

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E LIPASE POR *Aspergillus
fumigatus* CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO E AVALIAÇÃO DA
BIORREMEDIAÇÃO EM DERRAMES DE ÓLEOS E DERIVADOS**

ENG. ALIM. VANESSA SACRAMENTO CERQUEIRA

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de Alimentos
na sub-área de Bioprocessos em
Alimentos

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

Rio Grande, RS

2007

“Quando todos pensam o mesmo, ninguém está pensando.”

Walter Lippmann

**Dedico este trabalho aos meus pais, João da Cunha Cerqueira e Nilza Cerqueira,
ao meu irmão Vinícius Cerqueira, e ao meu noivo Renato dos Santos**

AGRADECIMENTOS

À Deus

pela vida.

Ao meu orientador Prof. Jorge Alberto Vieira Costa

pelo exemplo, orientação, compreensão e incentivo, minha eterna amizade e admiração.

Aos meus pais João e Nilza

pelo carinho, amor, apoio e zelo em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

Ao meu irmão Vinícius e cunhada Michele

pelo apoio, carinho, amizade, e principalmente por compreenderem minha ausência.

Ao meu noivo Renato

pelo companheirismo, amor, dedicação, paciência e incentivo, sempre.

Aos bolsistas Michael da Silva, Roberta Martins e Susan Duarte

pela grande contribuição ao trabalho e pela agradável convivência.

Ao Roque, Á Mara e colegas do LEB

Pelos momentos de alegria e descontração, e pelas experiências compartilhadas.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, Daniele Colembergue, Elisangela Radmann, Michele Andrade, Michele Greque, Ana Priscila da Rosa, Célia da Rosa, Marta Pinto, Vilásia Martins, Felipe Camerini, Jaqueline Garda e Giniani Dors pela amizade, conversas e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação

pelos ensinamentos adquiridos.

À CAPES

pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários e técnicos da Instituição

pelos auxílios prestados.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram na concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
RESUMO	2
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3 JUSTIFICATIVA.....	8
CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA.....	12
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
4.1 Fermentação	13
4.2 Fermentação em estado sólido.....	13
4.2.1 Substratos para a fermentação em estado sólido.....	15
4.3 Produção de enzimas	17
4.3.1 Lipases.....	17
4.4 Biossurfactantes	19
4.4.1 Propriedades dos biossurfactantes	22
4.4.2 Vantagens dos biossurfactantes.....	24
4.5 Produção de biossurfactantes.....	25
4.5.1 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes	25
4.5.1.1 Temperatura	26
4.5.1.2 Aeração	26
4.5.1.3 pH.....	27
4.5.1.4 Fonte de carbono.....	27
4.5.1.5 Fonte de nitrogênio	28
4.5.1.6 Concentração salina	28
4.6 Aplicação dos biossurfactantes.....	29
4.7 Biorremediação.....	30
4.7.1 Métodos de biorremediação	31
4.7.2 Fatores que afetam o processo de biorremediação.....	32
4.7.2.1 Aeração	32

4.7.2.2 Nutrientes	33
4.7.2.3 Umidade	33
4.7.2.4 Temperatura	33
4.7.2.5 Agitação.....	33
4.7.2.6 Disponibilização de contaminantes	34
4.7.3 Mecanismo da biorremediação.....	34
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	38
ARTIGO I PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE DURANTE CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESTADO SÓLIDO	40
RESUMO	41
ABSTRACT.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Microrganismo	44
2.2 Preparo do inóculo para a fermentação	44
2.3 Preparo do meio de fermentação.....	45
2.4 Fermentação em estado sólido	45
2.5 Extração do biosurfactante.....	46
2.6 Determinações analíticas.....	46
2.6.1 Determinação do pH	46
2.6.2 Determinação de Umidade.....	46
2.6.3 Determinação da atividade emulsificante óleo em água (AEo/w) e água em óleo (AEw/o).....	47
2.6.4 Determinação da tensão superficial e interfacial.....	48
2.7 Estabilidade do biosurfactante em diferentes condições	48
2.8 Análise Estatística.....	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Produção de biosurfactante	50
3.2 Estabilidade do biosurfactante	60
4 CONCLUSÃO	64
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ARTIGO II PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>Aspergillus fumigatus</i> CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO FIXO	69
RESUMO	70
ABSTRACT.....	71

1	INTRODUÇÃO	72
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1	Microrganismo	73
2.2	Preparo do inóculo para a fermentação	73
2.3	Preparo do meio de fermentação.....	74
2.4	Fermentação em estado sólido.....	74
2.5	Extração da enzima	75
2.6	Extração do biossurfactante.....	75
2.7	Determinações analíticas.....	75
2.7.1	Determinação de Umidade.....	76
2.7.2	Determinação da atividade lipolítica	76
2.7.3	Determinação da atividade emulsificante óleo/água ($AE_{o/w}$) e água/óleo ($AE_{w/o}$)	77
2.8	Análise Estatística	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
4	CONCLUSÃO	85
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	ARTIGO III BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR DERRAMES SIMULADOS DE ÓLEOS E DERIVADOS.....	89
	RESUMO	90
	ABSTRACT	91
1	INTRODUÇÃO	92
2	MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1	Coleta das amostras de solo.....	94
2.2	Caracterização do solo	94
2.3	Montagem dos experimentos.....	94
2.4	Surfactante	95
2.4.1	Produção de biossurfactante.....	95
2.4.1.1	Microrganismo	95
2.4.1.2	Preparo do inóculo para a fermentação	95
2.4.1.3	Fermentação em Estado Sólido	96
2.4.1.4	Extração do biossurfactante.....	96
2.4.2	Dispersante químico	96
2.5	Bioestimulação	97
2.6	Amostragem	97

2.7	Análises de biodegradação dos compostos	98
2.8	Análises microbiológicas.....	99
2.9	Análises de nitrogênio e fósforo total	99
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
3.1	Análises microbiológicas.....	100
3.2	Análises de nutrientes.....	103
3.3	Degradação dos contaminantes.....	105
4	CONCLUSÃO	112
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
6	CONCLUSÕES GERAIS.....	116
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	118
CAPÍTULO V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		119
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXOS		132

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Principais constituintes dos farelos de arroz e trigo.....	16
Tabela 2: Aplicações industriais de lipases.....	19
Tabela 3: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos	21

ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE DURANTE CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESTADO SÓLIDO

Tabela 1: Matriz das variáveis codificadas e valores reais (entre parênteses) das variáveis codificadas para o estudo de estabilidade do biossurfactante	49
Tabela 2: Resultados de atividade emulsificante máxima água em óleo (AEw/o), tempo de máxima atividade emulsificante e produtividade (Prod w/o) obtida no tempo respectivo de máxima atividade emulsificante, para os ensaios realizados.....	51
Tabela 3: Resultados de atividade emulsificante máxima óleo em água (AEo/w), tempo de máxima atividade emulsificante e produtividade (Prod o/w) obtida no tempo respectivo de máxima atividade emulsificante, para os ensaios realizados.....	52
Tabela 4: Tensão superficial (TS) e interfacial (TI) mínima nos extratos de biossurfactante.....	59
Tabela 5: Atividade relativa (%) emulsificante água em óleo, óleo em água, tensão superficial e interfacial para os experimentos do Planejamento Experimental 2 ³	62

ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Aspergillus fumigatus* CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO FIXO

Tabela 1: Resultados de Atividade Lipolítica máxima ($AL_{máx}$), tempo de máxima Atividade Lipolítica e produtividade (Prod. _{AL}) obtida no respectivo tempo de fermentação, para os ensaios realizados.	79
--	----

ARTIGO 3: BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR DERRAMES SIMULADOS DE ÓLEOS E DERIVADOS

Tabela 1: Experimentos de biorremediação realizados em solos para cada composto estudado	95
Tabela 2: Propriedades físico-químicas do dispersante químico utilizado.....	97

Tabela 3: Contagem de microrganismos heterotróficos totais e fungos nos experimentos de biorremediação de solos contaminados com óleo de pescado bruto	101
Tabela 4: Contagem de microrganismos heterotróficos totais, fungos e degradadores de hidrocarbonetos nos experimentos de biorremediação de solos contaminados com tolueno	102
Tabela 5: Composição (%) de ácidos graxos do óleo de pescado bruto no tempo de 0 e 90 dias de biorremediação para os diferentes experimentos.....	107
Tabela 6: Concentração de tolueno (mg/Kg) nos experimentos de biorremediação em solos	108

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Estruturas básicas formadas por biossurfactantes.....	22
Figura 2: Tensão superficial, tensão interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante	23
Figura 3: Mancha de óleo derramado pelo petroleiro Prestigie.....	30
Figura 4: Tipos de contaminação onde a biorremediação é mais aplicada.....	31
Figura 5: Biodegradação de um alceno	36

ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE DURANTE CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESTADO SÓLIDO

Figura 1: Esquema do aparato experimental.....	46
Figura 2: Atividade emulsificante água em óleo (w/o) ao longo do tempo em diferentes condições de processo. (a) + Exp.1; ■ Exp. 2; ● Exp. 3; ▲ Exp. 4. (b) + Exp.5; ■ Exp. 6; ● Exp. 7; ▲ Exp. 8. (c) + Exp.9; ■ Exp. 10; ● Exp. 11; ▲ Exp. 12.....	53
Figura 3: Atividade emulsificante óleo em água (o/w) ao longo do tempo em diferentes condições de processo. (a) + Exp.1; ■ Exp. 2; ● Exp. 3; ▲ Exp. 4. (b) + Exp.5; ■ Exp. 6; ● Exp. 7; ▲ Exp. 8. (c) + Exp.9; ■ Exp. 10; ● Exp. 11; ▲ Exp. 12.....	54
Figura 4: Teor de umidade (%) ao longo do tempo em diferentes condições de processo. (a) + Exp.1; ■ Exp. 2; ● Exp. 3; ▲ Exp. 4. (b) + Exp.5; ■ Exp. 6; ● Exp. 7; ▲ Exp. 8. (c) + Exp.9; ■ Exp. 10; ● Exp. 11; ▲ Exp. 12.....	58
Figura 5: Atividade relativa média (%) e desvio padrão dos ensaios do planejamento experimental 2 ³ . □ Atividade emulsificante água em óleo relativa. ■ Atividade emulsificante óleo em água relativa. ▨ Tensão superficial relativa (%).▩Tensão interfacial relativa. (a) pH 5,0 (ensaio 1, 3, 5, 7), 7,0 (ensaio 9, 10, 11) e 9,0 (ensaio 2, 4, 6, 8); (b) salinidade 3 (ensaio 1, 2, 5, 6), 16,5 (ensaio 9, 10, 11) e 30 (ensaio 3, 4, 7, 8); (c) temperatura 10°C (ensaio 1, 2, 3, 4), 20°C (ensaio 9, 10, 11) e 30°C (ensaio 3, 4, 7, 8).....	63

ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Aspergillus fumigatus* CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO FIXO

Figura 1: Esquema do aparato experimental.....	75
---	----

Figura 2: Atividade lipolítica ao longo do tempo em diferentes condições de processo. (a) + Exp. 1; ● Exp. 2; ▼ Exp. 3; × Exp. 4. (b) + Exp. 5; ● Exp. 6; ▼ Exp. 7; × Exp. 8. (c) + Exp. 9; ● Exp. 10; ▼ Exp. 11; × Exp. 12.....80

Figura 3: Atividade Lipolítica (+), Atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) (●), Atividade emulsificante óleo em água (AEo/w) (▼) ao longo do processo fermentativo. (a) Experimento 11 (tolueno, farelo de trigo, aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹). (b) Experimento 12 (tolueno, farelo de trigo, aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹).84

ARTIGO 3: BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR DERRAMES SIMULADOS DE ÓLEOS E DERIVADOS

Figura 1: Conteúdo de nitrogênio total nos experimentos de biorremediação (a) solos contaminados com óleo de pescado. (b) solos contaminados com tolueno. □ 0 dia, ▨ 45 dias e ■ 90 dias.103

Figura 2: Conteúdo de fósforo total nos experimentos de biorremediação (a) solos contaminados com óleo de pescado. (b) solos contaminados com tolueno. □ 0 dia, ▨ 45 dias e ■ 90 dias.104

Figura 3: Teor de lipídios totais ao longo do processo de biorremediação de óleo de pescado bruto ■ Controle; ▲ Bioestimulação; ▼ Biossurfactante; ► Dispersante químico; × Biossurfactante e Bioestimulação; ● Dispersante químico e Bioestimulação.106

Figura 4: Concentração de tolueno ao longo do processo de biorremediação ■ Controle (Exp.1); ▲ Bioestimulação (Exp.2); ▼ Biossurfactante (Exp.3); ► Dispersante químico (Exp.4); × Biossurfactante e Bioestimulação (Exp.5); ● Dispersante químico e Bioestimulação (Exp.6); + Branco (Exp.7)108

Figura 5: Eficiência de remoção de tolueno para diferentes intervalos de tempo. . □ 0 a 4 dias; ▨ 4 a 7 dias; ■ 7 a 14 dias.109

NOMENCLATURA

FAC	fonte adicional de carbono
MF	meio fermentativo
AER	aeração ($\text{mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
OP	óleo de pescado bruto
OS	óleo de soja degomado
T	tolueno
FA	farelo de arroz
FT	farelo de trigo
AEo/w	atividade emulsificante óleo em água (UE.g^{-1})
AEw/o	atividade emulsificante água em óleo (UE.g^{-1})
Prod o/w	produtividade emulsificante óleo em água ($\text{UE.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Prod w/o	produtividade emulsificante água em óleo ($\text{UE.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Abs	absorbância da suspensão do óleo em água
D	diluição da amostra em água
m	massa da amostra úmida (g)
U	fração mássica da umidade
E	relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total
t	tempo de cultivo (h)
TS	tensão superficial (mN.m^{-1})
TI	tensão interfacial (mN.m^{-1})
AL	atividade lipolítica (U.g^{-1})
AL _{máx}	atividade lipolítica máxima (U.g^{-1})
Prod.AL	produtividade lipolítica ($\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
NMP	número mais provável
C	concentração do contaminante tolueno (mg.Kg^{-1})
x	tempo de amostragem (dias)

