



LUCAS VIEIRA DE FARIA

**IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS DE
ISOLADOS DE *Aspergillus* SEÇÃO *Nigri* E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES**

LAVRAS - MG

2015

LUCAS VIEIRA DE FARIA

**IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS DE ISOLADOS DE *Aspergillus*
SEÇÃO *Nigri* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza

Coorientador

Dr. Cledir Rodrigues Santos

LAVRAS - MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Faria, Lucas Vieira de.

Identificação por Maldi-Tof MS de isolados de *Aspergillus* seção
Nigri e avaliação do potencial biotecnológico na produção de
biossurfactantes / Lucas Vieira de Faria. – Lavras : UFLA, 2015.
92 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientadora: Sara Maria Chalfoun de Souza.

Bibliografia.

1. Identificação fúngica. 2. Emulsificante. 3. Biossurfactante. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LUCAS VIEIRA DE FARIA

**IDENTIFICAÇÃO POR MALDI-TOF MS DE ISOLADOS DE *Aspergillus*
SEÇÃO *Nigri* E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de agosto de 2015.

Dr. Cledir Rodrigues Santos UFRO
Dr. Pascoal José Gaspar Júnior UNIFOR - MG

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza
Orientadora

LAVRAS - MG
2015

A Deus;

Aos meus pais, Rosa e Ronaldo;

À minha irmã, Júlia;

Aos amigos que fizeram parte desta jornada;

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e esperança; a Jesus Cristo pela força para encarar esta jornada e cumpri-la e a Maria pelo consolo e alento durante toda esta jornada.

Aos meus pais, Ronaldo e Rosilene, a minha irmã, Júlia e também a Tia Silvia, pelo carinho, pelo incentivo, amor e paciência. Amo vocês!

As minhas primas Kelly e Ana Cristina, pelo apoio no início do mestrado.

A todos os meus tios, tias, primos e primas, obrigado pelo amor de vocês.

As minhas avós, Vó Lia e Vó Linha, que de longe me observam e me abençoam, assim como minha Tia Beth e meus avôs.

À família em Lavras: Dayana, Bruno, Gabriel, Fernando, Hercílio, Pedro, Bebel, Gui, Caio, obrigado por estarem sempre por perto.

Aos amigos que fizeram parte desta jornada: Fatinha, Raizera, Quênia, Haroldo, Thiago, Manu, Josi, Ju, Carol, Carol Colela, Roberta, Tenille, Emanuelle, Nádia, Dayana, Gustavo, Suemis, Anielli, João Pedro, João Luiz, Paulinho, Rose.

A minha orientadora, Dra. Sara Chalfoun, pela orientação e apoio.

Ao meu coorientador, Dr. Cledir Santos, por toda ajuda e suporte.

Ao Dr. Pascoal, pela amizade e incentivo.

A Dayane e ao Márcio, pela ajuda nas análises estatísticas e a Luciana, pela ajuda com as análises reológicas.

À UFLA e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte.

Ao meu cachorro, Hunter e meus violões, por me desestressarem
sempre;

O meu sincero obrigado!

“Tudo posso naquele que me fortalece...” (Filipenses 4:13)

RESUMO GERAL

As espécies pertencentes à Seção *Nigri* formam um subgrupo do gênero *Aspergillus* e são cosmopolitas. Várias espécies desta Seção são utilizadas na indústria alimentícia e indústrias de fermentação, *A. niger* é a espécie desta Seção reportada mais frequentemente, possui “Status” GRAS. Porém esta seção é considerada por muitos taxonomistas como uma das mais difíceis de identificação devido à alta diversidade genética. Surfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam em uma mesma molécula duas porções: uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica e os biossurfactantes que são um grupo de diversas moléculas, produzidas por diferentes microrganismos, classificadas principalmente pela estrutura química e origem microbiana. Os objetivos deste trabalho foram identificar 32 isolados fúngicos de *Aspergillus* Seção *Nigri* através da técnica de MALDI-TOF MS e testar o potencial produtor de biossurfactantes de três isolados de *Aspergillus niger* tendo a bactéria *Bacillus subtilis* CCMA 0087 como controle. Foram testadas três diferentes metodologias de extração de proteínas por MALDI-TOF MS e estas foram comparadas quanto ao seu agrupamento por dendogramas. Os resultados demonstraram que o agrupamento pode variar com a metodologia. Com relação ao potencial produtor de biossurfactantes, estes foram testados para índice de emulsão, observando diversos aspectos para o favorecimento deste, análises reológicas e também um estudo de fitotoxicidade dos extratos em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) Os resultados sugerem que o isolado *B. subtilis* CCMA 0087 produziu mais emulsificantes, seguido pelo isolado *A. niger* 100. A presença de indutor favorece a produção do emulsificante, assim como os pH 5,0 e 7,0 e dia 1 apresentou melhores dados. Os extratos não diferiram nos parâmetros reológicos e todos se apresentaram fitotóxicos.

Palavras-chave: Identificação fúngica. Emulsificante. Biossurfactante.

GENERAL ABSTRACT

Species belonging to section *Nigri* form a subgroup of genus *Aspergillus*, and are cosmopolitan. Many species of this section are used in food and fermentation industries, being *A. niger* the most reported, presenting GRAS status. However, this section is considered by many taxonomists as one of the most difficult to identify due to high genetic variability. Surfactants are amphipathic molecules that present two portions in the same molecule: a hydrophilic portion and a hydrophobic portion. Biosurfactants are a group of many molecules produced by different microorganisms and mainly classified by chemical structure and microbial origin. The objectives of this work were to identify 32 *Aspergillus* section *Nigri* fungal isolates by means of the MALDI-TOF MS technique, and test the biosurfactant production capacity of three *Aspergillus niger* isolates, using bacteria *Bacillus subtilis* CCMA 0087 as control. We tested three different protein extraction methodologies by MALDI-TOF MS, comparing them by means of grouping in dendrograms. The results showed that the grouping could vary depending on the methodology used. Regarding biosurfactant production capacity, the fungi isolates were tested to obtain the emulsification index, considering many aspects for its favoring, rheological analyses and a phytotoxicity study of lettuce seed extracts (*Lactuca sativa* L.). The results suggest that isolate *B. subtilis* CCMA 0087 produced the most emulsifiers, and pH 5.0 and 7.0, as well as day 1 presented the best data. The extracts did not differ for rheological parameters, and all were phytotoxic.

Keywords: Fungal identification. Emulsifier. Biosurfactant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1 Princípios da tecnologia de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF MS) 18
- Figura 2 Dendograma dos isolados agrupados por extração por protocolo padrão (etanol: ácido trifluoracético: acetonitrila) 24
- Figura 3 Dendograma dos isolados agrupados por extração por sonicação 25
- Figura 4 Dendograma dos isolados agrupados por extração por sonicação com *glass beads* 26

CAPÍTULO 2

- Figura 1 Esquema didático sobre a molécula de surfactante e seu agrupamento em micelas 41
- Figura 2 Estrutura química de alguns biossurfactantes 46
- Figura 3 Estrutura química da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* 51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Resumo da análise de variância conjunta referente ao índice de emulsificação (IE).....	59
Tabela 2	Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados	60
Tabela 3	Valores médios referentes aos índices de emulsificação na presença e ausência de indutor	61
Tabela 4	Valores médios referentes ao índice de emulsificação ao longo dos seis dias	62
Tabela 5	Valores médios referentes à produção de emulsificantes nos diferentes pH.....	63
Tabela 6	Análise de variância referente à interação isolado: indutor	65
Tabela 7	Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentado pelos isolados em presença do indutor	65
Tabela 8	Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados em presença do indutor nos diferentes dias	66
Tabela 9	Valores médios referentes ao índice de emulsificação apresentados pelos isolados em presença do indutor e em diferentes índices de pH.....	66
Tabela 10	Resumo da análise de variância da interação isolado: dia 1	67
Tabela 11	Resumo da análise de variância da interação isolado: dia 2	67
Tabela 12	Resumo da análise de variância referente a interação isolado: dia 3	68

Tabela 13	Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em presença do indutor no terceiro dia de avaliação.....	68
Tabela 14	Resumo da análise de variância referente à interação isolado: dia 4.....	69
Tabela 15	Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em presença do indutor no quarto dia de avaliação	69
Tabela 16	Resumo da análise de variância referente à interação isolado:dia 5.....	70
Tabela 17	Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em presença do indutor no quinto dia de avaliação	70
Tabela 18	Resumo da análise de variância referente à interação isolado: dia 6.....	71
Tabela 19	Análise variância referente à interação da ausência de indutor com aos isolados	71
Tabela 20	Análise de variância referente ao parâmetro reológico viscosidade.....	74
Tabela 21	Valores médios referentes ao parâmetro reológico viscosidade para os diferentes tratamentos.....	75
Tabela 22	Resumo da análise de variância referente ao parâmetro reológico tixotropia	76
Tabela 23	Valores médios referentes ao parâmetro tixotropia para os diferentes tratamentos.....	77
Tabela 24	Valores referentes ao teste de fitotoxicidade com 2 mL de extrato em sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface) nos	

	quesitos germinação, tamanho da raiz e índice de germinação (IE) para os diferentes tratamentos.....	78
Tabela 25	Valores médios referentes à germinação e tamanho da raiz de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. (alface) tratada com 2 mL dos extratos brutos.....	82

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	MALDI-TOF MS	17
2.2	Aspergillus Seção <i>Nigri</i>	19
3	METODOLOGIA	21
3.1	Cultivo de microrganismos	21
3.2	MALDI-TOF MS	21
3.2.1	Análise proteica das células fúngicas	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Extração de proteínas	23
4.1.1	Dendograma formado pela extração de proteínas	23
4.1.2	Dendograma formado pela extração de proteínas por sonicação ..	24
4.1.3	Dendograma formado pela extração de proteínas por sonicação com <i>glass beads</i>	25
4.2	Comparação entre os dendogramas	26
5	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	CAPÍTULO 2 Avaliação do potencial produtor de biossurfactantes de isolados de <i>Aspergillus niger</i>	36
1	INTRODUÇÃO	38
2	REFERENCIAL TEÓRICO	40
2.1	Fungos	40
2.2	Surfactantes	41
2.3	Biossurfactantes	43
2.3.1	Classificação dos biossurfactantes	45
2.3.2	Aplicação dos biossurfactantes	47
2.4	Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos	48
2.5	<i>Aspergillus niger</i>	50
2.6	<i>Bacillus subtilis</i>	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	Microrganismos	53
3.2	Preparo do inóculo para a fermentação	53
3.3	Preparo do meio de fermentação	54
3.4	Fermentação	54
3.5	Extração do biossurfactante	54
3.6	Variação de pH	54
3.7	Determinação do índice de emulsificação	54
3.8	Teste de fitotoxicidade	55

3.9	Reologia	56
3.10	Análise estatística	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Potencial de produção de biossurfactantes	58
4.1.1	Índice de emulsificação	58
4.1.2	Reologia	72
4.2	Teste de fitotoxicidade	77
5	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	84

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

As espécies pertencentes à Seção *Nigri* formam um subgrupo do gênero *Aspergillus* e são cosmopolitas, podendo se desenvolver em uma vasta variedade de substratos. Várias espécies desta Seção são utilizadas na indústria alimentícia e indústrias de fermentação de diferentes ácidos orgânicos e enzimas hidrolíticas. *A. niger* é a espécie desta Seção reportada mais frequentemente, possui “Status” GRAS (“Generally Regarded as Safe”) pela “Food And Drug Administration” e é amplamente utilizada em processos biotecnológicos (ABARCA et al., 2004).

Até a década de 90, a caracterização e identificação das espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* eram realizadas considerando-se apenas caracteres morfológicos como: cor e textura das colônias, diâmetro, tamanho e ornamentação do conídio e estrutura do conidióforo. Esta seção é considerada por muitos taxonomistas como uma das mais difíceis de identificar devido à alta diversidade genética, o que dificulta a identificação baseada unicamente em caracteres morfológicos (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; KLICH, 2002; NOONIM et al., 2008; SAMSON et al., 2007; SOMMA; PERRONE; LOGRIECO, 2012; VARGA et al., 2011).

Sendo assim, vários pesquisadores têm relatado a importância de uma abordagem polifásica, ou seja, a combinação de diferentes ferramentas de identificação, como por exemplo, características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, na delimitação de espécie do gênero *Aspergillus* (SAMSON; VARGA, 2009; SØRENSEN et al., 2011). A técnica do MALDI-TOF MS (Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser Tempo-de-Voo/Espectrômetro de Massa) é uma ferramenta despontante que vem sendo

utilizada na identificação de fungos (SANTOS et al., 2010; SIMÕES et al., 2013). Estudos embasados na técnica do MALDI-TOF MS têm demonstrado o potencial desta nova abordagem capaz de discriminar espécies fortemente relacionadas de forma rápida e precisa em condições bem definidas (KALLOW et al., 2006; QIAN et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi identificar isolados fúngicos de *Aspergillus* Seção *Nigri* através da técnica de MALDI-TOF MS, comparando três metodologias diferentes de extração de proteínas e comparando seus dendogramas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MALDI-TOF MS

A utilização da espectrometria de massa (MS) como forma de identificação de microrganismos se iniciou nos anos 1970, mas o grande impulso para a evolução da tecnologia foi dado por Tanaka et al. (1988). Estes pesquisadores conseguiram ionizar grandes moléculas por laser, utilizando uma matriz composta por partículas de cobalto e glicerol. Previamente não era possível ionizar moléculas não voláteis ou de grande peso molecular (ANHALT; FENSELAU, 1975; TANAKA et al., 1988).

A matriz foi um componente chave para o desenvolvimento da tecnologia. Ela possui quatro utilidades: 1) ajuda a romper as células e extrair as proteínas, por ser de natureza ácida; 2) separa as moléculas de proteínas que são aderidas; 3) absorve a energia do laser e provoca a dessorção das moléculas (extração da placa sólida onde estão aderidas para o estado gasoso) e 4) doação de H^+ para as moléculas que passam a ser íons de carga positiva (TANAKA et al., 1988).

