from different substrates and their comparative study with commercially available chemical surfactant. **International Journal of Scientific & Technology research**, v. 3, n. 3, p. 146–149, 2014.

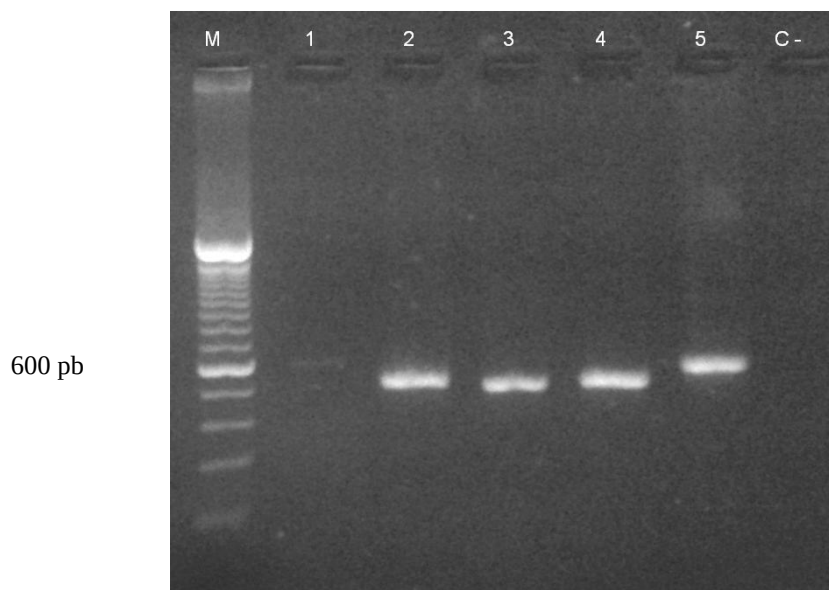
WHITE, D. A; HIRD, L. C.; ALI, S. T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 3, p. 744–55, set. 2013.

WHITE, T. . *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. p. 315–322. 1990.

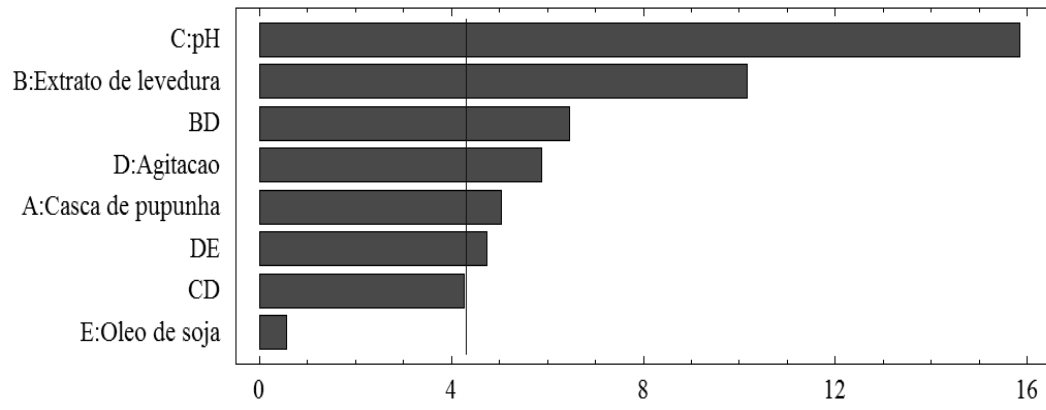
YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; MCINERNEY, M. J. Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 7690–5, dez. 2005.

YUYAMA, L. K. O. *et al.* **Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) quais os constiuintes nutricionais?** 8º Congresso Nacional da SBAN-Nutrição e Alimentação na Era Pós Genoma. **Anais**.2005 .

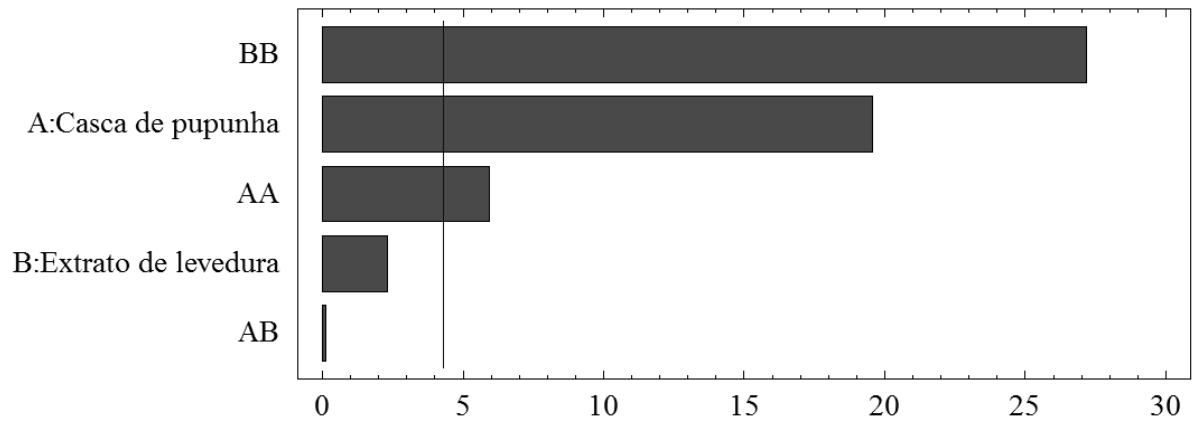
APÊNDICE A – Perfil de bandas correspondentes a região ITS1/ITS4 em gel de eletroforese (100A/100V por 25 min) após purificação dos amplicons. Marcador de pares de bases (M); 1) *Penicillium* 8 - 2CC; 2) *Fusarium* 85 - 2RV34; 3) *Fusarium* 86 - 2LV27; 4) *Fusarium* 87 - 2LIVI; 5) *Trichoderma* 91 - 2BVR31 e Controle negativo.



APÊNDICE B — Diagrama de Pareto padronizado dos efeitos para o índice de emulsificação (E24%). O ponto em que os efeitos foram significativos ($p < 0,05$) está indicado pela linha vertical.



APÊNDICE C – Diagrama de Pareto padronizado dos efeitos para o índice de emulsificação (E24%). O ponto em que os efeitos foram significativos ($p < 0,05$) está indicado pela linha vertical



APÊNDICE D – Emulsificação de um dos fungos estudados durante a cinética de produção de biossurfactante.