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos de superfície ativa sintetizados por diversos microrganismos e que têm recebido crescente interesse pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e produção a partir de fontes renováveis. Estes compostos apresentam propriedades emulsificante, solubilizante e dispersante, podendo ser aplicados em diversos processos, em especial, na biorremediação. O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de biossurfactante e lipase a partir do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliar a estabilidade do biossurfactante em diferentes condições físico-químicas e estudar a biorremediação em derrames de compostos de origem animal (óleo de pescado) e mineral (tolueno) ocasionados em solos utilizando o biossurfactante produzido. Para o estudo da produção de biossurfactante e lipase foram testados dois meios fermentativos (farelo de arroz e farelo de trigo), dois níveis de aeração (60 e 100 mL.g⁻¹.h⁻¹) e três fontes adicionais de carbono (óleo de soja degomado, óleo de pescado bruto e tolueno). Os experimentos foram realizados em biorreatores de coluna com leito fixo durante 144 h. Foram avaliados a cada 24 h, os teores de umidade, pH, atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) e óleo em água (AEo/w), atividade lipolítica, tensão superficial e interfacial. Para o estudo da estabilidade, foi utilizado um planejamento experimental fatorial 2³ com três pontos centrais, em que foram testados pH 5,0, 7,0 e 9,0, salinidades 3,0, 16,5 e 30,0, e temperaturas de 10, 20 e 30 °C. Os experimentos de biorremediação foram realizados durante 90 dias, sendo avaliado a influência da adição de biossurfactante ou dispersante químico e adição de fertilizantes (uréia e superfosfato triplo) na proporção C:N:P de 100:15:3 nos solos contaminados. Durante o processo foram realizadas análises de concentração do contaminante, teor de fósforo e nitrogênio total nos solos e contagem microbiológica. Os resultados mostraram que a máxima atividade emulsificante água em óleo (25,49 UE.g⁻¹) e atividade emulsificante óleo em água (58,51 UE.g⁻¹) foram obtidas quando se utilizou tolueno, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹. A maior redução na tensão superficial (36,2 mN.m⁻¹) e interfacial foi obtida quando se utilizou óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹. O surfactante produzido mostrou ser estável em diferentes níveis de temperatura, pH e salinidade, apresentando maior estabilidade quando mantido em pH 7,0, salinidade 16,5 e 20 °C. A máxima atividade lipolítica (112,46 U.g⁻¹) foi obtida quando se utilizou farelo de trigo, aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹ e tolueno como fonte adicional de carbono. Os ensaios de biorremediação em solos mostraram que a maior taxa de remoção do contaminante óleo de pescado foi 59,47% obtido no experimento contendo biossurfactante e bioestimulante em 90 dias de processo. A maior taxa de remoção do contaminante tolueno (100%) foi obtido em 14 dias para os experimentos contendo biossurfactante, dispersante químico e biossurfactante com bioestimulação. Os resultados demonstraram a possibilidade de produzir biossurfactantes e enzimas a partir de *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais e menores taxas de aeração, contribuindo para a minimização de custos de processos e impactos ambientais. O biossurfactante foi eficaz no processo de descontaminação de solos, favorecendo a remoção do poluente quando utilizado juntamente com bioestimulante. A utilização de fertilizantes mostrou favorecer o crescimento microbiano e o emprego de biossurfactante mostrou aumentar a biodisponibilidade do contaminante, acelerando o processo de degradação dos compostos.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, biorremediação, biossurfactante, fermentação em estado sólido, lipase

ABSTRACT

Biosurfactants are compounds of active surface synthesized by several microorganisms which have been increasingly receiving attention due to the advantages they show over chemical surfactants, such as biodegradability, low toxicity, and yield from renewable sources. Such compounds show emulsifying, solubilizing, and spreading features, being able to be applied to several processes, especially in bioremediation. This paper aimed at studying the production of biosurfactant and lipase from the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* through in the solid state fermentation, evaluating biosurfactant stability under different physical-chemical conditions, and studying the bioremediation in animal (fish oil) and mineral (toluene) origin compounds shedding that occur in soils using the biosurfactant produced. For studying the production of both biosurfactant and lipase two fermentation media have been tested (rice and wheat bran), two aeration levels (60 and 100 mL.g⁻¹.h⁻¹), and three additional carbon sources (degummed soybeans oil, raw fish oil, and toluene). The experiments have been performed in column, fix bed bioreactors for 144h. Moisture contents, pH, emulsifying activity water-in-oil (AEw/o) and oil-in-water (AEo/w), lipolytic activity, superficial and interfacial tension have been evaluated at 24h intervals. For studying stability a 2³ factorial experimental desing has been used with three central points in which pH 5.0, 7.0, and 9.0, salt contents 3.0, 16.5, and 30.0, and temperatures at 10, 20, and 30°C. Bioremediation experiments have been performed for 90 days, being evaluated the influence of adding biosurfactant or chemical spreading and adding fertilizers (urea and triple super phosphate) in the ratio C:N:P 100:15:3 on contaminated soils. During the process analyses have been performed on contaminant content, phosphorus content, and total nitrogen in the soils and microbiological count. The results have shown that the maximum emulsifying activity water-in-oil (25.49 UE.g⁻¹) and emulsifying activity oil-in-water (58.51 UE.g⁻¹) have been achieved when toluene, wheat bran and aeration 60 mL.g⁻¹.h⁻¹ have been used. The highest superficial and interfacial tension reduction (36.2 mN.m⁻¹) has been achieved when degummed soybeans oil, wheat bran and aeration 60 mL.g⁻¹.h⁻¹ have been used. The surfactant produced has shown to be stable at different temperature, pH, and salt levels, presenting higher stability when maintained under pH 7.0, salt content 16.5, and at 20°C. The maximum lipolytic activity (112.46 U.g⁻¹) has been obtained when wheat bran, aeration 100 mL.g⁻¹.h⁻¹ and toluene as carbon additional source were used. The bioremediation assays in soils have shown that the highest rate of fish oil contaminant removal was 59.47% obtained in the experiments containing biosurfactant and biostimulate in 90 days of process. The highest rate of toluene contaminant removal (100%) has been achieved in 14 days for experiments containing biosurfactant, chemical spreading, and biosurfactant with biostimulation. The results have shown the possibility of producing biosurfactants and enzymes from *Aspergillus fumigatus* by using agroindustrial residues and lower aeration rates, contributing to minimizing processes costs and environmental impacts. The biosurfactant has shown efficacy in the process of decontaminating soils, favoring the polluting removal when used along with a biostimulate. The use of fertilizers has shown to favor microbial growth and the use of biosurfactant has shown to increase contaminant bioavailability, accelerating the process of degrading compounds.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, bioremediation, biosurfactant, solid state fermentation, lipase

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma ampla variedade de substâncias tóxicas e perigosas têm sido introduzidas no meio ambiente. Entre as principais podem-se citar aquelas decorrentes de despejos de efluentes industriais e as provenientes de acidentes envolvendo derrames de petróleo e seus derivados.

Os resíduos líquidos gerados pelas indústrias químicas e de alimentos apresentam grande complexidade física e química, o que dificulta o seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados. No caso da exploração do petróleo, os derrames tanto na exploração quanto no transporte e os rejeitos produzidos nas atividades de refino, se incorporam ao meio ambiente natural em grandes volumes, ocasionando o acúmulo de uma grande quantidade de contaminantes (CURY, 2002).

Os derrames de óleo causados por acidentes com navios têm se tornado freqüentes e são responsáveis por cerca de dois milhões de toneladas de óleo por ano no mar, sendo que aproximadamente 92% dos acidentes ocorrem próximos à costa (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Atualmente, a despreocupação ambiental pela sociedade tem sido substancialmente modificada, fundamentalmente devido a pressões por parte da sociedade, dos grupos protecionistas e da sistemática fiscalização dos governos. A criação de leis internacionais que regulamentam o gerenciamento ambiental industrial tem tido um efeito inspirador no meio empresarial, motivando o despertar da consciência conservacionista e favorecendo a procura por tecnologias limpas.

As alternativas mais promissoras para a resolução de inúmeros problemas causados no meio ambiente derivam do estudo de novas tecnologias. Nesse contexto, a utilização de processos biológicos baseados na utilização de fungos e bactérias, ou diretamente na utilização de enzimas, tem surgido como uma das alternativas de grande potencial.

A biorremediação é definida como um conjunto de tecnologias que se baseia em processos nos quais organismos vivos, em geral microrganismos e/ou plantas, são responsáveis pela remoção ou redução de poluentes ambientais (RIZZO et al, 2006).

A grande maioria dos compostos orgânicos conhecidos, de origem animal ou vegetal, bem como muitos agentes químicos tóxicos, podem ser biodegradáveis através de técnicas de biorremediação utilizando microrganismos. Este processo pode ser acelerado através da adição de agentes facilitadores, compostos denominados biossurfactantes (RIZZO et al, 2006; MULLIGAN et al, 2001). Os biossurfactantes são

compostos de superfície ativa produzidos por diversos microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) podendo ser produzidos extracelularmente ou como parte da parede celular do microrganismo (MULLIGAN, 2005; VAN DYKE et al, 1991). Os surfactantes interagem com o contaminante hidrofóbico, aumentando a solubilidade dos mesmos em água e assim, promovendo aumento da metabolização e da possibilidade de biodegradação do contaminante (RIZZO et al, 2006).

O interesse por estes compostos vem aumentando nos últimos anos, principalmente por suas características superiores aos surfactantes químicos convencionais, como a baixa toxicidade, biodegradabilidade, especificidade, síntese a partir de material renovável e de baixo custo e aceitabilidade ecológica (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; CARRILLO et al, 1996).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, de-emulsificação, detergência, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases, podendo assim, serem aplicados principalmente nas indústrias químicas e de alimentos, na recuperação melhorada de petróleo e na biorremediação (NITSCHKE e PASTORE, 2002; LIMA, 1996).

A produção de biossurfactante por fungos filamentosos através de cultivo em estado sólido tem recebido grande interesse e se destaca por possibilitar a utilização de substratos renováveis, abundantes e baratos tais como insumos e resíduos agroindustriais. A utilização destes resíduos possibilita a redução de custos de produção de surfactantes microbianos e agrega valor aos resíduos.

Dentro do contexto atual, o estudo das condições favoráveis para o aumento da produção de biossurfactante, bem como a utilização destes compostos na biorremediação de locais contaminados, torna-se de extrema importância do ponto de vista social, econômico e ambiental.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande tem sua linha de pesquisa em Fermentação em Estado Sólido desde 1996, com pesquisas voltadas à utilização de subprodutos agroindustriais abundantes na região como substratos para a produção de diversos biocompostos. No total, até hoje, foram desenvolvidas nesta linha de pesquisa, nove dissertações de mestrado e seis trabalhos de conclusão de curso. Atualmente, encontram-se em desenvolvimento, duas teses de doutorado e uma dissertação de mestrado. Foram desenvolvidos estudos de enriquecimento protéico de farelo de arroz em biorreatores tipo tambor rotativo e tipo coluna de leito fixo, modelagem e simulação da transferência de calor

em fermentação semi-sólida de farelo de arroz em fermentador de leito fixo, produção de pectinase e de amiloglicosidase, e otimização da produção de fungos comestíveis (SANTOS et al, 2001; GANDRA et al, 2000; LINDE, 2000; MORAES, 1999; HASAN, 1998; TREICHEL et al, 1998). Em 2002, deu-se início aos projetos de produção de biossurfactantes, em que foram realizadas as seleções de cepas fúngicas produtoras de surfactantes, estudo da produção de biossurfactante por diferentes fungos em diferentes biorreatores, meios fermentativos, condições físicas de processo, e modelagem e simulação da produção de biossurfactantes (CASTIGLIONI, 2006; MARTINS, 2005; COSTA, 2004; RODRIGUES et al, 2003). Em vista da necessidade pela busca por tecnologias que visem à redução do impacto ambiental causado por diversos acidentes, o laboratório de Engenharia Bioquímica a partir de 2004, iniciou os estudos de biorremediação de solos utilizando biossurfactante produzido por fermentação em estado sólido (COSTA et al, 2006; MARTINS, 2005; CAMERINI e CHANIN, 2005). Em 2005, o laboratório firmou parceria com a empresa COPESUL com o intuito de avaliar diferentes tratamentos de regiões contaminadas pela presença de compostos tóxicos e perigosos. Assim, o desenvolvimento de tecnologias com o intuito de reduzir o impacto ambiental é um dos principais objetivos do Laboratório nesta linha de pesquisa, que conta com o apoio do CNPq, FAPERGS, CAPES e COPESUL.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de biossurfactante e lipase pelo fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido e avaliar a biorremediação de solos contaminados por derrames de compostos de origem animal (óleo de pescado bruto) e mineral (tolueno).

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a produção de biossurfactante em biorreator tipo coluna de leito fixo;
- Avaliar diferentes taxas de aeração, meios fermentativos e fontes adicionais de carbono durante a produção de biossurfactante pelo fungo *Aspergillus fumigatus*;
- Avaliar a estabilidade da atividade surfactante em diferentes níveis de pH, salinidade e temperatura;
- Estudar a produção de lipase durante a produção de biossurfactante;
- Avaliar o efeito da adição de surfactantes (biossurfactante e dispersante químico) e nutrientes (uréia e superfosfato triplo) na biorremediação de solos;
- Estudar a biorremediação de solos contaminados por compostos de origem animal e mineral.

3 JUSTIFICATIVA

O novo milênio tem sido marcado pela transformação da conscientização dos consumidores e sua relação com o ambiente. Atualmente, produtos de alta qualidade são entendidos como aqueles que também exercem um papel social e ambiental e não meramente um bem de consumo. A mudança de comportamento, implicou em transformações nas linhas de produção e na aplicação de tecnologias emergentes, com a clara intenção de atender as novas exigências do mercado globalizado e da segurança alimentar.

A evolução tecnológica dos processos industriais e o conseqüente surgimento de inúmeros produtos de conveniência proporcionaram à atividade industrial um caráter essencial na sociedade contemporânea. Neste contexto, a biotecnologia não atende somente as inovações tecnológicas das linhas de produção, mas a um melhor aproveitamento dos rejeitos agroindustriais e industriais e da obtenção de insumos mais adequados à aplicação em tecnologias limpas.

Dentro dos processos tecnológicos, os insumos recebem a mesma importância a qual se dá à qualidade e à procedência das matérias-primas que são empregadas nas formulações dos alimentos. Alguns insumos são obtidos sinteticamente e seus efeitos a longo prazo são ainda desconhecidos. Neste caso, a técnica de obtenção de biocompostos torna-se atrativa tanto no aspecto econômico quanto do ponto de vista de sustentabilidade ambiental e de saúde pública.

O processo de obtenção de biossurfactantes e lipases a partir de rejeitos agroindustriais, como o farelo de arroz e o farelo de trigo, é tão importante quanto o seu aproveitamento posterior na formulação de novos produtos ou no auxílio ao tratamento de áreas impactadas por produtos químicos.