O termo MALDI deriva-se da língua inglesa: *Mass Assisted Laser Desorption/Ionization*, ou seja, dessorção/ionização por laser assistido por matriz. Os equipamentos de MS apresentam variados analisadores que separam os íons de diferentes pesos/massas. Entre tais analisadores/separadores de íons, há aqueles que diferenciam os pesos/massas pelo tempo de voo destas moléculas em tubo de vácuo (TOF: *time of flight*).

A matriz absorve a energia do laser, ocorrendo assim a evaporação da amostra com a formação de íons com massas diferentes. Estes íons formados, apresentando carga +1, são acelerados sob a influência do campo elétrico de carga positiva para dentro de um tubo de voo, no qual se encontra em sua

extremidade o detector. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. O espectro de massa (EM) da amostra é formado pela soma dos íons analisados. A relação massa/carga corresponde ao eixo das abscissas. Já a intensidade do sinal encontra-se no eixo das ordenadas, que é proporcional à quantidade de íons de mesma massa (CARBONELLE; NASSIF, 2011).

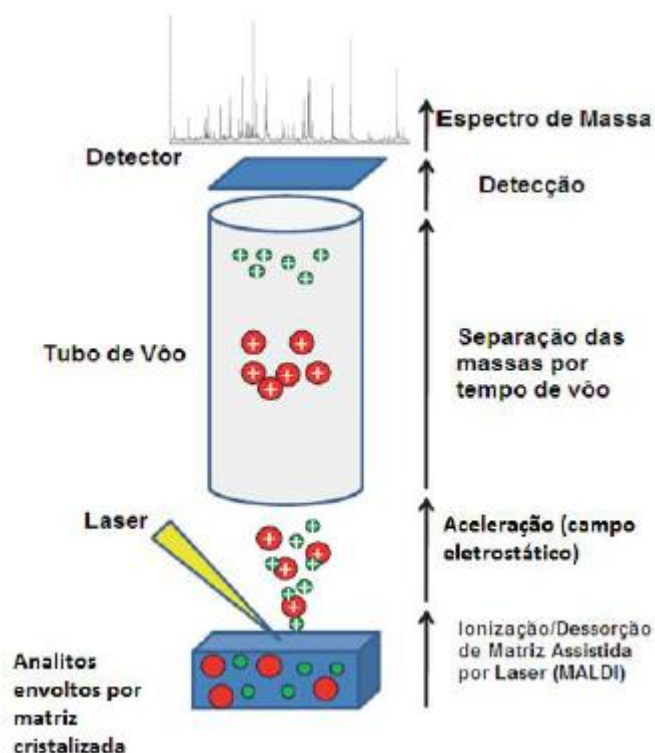


Figura 1 Princípios da tecnologia de espectrometria de massas por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF MS)

Fonte: Croxatto, Prod'Hom e Greub (2012).

Quando se compara a tecnologia MALDI-TOF MS com outras técnicas laboratoriais para identificação de microrganismos, a principal vantagem dessa

tecnologia é a agilidade para obtenção dos resultados. Entre o preparo do depósito e a leitura final, um resultado isolado pode ser obtido em menos de 30 minutos (CROXATTO; PROD'HOM; GREUB, 2012).

2.2 Aspergillus Seção *Nigri*

As espécies de *Aspergillus* presentes na seção *Nigri* estão entre as mais importantes dentro do gênero *Aspergillus*, pois esta seção abriga espécies de grande interesse biotecnológico que são utilizadas na produção industrial de alimentos e de produtos farmacêuticos devido ao rico perfil enzimático. São utilizadas em diversos setores industriais, bem como na produção de ácidos orgânico, cítrico e glucônico, dentre outros e utilizados industrialmente como fonte de enzimas extracelulares: amilase, catalase, celulase, glucoamilase, lipase, pectinase, protease, xilanase e fitase. (MINAFRA et al., 2010; PANDEY et al., 1999, 2005; PARIZA; JOHNSON, 2001; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011; SINGH; SINGH; BISHNOI, 2009).

Raper e Fennell (1965) fizeram um dos trabalhos mais completos sobre fungos do gênero *Aspergillus*, agrupando os fungos que possuíam conídios negros em um grupo à parte, conhecido como Seção *Nigri* (ABARCA et al., 2004). Algumas das marcantes características deste grupo são: a coloração dos conídios que pode variar de marrom-escuro a preto, possuem conidióforos que podem ser uni ou bisseriados e vesículas esféricas (KLICH, 2002; PERRONE et al., 2007).

As espécies de *Aspergillus* seção *Nigri* são as mais geralmente relacionadas com contaminantes de uvas e seus derivados. Entre as espécies, *A. carbonarius* é reconhecido principalmente por ser um dos maiores produtores de ocratoxina A, sendo encontrado principalmente em uvas, vinhos e cafés

(MITIDIERI et al., 2002; NOOMIN et al., 2008; SERRA, 2005; SERRA et al., 2003; SPADARO et al., 2010).

As técnicas de biologia molecular vêm sendo muito utilizadas atualmente, pois permitem a identificação das espécies em alguns dias ou apenas algumas horas (FUNGARO; SARTORI, 2009). É recomendada para a identificação das espécies da Seção *Nigri* a abordagem polifásica, em que vários caracteres (microscopia, perfil metabólico, métodos moleculares) são utilizados. O perfil genético desta seção vem sendo estudado intensivamente e, pelo fato da alta diversidade deste grupo, a classificação destas espécies torna-se ainda mais complexa (NIELSEN et al., 2009).

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo de microrganismos

Os fungos foram cedidos da coleção de fungos da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Lavras – MG e foram cultivados em meio MEA (extrato de malte 20,0 g/L; peptona 1,0 g/L; glicose 30 g/L; ágar 20,0 g/L; água destilada 1 L) e incubados a temperatura de 28 °C durante 48 horas.

3.2 MALDI-TOF MS

Um total de 33 isolados fúngicos, previamente identificados por técnicas de identificação polifásica, foram identificados usando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™).

A cepa *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS seguindo metodologia descrita por Lima-Neto et al. (2014). As células foram cultivadas em meio ágar Luria-Bertani (LB) e incubadas a 35 °C por 18 horas.

3.2.1 Análise proteica das células fúngicas

Os fungos foram crescidos em até 48 h e uma pequena amostra foi retirada e transferida para um eppendorf, contendo 6 mL da solução orgânica (água/acetonitrila/ácido trifluoroacético [50:47.5:2.5]) e homogeneizada em vórtex por 1 min. Em seguida, 0,7 mL desta suspensão foi transferida para a placa de aço inox do MALDI, e adicionado 1 mL da solução matriz de MALDI

(75 mg/mL de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético). Essa mistura foi seca ao ar à temperatura ambiente e a análise foi realizada em um sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata, para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Por fim, os espectros no intervalo de massa m/z = 2.000 a 20.000 foram obtidos e analisados no *software* Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) (LIMA-NETO et al., 2014).

Também foi utilizada a metodologia com sonicação, em que os eppendorfs, contendo uma amostra do isolado com solução orgânica, foram sonicados por 15 min a 22 °C, sendo após vortexados e feita a placa. Também foi testada a metodologia Sonicado + *Glass Beads*, em que esferas de vidro com aproximadamente 0,1 mm foram colocadas dentro do eppendorf contendo a amostra do isolado com a solução orgânica e sonicados por 30 min a 22 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de proteínas

Um dendograma de relação filogenética foi formado pelo programa Biotyper 3.0 (Bruker).

4.1.1 Dendograma formado pela extração de proteínas

Na análise de fungos por MALDI-TOF MS, são analisadas as moléculas de proteínas ribossomais e estruturais, que possuem massa molecular variando de 2.000 a 20.000 Da, sendo o modo linear o mais adequado para esse tipo de análise (MAIER et al., 2006).

O seguinte dendograma foi formado pela extração de proteínas e agrupamento de 32 isolados de *Aspergillus* Seção *Nigri*.

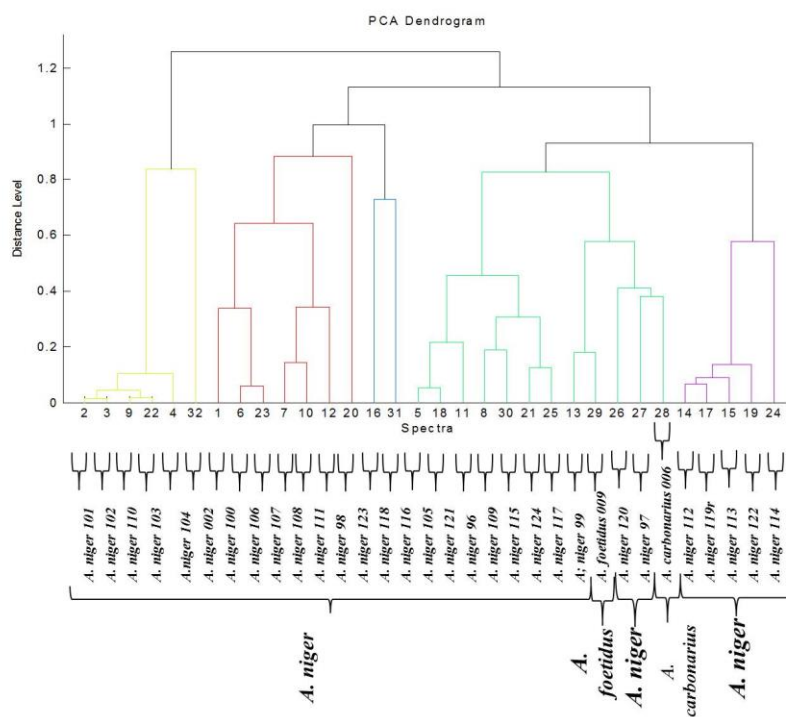


Figura 2 Dendrograma dos isolados agrupados por extração por protocolo padrão (etanol: ácido trifluoracético: acetonitrila)

Pode-se observar que as primeiras 23 posições são ocupadas por isolados de *Aspergillus niger*, sendo a 24^a posição ocupada por *A. foetidus*, a 25^a e 26^a posições, novamente por *Aspergillus niger*, a 27^a posição ocupada por *A. carbonarius* e as demais posições por *A. niger*.

4.1.2 Dendrograma formado pela extração de proteínas por sonicação

O seguinte dendrograma foi formado através do agrupamento de proteínas extraídas com o método de sonicação.

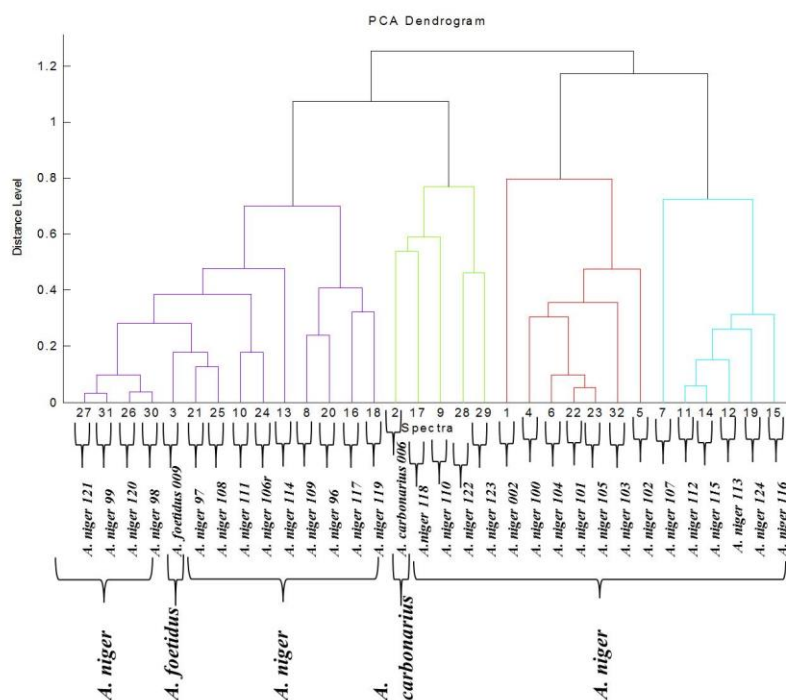


Figura 3 Dendrograma dos isolados agrupados por extração por sonicação

Pode-se observar pelo dendrograma formado que as quatro primeiras posições são ocupadas por isolados de *A. niger*, sendo a quinta posição ocupada por *A. foetidus*. Segue-se mais nove posições ocupadas por *A. niger* até termos a 15^a posição ocupada por *A. carbonarius*. As outras 17 posições restantes são ocupadas por *Aspergillus niger*.

4.1.3 Dendrograma formado pela extração de proteínas por sonicação com *glass beads*

O seguinte dendrograma foi formado pelo agrupamento de proteínas extraídas com o método de sonicação com *glass beads*.

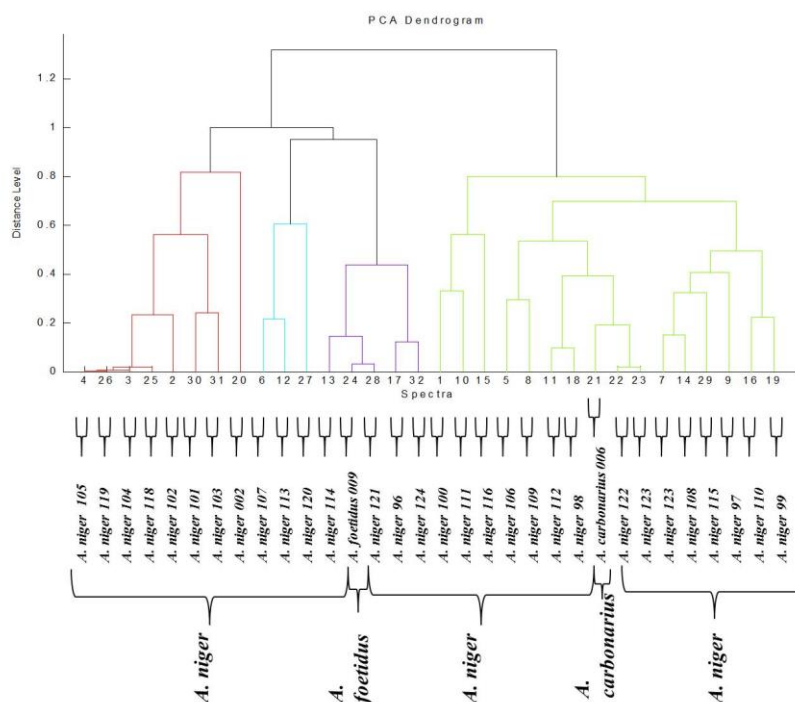


Figura 4 Dendrograma dos isolados agrupados por extração por sonicção com *glass beads*

Tem-se nesse dendrograma que as 12 posições iniciais são ocupadas por isolados do fungo *Aspergillus niger*, sendo a 13^a posição ocupada por *A. foetidus*. Seguindo o dendrograma, as seguintes 10 posições também são ocupadas por isolados de *A. niger*, para se ter na 24^a posição o fungo *A. carbonarius*, finalizando com as oito últimas posições de isolados de *A. niger*.

4.2 Comparação entre os dendogramas

Faz-se observável que, em cada um dos dendogramas apresentados, os fungos adquirem uma posição diferente, de acordo com a metodologia de extração de proteínas utilizada.

Tem-se que, no dendograma no qual se utiliza a metodologia de extração sem o uso de sonicação e/ou *glass beads*, *Aspergillus foetidus* ocupa a 24ª posição, enquanto que na metodologia de extração por sonicação este fungo ocupa a quinta posição e na metodologia de extração de proteínas por sonicação com *glass beads* ocupa a 13ª posição.

O mesmo ocorre com o isolado fúngico *Aspergillus carbonarius*, no qual, pela metodologia de extração de proteínas sem a utilização de sonicação e/ou *glass beads*, se apresenta na 27ª ocupação, já com a metodologia de extração de proteínas por sonicação, ocupa a posição de número 15, sendo que na metodologia de extração de proteínas por sonicação com *glass beads*, aparece na 24ª posição.

Isso pode ocorrer devido ao fato de o preparo da amostra afetar diferentes proteínas ou afetar as proteínas de diferentes formas, tornando assim variável o agrupamento de isolados.

Mesmo tendo conhecimento sobre o assunto, a identificação de algumas Seções pode ser muito complexa pelo grande número de espécies que estão estreitamente relacionadas, como é o caso da Seção *Nigri*. Tem-se, como exemplo, as espécies de *A. niger stricto sensu*, *brasiliensis*, *A. foetidus* e *A. tubingensis* sendo morfológicamente idênticas. Por este fato, são classificadas como *A. niger* Agregado (CABAÑES et al., 2002; PARENICOVÁ et al., 2001). Devido à dificuldade no processo de identificação, o potencial toxigênico dentro do grupo *A. niger* Agregado é incerto, com exceção da espécie *A. niger stricto sensu* (FERRACIN et al., 2009).

Devido ao fato de alguns produtos obtidos a partir de *Aspergillus niger* possuírem a categoria GRAS da FDA, sendo, portanto considerados como seguro e utilizados em quantidades significativas como aditivos alimentares, faz-se necessário a sua identificação quanto ao potencial toxigênico. Recentemente, foi descoberto que além da ocratoxina, espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri*

produzem outro tipo de micotoxina, a fumonisina (ABARCA et al., 2004; FRISVAD et al., 2007; MOGENSEN et al., 2010).

Maciel (2013) testou 93 linhagens de *Aspergillus* Seção *Nigri* e obteve dados de que aproximadamente 23% e 9% foram caracterizadas como produtoras de ocratoxina A (OTA) e fumonisina B2, respectivamente. Onze linhagens (em torno de 20%) de toda população de *A. niger* foram caracterizadas como produtoras de OTA. Todas as suas linhagens de *A. carbonarius* avaliadas foram consideradas produtoras de OTA.

Desse modo, a técnica do MALDI-TOF MS tem sido adotada de forma a gerar um espectro característico para cada espécie de fungo, a fim de se identificar os produtores de toxinas, evitando contaminações. Atualmente, perfis proteômicos gerados por MALDI-TOF MS têm sido utilizados como um importante passo na identificação polifásica de fungos filamentosos isolados a partir de diferentes campos (DIAS et al., 2011; PASSARINI et al., 2013; PEREIRA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2011; SANTOS et al., 2010, 2011).

5 CONCLUSÃO

A metodologia de preparo das amostras para leitura no equipamento MALDI-TOF MS faz com que o agrupamento dos espectros em dendogramas varie. Portanto, o uso da técnica MALDI-TOF MS deve ser complementada com outras abordagens polifásicas.

REFERÊNCIAS

ABARCA, M. L. et al. Taxonomy and significance of black *Aspergilli*. **Antoine Van Leuwnhoek**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 33-49, Aug. 2004.

ANHALT, J. P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 47, p. 219-225, 1975.

CABAÑES, F. J. et al. What is the source of ochratoxin A in wine? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 2013-2015, Dec. 2002.

CARBONELLE, E.; NASSIF, X. Application of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. **Medical Sciences**, Paris, v. 10, p. 882-888, Oct. 2011.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grape and dried vine fruits in South America. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1, p. 5-9, Sept. 2006. Supplement.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 36, n. 2, p. 380-407, Mar. 2012.

DESAI, J. D., BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, n. 1, p. 47-64, Mar. 1997.

DIAS, N. et al. Toenail onychomycosis in a Portuguese geriatric population. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 172, n. 1, p. 55-61, July 2011.

FATHABAD, E. G. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**, New York, v. 1, p. 58-69, Sept. 2010.

FERRACIN, L. M. et al. Genetic relationships among strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 241-248, Nov. 2009. Special issue.

FRISVAD, J. C. et al. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 23, p. 9727-9732, Oct. 2007.

FUNGARO, M. H.; SARTORI, D. An overview on molecular markers for detection of ochratoxigenic fungi in coffee beans. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1-9, 2009. Special issue.

KALLOW, W. et al. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* characterised by MALDI-TOF MS. In: INTERNATIONAL MYCOLOGICAL CONGRESS, 8., 2006, Bologna. **Proceedings...** Bologna: Medimond, 2006. p. 189-193.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, Jan./Feb. 2002a.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002b. 116 p.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolate culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

MACIEL, M. H. C. **Abordagem polifásica para identificação de linhagens de *Aspergillus* seção *Nigri* preservadas na micoteca URM e caracterização quanto a produção e purificação de poligalacturonases**. 2013. 151 p. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MAIER, T. et al. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. **Nature Methods**, London, v. 3, Mar. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/nmeth/journal/v3/n4/abs/nmeth870.html>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

MINAFRA, C. S. et al. Perfil bioquímico do soro de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com alfa-amilase de *Cryptococcus flavus* e *Aspergillus niger*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, n. 12, p. 2691-2696, dez. 2010.

MITIDIERI, S. et al. Detergentes biológicos biodegradáveis: avaliação das formulações do mercado. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 26, p. 56-60, maio/jun. 2002.

MOGENSEN, J. M et al. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 2, p. 954-958, Dec. 2010.

NIELSEN, K. F. et al. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 395, n. 5, p. 1225-1242, Nov. 2009.

NOONIM, P. et al. Two new species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 58, p. 1727-1734, Nov. 2008.

PANDEY, A. et al. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech, 2005. 760 p.

PANDEY, A. et al. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Columbus, v. 77, n. 1, p. 149-161, July 1999.

PARENICOVÁ, L. et al. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 521-527, Feb. 2001.

PARIZA, M. W.; JOHNSON, E. A. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 33, n. 2, p. 173-186, 2001.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drummacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 195, n. 2, p. 99-111, Feb. 2013.

PEREIRA, L. et al. The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 32, n. 1, p. 11-17, ene. 2014.

PERRONE, G. et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 59, n. 1, p. 53-66, Dec. 2007.

QIAN, J. et al. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 392, n. 3, p. 439-449, Oct. 2008.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965. 686 p.

RODRIGUES, P. et al. Species identification of *Aspergillus* section *Flavi* isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 111, n. 4, p. 877-892, Oct. 2011.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. R. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, ago. 2011.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, London, v. 2011, p. 1-39, 2011.

SAMSON, R. A. et al. Diagnostic tools to identify black aspergilla. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 59, p. 129-145, 2007.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. S1-S8, 2009. Supplement.

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterizations by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 375-385, Feb. 2010.

SANTOS, C. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry (MALDI-TOFICMS) to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 71, n. 3, p. 304-308, Nov. 2011.

SERRA, R. et al. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 63-68, 2003.

SERRA, R. M. A. **Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A**. 2005. 330 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Lisboa, 2005.

SIMÕES, M. F. et al. Polyphasic identification and preservation of fungal diversity: concepts and applications. In: MALIK, A.; GROHMANN, E.; ALVES, M. (Ed.). **Management of microbial resources in the environment**. Wageningen: Springer, 2013. p. 91-117.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. **International Journal of Environmental Science and Engineering**, Oxford, v. 3, p. 322-325, 2009.

SOMMA, S.; PERRONE, G.; LOGRIECO, A. F. Diversity of black aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 1, p. 131-147, 2012.

SØRENSEN, A. et al. *Aspergillus saccharolyticus* sp. nov., a black *Aspergillus* species isolated in Denmark. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 61, n. 12, p. 3077-3083, Dec. 2011.

SPADARO, D. A. et al. Occurrence of ochratoxin a before bottling in DoC and DOCG wines produced in Piedmont (northern Italy). **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 9, p. 1294-1297, Sept. 2010.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analysis up to m/z 100 000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 20, p. 151-153, 1988.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 69, n. 1, p. 1-17, June 2011.

CAPÍTULO 2 Avaliação do potencial produtor de biossurfactantes de isolados de *Aspergillus niger*

RESUMO

Surfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam em uma mesma molécula duas porções: uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica. Surfactantes sintéticos são utilizados para uma vasta gama de propósitos, como emulsificação, solubilização, detergência e umidificação. Biossurfactante é um grupo de diversas moléculas produzidas por diferentes microrganismos, classificadas principalmente pela estrutura química e origem microbiana. A maioria dos trabalhos publicados sobre a síntese de biossurfactantes tem sido realizada com bactérias, sendo poucas as referências quanto ao emprego de fungos filamentosos. O objetivo deste trabalho foi testar o potencial produtor de biossurfactantes a partir de isolados de *A. niger*, utilizando *Bacillus subtilis* CCMA 0087 como controle. Os isolados fúngicos foram cultivados em BDA por sete dias a 28 °C e a bactéria em meio APGE por 24 horas a 30 °C. Foram avaliados dois meios fermentativos, sendo um meio com adição de 1% de uma mistura de hidrocarbonetos ao meio de cultura, a fim de ser utilizado como indutor de produção do surfactante. A concentração inicial do inóculo de microrganismos foi de 4×10^6 esporos/g de meio. Os cultivos foram realizados em *shaker* mantidos a 30 °C, com rotação de 120 rpm durante 144 horas. A obtenção do biossurfactante a partir dos extratos resultantes da fermentação foi feita por filtragem a vácuo. A determinação do índice de emulsificação foi realizada utilizando a metodologia descrita por Cooper e Goldberg (1987). As análises reológicas foram feitas com um valor de tensão fixo dentro do intervalo de viscoelasticidade linear. Varreduras de frequência de 1,0 a 10 Hz foram efetuadas a temperatura de 20 °C. Para a análise da tixotropia, foram aplicadas rampas de rotação variando-se a taxa de deformação. A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em um teste estático com base na germinação de sementes e alongamento de raiz de *Lactuca sativa* L (alface) seguindo os métodos descritos por Tiquia, Tam e Hodgkiss (1996). A bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 apresentou maior índice de emulsificação (51,03%), seguido pelo isolado *A. niger* 100 (50,25%). A presença de indutor favoreceu a produção do surfactante, assim como os pH 5,0 e 7,0 e estabilidade até o terceiro dia de produção dos isolados testados. Os extratos se apresentaram como fluidos newtonianos e não diferiram nos parâmetros reológicos para viscosidade e tixotropia e todos os extratos mostraram-se fitotóxicos.

Palavras-chave: Emulsificante. Reologia. Fitotoxicidade.

Evaluation of biosurfactant production capacity of *Aspergillus niger* isolates

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules that present two portions in a same molecule: a hydrophilic portion and a hydrophobic portion. Synthetic surfactants are used for a wide range of goals, such as emulsification, solubilization, detergency and humidification. Biosurfactants are a group of several molecules, produced by different microorganisms, and mainly classified by chemical structure and microbial origin. Most published works that concern the synthesis of biosurfactants have been conducted with bacteria, with little reference to works with filamentous fungi. The objective of this work was to test biosurfactant production capacity of *A. niger* isolates, using *Bacillus subtilis* CCMA 0087 as witness. The fungal isolates were cultivated in PDA for seven days at 28°C, and, the bacteria, in **AGPE** medium for 24 hours at 30°C. We evaluated two fermentation mediums, one of them with the addition of 1% of a mixture of hydrocarbons to the culture medium as indicator for the production of surfactant. The initial concentration of the microorganism inoculum was of 4×10^6 spores/g of medium. The cultivations were held in shakers maintained at 30°C, with rotation of 120 rpm, for 144 hours. We obtained the biosurfactants from the extracts resultant of the fermentation by means of vacuum filtration. The emulsification index was determined using methodology described by Cooper and Goldberg (1987). The rheological analyses were performed with a fixed tension value within the interval of linear viscoelasticity. Frequency scans of 1.0 to 10 Hz were performed at the temperature of 20°C. To analyze **thixotropy**, we applied rotation ramps varying the rotation rate. The phytotoxicity of the biosurfactants was evaluated in a static test based on seed germination and root lengthening of *Lactuca sativa* L. (lettuce), according to methods described by Tiquia et al. (1996). Bacteria *B. subtilis* CCMA 0087 presented higher emulsification index (51.03%), followed by *A. niger* 100 isolate (50.25%). The presence of inductor favored surfactant production, such as occurred with pH 5.0 and 7.0, and stability up until the third day of production by the tested isolates. The extracts were presented as Newtonian fluids, and did not differ in concerning the rheological parameters for viscosity and **thixotropy**. All extracts were shown to be phytotoxic.