O Estado do Rio Grande do Sul se destaca nacionalmente como grande produtor de trigo e arroz. Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria do Trigo, a produção de trigo em 2004 alcançou 2.038.644 toneladas. O Rio Grande do Sul é considerado o maior produtor de arroz irrigado, sendo sua produção de aproximadamente 5.800.000 toneladas/ano. O seu beneficiamento gera de 7 a 12% de farelo e de 17 a 22% de casca, o que representa cerca de 470.000 toneladas/ano de farelo e 1.058.000 toneladas/ano de casca. Parte do farelo de arroz tem sido empregado para a extração de óleo comestível, obtendo-se assim o farelo de arroz desengordurado, que por sua vez é utilizado para a elaboração de ração animal. Com relação à casca de arroz, esta tem sido aproveitada em quase sua totalidade para a geração de vapor.

Assim, faz-se oportuno mencionar o aproveitamento mais racional, em especial do farelo de arroz desengordurado (FAD), que por possuir um alto teor de carboidratos (cerca de 50%), o torna um excelente substrato para a produção de compostos de alto valor agregado a partir de processos fermentativos.

Os processos em estado sólido são tidos como uma das mais antigas fermentações utilizadas pelo homem, e por aproveitarem substratos abundantes e de baixo custo, vêm sendo empregados, para a obtenção de produtos de grande importância comercial, podendo-se destacar os compostos denominados biossurfactantes e lipases. O baixo custo de produção destes compostos se torna um grande atrativo, principalmente pela possibilidade de empregar rejeitos industriais de menor valor agregado.

Os biossurfactantes são compostos produzidos por diversos microrganismos, e devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, apresentam capacidade de agir em interfaces, o que lhes confere excelente capacidade emulsificante, detergente, lubrificante, solubilizante e dispersante.

Devido a estas características, os surfactantes são aplicados em diversas áreas, como a agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, nas indústrias alimentícias como aditivos de condimentos, nas indústrias farmacêuticas, têxtil e cosmética. Atualmente, o maior mercado para os surfactantes é a indústria petroquímica, onde são amplamente utilizados para a recuperação terciária de petróleo (MEOR- Microbial Enhanced Oil recovery), remoção e mobilização de resíduos de óleo e para a biorremediação.

Tendo em vista a crescente preocupação ambiental, econômica e social, a questão da utilização de biossurfactantes tem recebido grande interesse devido à características que os tornam vantajosos frente aos surfactantes obtidos sinteticamente. Dentre estas, baixa toxicidade, biodegradabilidade e síntese a partir de material renovável e de baixo custo são fatores que tornam desejável a substituição dos compostos quimicamente sintetizados.

Há uma tendência mundial imposta pelos mercados emergentes na discussão a cerca do uso de aditivos químicos sintéticos e seus malefícios à saúde humana. Desta forma, as indústrias de alimentos vêm trabalhando em uma nova perspectiva de produção de alimentos.

Atualmente, há uma forte exigência dos consumidores no esclarecimento da origem da matéria-prima, da mão de obra empregada, das condições de trabalho adotadas (Boas Práticas de Fabricação), procedência dos insumos agregados e seu

comprometimento à saúde pública, implicações ambientais, entre outros. Alguns aditivos químicos, tais como os corantes sintéticos, foram proibidos em vários países da Europa. Certamente, esta medida tende a ser adotada por outros mercados e também serão cada vez mais discutidos outros aditivos químicos e seu uso em alimentos. Mesmo em países subdesenvolvidos, onde o maior problema é a falta de alimentos e sua má distribuição, a discussão sobre segurança alimentar não se restringe apenas à oferta de alimentos em quantidade, mas também à qualidade e ao atendimento do aspecto cultural da produção local.

A busca por alimentos seguros e ricos nutricionalmente, bem como produtos ecologicamente favoráveis, tem tornado o mercado cada vez mais competitivo e exigente. Neste contexto, um fator de extrema relevância dentro dos processos produtivos e que contribui para uma competitividade diferencial no mercado se refere à questão ambiental. Existe uma tendência de fixação dos conceitos de sustentabilidade dentro da premissa de que os melhores produtos ou melhores processos produtivos são aqueles que permitam contribuir com a minimização de agressões ao meio ambiente.

Grande parte dos processos produtivos são intrinsecamente poluentes produzindo rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao meio ambiente. Milhões de toneladas de resíduos provenientes de indústrias químicas e de alimentos são gerados cada ano em toda parte do mundo. Estas substâncias são introduzidas no meio ambiente principalmente através de despejos de efluentes industriais ou através de acidentes decorrentes de atividades de transporte e processamento de óleos, envolvendo derrames em solos e ambientes hídricos.

O município do Rio Grande, localizado no extremo sul do Brasil, apresenta-se como importante pólo industrial, caracterizado pela presença de indústrias de médio e grande porte. Localizado na extremidade final da Lagoa dos Patos, na interação dos ecossistemas oceânico atlântico, lacustre e estuariano-lagunar, destaca-se por possuir um dos maiores portos do país.

A zona portuária da cidade do Rio Grande apresenta constante movimentação de embarcações e cargas provenientes de indústrias, e se caracteriza por apresentar em sua costa a instalação de diversas empresas no setor alimentício, como a industrialização de pescado, e também na área química, como fertilizantes, petróleo e seus derivados (refino e armazenamento). Os terminais marítimos integram-se ao sistema de transporte destes produtos tanto para suprir o mercado interno quanto o mercado externo.

Devido à sua localização, o estuário da Lagoa dos Patos está exposto a diversas ocorrências de poluição, seja pela eliminação de rejeitos industriais, ou por derrames de óleos causados durante o processo, refino e transporte.

Tendo em vista a problemática causada aos ecossistemas marinhos e terrestres devido à poluição por atividades industriais e na área portuária, torna-se de extrema importância a aplicação de medidas corretivas para a rápida remoção de poluentes, com o intuito de degradar substâncias toxicamente perigosas de forma menos agressora ao meio ambiente.

Um processo atraente tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico é a biorremediação, pois além de reduzir o impacto causado ao meio ambiente através da ocorrência de microrganismos, é de menor custo quando comparada aos modelos convencionais de descontaminação e tratamento de rejeitos.

Em vista disto, a presente pesquisa visa o aproveitamento de subprodutos das indústrias locais para a produção de lipases e biossurfactantes de maneira a minimizar custos de produção, e avaliar a aplicação de biossurfactantes na biorremediação de solos impactados por derrames de compostos de origem animal e mineral.

**CAPÍTULO II –
REVISÃO DA LITERATURA**

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Fermentação

Fermentação é uma manifestação fisiológica da célula viva, podendo ser definida como a desassimilação (catabolismo da matéria orgânica) de carboidratos, gorduras, proteínas, através de reações acopladas, catalisadas por enzimas intra e extracelulares, acarretando na formação de substâncias intermediárias dos produtos finais da oxidação biológica; ou, então, derivados dessas substâncias (REGULY, 1996).

Os microrganismos obtêm sua energia da oxidação da matéria orgânica, que é fundamentalmente um processo de desidrogenação desta. Como a queima é um processo gradual e não uma simples oxidação até CO₂, dando-se através de múltiplas etapas ou reações enzimáticas acopladas, cada uma catalisada por enzima distinta, somente os microrganismos cujo metabolismo seja respiratório, isto é que conduz até o oxigênio receptor para formar a água, é que obtém a máxima energia (REGULY, 1996).

Os processos fermentativos podem ser classificados em função das seguintes características:

- modo de condução: pode ser descontínua ou contínua;
- modo de cultivo e desenvolvimento do agente microbiano: processos em estado sólido, também chamado de semi-sólido, ou processos submersos;
- suprimento de oxigênio: processos aerados ou não aerados (REGULY, 2000).

4.2 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é definida como o processo fermentativo envolvendo sólidos na ausência total ou parcial de água livre. Os substratos utilizados neste tipo de processo devem possuir umidade suficiente na forma complexada ou absorvida, para permitir o crescimento e metabolismo dos microrganismos. O teor de umidade máximo é função do tipo de substrato, ou seja, função da propriedade que o mesmo possui de absorver água (PANDEY, 2003; RAGHAVARAO et al, 2003; ROBINSON et al, 2001).

A umidade é o elemento chave do controle e otimização destes processos. Muita umidade compacta o substrato, diminui a penetração de oxigênio e facilita a contaminação por crescimento de bactérias. Por outro lado, a baixa umidade inibe este

crescimento, ativa as enzimas e torna acessíveis os nutrientes (TREICHEL et al, 1998).

Muitos microrganismos são capazes de crescer em substratos sólidos, mas somente fungos filamentosos podem crescer na ausência de água livre. Bactérias e leveduras crescem em substratos sólidos em níveis de 40-70% de umidade, mas o crescimento e a propagação dos organismos unicelulares sempre requerem água livre (RAGHAVARAO et al, 2003).

Há diversos fatores importantes, os quais afetam os processos de fermentação em estado sólido. Entre estes, a seleção de cepas, substratos adequados e parâmetros de processo (físico, químico e bioquímico) são cruciais. A seleção do substrato para o processo de fermentação em estado sólido depende de diversos fatores, principalmente relacionados aos custos de produção e disponibilidade de matérias-primas (PANDEY et al, 2000). Na fermentação em estado sólido, o substrato não somente fornece os nutrientes para o crescimento microbiano, mas também serve como um suporte para as células. O substrato que proporciona todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo deve ser considerado como o substrato ideal. No entanto, alguns dos nutrientes podem estar disponíveis em concentrações sub-ótimas. Neste caso, deve ser feito um pré-tratamento (químico ou mecânico) em alguns substratos antes do uso nos processos de fermentação em estado sólido, o que faz com que eles se tornem mais facilmente acessíveis para o crescimento microbiano (PANDEY et al, 2000).

Entre os diversos fatores que são importantes para o crescimento e atividade microbiana em um determinado substrato, o tamanho de partícula e o nível de umidade são os mais críticos. Geralmente, partículas pequenas de substrato promovem maior área de superfície para ataque microbiano, sendo considerado um fator desejável. No entanto, partículas de substratos muito pequenas, pode na maioria dos casos, resultar em aglomeração do substrato, o que pode interferir com a respiração microbiana/aeração e deste modo podendo resultar em menor taxa de crescimento. Ao mesmo tempo, partículas maiores promovem melhor respiração/eficiência de aeração (devido o aumento do espaço entre partículas), mas proporcionam superfície limitada para o ataque microbiano (PANDEY et al, 2000).

Os fungos filamentosos são, sem dúvida, os microrganismos mais utilizados nos processos em estado sólido, devido à grande capacidade de crescer na ausência de água livre, versatilidade de aplicações e facilidade de manipulação e adaptação (COSTA, 1996). Os fungos são organismos eucarióticos cujos núcleos são dispersos

em um micélio (conjunto de hifas) contínuo ou septado. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção (ESPOSITO E AZEVEDO, 2004).

O ciclo de vida dos fungos não é obrigatório e sim facultativo. Dessa maneira, se as condições do meio são ideais para o crescimento somático (vegetativo), então tal crescimento segue ocorrendo. Entretanto, se há uma redução acentuada de nutrientes disponíveis, então pode ocorrer uma seqüência de etapas de desenvolvimento que leva à esporulação. Geralmente, utiliza-se o termo reprodução para se referir aos processos tanto de origem assexual como sexual que originam tais esporos; contudo, esse uso reflete as origens botânicas da micologia (ESPOSITO E AZEVEDO, 2004).

Os esporos dos fungos seriam análogos às sementes dos vegetais, que originam novos indivíduos, e “reprodução” à esporulação. No caso dos fungos miceliais essa posição tem alguma validade, entretanto, esse conceito torna-se mais inadequado em formas levuriformes, já que o processo de esporulação está relacionado à sobrevivência (ascomicetos levuriformes) e à dispersão (basidiomicetos levuriformes), e não ao aumento do número de indivíduos. Considera-se que as funções dos esporos são a produção de novos indivíduos, a dispersão a um novo local e a sobrevivência do organismo até o retorno a condições favoráveis. Baseados em tal critério pode-se afirmar que muitos fungos produzem mais de um tipo de esporo. Por outro lado, a variabilidade morfológica dos esporos apresentada pelos fungos é enorme, considerando o Reino todo ou mesmo só uma das Divisões. A diferença fundamental na produção dos esporos baseia-se no tipo de divisão nuclear que os origina. Assim, os esporos assexuais são produzidos via mitose, e os sexuais, via meiose (ESPOSITO E AZEVEDO, 2004).

4.2.1 Substratos para a fermentação em estado sólido

Pesquisas na seleção de substratos adequados para a fermentação em estado sólido têm centrado principalmente em resíduos e produtos tropicais agroindustriais. Estes incluem produtos tais como mandioca, soja, açúcar de beterraba, batata, batata doce, resíduos como farelo de trigo, farelo e casca de arroz, bagaço de cana de açúcar e mandioca, resíduos do processamento de frutas, entre outros (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

A utilização de resíduos industriais, particularmente da agroindústria, é uma forma de gerar recursos a partir de produtos até então considerados de baixo valor. Os

farelos de arroz e trigo são subprodutos de enorme potencial como insumo para o desenvolvimento de processos fermentativos em estado sólido, uma vez que o conteúdo de carboidratos é bastante elevado, composto este preferencial para fungos. Outro fator de extrema importância para seu aproveitamento se refere a sua vasta disponibilidade em nível regional, visto que o Rio Grande do Sul é um dos maiores produtores e processadores de arroz e trigo.

O farelo de arroz é um subproduto do beneficiamento do arroz polido ou parboilizado, correspondendo de 7 a 12% do peso do grão. É fonte natural de proteínas, fibras, minerais e vitaminas. No Brasil, o farelo é empregado principalmente como matéria-prima em ração ou na extração de óleos, que por sua vez gera o farelo de arroz desengordurado (FAD) (SILVA et al, 2001). O farelo de trigo é um subproduto do processo de moagem industrial do grão para a obtenção da farinha de trigo. O farelo é rico em proteínas e carboidratos, porém não apresenta quantidades significativas de lipídios. Sendo assim, é considerado um ótimo substrato para fungos na fermentação em estado sólido (NANDINI e SALIMATH, 2001). A Tabela 1 apresenta os principais constituintes dos farelos de arroz e trigo.

Tabela 1: Principais constituintes dos farelos de arroz e trigo

Constituintes	Farelo de arroz*	Farelo de arroz desengordurado**	Farelo de trigo*
Proteína (%N x 6,25)	12-15,6	15,0	14,5-15,7
Lipídios (%)	15-19,7	1,5	2,9-4,3
Fibra (%)	7-11,4	12,2	6,8-10,4
Carboidratos (%)	34,1-52,3	49,0	50,7-59,2
Cinzas (%)	6,6-9,9	9,8	4,0-6,5

Fonte: *Silva et al, 2001, ** Reguly, 2000.