Keywords: Emulsifier. Rheology. Phytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Surfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam em uma mesma molécula duas porções: uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica (DESAI; BANAT, 1997; FATHABAD, 2010). Surfactantes sintéticos são utilizados para uma vasta gama de propósitos, como emulsificação, solubilização, detergência e umidificação. O mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano (MUTHUSAMY et al., 2008), porém, estes compostos não são biodegradáveis, podendo ser tóxicos para o meio ambiente (DESAI; BANAT, 1997).

Biossurfactante é um grupo de diversas moléculas, produzidas por diferentes microrganismos, classificadas principalmente pela estrutura química e origem microbiana (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Biossurfactantes têm muitas aplicações ambientais, tais como biorremediação e dispersão de derramamentos de petróleo, uma melhor recuperação de petróleo e de transferência de petróleo bruto. Outras potenciais aplicações dos biossurfactantes relacionam-se com a alimentação, cosméticos e limpeza de químicos tóxicos de origem industrial e agrícola (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Porém, devido aos baixos rendimentos dos processos de produção e de recuperação e purificação, os biossurfactantes ainda não são competitivos em relação aos surfactantes químicos quanto à utilização em larga escala pelo alto custo (RODRIGUES, 2011).

Os fungos apresentam um grande potencial de aplicação nas diferentes áreas industriais, como alimentos, cosméticos e medicamentos (SUTHERLAND, 1998). Industrialmente, os fungos têm grande importância como fontes de lipases, pectinases e celulasas, pois as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares, o que facilita a sua extração do meio

fermentado e, também por serem considerados microrganismos seguros, para aplicação na indústria de alimentos, de bebidas e indústria farmacêutica (PINHEIRO, 2006).

A maioria dos trabalhos publicados tratando sobre a síntese de biossurfactantes tem sido realizada com bactérias, sendo poucas as referências quanto ao emprego de fungos filamentosos (LUNA-VELASCO et al., 2007). Os fungos filamentosos apresentam características que os classificam como bons degradadores de óleos. Devido ao seu crescimento micelial e sua bioatividade, os fungos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o por meio da secreção de enzimas extracelulares (MOLLEA; BOSCO; RUGGERI, 2005).

O objetivo deste trabalho foi testar o potencial produtor de isolados de *Aspergillus niger* visando à produção de biossurfactantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos

Os fungos são microrganismos eucariontes, heterotróficos, que obtêm sua energia pela degradação de moléculas orgânicas, ocupando variados nichos ecológicos, atuando como parasitas, saprófitas ou então estabelecendo relações simbióticas, por exemplo, com algas, formando os líquens (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000).

Fungos são organismos extremamente versáteis no que diz respeito às condições ambientais. Eles podem alterar suas atividades metabólicas em resposta às condições físicas e químicas de um ambiente (VASCONCELOS et al., 2003).

De acordo com Bravo et al. (2000) bactérias, leveduras e outros fungos têm despertado grande interesse de estudo nos últimos anos, em razão das inúmeras vantagens apresentadas, destacando: (1) Não há necessidade de grandes locais para seu crescimento e não dependem das condições atmosféricas; (2) Fatores de crescimento como pH, concentração de nutrientes, oxigênio e células podem ser facilmente manipulados; (3) Conseguem degradar e crescer em variados substratos, inclusive resíduos industriais, podendo estes serem aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada. Como consequência deste fato, tem-se o controle e a redução dos problemas causados por estes resíduos; (4) Possuem rápido crescimento em condições favoráveis, podendo, em relação aos fungos, a população dobrar em um intervalo de 4 a 12 horas, as leveduras de 1 a 3 horas e as bactérias de 0,5 a 2 horas e (5) Podem ser manipulados geneticamente para a obtenção de mutantes desejados.

Os fungos apresentam um grande potencial de aplicação nas diferentes áreas industriais, como alimentos, cosméticos e medicamentos (SUTHERLAND, 1998). Industrialmente, os fungos têm grande importância como fontes de lipases, pectinases e celulases, pois as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares, o que facilita a sua extração do meio fermentado e, também por serem considerados microrganismos seguros, para aplicação na indústria de alimentos, de bebidas e indústria farmacêutica (PINHEIRO, 2006).

2.2 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam em uma mesma molécula duas porções: uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica (DESAI; BANAT, 1997; FATHABAD, 2010). Essas moléculas anfipáticas reduzem a tensão superficial e interfacial através do acúmulo na interface de fluidos imiscíveis, fazendo assim a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou orgânicos aumentarem (SINGH; HAMME; WARD, 2007).

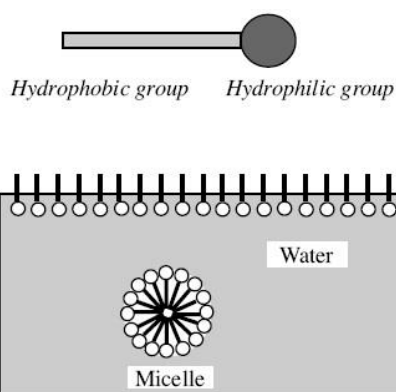


Figura 1 Esquema didático sobre a molécula de surfactante e seu agrupamento em micelas

Fonte: Fathabad (2010).

Usualmente a porção apolar é uma cadeia hidrocarbonada em vista que a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica¹. Pode-se citar como exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente os sais de amônio quaternário (catiônico) e ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos, que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos que apresentam baixa solubilidade em água (MULLIGAN; YOUNG; GIBBS, 2001).

Surfactantes sintéticos são utilizados para uma vasta gama de propósitos, como emulsificação, solubilização, detergentência e umidificação. Atualmente, o mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano (MUTHUSAMY et al., 2008).

Os surfactantes são utilizados tanto em escala doméstica quanto industrial, tornando-os assim uma importante classe de compostos químicos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Porém, estes compostos não são biodegradáveis, podendo então ser tóxicos para o meio ambiente (DESAI; BANAT, 1997).

Diversas metodologias analíticas têm sido utilizadas para monitorar as propriedades de emulsões, dentre as quais se destacam medidas de tensão superficial e interfacial, inspeção visual, análise do tamanho de partícula, determinação do potencial eletrocinético (potencial zeta) e cálculo do índice de separação do óleo da emulsão, recorrentes na maioria das publicações na área, usadas em conjunto ou isoladamente. Mais recentemente, a avaliação da reologia da emulsão também tem sido empregada com este fim, embora a correlação entre as propriedades reológicas e a estabilidade da emulsão ainda esteja longe de ser elucidada (MCCLEMENTS, 1999).

Grande parte dos surfactantes tem como base derivados de petróleo, porém avanços rápidos na biotecnologia e a crescente preocupação dos consumidores com a utilização de produtos que não agridem o meio ambiente têm aumentado a possibilidade do uso de surfactantes biológicos (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; DELEU; PAQUOT, 2004).

2.3 Biossurfactantes

Os biossurfactantes foram descobertos na década de 60 como compostos extracelulares anfifílicos em pesquisas de fermentações de hidrocarbonetos (COOPER; ZAJIC, 1980). Biossurfactante é um grupo de diversas moléculas estruturais, produzidas por diferentes microrganismos, classificadas principalmente pela sua estrutura química e origem microbiana (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). As classes principais incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI; DESAI, 1993).

Os biossurfactantes são classificados em dois grupos principais: os que reduzem a tensão superficial da interface ar/água, que são conhecidos como biossurfactantes e aqueles que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis, atuando também em interfaces sólido/líquido, os bioemulsificantes. De modo geral, os biossurfactantes também apresentam a capacidade de emulsificar, mas nem sempre os bioemulsificantes reduzem a tensão superficial (FREITAS et al., 2009).

A produção de biossurfactantes por diversos tipos de microrganismos vem sendo bastante estudada, indicando uma grande variedade de dados bem relevantes sobre a produção, tipo e suas propriedades (MUKHERJEE; DAS; SEM, 2006). Essas diferenças fazem com que um grupo de surfactantes tenha

vantagem em uma aplicação específica e outros sejam mais apropriados em outras aplicações (MATSUURA, 2004).

Os biossurfactantes apresentam uma estrutura comum: uma porção lipofílica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, podendo ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica, que pode ser um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato. A grande parte dos biossurfactantes são neutros, ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros (BOGNOLO, 1999; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Biossurfactantes têm muitas aplicações ambientais, tais como biorremediação e dispersão de derramamentos de petróleo, uma melhor recuperação de petróleo e de transferência de petróleo bruto. Outras potenciais aplicações dos biossurfactantes relacionam-se com a alimentação, cosméticos, indústria de cuidados com saúde e de limpeza de químicos tóxicos de origem industrial e agrícola (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

A fermentação submersa em relação à fermentação sólida é a técnica de fermentação mais relatada na literatura para a produção de biossurfactantes em virtude de variáveis como a homogeneidade do meio, o pH e a transferência de calor são mais facilmente controlados e devido à facilidade e simplicidade de operação (GEORGE et al., 1997).

Entretanto, os biossurfactantes ainda não são competitivos em relação aos surfactantes químicos quanto à utilização em larga escala pelo alto custo, devido aos baixos rendimentos dos processos de produção e de recuperação e purificação. A possibilidade de utilização de substratos baratos ou subutilizados pode diminuir drasticamente o custo da produção e, os resíduos orgânicos e industriais ou domésticos são apontados como possíveis substratos para a sua produção econômica (RODRIGUES, 2011).

2.3.1 Classificação dos biossurfactantes

Contrariamente aos surfactantes sintetizados quimicamente, que são classificados pela natureza do seu grupo polar, os biossurfactantes são classificados por sua composição química e também pela origem microbiana (FATHABAD, 2010).

Alguns autores preferem agrupar os biossurfactantes de acordo com seu peso molecular (BACH; BERDICHEVSKY; GUTNICK, 2003; RON; ROSENBERG, 2002). Os polímeros de alto peso se ligam fortemente às superfícies estabilizando emulsões óleo-água e água-óleo, já os biossurfactantes de peso molecular baixo reduzem a tensão superficial de forma eficiente (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

De acordo com Ron e Rosenberg (2002), os biossurfactantes com baixo peso molecular são em sua maioria glicolipídeos. Ramnolipídeo é um dos glicolipídeos mais bem estudados, sendo produzido por diversas espécies de *Pseudomonas*. Já os biossurfactantes, que apresentam alto peso molecular, têm ação dispersante, prevenindo a coalescência das gotas de óleo na água, sendo produzidos por um variado número de espécies de bactérias de diferentes gêneros. São compostos de polissacarídeos, lipopolissacarídeos, proteínas, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros.

Os surfactantes lipoprotéicos são reconhecidos por suas atividades antibióticas, sendo que os produzidos por *Bacillus* sp são melhores caracterizados, isso inclui surfactina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina bacilomicina e iturina. Esse composto se caracteriza pela existência de peptídios ligados a ácidos graxos, sendo que a porção proteica da molécula pode ser neutra ou aniônica (BARROS et al., 2007).

Surfactantes tipo ramnolipídeos, trehalolipídeos e lipopeptídeos são produzidos principalmente por bactérias, enquanto que leveduras produzem

soforolipídeos e manosileritritolipídeos. Já os fungos filamentosos produzem ácido ustilágico e manosileritritolipídeos (BOGNOLO, 1999).

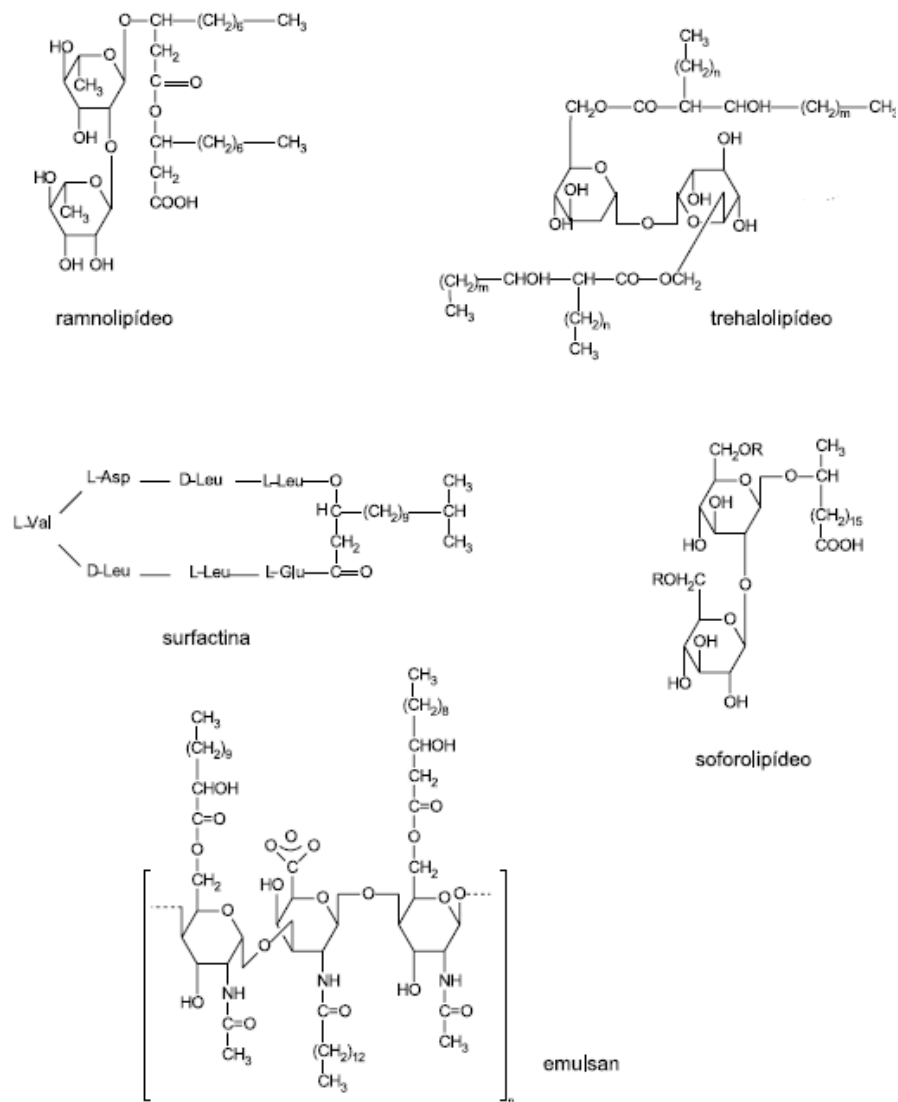


Figura 2 Estrutura química de alguns biosurfactantes

Fonte: Cameotra e Makkar (1998).

2.3.2 Aplicação dos biossurfactantes

A principal indústria que utiliza os biossurfactantes é a indústria petrolífera, que os incorpora em formulações de óleos lubrificantes e na produção de petróleo. Outras aplicações estão relacionadas à biorremediação, à dispersão no derramamento de óleos, à recuperação melhorada de petróleo (MEOR), à remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, às aplicações terapêuticas, à agricultura, mineração, aplicação em produtos de higiene e cosméticos e na indústria de alimentos (LIU et al., 2004; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono realizam a biorremediação de petróleo. Esses microrganismos são eficazes no processo de degradação de vários tipos de hidrocarbonetos – cadeia curta, cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (todos esses compostos possuem baixa solubilidade na água). Isto, aliado ao fato de que o primeiro passo na degradação de hidrocarbonetos envolve as oxigenases ligadas na membrana, torna essencial para a bactéria ter um contato direto com os hidrocarbonetos. A emulsificação desse hidrocarboneto é uma estratégia biológica para aumentar o contato entre a bactéria e o hidrocarboneto insolúvel na água. Dessa forma, não é surpreendente que a bactéria que cresce no petróleo seja geralmente um emulsificador potente. Esses surfactantes ajudam na dispersão do óleo, aumentam a área superficial para o crescimento e ajudam liberar a bactéria da gota de óleo após a sua utilização (MATSUURA, 2004; RON; ROSENBERG, 2002).

Na indústria de alimentos, utiliza-se os biotensoativos como emulsificantes no processamento de matérias-primas. A emulsificação realiza um importante papel na formação da consistência e texturas exatas, assim como na dispersão de fases creme, maionese, manteiga, molho de saladas, salsichas,

sorvetes, entre outros, são exemplos de emulsões em alimentos processados (ACCORSINI, 2010; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Na indústria de cosméticos, sua utilização deve-se às suas propriedades umectantes, baixo grau de irritação e compatibilidade com a pele, assim como as propriedades espumantes (MAIER; SOBERÓN-CHAVEZ, 2000).

Estudos comprovando sua atividade antimicrobiana abrem novos horizontes com relação a novas possibilidades de utilização comercial. Como por exemplo, no campo da medicina, visto que, além de possuírem elevada atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica alguns biossurfactantes podem atuar impedindo a fixação de agentes patógenos, tornando sua utilização interessante no tratamento de algumas doenças, atuando como agente terapêutico e probiótico (SINGH; CAMEOTRA, 2004).

2.4 Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos

A maioria dos trabalhos publicados tratando sobre a síntese de biossurfactantes tem sido realizada com bactérias, sendo poucas as referências quanto ao emprego de fungos filamentosos (LUNA-VELASCO et al., 2007). Conforme mencionado por Hewald, Josephs e Bolker (2005), a produção de glicolípídeos extracelulares, com propriedades biossurfactantes vem sendo detectada em algumas espécies de fungos filamentosos.

De acordo com Atagana, Haynes e Wallis (2006), fungos compõem um grupo de microrganismos atrativos e promissores para a investigação como agentes degradadores, uma vez que avaliações de fungos em escala de laboratório apresentam um potencial adequado para degradar Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) de alto peso molecular e outros compostos orgânicos recalcitrantes por meio de sistemas enzimáticos extracelulares.

Os fungos filamentosos apresentam características que os classificam como bons degradadores de petróleo. Devido ao seu crescimento micelial e sua bioatividade, os fungos ramificam-se rapidamente no substrato, digerindo-o por meio da secreção de enzimas extracelulares (MOLLEA; BOSCO; RUGGERI, 2005).

A produção de ácido ustilágico, uma classe de glicolipídios, foi descrita pela primeira vez em 1950, quando se observou a formação de um composto insolúvel com atividade antibiótica, produzido pelo fungo *Ustilago maydis* em cultura submersa. Foi isolado também do mesmo fungo outro glicolipídio extracelular, o manosil eritritol, com densidade maior que a da água (HASKINS, 1950; RODRIGUES, 2011).

Assim como as bactérias, fungos desempenham importante papel em biorremediações graças as suas características morfológicas, estratégias fisiológicas e reprodutivas, que contribuem na adaptação em ambientes contaminados. Com a otimização dos parâmetros ambientais, em conjunto com a seleção de cepas que apresentam rápido crescimento e altas taxas de sobrevivência em concentrações elevadas de contaminantes, o potencial de biorremediação desse grupo de microrganismos pode ser aumentado (BENNETT et al., 2001).

Aspergillus fumigatus foi testado com casca de farelo de arroz, obtendo-se ótimos resultados, utilizando indutores (óleo de soja e óleo diesel), sendo uma alternativa prática e economicamente viável (CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009).

A avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos demonstrou que cepas identificadas como *Aspergillus niger* (LEB 025) e *Rhizopus sp.* (LEB 037 e 044) demonstraram potencial para a produção de ambos os compostos de interesse concluindo que

podem ser utilizados em estudos posteriores de otimização e aumento de escala do bioprocesso (SPERB et al., 2015).

2.5 Aspergillus niger

O gênero *Aspergillus* apresenta mais de 185 espécies, sendo encontrado nos mais variados *habitats*. Caracteriza-se por possuir cabeças conidiais escuras, geralmente, negras com conidióforos hialinos a acinzentados e cabeças globosas (COSTA, 2011). O gênero apresenta uma ampla variação na coloração das colônias, sendo então a principal característica macroscópica utilizada na classificação. São encontradas colorações de colônias em tons de verde, amarelo, cinza, marrom, preto e branco (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

Aspergillus niger é um dos mais importantes microrganismos utilizados na indústria biotecnológica. Ele tem sido usado já por muitas décadas para a produção de enzimas extracelulares e assim como o ácido cítrico. Na verdade, o ácido cítrico e muitas enzimas do *A. niger* são considerados “GRAS” (geralmente reconhecido como um produto seguro) pelo *United States Food and Drug Administration*. Além disso, *A. niger* é utilizado para biotransformações e tratamento de resíduos (SCHUSTER et al., 2002).

O *Aspergillus niger* atende a várias exigências para a produção comercial de enzimas, entre elas, destacam-se sua capacidade de se desenvolver em substratos de baixo custo e a produção em velocidade acelerada de enzimas estáveis a variações de temperatura e pH, além de serem de fácil recuperação (COSTA, 2011).

Mitidieri et al. (2006) testaram o fungo *Aspergillus niger* a fim de estabelecer o uso da enzima amilase produzida por ele em detergentes utilizados em hospitais para limpezas de equipamentos cirúrgicos e endoscopia. A

exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano. Em um estudo realizado por Barros, Quadros e Pastore (2008), o potencial de produção de biossurfactante por *B. subtilis* é comprovado, visto que, quando esta era cultivada em resíduos industriais de mandioca, foram capazes de reduzir a tensão superficial da água em 72,31 para 27,01 mM.m⁻¹.

De acordo com Queiroga, Nascimento e Serra (2003), ao utilizarem *B. subtilis* para avaliação da tensão superficial na produção de biossurfactantes em presença de petróleo, foi-se observado uma redução na tensão superficial de 53 mN/m para 25,7 mN/m.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O meio, as condições de cultivo dos fungos e as metodologias das determinações analíticas foram baseados na metodologia proposta por Castiglioni, Bertolin e Costa (2009), com modificações.

3.1 Microrganismos

Foram utilizados isolados do fungo filamentosso *Aspergillus niger*, cedidos da coleção de fungos da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Lavras – MG. Foram utilizados também isolados de *Bacillus subtilis* (CCMA 0087), como controle positivo.

3.2 Preparo do inóculo para a fermentação

A propagação do inóculo *A. niger* foi feita através da técnica de espalhamento em superfície, realizada em placas de Petri contendo ágar batata-dextrose (BDA – 200 g/L de batata; 15,0 g/L de dextrose; 15 g/L de ágar). As placas de Petri foram mantidas em estufa a 28 °C durante sete dias, visando o recobrimento completo da superfície e a esporulação total dos microrganismos. Após este período, foi realizada a raspagem dos esporos e posterior filtração. Na suspensão obtida, foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer (MARTINS et al., 2006).

Os isolados de *Bacillus subtilis* foram mantidos em meio APGE (consistindo de 15,0 g/L ágar; 5,0 g/L peptona; 5,0 g/L glicose e 2,5 g/L extrato de levedura), a 30 °C, por 24 horas (ISMAIL et al., 2013) com modificações.

3.3 Preparo do meio de fermentação

Foram avaliados dois meios fermentativos, que consistiram em uma solução nutriente composta por: 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,0 g de $NaNO_3$, 1,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de extrato de levedura e 0,3 g de peptona por litro de água destilada, tendo havido também o acréscimo de 1% de óleo de motor e 1% de glicose no outro meio, a fim de ser utilizado como indutor.

A concentração inicial do inóculo de microrganismos foi de 4×10^6 esporos/g de meio.

3.4 Fermentação

Os cultivos foram realizados em *shaker* (TECNAL – TE 424, Brasil), mantidos a 30 °C, rotação de 120 rpm durante 144 horas.

3.5 Extração do biossurfactante

A obtenção do biossurfactante a partir dos extratos resultantes do processo de fermentação pelo fungo *A. niger* em meio líquido foi efetuada por filtragem a vácuo. Esse filtrado foi considerado o extrato bruto.

3.6 Variação de pH

Foram utilizadas três variações de pH: pH 5,0; 7,0 e 9,0.

3.7 Determinação do índice de emulsificação

A determinação do índice de emulsificação foi realizada utilizando a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987), em que 2 mL de óleo de

soja foram adicionados a 2 mL de extrato bruto, livre de células (centrifugados por 5 min a 10.000 rpm/ 4 °C), em um tubo de ensaio e vortexado à alta velocidade por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas. O índice de emulsão foi calculado dividindo a altura da camada de emulsão pela altura total da mistura e multiplicada por 100. Os ensaios foram feitos em triplicata.

3.8 Teste de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em um teste estático com base na germinação de sementes e alongamento de raiz de *Lactuca sativa* L (alface) seguindo os métodos descritos por Tiquia et al. (1996). A toxicidade foi determinada em placas de Petri esterilizadas (1 × 10 cm) contendo um papel Whatman N° filtro 1 e um papel filtro comercial. Dez sementes foram inoculadas em cada placa de Petri com 5 mL e 2 mL do extrato bruto. Após cinco dias de incubação no escuro a 27 °C, a germinação das sementes, alongamento da raiz e o índice de germinação (um fator de germinação das sementes e alongamento em relação raiz relativa) foram determinados como se segue:

- a) Germinação de sementes relativo (%) = (número de sementes germinadas no extrato / número de sementes germinadas no controle) × 100;
- b) Comprimento radicular relativo (%) = (comprimento médio das raízes nos tratamentos / comprimento da raiz no controle) × 100;
- c) Índice de germinação = [(% de germinação das sementes) x (% de crescimento da raiz)] / 100%.

Foi utilizada água destilada como controle positivo e TRITON X-100 como controle químico, sendo que este último foi diluído a uma concentração de 1%.

Foram utilizadas sementes *TOP SEED* (AGRISTAR do Brasil Ltda.) com taxa de germinação de 85% e pureza de 99%.

3.9 Reologia

O estudo do comportamento reológico das emulsões foi feito utilizando-se o reômetro HAAKE RheoStress 6000 (marca Thermo Scientific) acoplado a um controlador de temperatura HAAKE UTM Controller (marca Thermo Scientific). As análises foram realizadas com placas paralelas com 34,997 mm de diâmetro com GAP de 1 mm.

A curva de fluxo foi obtida através de uma curva de escoamento variando-se a taxa de deformação de 0 a 300 s⁻¹ durante um período de 2 minutos a temperatura de 20 °C.

Nos ensaios oscilatórios, primeiramente foram realizadas varreduras de tensão para a determinação do intervalo de viscoelasticidade linear.

Com um valor de tensão fixo dentro do intervalo de viscoelasticidade linear, varreduras de frequência de 1,0 a 10 Hz foram efetuadas a temperatura de 20 °C.

A programação para quantificar o valor de tixotropia utilizada consiste em:

- a) Rampa de aumento de taxa de deformação de 0 a 300 (s⁻¹) por um período de 2 minutos e;
- b) Rampa de redução da taxa de deformação de 300 a 0 (s⁻¹) por um período de 2 minutos.

A análise do comportamento reológico das emulsões foi realizada nos extratos brutos de pH 5,0 com três repetições cada. Cada teste foi realizado em triplicata.