Os processos biotecnológicos têm utilizado estes resíduos para a produção de diversos metabólitos de grande importância comercial, tais como enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biossurfactantes, entre outros.

4.3 Produção de enzimas

Enzimas são proteínas produzidas pelas células com a finalidade de acelerar as reações químicas do metabolismo. As enzimas são bastantes específicas quanto à sua função e, sendo assim, podem ser encontrados diversos tipos de enzima biossintetizada para catalisar os diferentes tipos de reação bioquímica.

As enzimas hidrolíticas constituem uma grande classe de enzimas responsáveis pela catálise das reações de hidrólise de diversos substratos, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, além de biomoléculas menores como aminoácidos, ésteres e fosfatos orgânicos. Uma grande variedade de enzimas hidrolíticas pode ser produzida pelos fungos filamentosos e tem sido muito explorada tecnologicamente, com aplicação em vários setores industriais (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Recentemente, muitos estudos têm procurado métodos alternativos para a produção de enzimas por fungos, baseando-se principalmente em processos sólidos. Este processo é apropriado para a produção de enzimas e outros produtos termolábeis, especialmente quando altos rendimentos são requeridos (COUTO e SANROMAN, 2006). As principais vantagens deste processo em relação aos submersos vêm sendo citados como: utilização de rejeitos agrícolas como substrato, alto rendimento e facilidade de recuperação do produto com baixo requerimento de energia. Diversas hidrolases já são produzidas por fermentação em estado sólido utilizando rejeitos agroindustriais como substratos. Celulases, xilanases, proteases, poligalacturonases, lipases e amilases têm sido obtidas de culturas de fungos filamentosos (gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Thermomyces*, *Humicola*, *Mucor*, entre outros) e leveduras (principalmente os gêneros *Candida* e *Saccharomyces*), cultivados em palha de trigo, palha de aveia, bagaço de cana, casca de arroz, polpa de beterraba, entre outros (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

4.3.1 Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas que atuam na interface óleo/água catalisando as reações de hidrólise de triacilglicerídios, resultando na formação de diacilglicerídios, monoacilglicerídios, ácidos graxos e glicerol. No entanto, dependendo das condições reacionais como baixa concentração de água, as lipases podem também catalisar a síntese, de mono, di ou triacilglicerol a partir de ácidos graxos e glicerol. As lipases propiciam a quebra de emulsões de ésteres, glicerinas e ácidos graxos de cadeia longa. Ambas lipases e esterases são capazes de catalisar a

hidrólise de ésteres, embora apenas as lipases atuem sobre ésteres insolúveis em água como os triglicerídios. As lipases apresentam um modo de ação semelhante ao das esterases, porém sua atividade aumenta em muito quando situadas na interface polar/apolar, provavelmente devido ao fato de uma parte da superfície da enzima se encontrar em melhor equilíbrio termodinâmico quando inserida na interface polar/apolar, colocando o sítio ativo da enzima em posição favorável para a catálise (VARGAS, 2004).

A maioria dos microrganismos produtores de lipase são mesófilos, sendo normalmente utilizadas temperaturas de incubação de cerca de 30 °C (VARGAS, 2004). Um número de lipases tem sido produzidas comercialmente, com a maioria deles originário de fungos e bactérias. Uma publicação relacionada a lipases triacilgliceróis disponíveis comercialmente listou enzimas de 34 diferentes fontes, incluindo 18 de fungos e 7 de bactérias (JAEGER e REETZ, 1998). Atualmente, o mercado comercial de enzimas está em torno de US\$ 3 bilhões.

Fungos são uma das mais importantes fontes de lipase para a aplicação industrial, uma vez que as enzimas fúngicas são usualmente excretadas extracelularmente, facilitando a extração do meio de cultivo. Um grande número de fungos filamentosos tem sido estudados para a produção de lipases (SILVA et al, 2005).

Diversos fatores podem afetar a produção de lipase extracelular tais como pH, temperatura, aeração e composição do meio. Além disso, a presença de triglicerídios ou ácidos graxos tem sido verificado aumentar a secreção de enzima lipolítica por um certo número de microrganismos (COUTO e SANROMAN, 2006).

Lipases microbianas tem um grande potencial para aplicações industriais devido sua estabilidade, seletividade e especificidade (CARDENASA et al, 2001). Atualmente, as lipases são amplamente usadas em indústrias de alimentos, químicas, detergentes, cosméticos e farmacêutica (COUTO e SANROMAN, 2006). Alguns exemplos de aplicações industriais de lipases estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Aplicações industriais de lipases

Indústria	Aplicação
	Hidrólise da gordura do leite
Laticínio	Aumento do aroma, da qualidade e da vida de prateleira
Cervejaria	Aumento do aroma e aceleração do processo fermentativo
Molhos e condimentos	Aumento de propriedades funcionais
Processamento de carnes	Desenvolvimento de aromas e redução no conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação de óleos – introdução de ácidos graxos de interesse em óleos e gorduras naturais
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos
Detergentes	Hidrólise de gorduras
Farmacêutica	Auxiliares de digestão
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídios de efluentes.

Fonte: Pastore et al, 2003.

4.4 Biossurfactantes

Biossurfactantes são grupos diversos estruturalmente de moléculas de superfície ativa sintetizados por microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras durante processos fermentativos (DESAI e BANAT, 1997).

Os surfactantes se caracterizam por apresentar na mesma molécula uma porção polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). A porção apolar da molécula é composta por grupos hidrofóbicos, em geral hidrocarbonetos, sejam cadeias alifáticas ou grupos aromáticos ou policíclicos (COOPER, 1986). Esta parte da molécula tem uma baixa solubilidade em água devido ao “efeito hidrofóbico”, provocado não tanto pela atração entre grupos apolares mas principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água.

Os grupos polares ou hidrofílicos podem ser carregados (aniônicos, catiônicos ou anfóteros) ou neutros (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Entre estes, encontram-se grupos como fosfato, amino, sulfato, éster, grupos carboxílicos ou um carboidrato

(KOSARIC e CAIRNS,1987). A grande maioria dos biossurfactantes são neutros ou aniônicos variando desde pequenos ácidos graxos até grandes polímeros.

Os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, sendo classificados de acordo com a sua composição química e/ou sua origem microbiana (DESAI e BANAT, 1997).

Os principais tipos de biossurfactantes são:

- *Glicolipídios*: são compostos formados por um carboidrato e um lipídio. A ligação é feita por meio de um grupamento éter ou éster. Os principais glicolipídios já encontrados e estudados são ramnolipídios, soforolipídios, trealoses.
- *Lipopeptídios e lipoproteínas*: consiste de um lipídio agregado a um polipeptídio. Os principais lipopeptídios e lipoproteínas já encontrados e estudados são surfactina, viscosina, serrawetina, subtilisina, gramicidina e polimixina.
- *Fosfolipídios*: são compostos formados entre grupos alquil sobre um lipídio e um fosfato.
- *Surfactantes poliméricos*: são produtos formados novamente por unidades de sacarídeos e resíduos de ácidos graxos, porém, são poliméricos por natureza. Os principais surfactantes poliméricos encontrados são emulsan, dispersan e liposan (RON e ROSENBERG, 2002).
- *Surfactantes particulados*: as vesículas e células microbianas com atividade surfactante são classificadas como biossurfactantes particulados (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

As principais classes de microrganismos envolvidos na produção de biossurfactantes estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos

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

Fonte: Nitschke e Pastore, 2002.

4.4.1 Propriedades dos biossurfactantes

Devido à presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os biossurfactantes são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras, como mostrado esquematicamente na Figura 1. Estes se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água e agindo como agentes umectantes em superfícies sólidas, água/sólido (CHAMPION et al, 1995).

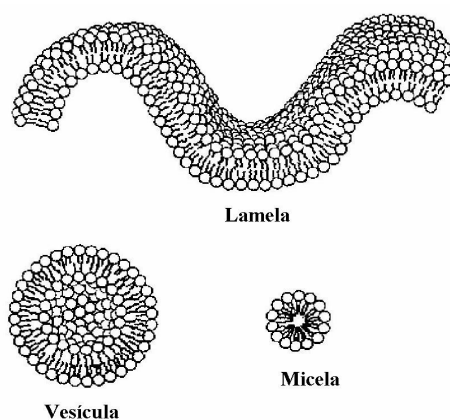


Figura 1: Estruturas básicas formadas por biossurfactantes

Fonte: CHAMPION et al, 1995.

O mecanismo de formação do biofilme na interface óleo/água ocorre inicialmente com a aderência dos microrganismos à superfície de grandes gotas de óleo, em seguida forma-se uma camada delgada na interface óleo/água. Com a produção do biossurfactante nesta camada que reveste a gota, a tensão interfacial é reduzida para o crescimento dos microrganismos (ÁSCON-CABRERA e LEBEAULT, 1995).

A efetividade e eficiência são características básicas essenciais para avaliar a capacidade de um surfactante. A efetividade de um surfactante é determinada pela sua habilidade em baixar a tensão superficial, que é definida como a força por unidade de comprimento que duas camadas superficiais exercem uma sobre a outra. Devido à presença de um surfactante, menos trabalho é requerido para quebrar uma molécula para a superfície e a tensão superficial é reduzida (MULLIGAN, 2005). Efetivos surfactantes devem atingir valores menores que 30 mN/m e 1 mN/m de tensão

superficial e tensão interfacial (tensão entre líquidos polares e apolares), respectivamente (GOUVEIA et al, 2003).

Para avaliar a eficiência de um surfactante, um dos índices mais utilizados é a concentração micelar crítica (CMC) que varia de 1 a 200 mg.L⁻¹, e que se caracteriza como sendo a solubilidade de um surfactante dentro da fase aquosa ou a concentração mínima requerida para atingir a mais baixa tensão superficial ou interfacial (MULLIGAN et al, 2001). A Figura 2 mostra como outros parâmetros variam em função da concentração de surfactante.

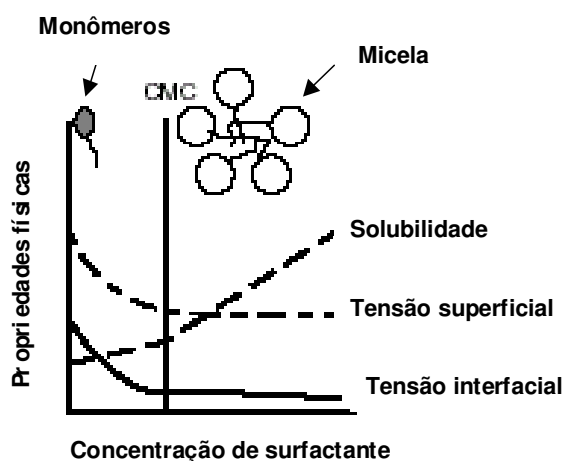


Figura 2: Tensão superficial, tensão interfacial e solubilização em função da concentração de surfactante

Fonte: MULLIGAN et al, 2001.

As moléculas de surfactante na solução aquosa, após uma certa concentração (CMC) passam a se agregar sob a forma de micelas. São as micelas os "entes" da solução responsáveis pela solubilização de gorduras. A principal razão que leva os monômeros de surfactante a se associarem sobre a forma de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água.

Os surfactantes iônicos possuem dois tipos de comportamento em solução aquosa. Abaixo da CMC, os monômeros comportam-se como eletrólito forte. Após a micelização, cada monômero adicionado contribui para a formação de micelas. A micela não é completamente ionizada, apenas uma fração, a de íons fica livre na solução. Após a CMC o incremento da condutividade da solução com a adição de

surfactante é menor. Acima da CMC, a solubilidade do óleo aumenta devido à agregação das micelas de surfactantes (MULLIGAN et al, 2001).

Outro parâmetro muito utilizado para avaliar o comportamento do surfactante é o valor do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), o qual indica se o surfactante promoverá emulsão água em óleo ou óleo em água através de comparação com surfactantes de propriedades e valores HLB conhecidos. A escala HLB pode ser construída pela fixação de valor 1 para ácido oléico e um valor de 20 para oleato de sódio e usando uma faixa de misturas destes dois componentes em diferentes proporções para obter valores intermediários. Emulsificantes com valores HLB menores do que 6 favorecem a estabilização de emulsão água em óleo, assim como, emulsificantes com valores HLB entre 10 e 18 tem efeito oposto e favorece emulsão do tipo óleo em água (GOUVEIA et al, 2003; DESAI e BANAT, 1997).

4.4.2 Vantagens dos biossurfactantes

O interesse pelos surfactantes microbianos vem aumentando nos últimos anos, principalmente por suas características superiores aos agentes emulsificantes químicos convencionais (CARRILLO et al, 1996). Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes, tais como:

- *Atividade superficial e interfacial*: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados) pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (BOGNOLO, 1999);
- *Tolerância à temperatura, pH e força iônica*: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999);
- *Biodegradabilidade*: os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo;
- *Baixa toxicidade*: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disto, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002);

- *Especificidade*: sendo os biossurfactantes moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos, são freqüentemente específicos em sua ação (KOSARIC, 1992);
- *Quebra de emulsão*: emulsões feitas por biossurfactantes podem ser facilmente quebradas pela adição de enzimas;
- *Concentração micelar crítica*: os biossurfactantes apresentam pequena concentração micelar crítica (CMC), que consiste na concentração mínima necessária para iniciar a formação de micelas (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

4.5 Produção de biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser produzidos extra ou intracelularmente, durante o crescimento do microrganismo em diferentes substratos, podendo estes variar desde carboidratos até hidrocarbonetos (COOPER, 1986). A maioria dos biossurfactantes são liberados no meio de cultura durante o estado estacionário, ou então na fase de crescimento exponencial (RON e ROSENBERG, 2002; CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

A mudança de substratos altera a estrutura do biossurfactante e, conseqüentemente, as propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma determinada aplicação (COOPER, 1986). A composição e o rendimento dos biossurfactantes dependem também do pH e da composição dos nutrientes no meio de cultivo, das características do fermentador e da temperatura utilizada (MULLIGAN et al, 2001).

A produção de biossurfactante requer o desenvolvimento de processos baratos e o uso de materiais de baixo custo, visto que estes correspondem a aproximadamente 30% do custo total de produção. Substratos adicionais têm sido sugeridos para a produção de biossurfactantes, especialmente resíduos agroindustriais. Também têm sido evidenciado estudos utilizando efluentes de indústrias contendo resíduos oleosos, gordura animal, soro de leite, resíduos ricos em amido, entre outros (MANEERAT, 2005; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

4.5.1 Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

Para a obtenção de grande quantidade de biossurfactantes é de fundamental importância o estudo de requerimentos nutricionais e condições de processo.