3.10 Análise estatística

Para determinar as melhores condições de produção de biossurfactante o experimento foi realizado utilizando três isolados do fungo *Aspergillus niger*, utilizando dois meios fermentativos, um contendo indutor (óleo de motor) e outro sem indutor, com variação no pH (5,0; 7,0; 9,0). Os dados de produção de biossurfactantes obtidos foram submetidos à análise de variância. Em seguida, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott. Para as análises, foi utilizado o *software* R. Para as características germinação e tamanho da raiz, foi feita uma transformação dos dados de porcentagem e em seguida estes foram analisados e as médias agrupadas. Os dados obtidos nas análises reológicas foram ajustados aos modelos reológicos utilizando-se o *software* SAS e os parâmetros significativos dos modelos e os valores de tixotropia foram analisados através de análise de variância e Teste de Tukey, pelo *software* Sisvar (UFLA). Os dados significativos foram analisados através de teste de média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Potencial de produção de biossurfactantes

Os dados obtidos sobre a produção de biossurfactantes estão apresentados abaixo.

4.1.1 Índice de emulsificação

A avaliação do índice de emulsificação teve uma boa precisão experimental, o coeficiente de variação experimental foi de 10,213. As fontes de variação isolado, indutor e dia foram significativas, pelo menos um difere dos demais, o mesmo é válido para dia e indutor (Tabela 1). Os três pH testados não foram estatisticamente diferentes, dessa forma, a avaliação pode ser realizada em qualquer um dos pH avaliados.

Tabela 1 Resumo da análise de variância conjunta referente ao índice de emulsificação (IE)

	GL	SQ	QM	F calc.	Pr(>F)	
Isolado	3	342,1	114,02	4,3569	0,004719	*
Indutor	1	576,8	576,82	22,04	3,20E-06	*
Dia	5	1038,1	207,63	7,93	2,74E-07	*
pH	2	66,5	33,23	1,26	0,281591	
Isolado:Indutor	3	973,3	324,42	12,39	6,52E-08	*
Isolado:Dia	15	830,1	55,34	2,11	0,007967	*
Isolado:pH	6	236	39,34	1,50	0,174261	
Indutor:Dia	5	377,8	75,56	2,88	0,013685	*
Indutor:pH	2	194,2	97,09	3,70	0,024949	*
Dia:pH	10	384,7	38,47	1,47	0,146031	
Isolado:Indutor:Dia	15	746,7	49,78	1,90	0,020166	*
Isolado:Indutor:pH	6	845,4	140,89	5,3835	1,88E-05	*
Indutor:Dia:pH	10	433,1	43,31	1,6549	0,087392	
Isolado:Dia:Ph	30	871,2	29,04	1,1096	0,315271	
Isolado:Indutor:Dia:pH	30	1060	35,33	1,35	0,101764	
Resíduos	719	18817,1	26,17			

*Teste F significativo a 5% de probabilidade.

As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott. Considerando os isolados testados, dois grupos foram formados (Tabela 2).

Tabela 2 Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados

Isolado	Porcentagem	
Bact	51,03	A
100	50,25	A
107	49,73	B
98	49,35	B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que a bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 e o isolado *A. niger* 100 apresentaram índices de emulsificação significativamente maiores que os demais isolados testados. Deve-se observar que a bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 é considerada uma grande produtora de biossurfactantes, já estudada há um longo tempo, ao contrário de *A. niger* 100, que apresentou um bom resultado, não havendo muitos estudos sobre esse fungo como produtor de biossurfactantes.

Rocha et al. (2006) estudaram a produção de biossurfactante por *Acinetobacter calcoaceticus*, utilizando suco de caju como meio de fermentação. O produto, sintetizado a partir dos açúcares redutores, apresentou um índice de emulsão para querosene de 80%.

Silva et al. (2010) testaram a cepa da bactéria *P. aeruginosa* UCP0992 em diferentes substratos e obtiveram um índice de emulsificação de 50,2%, índice esse menor que de *B. subtilis* CCMA 0087.

Luna et al. (2013) estudaram *Candida sphaerica* UCP0995, e a testaram em diferentes meio de cultura, a fim de analisar seu índice de emulsificação. Quando testada com óleo de motor, eles obtiveram um índice de emulsão de praticamente 100%.

Barros, Quadros e Pastore (2008) testaram a linhagem *B. subtilis* LB5a para a produção de emulsificantes em variados hidrocarbonetos, obtendo com 24

horas uma taxa de aproximadamente 80% de emulsificação com hexano + SDS. (Silva et al., 2014).

Silva et al. (2014) estudaram o potencial de *Cunninghamella echinulata* para a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes e obtiveram aproximadamente 85% de emulsificação em óleo de motor.

Kiran et al. (2009) estudaram o fungo *Aspergillus ustus* MSF3 quanto ao seu potencial para produção de biossurfactantes em variados meios de cultura. Quando testado no meio de cultura, Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) obtiveram aproximadamente 42%.

Com relação ao indutor, este também se apresenta como significativo, como se pode observar na tabela a seguir:

Tabela 3 Valores médios referentes aos índices de emulsificação na presença e ausência de indutor

Indutor	Porcentagem	
Com indutor	50,91	A
Sem indutor	49,27	B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O meio de cultura que contou com a adição de indutor mostrou-se mais efetivo para a produção de biossurfactantes, apresentando uma produção significativamente maior quando comparada ao meio sem indutor, comprovando o fato de sua presença no meio estimular a produção do mesmo.

O estudo realizado por Gutiña et al. (2015) com *B. subtilis*, em que milhocina foi adicionada ao meio de cultura, apresentou um índice de emulsificação de até 40% em meio contendo 15% de milhocina com 24 horas.

Silva et al. (2014) ao estudarem o fungo *Cunninghamella echinulata* com milhocina e resíduos de óleo de soja, testaram a emulsificação com óleo de

motor, óleo de motor queimado, óleo de canela e óleo de soja, obtendo respectivamente 85%, 80%, 70% e 65%, com 24 horas.

Ao testarem *Aspergillus ustus* MSF3 com diferentes fontes de carbono, Kiran et al. (2009) obtiveram uma emulsificação de 15% com óleo de soja, 37% em querosene e 20% em glicose.

O fator dia também apresentou uma significância conforme os resultados apresentados na Tabela 4:

Tabela 4 Valores médios referentes ao índice de emulsificação ao longo dos seis dias

Dias	Índice de emulsificação (%)	
1	51,82	A
3	50,93	A
2	50,35	A
5	49,50	B
4	49,49	B
6	48,44	B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que durante os três primeiros dias de fermentação, os índices de emulsificação foram maiores e estatisticamente semelhantes em relação aos três últimos dias. Este fato pode ter ocorrido devido à quantidade de nutrientes no meio e à ausência de metabólitos tóxicos nos três primeiros dias em relação aos três últimos.

O fungo *Aspergillus ustus* MSF3 foi cultivado durante seis dias por Kiran et al. (2009), a fim de observar sua capacidade emulsificante. Foram obtidos os seguintes dados: com 24 horas o fungo havia produzido uma emulsificação de 2%, uma quantidade 25 vezes inferior do que a média produzida pelos isolados testados neste experimento. No segundo dia, 4% foram produzidos. Houve um aumento de cinco vezes esse valor no terceiro dia,

quando foi obtido um percentual de 20% de emulsificação. No quarto dia de teste, *A. ustus* produziu uma emulsão de 40%. No quinto dia de experimento, *A. ustus* obteve seu máximo de produção de emulsificante, com aproximadamente 55%, uma quantidade 5% superior à produzida no mesmo dia pela média dos isolados deste experimento e 4% superior ao melhor dia de produção destes. No sexto dia, no entanto, houve um decaimento de 50% desta produção, com um total de 25% de emulsificante, demonstrando assim uma grande variação no fluxo de produção de emulsificante, isso contradiz os dados obtidos neste experimento, em que há certa regularidade na produção do mesmo com o decorrer do experimento.

O fator pH, de grande importância, não apresentou variações estatisticamente significativas.

Tabela 5 Valores médios referentes à produção de emulsificantes nos diferentes pH

pH	Porcentagem	
5	50,46	A
7	50,03	A
9	49,77	A

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

O fato de o pH não ter se apresentado significativo pode ser devido à amplitude de pH em que os fungos podem se desenvolver, o mesmo caso de *B. subtilis*.

De acordo com Cooper e Goldenberg (1987), o emulsificante produzido por cepa de *Bacillus cereus* foi ativo somente em pH abaixo de 7,0. Já o emulsificante produzido por *Bacillus* sp. cepa IAF 343 demonstrou maior atividade emulsificante água em óleo quando mantido em pH entre 4 e 8, tendo um total emulsificante de mais de 60%, enquanto *B. subtilis* produziu

aproximadamente 50%. Acima do pH 9 e abaixo do pH 3, o índice de emulsão foi reduzido em 50%.

Luna et al. (2013) estudaram *C. sphaerica* em diferentes pH e obtiveram uma produção de emulsificante superior a 80% em pH entre 4 e 10 com óleo de motor como indutor.

Testando variados pH e utilizando a bactéria *P. aeruginosa* como produtora de emulsificante, Silva et al. (2010) obtiveram um índice de emulsificação de aproximadamente 50% em pH entre 4,0 e 8,0 utilizando óleo diesel.

Suwansukho et al. (2008), testando a cepa *B. subtilis* MUV4, obtiveram em pH 7,0 um índice de emulsão de 66,67% com o biossurfactante bruto.

Silva et al. (2014) testaram a produção de emulsificante nos pH 2,0; 4,0 e 6,0 com o fungo *Cunninghamella echinulata*, obtendo respectivamente 80% , 90% e 80% com óleo de motor.

Kiran et al. (2009) ao testarem o efeito de variados pH na produção do biossurfactante por *Aspergillus ustus* MSF3, em meio SDA por 120 horas com 3% de salinidade, observaram que o melhor índice de emulsificação ocorreu no pH 9,0 com um índice de 13% de emulsificação. No pH 5,0, foram obtidos 4% de emulsificação e no pH 7,0 5% de emulsificação.

Há algumas interações no experimento que são interessantes, como a interação isolado:indutor significativa, que demonstra que um ou mais isolados na presença do indutor obteve melhor produção de biossurfactantes, conforme pode ser observado nas tabelas abaixo:

Tabela 6 Análise de variância referente à interação isolado: indutor

Com indutor	GL	QM	Pr(>F)	
Isolado	3	400,05	0,00	*
Dia	5	224,30	0,00	*
pH	2	105,18	0,01	*
Isolado:Dia	15	81,16	0,00	*
Isolado:pH	6	143,55	0,00	*
Dia:pH	10	47,42	0,03	*
Isolado:Dia:pH	30	38,92	0,02	*
Residuals	360	23,19		

A comparação das médias referentes à interação significativa entre isolado x indutor encontra-se representada na Tabela 7:

Tabela 7 Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentado pelos isolados em presença do indutor

Isolados	Média(%)	
Bact	53,65	A
100	50,75	B
107	49,86	B
98	49,34	B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que a bactéria comportou-se de melhor forma em presença do indutor, apresentando um índice de emulsificação estatisticamente superior a dos demais isolados testados.

Há também uma interação indutor: dia:

Tabela 8 Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados em presença do indutor nos diferentes dias

Dia	Média(%)	
1	53,81	A
3	51,97	B
2	51,04	C
4	50,00	C
6	49,32	C
5	49,28	C

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar três classes estatisticamente diferentes, sendo que, o índice de emulsificação foi estatisticamente superior aos demais no primeiro dia, seguido do terceiro, sendo que ambos foram estatisticamente superiores aos demais dias estudados.

Outra interação relacionada ao indutor foi a interação indutor:pH, cujos resultados encontram-se representados na Tabela 9:

Tabela 9 Valores médios referentes ao índice de emulsificação apresentados pelos isolados em presença do indutor e em diferentes índices de pH

pH	Média	
5	51,52	A
7	51,26	A
9	49,93	B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Pode-se observar que os índices de pH 5,0 e 7,0, na presença do indutor, não diferiram estatisticamente, diferenciando-se apenas do tratamento com pH 9,0, que apresentou um decréscimo significativo do índice de emulsificação.

Outra interação dupla que ocorre é entre isolado:dia, que pode ter ocorrido devido ao comportamento dos isolados com o passar do tempo,

afetando sua produção por fatores, como por exemplo, queda de nutrientes conforme os dias se passavam, o aumento da população e a produção de metabólitos tóxicos.

Tabela 10 Resumo da análise de variância da interação isolado: dia 1

DIA 1	GL	QM	Pr(>F)	
Isolado	3	12,87	0,68	
Indutor	1	573,16	0,00	*
pH	2	8,82	0,71	
Isolado:Indutor	3	36,51	0,24	
Isolado:pH	6	52,09	0,06	
Indutor:pH	2	98,56	0,02	*
Isolado:Indutor:pH	6	22,08	0,52	
Residuals	120	25,45		

Pode-se observar que no primeiro dia não houve interação entre isolado: dia, assim como no segundo dia.

Tabela 11 Resumo da análise de variância da interação isolado: dia 2

DIA 2	GL	QM	Pr(>F)
Isolado	3	6,47	0,84
Indutor	1	69,76	0,08
pH	2	14,86	0,52
Isolado:Indutor	3	47,10	0,11
Isolado:pH	6	10,75	0,83
Indutor:pH	2	5,34	0,79
Isolado:Indutor:pH	6	23,82	0,40
Residuals	120	22,78	

Tab – ANOVA interação isolado: dia 2.

A partir do terceiro dia, começa a haver diferenças significativas nos resultados desta interação.

Tabela 12 Resumo da análise de variância referente a interação isolado: dia 3

DIA 3	GL	QM	Pr(>F)	
Isolado	3,00	68,10	0,03	*
Indutor	1,00	155,90	0,01	*
pH	2,00	149,73	0,00	*
Isolado:Indutor	3,00	57,40	0,06	.
Isolado:pH	6,00	28,38	0,27	
Indutor:pH	2,00	37,69	0,19	
Isolado:Indutor:pH	6,00	66,80	0,01	*
Residuals	120,00	22,23		

Conforme a comparação de médias apresentados na Tabela 13, pode-se observar que no terceiro dia avaliado ocorreu uma diferença significativa entre os índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em que a bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 apresentou um índice de emulsificação estatisticamente superior em relação aos isolados testados.