4.5.1.1 Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes na regulação de atividades microbianas em ambientes naturais. A temperatura influencia diretamente a resposta de microrganismos por seus efeitos na taxa de crescimento, atividade enzimática, composição celular, produção de metabólitos e requerimentos nutricionais.

Microrganismos termofílicos são cepas capazes de sobreviver e crescer a temperaturas na faixa de 42 a 100 °C. Em estudos realizados por Acevedo e McInerney (1996), citado por CAMEOTRA e MAKKAR (1998), com a finalidade de determinar a capacidade de microrganismos termofílicos de produzirem biossurfactante e/ou bioemulsificante, isolou-se bioemulsificante de *Methanobacterium thermoautotrophium*, o qual foi ativo a temperaturas acima de 80 °C. Os emulsificantes formaram emulsões viscosas, mas não reduziram a tensão superficial da água e a tensão interfacial entre água e hexadecano.

CAMEOTRA e MAKKAR (1998) depois de selecionar mais de 22 microrganismos sob condições termofílicas reportaram a produção de biossurfactantes por duas cepas de *Bacillus subtilis*. A atividade superficial destas cepas demonstrou suas capacidades como produtoras de biossurfactantes. Os biossurfactantes produzidos por estas cepas foram estáveis, demonstrando a capacidade destes microrganismos de crescerem em condições termofílicas.

Microrganismos psicrófilos são definidos como aqueles que têm uma temperatura ótima de crescimento de 15 °C ou menos, uma temperatura máxima de crescimento de aproximadamente 20 °C e uma temperatura mínima de crescimento de 0 °C ou menos. Bactérias psicrófilas têm sido isoladas de diversos ambientes naturais. Pruthi e Cameotra (1997) citados por CAMEOTRA e MAKKAR (1998), estudaram a produção de biossurfactantes por *Arthrobacter* (uma cepa Antártica). O biossurfactante foi produzido durante o crescimento do microrganismo em uma fonte de carbono imiscível em água, n-hexadecano, e foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 68,00 mN.m⁻¹ para 30,60 mN.m⁻¹ e mostrou ótima capacidade emulsificante.

4.5.1.2 Aeração

Em estudos realizados por ADAMCZAK e BEDNARSKI (2000), foi verificado que o rendimento de biossurfactantes produzidos por *Candida antarctica* através de fermentação submersa dependem principalmente da fonte de carbono e condições de aeração no meio de cultivo. Testes utilizando taxas de aeração de 1 e 2 vvm foram

realizados, e observaram que maior rendimento na produção de biossurfactantes foi conseguido com aeração de 1 vvm.

VEENANADIG et al (2000) estudaram a produção de biossurfactante através de fermentação em estado sólido por *Bacillus subtilis* em biorreator de coluna contendo farelo de trigo como meio de cultivo, testando diferentes vazões de aeração, variando de 10 a 20 L/min. Os resultados obtidos mostraram que a vazão de ar de 20 L/min proporcionou maior produção de biossurfactante.

4.5.1.3 pH

Tem sido evidenciado que o pH do meio de cultivo tem um importante papel na produção de biossurfactantes. Estudos mostraram que a máxima produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* spp. foi alcançada na faixa de pH entre 6,0-6,5 e que houve redução da produção em pH acima de 7,0. Já em estudos utilizando *Nocardia corynbacteroides*, a faixa de pH de 6,5 a 8,0 não afetou a produção de biossurfactantes além disto verificou-se que o biossurfactante permaneceu estável sobre uma ampla faixa de pH (DESAI e BANAT, 1997).

4.5.1.4 Fonte de carbono

A fonte de carbono é um dos fatores mais importantes para a produção de biossurfactantes. A composição do meio de cultivo influencia a quantidade e propriedades dos biossurfactantes produzidos. A fonte de carbono geralmente usada pode ser dividida em três categorias: carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais. Alguns microrganismos produzem biossurfactantes somente utilizando fonte de carbono hidrofóbicas, hidrocarbonetos ou óleos vegetais, outros somente usam carboidratos, e outros ainda usam diversas fontes de carbono, em combinação ou individualmente (KIM et al, 1997).

BONILLA et al (2005) avaliaram a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas putida* ML2, em meios contendo etanol, glicerol, fenantreno e naftaleno, e verificaram que o surfactante foi produzido somente em glicerol, etanol e naftaleno.

Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus ruber* e *Rhodococcus erythropolis* foi estudada por BICCA et al (1999), utilizando diferentes fontes de carbono (querosene, heptano, pentano, benzeno, diesel e óleo lubrificante). Os resultados mostraram que esta bactéria foi capaz de crescer e produzir biossurfactantes nos diferentes substratos utilizados.

Estudo realizado por SPOECKNER et al (1999) avaliou a produção de biossurfactantes do tipo glicolipídios pelo fungo *Ustilago maydis* crescendo em óleo de girassol e seus derivados e glicose. Rendimento de 30 g.L⁻¹ de glicolipídio foi alcançado utilizando 45 g.L⁻¹ de ácidos graxos de óleo de girassol. Estudos iniciais demonstraram que *Ustilago maydis* é capaz de crescer em triglicerídios contendo ácido oléico, metil ésteres ou ácidos graxos livres.

4.5.1.5 Fonte de nitrogênio

A fonte de nitrogênio afeta a produção de biossurfactante, tanto na quantidade como na sua composição. Em estudos realizados para avaliar o efeito da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus spp.*, foi verificado que máximas produções foram alcançadas utilizando nitrato como fonte de nitrogênio (DESAI e BANAT, 1997).

FERNANDES et al (2005) avaliaram o efeito da concentração de nitrogênio na produção de biossurfactante ramnolipídico por *Pseudomonas aeruginosa* LBI, quando cultivada em resíduos do refino de óleos vegetais, testando diferentes concentrações de NaNO₃ (4, 5, 6 e 7 g.L⁻¹), onde verificaram que a concentração de 4 g.L⁻¹ proporcionou maior rendimento do bioproduto.

Em estudos realizados por MAKKAR e CAMEOTRA (1997), diferentes fontes de nitrogênio (0,3%) foram testadas na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, onde verificaram que nitrato de sódio, nitrato de potássio e uréia foram as melhores fontes de nitrogênio testadas.

Entre os sais inorgânicos testados, uréia e sais de amônio foram as fontes de nitrogênio preferenciais para a produção de biossurfactantes por *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 (Duvnjak, 1982, citado por BENTO et al, 2006).

Vários autores relatam a importância de usar meio limitado em nitrogênio para produzir biossurfactantes (BENTO et al, 2006).

4.5.1.6 Concentração salina

Alguns microrganismos podem crescer e sobreviver sob uma ampla faixa de concentração salina. Bertrand et al (1990) citado por CAMEOTRA e MAKKAR (1998), estudaram o isolamento de bactéria hidrocarbonoclástica halófila, mostrando que a metabolização do hidrocarboneto pode ocorrer em condições hipersalinas.

Estudos realizados por MAKKAR e CAMEOTRA (1997) avaliaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em diferentes concentrações de NaCl (0,01-

4%), e verificou que altas concentrações de NaCl no meio de cultivo não afetaram a capacidade do microrganismo em sintetizar o biossurfactante, no entanto, a biossíntese destes compostos foram reduzidas em concentração de 4% de NaCl.

ABU-RUWAIDA et al (1991) verificaram que concentrações salinas afetaram a produção de biossurfactantes. Alguns biossurfactantes, no entanto, não foram afetados por concentrações salinas acima de 10%, embora pequenas reduções nas CMCs foram detectadas. Já Yakimov et al (1995), citado por CAMEOTRA e MAKKAR (1998), estudaram a produção de surfactantes lipopeptídios por *Bacillus licheniformis* e verificaram que esta cepa foi capaz de produzir biossurfactantes em concentrações salinas acima de 13%.

4.6 Aplicação dos biossurfactantes

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de microrganismos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, solubilização, de-emulsificação, detergência, capacidade espumante, lubrificação e dispersão de fases (MAYER e SOBERON-CHAVES, 2000). Devido a isto, estes compostos podem ser aplicados em diversas áreas como na agricultura, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil, cosmética e petrolífera (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são usados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes são geralmente usados como emulsificantes. A emulsificação tem função importante na formação de textura e consistência, bem como na dispersão de fases e na solubilização de aromas. Os agentes tensoativos encontram aplicação, por exemplo, em panificação e produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras (NITSCHKE e PASTORE 2002; BANAT et al, 2000).

Atualmente, o maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Aplicações de crescente interesse incluem biorremediação e dispersão em derrames de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e recuperação terciária de petróleo (NITSCHKE e PASTORE, 2000).

4.7 Biorremediação

Inúmeros casos de contaminação de solos e de ambientes hídricos decorrentes de derrames de óleos têm ocorrido nos últimos anos, geralmente devido à acidentes durante seu processamento e transporte, ou devido à liberação de resíduos e efluentes industriais no meio ambiente. Conseqüentemente, ocorre efeito pronunciado sobre as propriedades do local contaminado, com processos de toxicidade sobre os microrganismos e mortandade dos organismos.

Após o acidente com o petroleiro Exxon Valdez, em 1990, em que o óleo derramado no mar atingiu 15% da costa do Alasca, os processos de degradação biológica, chamados de biorremediação, receberam maior atenção. Estes processos surgiram a partir de estudos de decomposição e detoxicação de pesticidas em solos e, mais tarde, foi proposta a recuperação de áreas atingidas por derrames de óleo (CRAPEZ et al, 2002).

Um dos acidentes de grandes proporções ocorreu em 2002 com o petroleiro Prestige (Figura 3), com bandeira de Bahamas. O acidente ocorreu devido a um dano no casco do navio, que se partiu e adernou na Costa da Galícia, Espanha, derramando cerca de 25.000 toneladas de óleo. As proporções deste acidente foram tão grandes que o óleo atingiu as costas portuguesas e francesas, prejudicando as atividades pesqueiras e turísticas da região (PAES, 2005).



Figura 3: Mancha de óleo derramado pelo petroleiro Prestigie

Fonte: PAES, 2005.

Em vista de diversos acidentes ocorrendo ao redor do mundo, e seus inúmeros danos causados no meio ambiente, grande interesse tem sido dado à tecnologia de biorremediação. Entende-se como biorremediação, qualquer forma de tratamento que utiliza microrganismos para biodegradar os contaminantes do solo e de águas,

transformando os compostos orgânicos perigosos em energia e em substâncias não tóxicas ou pouco tóxicas, com isto reduzindo o impacto causado no meio ambiente (MARTINS et al, 2003). Os tipos de contaminação em que a biorremediação é freqüentemente aplicada estão mostrados na Figura 4.

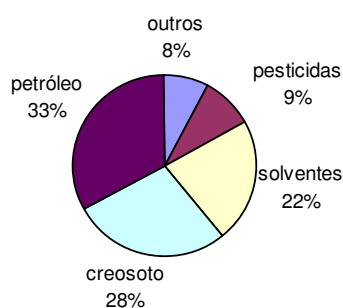


Figura 4: Tipos de contaminação onde a biorremediação é mais aplicada

Fonte: MARTINS et al, 2003.

4.7.1 Métodos de biorremediação

A técnica de biorremediação pode ser classificada de acordo com o local de aplicação e ações aplicadas. Em relação ao local de aplicação, a tecnologia de biorremediação pode ser classificada como *ex situ* e *in situ*. As tecnologias *ex situ* são aqueles tratamentos que envolvem a remoção física do material contaminado para a realização do tratamento. Ao contrário, as técnicas *in situ* envolvem tratamento do material contaminado no próprio local.

Segundo BOOPATHY (2000), entre os exemplos de técnicas de biorremediação *ex situ* e *in situ* podem-se citar:

- *Landfarming*: sistema de tratamento na fase sólida para solos contaminados, através de atividade aeróbia e/ou de aplicação de nutrientes;
- *Compostagem*: processo de tratamento termofílico aeróbio, no qual o material contaminado é misturado com um agente aglomerante, o qual aumenta a permeabilidade do solo, melhora a transferência de oxigênio e textura do solo. Pode ser feito usando pilhas estáticas ou pilhas aeradas. A tecnologia de Biopilhas envolve a construção de células ou pilhas de solo contaminado de forma a estimular a atividade microbiana aeróbica dentro da pilha através de uma aeração muito eficiente. Os produtos resultantes são gás carbônico, calor, água e a matéria orgânica compostada, geralmente utilizada como adubo;

- *Biorreatores*: a biodegradação é feita em biorreatores. Podem ser utilizados para tratar líquidos ou lodos. A degradação microbiana de compostos orgânicos poluentes é feita através do metabolismo aeróbio, facilitado pela disponibilidade artificial de oxigênio em reatores, convertendo em água e gás carbônico;
- *Bioaeração*: método de tratamento de solos contaminados através da injeção de ar, acima do lençol freático, por meio de poços de injeção situados nos locais contaminados. A quantidade, a localização e a profundidade dos poços dependem de muitos fatores geológicos, físicos e químicos. Usa-se um ventilador para forçar a entrada de ar no solo através dos poços de injeção. O ar flui pelo solo, levando o oxigênio até os microrganismos;
- *Biofiltros*: Espécies específicas de bactérias podem ser introduzidas pelo filtro para degradar determinado contaminante;
- *Bioaugmentação*: adição de microrganismos no local contaminado;
- *Bioestimulação*: estimulação de populações microbianas no solo pela adição de nutrientes necessários, promovendo o crescimento e conseqüentemente o aumento da atividade metabólica na degradação de contaminantes.

4.7.2 Fatores que afetam o processo de biorremediação

As condições ambientais podem afetar o processo de biodegradação em dois níveis: influenciando o crescimento e a atividade microbiana e influenciando também as propriedades físicas e químicas dos poluentes. Os efeitos das condições ambientais impostas ao sistema solo/poluentes/microbiota podem ser interativos, o que torna difícil prever-se um modelo de comportamento deste sistema. A otimização das condições ambientais é, portanto uma etapa fundamental no desenvolvimento de qualquer tecnologia a ser adotada no processo de biorremediação de solos contaminados (RIZZO et al, 2006).

4.7.2.1 Aeração

O oxigênio é utilizado pelos microrganismos como acceptor final de elétrons na respiração aeróbia e como substrato nas reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase. A adequada aeração do sistema solo/contaminante é portanto, essencial ao processo de biodegradação aeróbia (RIZZO et al, 2006).

4.7.2.2 Nutrientes

Para sobreviver, os microrganismos de uma forma geral, necessitam de fontes de nutrientes e de um aceptor final de elétrons. Organismos aeróbios envolvidos no processo de biorremediação de solos contaminados utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons e o carbono orgânico, proveniente dos contaminantes como fonte de carbono. Nitrogênio, fósforo e potássio são, por sua vez, os principais nutrientes inorgânicos adicionados nos processos de biorremediação (RIZZO et al, 2006).

4.7.2.3 Umidade

Teores reduzidos de umidade afetam negativamente o metabolismo microbiano, a movimentação dos microrganismos no solo, assim como o transporte dos nutrientes através deste. Por outro lado, teores excessivos de umidade limitam o transporte de oxigênio no solo. A definição do teor de umidade adequado a ser adotado no tratamento biológico de solos contaminados constitui-se portanto, uma etapa fundamental da otimização do processo de biorremediação (RIZZO et al, 2006).

4.7.2.4 Temperatura

A temperatura tem efeito nas características físicas do contaminante (solubilidade, sorção, viscosidade e volatilização) e no metabolismo microbiano. As características físicas do contaminante quando alteradas podem interferir significativamente na sua disponibilização aos microrganismos responsáveis pela biodegradação, afetando assim as taxas de degradação dos contaminantes (RIZZO et al, 2006).

4.7.2.5 Agitação

Os microrganismos não se dispersam facilmente no solo e não possuem a habilidade de se movimentar de um ponto de contaminação para outro. Este movimento restrito dos microrganismos pode afetar severamente a biodegradação dos contaminantes, uma vez que o substrato precisa estar disponível e acessível tanto para os microrganismos quanto para suas enzimas extracelulares, para que a metabolização dos mesmos ocorra. O movimento é importante para que os microrganismos atinjam as interfaces onde nutrientes, contaminantes e outros microrganismos estejam agregados. Para que a biodegradação efetiva de compostos com baixa solubilidade ocorra, é necessário um contato estreito entre as células e os

poluentes. A adição de água é uma alternativa atrativa, podendo auxiliar no aumento da movimentação microbiana, porém há a possibilidade de lixiviação dos poluentes para o lençol freático e na limitação ao transporte de oxigênio no meio, quando teores excessivos de umidade são adicionados.

A agitação mecânica utilizada em algumas técnicas de biorremediação para aumentar a aeração do solo, facilita a dispersão destes microrganismos degradadores (RIZZO et al, 2006).

4.7.2.6 Disponibilização de contaminantes

A baixa disponibilização para os microrganismos de muitos dos contaminantes encontrados em solos é um dos principais fatores que interferem no processo de biodegradação. Mesmo quando microrganismos capazes de degradar os poluentes estão presentes no sistema e todas as condições ambientais estão adequadas, a inabilidade destes microrganismos em entrar em contato com os compostos poluentes pode vir a interferir negativamente nas taxas de degradação.

O uso de surfactantes, em particular dos biossurfactantes, é um método promissor de disponibilização de contaminantes à atividade microbiana. Os surfactantes podem interagir com os compostos contaminantes e aumentar a solubilidade dos mesmos em água. A presença de surfactantes, naturais ou sintéticos, torna estes compostos disponíveis aos microrganismos e conseqüentemente à biorremediação (RIZZO et al, 2006).

4.7.3 Mecanismo da biorremediação

As técnicas de biorremediação visam criar condições ideais para que ocorra a biodegradação necessária, estimulando o crescimento da população de microrganismos no local contaminado, capazes de promover a degradação do contaminante, de forma adequada à sua quantidade e qualidade (SCHMIDT, 2004).

O processo de biorremediação se inicia com a aderência dos microrganismos à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células. Em seguida, forma-se uma camada delgada na interface óleo/água, fazendo com que os compostos insolúveis em água da fase oleosa sejam extraídos. Com a produção de substâncias de superfície ativa pelos microrganismos, as quais são denominadas biossurfactantes, nesta camada que reveste a gota, a tensão interfacial é reduzida para o crescimento dos microrganismos. Então, quando o composto oleoso presente

nas gotas desaparece, os microrganismos colonizam outras gotas (ÁSCON-CABRERA e LEBEAULT, 1995).

As gotículas de óleo presentes são circundadas pelas substâncias surfactantes, promovendo e estabilizando a dispersão. O surfactante reduz a tensão superficial, auxiliando a formação de gotículas menores do composto, diminuindo a tensão interfacial e aumentando a área interfacial. É importante salientar que quando a tensão interfacial do meio decresce, a pseudosolubilização (solubilização das microgotas mais solubilidade real do composto) cresce (SAMPAIO, 1995; KOSARIC e CAIRNS, 1987).

O contato direto das gotas de óleo e as células parece ser o mecanismo pelo qual a maior parte do substrato é consumido. A área superficial do óleo a ser contactada, inclui as gotas maiores nas quais as células se aderem, e as microgotas, são adsorvidas pelas células (SAMPAIO, 1995). As microgotas são adsorvidas na superfície celular e permanecem até serem consumidas. A contribuição relativa dessas microgotas, varia com as diferentes condições experimentais e com diferentes espécies.

Uma vez que as gotas de óleo foram aumentadas no meio, inicia-se o processo de degradação dos compostos. A biodegradação pode ser definida como o processo de reações bioquímicas, catalisadas por microrganismos, que promove a redução da complexidade de um composto químico, o qual constitui-se em substratos capazes de fornecer elementos químicos e energia necessária às reações. É fundamental que os microrganismos do ambiente onde o contaminante se encontra possuam enzimas capazes de metabolizá-lo (SCHMIDT, 2004). O processo de degradação é acompanhado pela necessidade do contato direto entre as células e uma grande quantidade de gotas de óleo (MARTINS et al, 2003; CURY, 2002).

A biodegradação pode ocorrer sob condições aeróbias ou anaeróbias. Em condições aeróbias, os microrganismos se desenvolvem usando o oxigênio que, em quantidade suficiente, transforma grande quantidade de contaminantes em dióxido de carbono e água. Em condições anaeróbias, a atividade biológica acontece na ausência de oxigênio, de tal forma que os microrganismos decompõem os compostos orgânicos, como por exemplo, do solo para liberar a energia que necessitam. Este processo de degradação é muito mais lento que o aeróbio local (MARTINS et al, 2003).

O processo de biorremediação é realizado por microrganismos encontrados na natureza e que sejam capazes de degradar vários tipos de contaminantes (cadeia

curta, cadeia longa e numerosos compostos aromáticos, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), compostos geralmente caracterizados por baixa solubilidade em água (CAMEOTRA e BOLLAG, 2003). Isto, associado ao fato de a primeira etapa no processo de degradação obrigar o microrganismo a entrar em contato direto com estes substratos, atribuiu aos mesmos, através da evolução, uma estratégia que possibilita o aumento do contato entre microrganismos e compostos insolúveis em água através da emulsificação. Sendo assim, não é surpreendente que microrganismos os quais crescem sobre substratos imiscíveis em água usualmente produzam emulsificantes potenciais. Os surfactantes produzidos ajudam a dispersar o óleo, aumentando a área superficial para o crescimento e ajudam a desprender o microrganismo do óleo depois do composto utilizado ter sido esgotado (CAMEOTRA e BOLLAG, 2003).

A degradação microbiológica possui uma seqüência preferencial de compostos a serem degradados. No caso de hidrocarbonetos, os alifáticos (alcanos e alcenos) são mais rapidamente e facilmente degradados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos e finalmente cicloalcanos.

O caminho geral para a degradação de um alcano envolve um mecanismo seqüencial denominado co-oxidação, que se inicia com o ataque monoterminal formando álcool primário, seguido de um aldeído e um ácido carboxílico (LIMA, 1996). A Figura 5 mostra a seqüência das substâncias formadas.

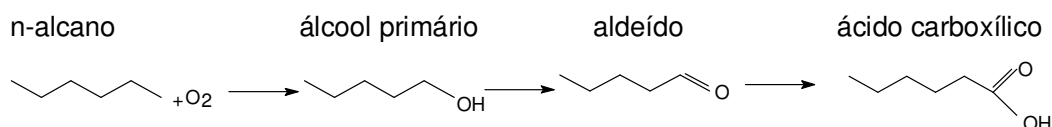
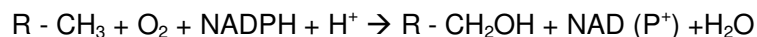


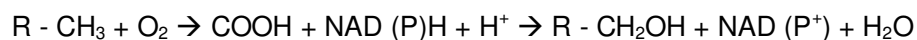
Figura 5: Biodegradação de um alcano

A conversão de n-alcano ao correspondente álcool pode seguir dois processos:

- por hidroxilação através de hidrolase:



- por utilização da oxigenase:



O ácido carboxílico formado na degradação do alcano, é então quebrado, formando ácido graxo com duas unidades de carbono a menos, dióxido de carbono e acetil CoA. Este processo é conhecido como β -oxidação (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

Os compostos aromáticos são particularmente resistentes a biodegradação. No entanto, estudos mostram que hidrocarbonetos cíclicos contendo até seis anéis condensados, podem ser degradados. O processo de degradação envolve hidroxilação da estrutura do anel benzênico por ação de uma enzima, formando um diol (catecol), os quais são subsequenteemente degradados por intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Interessantemente, fungos e bactérias formam intermediários com diferentes estereoquímica. Fungos formam trans-dióis enquanto bactérias quase sempre formam cis-dióis. Uma vez que as bactérias são degradadores de hidrocarbonetos dominantes nos ambientes marinhos, a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos resulta em detoxificação e não produz cancerígenos potenciais. A completa biodegradação de hidrocarbonetos resulta em produtos finais não tóxicos, dióxido de carbono e água, bem como biomassa celular (ATLAS, 1995).

**CAPÍTULO III –
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

Para uma melhor compreensão, o presente trabalho foi dividido em três artigos:

ARTIGO I - PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE DURANTE CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESTADO SÓLIDO

ARTIGO II - PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Aspergillus fumigatus* CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO FIXO

ARTIGO III - BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR DERRAMES SIMULADOS DE ÓLEOS E DERIVADOS

ARTIGO I

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE DURANTE
CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESTADO SÓLIDO**

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE DURANTE CRESCIMENTO FÚNGICO EM ESTADO SÓLIDO

Vanessa Sacramento Cerqueira, Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos produzidos por diversos microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) e se destacam por apresentar baixa toxicidade, biodegradabilidade, aceitabilidade ecológica e capacidade de produção a partir de fontes renováveis e de baixo custo, em especial os resíduos agroindustriais. Possuem ampla variedade de aplicações podendo ser utilizados como agentes emulsificantes, solubilizantes, detergentes e espumantes. O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de biossurfactante pelo fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido, testando diferentes meios fermentativos, taxas de aeração e fonte adicional de carbono, e avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido em diferentes condições físico-químicas. Os resultados obtidos mostraram que a maior atividade emulsificante água em óleo ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$) e atividade emulsificante óleo em água ($58,51 \text{ UE.g}^{-1}$) foram alcançadas quando se utilizou tolueno, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A maior redução na tensão superficial e interfacial foi obtida quando se utilizou óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O surfactante produzido mostrou ser estável em diferentes níveis de temperatura, pH e salinidade, indicando grande capacidade de utilização em diversos setores industriais. Os resultados evidenciaram a possibilidade de produzir biossurfactantes a partir de rejeitos agroindustriais e baixas taxas de aeração, tornando o processo ambiental e economicamente vantajoso.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, bioemulsificante, biossurfactante, fermentação em estado sólido.

ABSTRACT

Biosurfactants are compounds produced by several microorganisms (bacteria, filamentous fungi, and yeasts) which stand out for their low toxicity, biodegradability, ecological acceptance and production capability from renewable, low cost sources, especially agroindustrial residues. They show a large range of applications, such as being used as emulsifying, solubilizing, detergent, and foaming agents. This paper aimed at studying biosurfactant production by the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* cultivated under solid state, testing different media, aeration rates, and additional carbon sources, as well as evaluating the stability of the biosurfactant produced under different physical-chemical conditions. The results obtained have shown that the highest emulsifying activity water-in-oil (25.49 UE.g^{-1}) and emulsifying activity oil-in-water (58.51 UE.g^{-1}) have been achieved when toluene, wheat bran, and aeration $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ were used. The highest reduction in superficial and interfacial tension was achieved when degummed soybean oil, wheat bran, and aeration $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ were used. The surfactant produced has shown to be stable under different temperature, pH, and salt levels, indicating a great capability to utility to several industrial sectors. The results have evidenced the possibility to produce biosurfactants from agroindustrial wastes and at low aeration rates, causing the process to become environmentally and economically advantageous.

Key words: *Aspergillus fumigatus*, bioemulsifier, biosurfactant, solid state fermentation.

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes constituem um grupo de metabólitos secundários com propriedades tensoativas e que são sintetizados por uma variedade de microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Estes metabólitos são moléculas anfipáticas, que se caracterizam por apresentar uma porção hidrofílica, constituída geralmente por di-, mono-, oligo- ou polissacarídeos, aminoácidos, grupos carboxilados ou fosfatos e outra porção hidrofóbica formada por cadeia hidrocarbonada (BENINCASA et al, 2004; DESAI e BANAT, 1997).

Em função da presença de grupos polares e apolares na mesma molécula, esses compostos tendem a se distribuir nas interfaces com diferentes graus de polaridade (água-óleo ou ar-água), reduzindo a tensão interfacial e superficial, o que os tornam adequados para diversas aplicações industriais, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases (GOUVEIA et al, 2003; NITSCHKE e PASTORE, 2002; MAYER e SOBERON-CHAVES, 2000). Estes compostos podem ser aplicados em diversas áreas como agricultura, indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil, cosmética e petrolífera (BANAT et al, 2000).

Na indústria de alimentos, os biossurfactantes têm diversas aplicações promissoras, principalmente como aditivos de alimentos, sendo candidatos potenciais na busca por produtos diferentes funcionalmente (DESAI e BANAT, 1997). Outra área de grande aplicação se refere à indústria petrolífera, onde são amplamente utilizados para a recuperação terciária de petróleo (MEOR-Microbial Enhanced Oil Recovery), na remoção e mobilização de resíduos de óleo e na biorremediação (RON e ROSENBERG, 2002).

Em relação às potencialidades de aplicação dos biossurfactantes, deve-se considerar que estas macromoléculas são produzidas por uma ampla variedade de microrganismos e que possuem diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície. O tipo e a quantidade de biossurfactante produzido dependem primeiramente do tipo de microrganismo produtor e de variáveis de produção como fontes de carbono e de nitrogênio, elementos traços, aeração, temperatura, entre outros (FRANCY et al, 1991).