Tabela 13 Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em presença do indutor no terceiro dia de avaliação

Isolado	Média
Bact	52,82 A
107	50,77 B
100	50,59 B
98	49,54 B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

No quarto dia de fermentação, apresenta-se a mesma interação.

Tabela 14 Resumo da análise de variância referente à interação isolado: dia 4

DIA 4	GL	QM	Pr(>F)	
Isolado	3	163,00	0,01	*
Indutor	1	37,73	0,34	
pH	2	42,00	0,36	
Isolado:Indutor	3	170,76	0,01	*
Isolado:pH	6	24,58	0,73	
Indutor:pH	2	0,46	0,99	
Isolado:Indutor:pH	6	72,76	0,11	
Residuals	120	41,11		

Tem-se no quarto dia uma maior produção de *B. subtilis*, sendo diferente estatisticamente dos isolados. Há também uma ligeira queda na produção de emulsificantes.

Tabela 15 Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em presença do indutor no quarto dia de avaliação

Isolado	Média	
Bact	52,68	A
100	48,5	B
107	48,49	B
98	48,27	B

Tab – Scott-Knott isolado: dia 4.

A tabela a seguir apresenta a interação isolado:dia no quinto dia.

Tabela 16 Resumo da análise de variância referente à interação isolado:dia 5

DIA 5	GL	QM	Pr(>F)	
Isolado	3	87,793	0,000114	*
Indutor	1	6,917	0,442014	
pH	2	9,75	0,4348	
Isolado:Indutor	3	184,273	9,58E-09	*
Isolado:pH	6	21,065	0,102319	
Indutor:pH	2	40,694	0,033303	*
Isolado:Indutor:Ph	6	75,307	6,12E-06	*
Residuals	120	11,626		

Tab – ANOVA interação isolado: dia 5.

Tem-se novamente *B. subtilis* sendo o maior produtor, tendo diferença de aproximadamente 7% quando compara ao isolado *A. niger* 98.

Tabela 17 Valores médios referentes aos índices de emulsificação apresentados pelos isolados testados, em presença do indutor no quinto dia de avaliação

Isolado	Média	
Bact	51,64	A
100	49,67	B
107	48,35	B
98	48,32	B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Por fim, no sexto dia, não há interação entre o isolado:dia.

Tabela 18 Resumo da análise de variância referente à interação isolado: dia 6.

DIA 6	GL	QM	Pr(>F)
Isolado	3	52,79	0,20
Indutor	1	112,96	0,07 .
pH	2	0,65	0,98
Isolado:Indutor	3	76,95	0,08 .
Isolado:pH	6	48,73	0,21
Indutor:pH	2	131,89	0,02 *
Isolado:Indutor:pH	6	55,72	0,14
Residuals	119	33,90	

Tem-se também algumas interações triplas, como por exemplo, a interação isolado:indutor:dia, em que os isolados se comportaram de modo diferente na presença do indutor em alguns dias do processo fermentativo, o mesmo ocorre com a interação isolado:indutor:pH, quando os isolados se comportaram de modo diferente para os diferentes pH na presença do indutor óleo de motor.

Os resultados relativos à análise dos tratamentos na ausência do indutor demonstraram não haver significância para as variáveis isoladas e suas interações, conforme apresentado na Tabela 19.

Tabela 19 Análise variância referente à interação da ausência de indutor com aos isolados

Sem indutor	GL	QM	Pr(>F)
Isolado	3	39,17	0,26
Dia	5	58,45	0,07
pH	2	25,42	0,41
Isolado:Dia	15	23,83	0,65
Isolado:pH	6	37,15	0,26
Dia:pH	10	34,24	0,30
Isolado:Dia:pH	30	25,45	0,66
Residuals	359	29,15	

4.1.2 Reologia

As análises reológicas foram realizadas para se obter a classificação reológica das emulsões. Os dados reológicos foram ajustados aos modelos Lei de Newton, Lei da Potência e Hershell-Buckley.

Após os ajustes avaliando-se os valores de coeficiente de correlação (R^2) e quadrado médio do resíduo (QMR) concluiu-se que o modelo da Lei de Newton explica com maior exatidão os dados reológicos obtidos. Portanto a emulsão é um líquido newtoniano, ou seja, a viscosidade do fluido não muda com a taxa de cisalhamento aplicada nem com o tempo de análise. Os fluidos newtonianos apresentam relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, conforme a Lei de Newton (TADROS, 2010).

Pode-se dizer como exemplo, que durante o escoamento de um fluido em um tubo, as moléculas colidem entre si e quanto mais próximas das paredes menor é a velocidade de escoamento aumentando em direção ao centro do líquido. Quando esta velocidade é praticamente igual diz-se que o fluido tem comportamento newtoniano e a derivada do gráfico é 0 (SANTOS, 2011).

Amostra	Lei de Newton			Lei da Potência				Herschell-Buckley				
	R ²	QMR	μ	R ²	QMR	K	n	R ²	QMR	T	K	n
98 GI 1	0,9715	0,6974	0.045536*	0.9703	0.7046	0.047006*	0.994102*	0.9704	0.7067	0.097786	0.042645	1.010192*
98 GI 2	0.9971	0.2690	0.055075*	0.9969	0.2727	0.053212*	1.006402*	0.9969	0.2726	0.111703	0.048362	1.022275
98 GI 3	0.9837	0.5045	0.044046*	0.9829	0.5080	0.050161*	0.975896*	0.9829	0.5098	0.050288	0.047729*	0.984071*
98 SN 1	0.9846	0.6663	0.060073*	0.9850	0.6453	0.081664*	0.942997*	0.9850	0.6476	0.104612	0.075679*	0.955536*
98 SN 2	0.9850	0.5080	0.045354*	0.9839	0.5165	0.043955*	1.005805*	0.9840	0.5166	0.177857	0.036635*	1.036005*
98 SN 3	0.9448	1.0865	0.050901*	0.9418	1.0968	0.064521*	0.955887*	0.9418	1.1013	0.106303	0.058785	0.971261*
100 GI 1	0.9887	0.4763	0.049772*	0.9880	0.4836	0.047061*	1.010436*	0.9880	0.4850	0.112016	0.042285*	1.028234*
100 GI 2	0.8738	1.4983	0.045484*	0.8669	1.5126	0.06219*	0.941907*	0.8669	1.5185	1.5185	0.059966	0.947867*
100 GI 3	0.9446	1.1225	0.052424*	0.9413	1.1391	0.054975*	0.991149*	0.9413	1.1429	0.152527	0.048093	1.013302*
100 SN 1	0.9828	0.5226	0.045379*	0.9818	0.5297	0.042838*	1.010745*	0.9818	0.5312	0.110575	0.038283	1.029387*
100 SN 2	0.9401	1.0543	0.046885*	0.9361	1.0709	0.047847*	0.996221*	0.9361	1.0751	0.050763	0.04558	1.004245*
100 SN 3	0.9390	1.2487	0.054265*	0.9355	1.2674	0.055584*	0.995534*	0.9356	1.2711	0.22216	0.04582	1.027606*
107 GI 1	0.9901	0.4431	0.049904*	0.9897	0.4465	0.054953*	0.982053*	0.9897	0.4478	0.071623	0.051499*	0.992786*
107 GI 2	0.9883	0.5076	0.054163*	0.9877	0.5123	0.05921*	0.98335*	0.9877	0.5140	0.073737	0.055683*	0.993519*
107 GI 3	0.9841	0.5065	0.043661*	0.9829	0.5146	0.044273*	0.997428*	0.9829	0.5161	0.108961	0.039549*	1.016061*
107 SN 1	0.9817	0.6374	0.053197*	0.9804	0.6449	0.060024*	0.977581*	0.9806	0.6437	0.315317	0.045751	1.022518*
107 SN 2	0.9390	1.2487	0.054265*	0.9355	1.2674	0.055584*	0.995534*	0.9356	1.2711	0.22216	0.04582	1.027606*
107 SN 3	0.9193	1.3816	0.054623*	0.9174	1.3824	0.074978*	0.9411*	0.9174	1.3874	0.042037	0.072615	0.946353*
Bact GI 1	0.9809	0.5815	0.046615*	0.9798	0.5856	0.054615*	0.9706*	0.9799	0.5871	0.151157	0.047119	0.995015*
Bact GI 2	0.9847	0.5883	0.053815*	0.9845	0.5827	0.066644*	0.960183*	0.9845	0.5849	0.002446	0.066513*	0.960507*
Bact GI 3	0.9852	0.6095	0.055955*	0.9843	0.6176	0.052078*	1.01334*	0.9843	0.6190	0.163116	0.045525*	1.035618*
Bact SN 1	0.9987	0.1929	0.062254*	0.9986	0.1953	0.064024*	0.994769*	0.9986	0.1942	0.119011	0.058779*	1.008901*
Bact SN 2	0.9986	0.1993	0.061346*	0.9987	0.1902	0.067778*	0.981427*	0.9987	0.1898	0.092845	0.063289*	0.992763*
Bact SN 3	0.9984	0.2240	0.061416*	0.9982	0.2279	0.062055*	0.998077*	0.9982	0.2286	0.059405	0.0594*	1.005309*

Quadro 1 Parâmetros reológicos para as emulsões obtidas pelos isolados do fungo *Aspergillus niger* 98, 100 e 107 e pela bactéria *Bacillus subtilis*, com e sem indutor, segundo os modelos de Newton, Lei da Potência e Herschell-Buckley

μ = viscosidade (Pa.s⁻¹); K = índice de consistência (Pa.sⁿ); n = índice de comportamento de fluxo (adimensional); t = tensão inicial (Pa); R² = coeficiente de determinação; QMR = quadrado médio do resíduo, *Parâmetros significativos (p<0,01).

De acordo com Nietschke e Pastore (2002) os biossurfactantes são utilizados como emulsionantes no processamento de matérias-primas, seus princípios tensoativos têm aplicação em panificação e produtos derivados de carne, pois influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras.

Segundo Wazer (1966) o termo “viscosidade” é usado somente para fluidos newtonianos. Como a emulsão foi classificada como fluido newtoniano, a viscosidade é constante e foi analisada por teste de média.

Os valores de tixotropia também foram analisados entre os tratamentos.

Conforme se pode observar na tabela abaixo, não houve nenhuma diferença significativa em nenhum tratamento:

Tabela 20 Análise de variância referente ao parâmetro reológico viscosidade

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	22	0,002131	0,000097	1.280	0,238
Repetição	2	0,000833	0,000417	6	0,0073
Erro	44	0,00333	0,000076		

Foi feito teste de Tukey, com significância de 5%, a fim de comprovar o que havia sido apresentado na análise de variância.

Tabela 21 Valores médios referentes ao parâmetro reológico viscosidade para os diferentes tratamentos

Tratamentos	Média (Pa.s)	Resultados do teste
107 CI 3	0,04	A1
98 CI 3	0,04	A1
100 SI 1	0,04	A1
98 SI 2	0,04	A1
BAC CI 1	0,04	A1
98 CI 1	0,04	A1
100 CI 2	0,04	A1
100 SN 2	0,04	A1
100 CI 1	0,04	A1
107 CI 1	0,05	A1
98 SI 3	0,05	A1
100 CI 3	0,05	A1
107 SI 1	0,05	A1
107 SI 2	0,05	A1
BAC CI 1	0,05	A1
107 CI 2	0,05	A1
107 SI 3	0,05	A1
98 CI 2	0,05	A1
BAC CI 3	0,05	A1
98 SI 1	0,06	A1
BAC SI 2	0,06	A1
BAC SI 3	0,06	A1
BAC SI 1	0,06	A1

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Valores em Pa.s

SI = Sem Indutor / CI = Com indutor.

BAC = Bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 / 98; 100 e 107 = Isolados *A. niger*.

Deste modo, tem-se que todos os tratamentos, incluindo o extrato obtido a partir da bactéria *B. subtilis* CCMA 0087, não diferiram estatisticamente entre si. Observa-se ainda que os resultados obtidos quanto à viscosidade proporcionados pelos extratos a partir dos isolados de *A. niger* e *B. subtilis*, em

presença ou ausência do indutor, proporcionaram índices semelhantes de viscosidade.

Santos (2011) testou um bio surfactante produzido por *P. aeruginosa* e observaram o comportamento de uma solução 4,0 g/L do bio surfactante impuro e outra 4,0 g/L do bio surfactante purificado. Foi observado que os fluidos comportaram-se como fluidos newtonianos, com viscosidade muito baixa na ordem de 10^{-3} Pa.s.

Martínez-Checa et al. (2007) testaram a bactéria *Halomonas eurihalina* F2-7H e puderam observar que, no diz respeito ao comportamento reológico, todos os exopolissacarídeos (EPS) sintetizados em suportes de hidrocarbonetos originaram soluções com uma viscosidade muito baixa e eram incapazes de formar soluções de elevada viscosidade com pH 3.

Os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram-se superiores aos valores citados, confirmando o potencial dos tratamentos para a redução da viscosidade de resíduos oleosos.

De forma semelhante ao observado com relação aos valores de viscosidade, não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nos valores de tixotropia ($p > 0,05$) conforme apresentado na Tabela 22.

Tabela 22 Resumo da análise de variância referente ao parâmetro reológico tixotropia

FV	GL	QM	FC	Pr>Fc
Tratamento	22	136506,473	1,21	0,2876
Repetição	2	4366,22	0,03	0,962
Erro	44	112735,49		

Através dos dados, conclui-se que as emulsões apresentaram o mesmo comportamento tixotrópico.