Os surfactantes de origem microbiana têm sido reconhecidos como substitutos parciais ou totais dos surfactantes sintéticos, visto suas características superiores. Dentre as vantagens que elevam o potencial comercial destas biomoléculas destacam-

se baixa toxicidade, biodegradabilidade e possibilidade de produção a partir de materiais de baixo custo (BENTO et al, 2006).

No entanto, poucos biossurfactantes são utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção. Devido a isto, estudos vêm sendo realizados em relação ao desenvolvimento de processos mais econômicos na produção destes biocompostos, em especial a utilização de matérias-primas de baixo custo, responsáveis por 10-30% do custo total (HABA et al, 2000).

Neste contexto, o processo de fermentação em estado sólido desempenha um papel de destaque, por possibilitar o aproveitamento de resíduos ou subprodutos sólidos agroindustriais, como por exemplo, farelos, cascas, bagaços, entre outros (PINTO et al, 2005). Considerando o grande potencial do Brasil para a produção agrícola, e com isso a grande geração de resíduos ou subprodutos agroindustriais, a fermentação em estado sólido para a produção de biossurfactantes se torna interessante, pois além de agregar valor a essas matérias-primas, diminui possíveis ocorrências de poluição ambiental.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de biosurfactante através de processo fermentativo em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais e avaliar a sua estabilidade em diferentes condições físico-químicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A linhagem foi mantida a 4°C em tubos de ensaio inclinado contendo meio ágar batata-dextrose (PDA), adicionado de 1% de glicerina e 0,5% de ágar-ágar (MARTINS et al, 2006).

2.2 Preparo do inóculo para a fermentação

A propagação do inóculo foi feita através da técnica de espalhamento em superfície, realizada em frascos de Roux contendo ágar batata-dextrose (PDA) adicionado de 1% de glicerina e 0,5% de ágar-ágar. Os frascos de Roux foram mantidos em estufa a 30°C durante 7 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).

2.3 Preparo do meio de fermentação

Foram avaliados dois meios fermentativos, como fonte de carbono, o primeiro constituído de farelo de arroz desengordurado, e o segundo constituído de farelo de trigo. Foi adicionada ao meio, casca de arroz como inerte, e as proporções utilizadas foram 15% de casca e 85% de farelo. Previamente ao preparo do meio, foi realizada a moagem do farelo arroz em moinho de facas, e posteriormente o peneiramento, onde foram recolhidas as partículas com granulometria entre 0,420 e 0,500 mm (Tyler 35 e 32, respectivamente). O farelo de trigo foi peneirado e recolhidas as partículas com granulometria entre 0,710 e 1,000 mm (Tyler 24 e 16, respectivamente).

Foi adicionada à mistura da casca e farelo, 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. O meio foi ajustado para umidade de 50% e pH 4,5. Foi avaliada a adição de três fontes adicionais de carbono (óleo de soja degomado, óleo de pescado bruto e tolueno) na proporção de 1% (v/p). A concentração inicial de microrganismo foi de 4×10^6 esporos/g de meio.

2.4 Fermentação em estado sólido

Os cultivos foram realizados em biorreatores encamisados tipo coluna de leito fixo, com dimensões internas 50 x 250 mm (diâmetro x altura), mantidos a 30°C durante 144 h. O ar fornecido ao sistema foi controlado através de rotâmetros previamente calibrados, sendo testadas aerações de 60 e 100 $mL \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. O esquema do aparato experimental utilizado está mostrado na Figura 1.

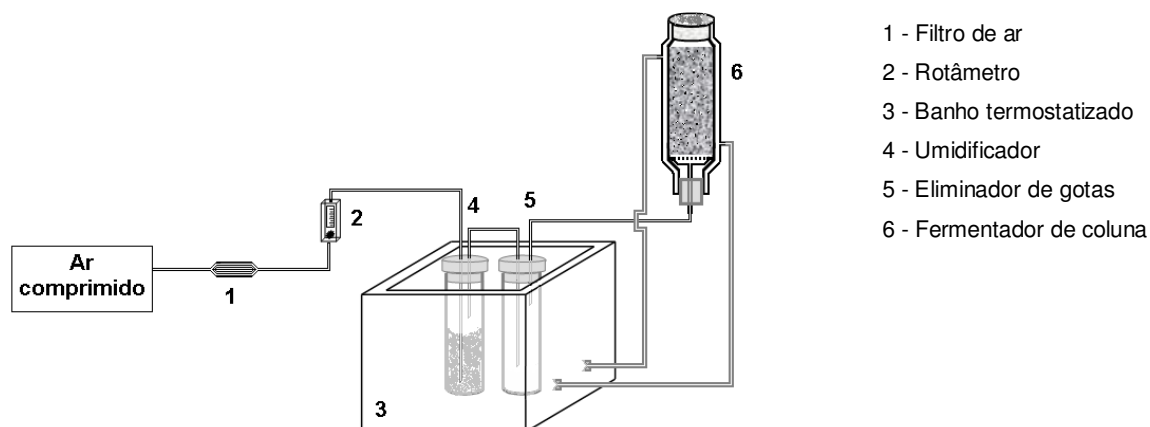


Figura 1: Esquema do aparato experimental.

2.5 Extração do biossurfactante

A extração do biossurfactante do farelo fermentado foi realizada com água destilada a 90°C na proporção de 1:9 (1g de farelo e 9 mL de água). Posteriormente, a amostra foi submetida à agitação em incubadora rotativa (B. BRAUN CERTOMAT BS-1, Alemanha) a 160 rpm e 50°C durante 30 min, sendo em seguida filtrada à vácuo. O extrato obtido foi utilizado na determinação da atividade emulsificante e medidas da tensão superficial e tensão interfacial.

2.6 Determinações analíticas

Foram coletadas amostras a cada 24 h do processo fermentativo e as análises foram realizadas em triplicata.

2.6.1 Determinação do pH

A determinação do pH das amostras fermentadas foi feita utilizando o extrato obtido através da diluição do meio fermentado seco em água na proporção de 1:10 (p/v) em pHmetro digital (Quimis HI 8314, Brasil) utilizando eletrodo de vidro.

2.6.2 Determinação de Umidade

A determinação do teor de umidade das amostras fermentadas foi feita segundo metodologia padrão da AOAC (1995).

2.6.3 Determinação da atividade emulsificante óleo em água (AEo/w) e água em óleo (AEw/o)

O extrato de biossurfactante juntamente com água destilada e óleo de soja foram colocados em tubos de ensaio e agitados durante 1 min em agitador vortex (Phoenix, AP56, Brasil) a 700 rpm. Após 60 min em repouso foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Femto, 700 Plus, Brasil) a 610 nm para a determinação da atividade emulsificante óleo em água (AEo/w) (JOHNSON et al, 1992). Nesta análise foi realizado um ensaio branco para cada amostra que consistiu na leitura da absorbância em espectrofotômetro a 610 nm do extrato do biossurfactante anteriormente à agitação.

Os tubos contendo as emulsões foram mantidos em repouso durante 24 h, e então determinada a atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) através da leitura da altura da emulsão formada e da camada de óleo remanescente formada (BRODERICK e COONEY, s/d). Nesta análise, ensaios brancos foram realizados consistindo na agitação de água e óleo de soja em agitador vortex, sem a presença do biossurfactante, e efetuada a leitura após 24 h em repouso.

Os valores de atividade emulsificante foram definidos pelas Equações 1 e 2 e a produtividade pela Equação 3:

$$AEo/w = (Abs \cdot D) / (m \cdot (1 - U)) \quad (\text{Equação 1})$$

$$AEw/o = (E \cdot D) / (m \cdot (1 - U)) \quad (\text{Equação 2})$$

$$Prod = (AE_x - AE_0) / (t_x - t_0) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

AEo/w = atividade emulsificante óleo em água (UE.g⁻¹);

AEw/o = atividade emulsificante água em óleo (UE.g⁻¹);

Prod = produtividade (UE.g⁻¹.h⁻¹);

Abs = absorbância da suspensão do óleo em água;

D = diluição da amostra em água;

m = massa da amostra úmida (g);

U = fração mássica da umidade;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total;

AE_x = Atividade emulsificante no tempo de cultivo (UE.g⁻¹);

AE_0 = Atividade emulsificante no tempo inicial de cultivo ($UE.g^{-1}$);

t_x = tempo de cultivo (h);

t_0 = tempo inicial de cultivo (h).

A atividade emulsificante óleo em água ($AE_{o/w}$) foi expressa em Unidade Emulsificante por grama ($UE.g^{-1}$) e definida como a quantidade de biossurfactante necessário para aumentar a absorvância em 1,0 à 610 nm quando comparado com o branco.

A atividade emulsificante água em óleo ($AE_{w/o}$) foi expressa em Unidade Emulsificante por grama ($UE.g^{-1}$) e definida como a massa de farelo fermentado necessária para manter uma emulsão estável por um período de 24 h.

2.6.4 Determinação da tensão superficial e interfacial

As determinações de tensão superficial e interfacial foram realizadas em Tensiômetro Digital Kruss K-9 (Kruss, Alemanha) usando o método do anel Du Nouy (COSTA et al, 2006). A medida da tensão interfacial foi feita utilizando hexadecano (COSTA et al, 2006).

2.7 Estabilidade do biossurfactante em diferentes condições

Para avaliar a estabilidade do biossurfactante foi utilizado o extrato obtido no tempo de 144 h de fermentação utilizando farelo de trigo como meio fermentativo, aeração de $60 mL.g^{-1}.h^{-1}$ e tolueno como fonte adicional de carbono, o qual apresentou maior atividade emulsificante água em óleo e óleo em água.

A estabilidade do biossurfactante produzido foi avaliada em diferentes temperaturas (10, 20 e 30 °C), pH (5,0, 7,0 e 9,0) e salinidade (3, 16,5 e 30). O ajuste de pH foi realizado com ácido acético 20% e hidróxido de amônio 20% e a salinidade utilizando NaCl P.A. Os extratos foram mantidos em banho-maria por 1 h e deixados à temperatura ambiente para estabilização da mesma. Posteriormente, foram realizadas as medidas da atividade emulsificante e tensões superficial e interfacial. Os resultados foram expressos em termos de atividade relativa (%), calculada tendo como padrão (100%) o extrato obtido nas condições citadas de fermentação.

2.8 Análise Estatística

Para determinar as melhores condições de produção de biossurfactante foram realizados 12 experimentos, onde foram estudados dois meios fermentativos (MF): farelo de arroz (FA) e farelo de trigo (FT); duas taxas de aeração (AER): 60 e 100mL.g⁻¹.h⁻¹ e três fontes adicionais de carbono (FAC): óleo de pescada bruto (OP), óleo de soja degomado (OS) e tolueno (T). As respostas foram avaliadas através de Análise de Variância (ANOVA) das triplicatas das amostras, utilizando teste de Tukey.

Para o estudo da estabilidade do biossurfactante, os experimentos realizados seguiram um modelo de Planejamento Experimental Fatorial completo 2³ com triplicata no ponto central. A Tabela 1 apresenta a matriz das variáveis codificadas e os valores reais.

Tabela 1: Matriz das variáveis codificadas e valores reais (entre parênteses) das variáveis codificadas para o estudo de estabilidade do biossurfactante

Experimento	Variáveis		
	pH	Salinidade	Temperatura (°C)
E1	-1 (5,0)	-1 (3)	-1 (10)
E2	1 (9,0)	-1 (3)	-1 (10)
E3	-1 (5,0)	1 (30)	-1 (10)
E4	1 (9,0)	1 (30)	-1 (10)
E5	-1 (5,0)	-1 (3)	1 (30)
E6	1 (9,0)	-1 (3)	1 (30)
E7	-1 (5,0)	1 (30)	1 (30)
E8	1 (9,0)	1 (30)	1 (30)
E9	0 (7,0)	0 (16,5)	0 (20)
E10	0 (7,0)	0 (16,5)	0 (20)
E11	0 (7,0)	0 (16,5)	0 (20)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de biossurfactante

As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores máximos das Atividades Emulsificante água em óleo (AEw/o) e óleo em água (AEo/w) obtidos durante o processo fermentativo, respectivamente, tempo de máxima atividade emulsificante e valores de produtividade alcançados no tempo correspondente à máxima atividade emulsificante.

As Figuras 2 e 3 mostram o comportamento da AEw/o e AEo/w, respectivamente, ao longo do tempo de fermentação. Os resultados apresentados demonstram a capacidade de produção de biossurfactante pelo fungo filamentosso *A. fumigatus* nas diferentes condições nutricionais e de aeração empregadas. O máximo valor de AEw/o ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$) e máxima AEo/w ($58,51 \text{ UE.g}^{-1}$) foram alcançadas em 144 h de fermentação quando se utilizou farelo de trigo, aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e tolueno como fonte adicional de carbono (experimento 11).

As máximas atividades emulsificantes água em óleo foram obtidas entre 48 e 144 h de fermentação, alcançando valores entre $15,52$ e $25,49 \text{ UE.g}^{-1}$. As mais altas atividades emulsificantes água em óleo foram obtidas ao utilizar farelo de trigo como meio fermentativo ($p < 0,05$). A utilização de óleo de soja degomado e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, proporcionou, em média, maior atividade emulsificante ($p < 0,05$).

A partir de 96 h de processo, os experimentos 1 a 9, exceto experimento 8, apresentaram redução na atividade emulsificante água em óleo (Figura 2). A utilização de óleo de pescado, farelo de arroz e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (experimento 1) e $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (experimento 2), promoveram as menores atividades emulsificantes água em óleo alcançando valores de $15,51$ e $17,25 \text{ UE.g}^{-1}$, respectivamente ($p > 0,05$).

As máximas atividades emulsificantes óleo em água (AEo/w) foram obtidas nos experimentos em que se empregou farelo de trigo juntamente com tolueno e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($58,51 \text{ UE.g}^{-1}$) e com óleo de pescado bruto e $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($50,67 \text{ UE.g}^{-1}$), não apresentando diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). As máximas atividades emulsificante óleo em água (AEo/w) foram obtidas entre 96 e 144 h de processo (Figura 3).

Tabela 2: Resultados de atividade emulsificante máxima água em óleo (AEw/o), tempo de máxima atividade emulsificante e produtividade (Prod w/o) obtida no tempo respectivo de máxima atividade emulsificante, para os ensaios realizados.