Tabela 23 Valores médios referentes ao parâmetro tixotropia para os diferentes tratamentos

Tratamentos	Médias (Pa.s ⁿ)	Resultados do teste
98 SI 1	-247,66	A1
100 SI 1	-247,33	A1
98 SI 2	-184,33	A1
107 CI 2	-143	A1
100 SI 2	-108,33	A1
98 SI 3	-47,27	A1
98 CI 3	-43,33	A1
107 CI 3	-40,33	A1
BAC SI 2	-29	A1
98 CI 1	-23,66	A1
BAC SI 3	-11,66	A1
98 CI 2	-11,33	A1
107 CI 1	3,33	A1
BAC CI 3	5,33	A1
100 CI 3	29,33	A1
107 SI 1	49,33	A1
BAC SI 1	69	A1
107 SI 3	109,66	A1
107 SI 2	109,66	A1
BAC CI 2	136,33	A1
BAC CI 1	169	A1
100 CI 2	407	A1
100 CI 1	763	A1

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores em Pa.sⁿ

SI = Sem Indutor / CI = Com Indutor.

BAC = Bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 / 98; 100 e 107 = Isolados *A. niger*.

4.2 Teste de fitotoxicidade

A tabela a seguir apresenta os resultados do teste de fitotoxicidade no que se diz sobre a germinação das sementes, tamanho da raiz, e índice de

germinação utilizando 2 mL de extrato bruto. É utilizado como indicador de ausência de fitotoxicidade um valor de 80% de índice de germinação (TIQUIA; TAM; HODGKISS, 1996).

Tabela 24 Valores referentes ao teste de fitotoxicidade com 2 mL de extrato em sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) nos quesitos germinação, tamanho da raiz e índice de germinação (IE) para os diferentes tratamentos

Tratamentos	Repetição	Germinação relativa (%)	Comprimento raiz relativo (%)	Índice de Germinação (%)
98 SI	1	75,03	35,71	26,80
98 SI	2	100,04	31,77	31,78
98 SI	3	92,89	30,05	27,91
98 CI	1	92,89	56,29	52,29
98 CI	2	100,04	37,86	37,87
98 CI	3	100,04	68,40	68,42
100 SI	1	100,04	13,61	13,61
100 SI	2	89,32	11,07	9,89
100 SI	3	94,64	12,32	11,66
100 CI	1	92,89	96,07	89,24
100 CI	2	103,61	61,47	63,69
100 CI	3	103,61	107,53	111,41
107 SI	1	75,03	18,07	13,56
107 SI	2	100,04	51,44	51,45
107 SI	3	96,46	45,47	43,86
107 CI	1	89,32	51,14	45,67
107 CI	2	100,04	42,58	42,60
107 CI	3	96,46	48,76	47,04
BACT SI	1	103,61	41,77	43,28
BACT SI	2	100,04	44,64	44,66
BACT SI	3	103,61	50,93	52,76
BACT CI	1	85,74	59,86	51,33
BACT CI	2	107,18	45,18	48,42
BACT CI	3	107,18	34,64	37,12

“Tabela 24, conclusão”

Tratamentos	Repetição	Germinação relativa (%)	Comprimento raiz relativo (%)	Índice de Germinação (%)
AGUA	1	85,74	66,96	57,42
AGUA	2	107,18	137,40	147,27
AGUA	3	107,18	95,73	102,61
TRITON	1	75,03	9,67	7,26
TRITON	2	42,87	11,61	4,98
TRITON	3	53,59	13,39	7,18

SI = Sem indutor / CI = com indutor

BAC = Bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 / 98; 100 e 107 = Isolados *A. niger*.

Tem-se que os tratamentos obtiveram um bom índice de germinação relativa, com a grande maioria acima de 80% de germinação, sendo que o TRITON X-100 1% apresentou a menor taxa de germinação e a bactéria *B. subtilis* sem indutor a melhor taxa de germinação. No quesito comprimento relativo da raiz, tem-se que o isolado 100 de *A. niger* com indutor apresentou um bom comprimento radicular relativo, e mais uma vez, TRITON X-100 1% apresentou o menor comprimento radicular relativo. Com relação ao índice de germinação, tem-se que o extrato do isolado 100 de *A. niger* com indutor não se apresentou fitotóxico, tendo um índice de germinação de 11, 41%.

Luna et al. (2013) testaram a fitotoxicidade do seu biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* cultivado em água destilada suplementado com 9% de óleo de amendoim refinado e 9% de milhocina contra *Lactuca sativa* L. (alface). Foram testadas diferentes concentrações e os resultados obtidos para germinação da semente foram 100% para todas as concentrações.

Quando se analisa o tamanho da raiz, novamente tem-se que o tratamento Bact SN 1, 2 e 3 apresentou um crescimento superior aos outros extratos, com uma média de aproximadamente 56, 45%. Entre os tratamentos com extratos fúngicos, novamente o que apresentou melhores resultados foi o 107 GI 1, 2 e 3, com média aproximada de 42, 41%. As sementes que receberam

o tratamento com água destilada obtiveram um resultado médio de 100%. As sementes que receberam o tratamento TRITON X-100 1%, apesar de terem germinado com média superior de 80%, não conseguiram se desenvolver bem, tendo um tamanho relativo de raiz de aproximadamente 18,94%.

Luna et al. (2013) testaram a fitotoxicidade do seu biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* cultivado em água destilada suplementado com 9% de óleo de amendoim refinado e 9% de milhocina contra *Lactuca sativa* L. (alface). Foram testadas diferentes concentrações e os resultados obtidos para alongação da raiz foram de 125% para 0,125 g/L (1/2 CMC); 138% para 0,25 g/L (1 CMC) e de 167% para 0,5 g/L (2 x CMC).

Quando o fator índice de germinação foi avaliado, não se observou uma variação dos resultados. O tratamento Bact SN 1, 2 e 3 apresentou o melhor índice, com média de aproximadamente 50%. Entre os tratamentos com extrato fúngico, destacou-se 107 GI 1, 2 e 3, com média em torno de 28,5%. O controle com água destilada obteve um índice de germinação média de 100% e o controle químico com TRITON X-100 1% obteve média de 15,8%.

Luna et al. (2013), testaram a fitotoxicidade do seu biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* cultivado em água destilada suplementado com 9% de óleo de amendoim refinado e 9% de milhocina contra *Lactuca sativa* L. (alface). Foram testadas diferentes concentrações e os resultados obtidos para índice de germinação foram de 125% para 0,125 g/L (1/2 CMC); 138% para 0,250 g/L (1 CMC) e 167% para 0,5 g/L (2 x CMC).

Silva et al. (2010) testaram a fitotoxicidade do seu biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992 contra sementes de *Brassica oleracea* (couve) em diferentes concentrações e obtiveram um índice de germinação de 245, 187, 132 e 87%, respectivamente nas concentrações de 175, 350, 525 e 700 mg/L.

Rufino et al. (2014) testaram a fitotoxicidade de *Candida lipolytica* e os resultados obtidos indicam que as soluções testadas não apresentaram efeitos inibitórios sobre a germinação das sementes e alongamento da raiz da couve, pois apresentaram índice de germinação de 136% para soluções de 60 mg/L do biossurfactante, sendo possível visualizar as folhas e o alongamento de raízes secundárias.

Qazi et al. (2013) estudaram os efeitos da fitotoxicidade do seu biossurfactante produzido pelo fungo *Fusarium sp* em sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) BS-8. Observaram que o biossurfactante teve efeito significativo na germinação de sementes e apresentou 5%, 10% e 15% de inibição da germinação a 40, 50 e 60 mg mL⁻¹ respectivamente. O sobrenadante livre também mostrou o efeito significativo na raiz e comprimento da parte aérea, com 25% de inibição da germinação de sementes.

Tem-se a seguir o teste de Scott-Knott para as características de germinação e comprimento radicular de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) testados com 2 mL de extrato.

Tabela 25 Valores médios referentes à germinação e tamanho da raiz de sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) tratada com 2 mL dos extratos brutos

Tratamentos	Germinação	Comprimento radicular
98 SI	8,33 A	0,72 A
98 CI	9,11 A	1,21 A
100 SI	8,83 A	0,27 B
100 CI	9,33 A	1,97 A
107 SI	8,44 A	0,85 A
107 CI	8,77 A	1,06 A
BACT SI	9,55 A	1,02 A
BACT CI	9,33 A	1,04 A
AGUA	9,33 A	2,24 A
TRITON	5,33 B	0,25 B

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

SI = Sem Indutor / CI = Com indutor

BAC = Bactéria *B. subtilis* CCMA 0087 / 98; 100 e 107 = Isolados *A. niger*.

Observa-se que com relação à germinação, tem-se dois grupos estatísticos, sendo que apenas o TRITON X-100 1% faz parte de um grupo estatístico diferente. Já no quesito comprimento radicular, novamente tem-se dois grupos, sendo que TRITON X-100 1% e o isolado *A. niger* 100 sem indutor fazem parte do grupo B.

5 CONCLUSÕES

O isolado *Aspergillus niger* 100 apresentou um bom índice de emulsificação até o terceiro dia de avaliação.

Os isolados de *A. niger* testados apresentaram potencial positivo para a redução de viscosidade de resíduos oleosos.

A adição do indutor óleo de motor é necessária para a comprovação da capacidade surfactante dos tratamentos.

O poder emulsificante dos tratamentos apresentou relação com os dias de análise (máximo terceiro dia) e as melhores produções aconteceram no pH 5,0 e no pH 7,0.

O poder emulsificante não foi comprovado por meio das análises reológicas.

Os resultados referentes à fitotoxicidade foram insuficientes para comparar a fitotoxicidade dos biossurfactantes com relação aos tratamentos padrões.

REFERÊNCIAS

ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. *Fungal* Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 172, n. 1, p. 201-219, May 2006.

BACH, H.; BERDICHEVSKY, Y.; GUTNICK, D. An exocellular protein from the oildegrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier Emulsan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2608-2615, 2003.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 5, p. 495-508, May 2000.

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

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BENNETT, J. W. et al. **Fungi in bioremediation: formulation of fungi for in situ bioremediation**. Cambridge: Cambridge University, 2001. 935 p.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 152, n. 1/2, p. 41-52, July 1999.

BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 137-152, dez. 2000. Edição especial.

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

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 520-529, Nov. 1998.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G.; ZAJIC, E. Surface-active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 26, p. 229-253, 1980.

COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes citrato sintase**. 2011. 93 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 6, p. 915-929, 2002.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 7, n. 6/7, p. 641-646, June/July 2004.

DESAI, J. D., BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, n. 1, p. 47-64, Mar. 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. In: KOSARIC, N. (Ed.). **Biosurfactants: production, properties, applications**. New York: M. Decker, 1993. chap. 3.

FATHABAD, E. G. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**, New York, v. 1, p. 58-69, Sept. 2010.

FREITAS, F. et al. Emulsifying behavior and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 78, n. 3, p. 549-556, Oct. 2009.

GEORGE, S. et al. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 16, p. 381, 1997.

GUDIÑA, E. J. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**, New York, v. 6, p. 1-7, Feb. 2015.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, n. 7, p. 247-256, July 1992.

HASKINS, R. H. Biochemistry of the Ustilaginales: I., preliminary cultural studies of *Ustilago zaeae*. **Canadian Journal of Research**, Ottawa, v. 28, p. 213-223, 1950.

HEWALD, S.; JOSEPHS, K.; BOLKER, M. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 6, p. 3033-3040, 2005.

HUE, N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 15, n. 3, p. 203-209, 2001.

ISMAIL, W. et al. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 84, p. 168-178, Oct. 2013.

KANIKUMA, A. et al. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 33, p. 1669-1672, 1969.

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**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 250-256, Oct. 2009.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Amsterdam: Centraal Bureau voor Schimmelauctures, 2002. 116 p.

LIU, Q. et al. Improved oil recovery by adsorption-desorption in chemical flooding. **Journal of Petroleum Science Engineering**, Amsterdam, v. 43, n. 1/2, p. 75-86, June 2004.

LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 102, p. 202-209, Feb. 2013.

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

MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 54, n. 5, p. 625-633, Nov. 2000.

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

MARTÍNEZ-CHECA, F. et al. Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 16, p. 3130-3135, Nov. 2007.

MARTINS, V. G. et al. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Leipzig, v. 61, n. 9/10, p. 721-726, 2006.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MCCLEMENTS, D. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 47, n. 7, p. 611-649, 2007.

MITIDIERI, S. et al. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 10, p. 1217-1224, July 2006.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**, Oxford, v. 60, n. 5, p. 636-643, July 2005.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEM, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, Amsterdam, v. 60, n. 1/4, p. 371-380, 2001.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, Columbus, v. 94, p. 736-747, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PINHEIRO, T. L. F. **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

QAZI, M. A. et al. Role of biosurfactant produced by *Fusarium* sp BS-8 in enhanced oil recovery (EOR) through sand pack column. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, San Bernardino, v. 3, n. 6, p. 598-604, 2013.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 1-10, 2003.

ROCHA, M. V. P. et al. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 1295-1299, Dec. 2006.

RODRIGUES, C. **Seleção de fungos produtores de lipases a partir de resíduos oleosos derivados do saneamento ambiental**. 2011. 195 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 3, p. 249-252, June 2002.

RUFINO, R. D. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, New York, v. 17, n. 1, p. 34-38, Jan. 2014.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, London, v. 2011, p. 1-39, 2011.

SANTOS, F. P. B. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* EQ 109 a partir de glicerol**. 2011. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 4/5, p. 426-435, Aug. 2002.

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**, Basel, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, Sept. 2014.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 174-183, Aug. 2010.

SINGH, A.; HAMME, J. D. van; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2, application aspects. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 1, p. 99-121, Jan./Feb. 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical science. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

SPERB, J. G. C. et al. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biosurfactantes por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, Niterói, v. 17, n. 3, p. 385-397, set. 2015.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

SUWANSUKHO, P. et al. Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. **Songklanakarín Journal Science and Technology**, Songkhla, v. 30, p. 97-93, Jan. 2008.

TADROS, T. F. **Rheology of dispersions: principles and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2010. 216 p.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, Barking, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 934 p.

VARGA, J. et al. Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 5, p. 627-640, June 2004.

VASCONCELOS, W. E. et al. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 3, n. 2, p. 1-18, jul./dez. 2003.

WAZER, J. R. van et al. **Viscosity and flow measurement:** a laboratory handbook of rheology. 2nd ed. New York: Interscience, 1966. 406 p.