Exp.	FAC	MF	AER (mL.g ⁻¹ .h ⁻¹)	AEw/o (UE.g ⁻¹)	Tempo de fermentação (h)	Prod w/o (UE.g ⁻¹ .h ⁻¹)
1	OP	FA	60	15,52 ^a	96	0,0425 ^a
2	OP	FA	100	17,25 ^{abh}	96	0,0316 ^a
3	OP	FT	60	21,54 ^{cd}	96	0,1092 ^b
4	OP	FT	100	22,12 ^{cd}	96	0,1069 ^b
5	OS	FA	60	21,68 ^{cd}	96	0,0767 ^{cd}
6	OS	FA	100	20,32 ^{dgi}	96	0,0607 ^{dgi}
7	OS	FT	60	23,39 ^{ce}	96	0,1044 ^{be}
8	OS	FT	100	24,46 ^{ef}	120	0,0855 ^{ce}
9	T	FA	60	18,99 ^{bdghi}	96	0,0457 ^{af}
10	T	FA	100	17,52 ^{bh}	48	0,0809 ^{cg}
11	T	FT	60	25,49 ^f	144	0,0767 ^{cd}
12	T	FT	100	18,79 ^{hi}	120	0,0465 ^{af}

Exp.= Experimento; FAC = fonte adicional de carbono; MF = meio fermentativo; AER = aeração; OP = óleo de pescado bruto; OS = óleo de soja degomado; T = tolueno; FA = farelo de arroz; FT = farelo de trigo.

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para cada resposta estudada

Tabela 3: Resultados de atividade emulsificante máxima óleo em água (AEo/w), tempo de máxima atividade emulsificante e produtividade (Prod o/w) obtida no tempo respectivo de máxima atividade emulsificante, para os ensaios realizados.

Exp.	FAC	MF	AER (mL.g ⁻¹ .h ⁻¹)	AEo/w (UE.g ⁻¹)	Tempo de fermentação (h)	Prod o/w (UE.g ⁻¹ .h ⁻¹)
1	OP	FA	60	46,99 ^{abe}	144	0,2499 ^{abc}
2	OP	FA	100	41,31 ^{ace}	144	0,2173 ^a
3	OP	FT	60	48,55 ^{ad}	144	0,2561 ^{abc}
4	OP	FT	100	50,67 ^{bdf}	144	0,2630 ^{abc}
5	OS	FA	60	39,53 ^{eg}	120	0,2317 ^{ab}
6	OS	FA	100	44,32 ^{adeg}	120	0,2932 ^{bc}
7	OS	FT	60	42,16 ^{adeg}	120	0,2766 ^{abc}
8	OS	FT	100	40,74 ^{age}	120	0,2312 ^{ab}
9	T	FA	60	43,04 ^{adeg}	144	0,2165 ^a
10	T	FA	100	36,16 ^{cg}	120	0,2240 ^a
11	T	FT	60	58,51 ^f	144	0,3066 ^c
12	T	FT	100	38,80 ^{eg}	96	0,2599 ^{abc}

Exp.= Experimento; FAC = fonte adicional de carbono; MF = meio fermentativo; AER = aeração; OP = óleo de pescado bruto; OS = óleo de soja degomado; T = tolueno; FA = farelo de arroz; FT = farelo de trigo.

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para cada resposta estudada

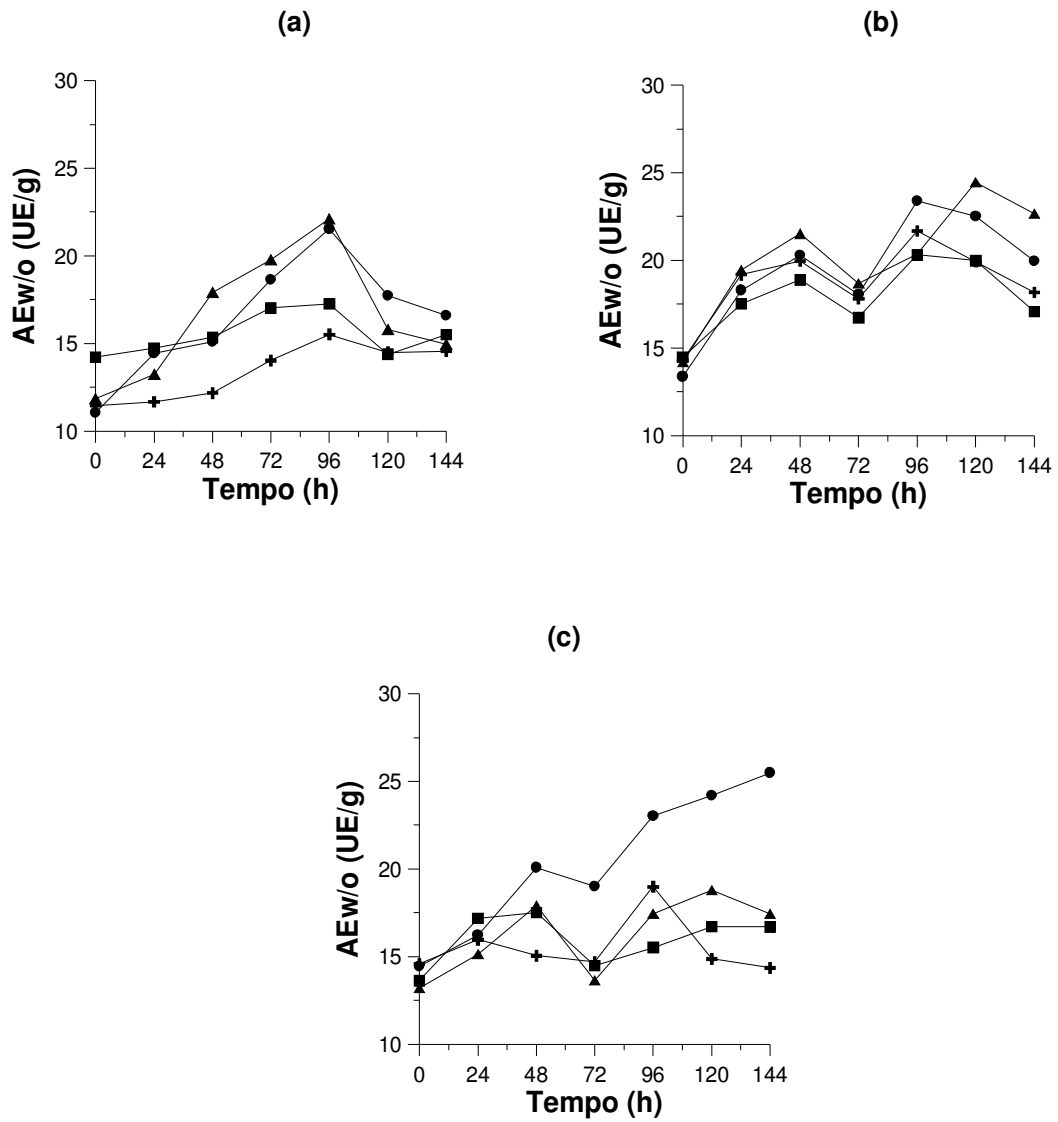


Figura 2: Atividade emulsificante água em óleo (w/o) ao longo do tempo em diferentes condições de processo. **(a)** + Exp.1; ■ Exp. 2; ● Exp. 3; ▲ Exp. 4. **(b)** + Exp.5; ■ Exp. 6; ● Exp. 7; ▲ Exp. 8. **(c)** + Exp.9; ■ Exp. 10; ● Exp. 11; ▲ Exp. 12.

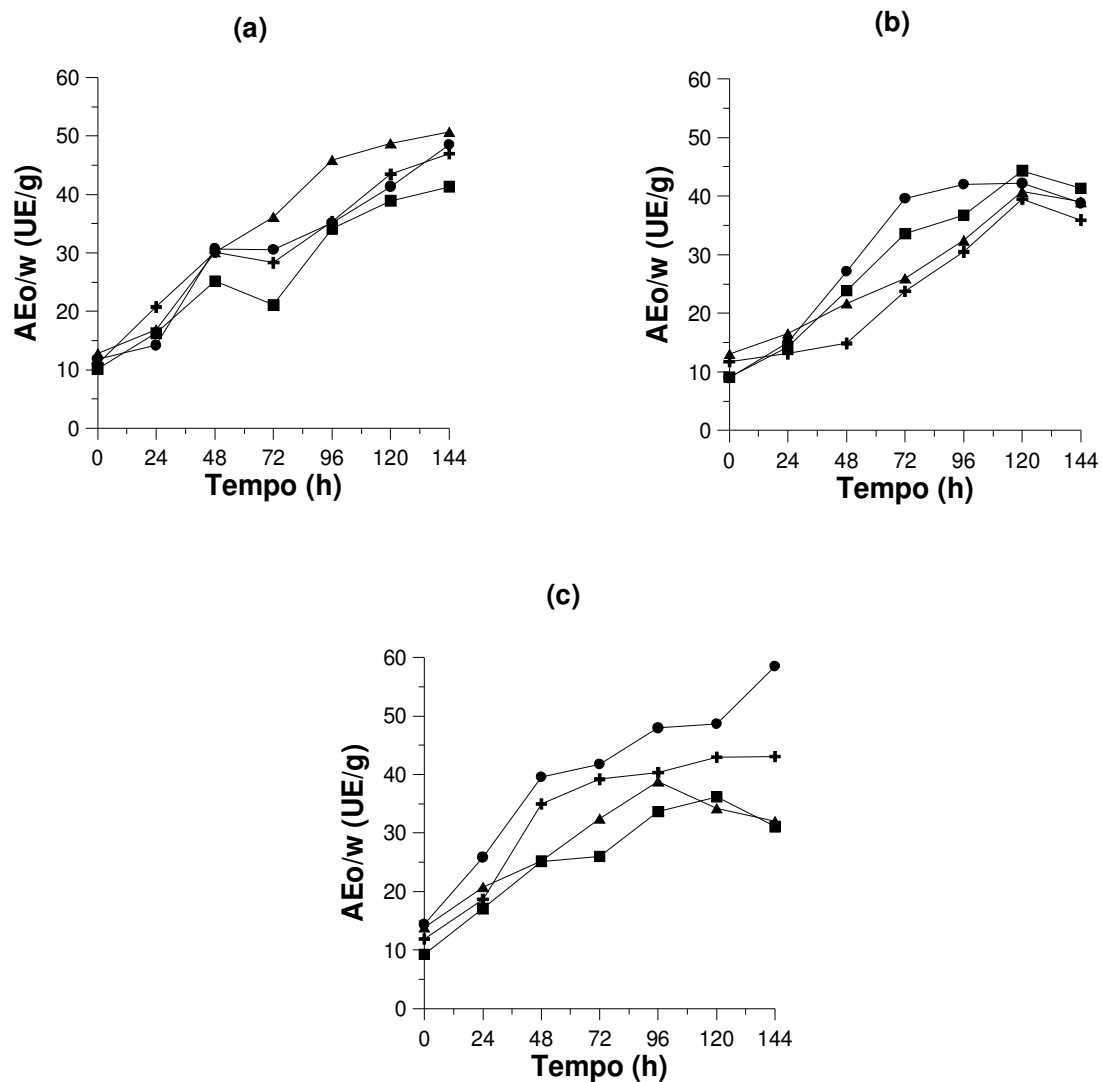


Figura 3: Atividade emulsificante óleo em água (o/w) ao longo do tempo em diferentes condições de processo. **(a)** + Exp.1; ■ Exp. 2; ● Exp. 3; ▲ Exp. 4. **(b)** + Exp.5; ■ Exp. 6; ● Exp. 7; ▲ Exp. 8. **(c)** + Exp.9; ■ Exp. 10; ● Exp. 11; ▲ Exp. 12.

As produtividades água em óleo (Prod w/o) e óleo em água (Prod o/w) foram consideradas no tempo de máxima atividade emulsificante, sendo este variável para cada experimento. A mais alta produtividade água em óleo foi obtida ao se utilizar óleo de pescado, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($0,1092 \text{ UE.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e mais alta produtividade óleo em água foi obtida quando se utilizou tolueno, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($0,3066 \text{ UE.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Com relação às respostas atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) e óleo em água (AEo/w), produtividade água em óleo (Prod w/o) e óleo em água (Prod o/w), o fator meio fermentativo apresentou diferença significativa ao nível de 5% de

significância, sendo o farelo de trigo, o substrato que proporcionou maiores atividades e produtividades emulsificantes. Segundo LONSANE et al (1985), o trigo é mais adequado do que o arroz para a produção de metabólitos por microrganismos, pois as partículas do trigo apresentam menor tendência a aderirem umas às outras, facilitando o acesso do microrganismo ao substrato. Considerando a necessidade de redução dos custos associados ao processo de produção de biossurfactantes, especialmente no que se refere aos componentes do meio, a possibilidade de utilização de farelo de trigo é favorável para obtenção biotecnológica desses agentes de forma mais econômica e ambientalmente viável, visto o melhor gerenciamento e agregação de valor deste resíduo (DELEU e PAQUOT, 2004; NITSCHKE et al, 2004; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

O fungo filamentososo *A. fumigatus* mostrou ser capaz de utilizar as fontes de carbono de diferentes naturezas para a produção de biossurfactantes. Em média, os maiores valores de AEW/o, Prod w/o e Prod o/w foram obtidos ao utilizar farelo de trigo, aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e óleo de soja como fonte adicional de carbono. Estudos anteriores mostraram que a presença de óleos vegetais no meio de cultivo de alguns microrganismos como *Candida antarctica sp. SY16* foi o mais efetivo para o crescimento celular e para a produção de biossurfactante (KIM et al, 2002). VOLLBRECHT et al (1999) verificaram maior produção de biossurfactante por *Tsukamurella* DSM 44370 crescendo em óleos vegetais do que em meio complexo.

As maiores atividades emulsificante óleo em água, em média, foram obtidas ao utilizar óleo de pescado e tolueno como fonte adicional de carbono ($p > 0,05$). Diversas fontes de carbono vêm sendo estudadas para o aumento na produção de biossurfactante, podendo-se citar aquelas solúveis em água como glicose, glicerol e etanol e aquelas insolúveis em água, como hidrocarbonetos, óleos de origem animal e vegetal (BONILLA et al, 2005; NITSCHKE et al, 2004; RAHMAN et al, 2002).

As mais altas atividades emulsificantes água em óleo ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$) e óleo em água ($58,51 \text{ UE.g}^{-1}$) foram obtidas ao utilizar-se como fonte adicional de carbono tolueno juntamente com farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Esta evidência pode ser relacionada ao fato de que a cepa em estudo foi isolada de local contaminado com petróleo, apresentando, portanto, maior capacidade de utilização de composto de mesma natureza.

O emprego de aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, favoreceu a produção de biossurfactante ($p < 0,05$) e altas produtividades água em óleo ($p < 0,05$). A aeração do meio além de incrementar o metabolismo fúngico, possibilita a dissipação de calor

metabólico, fator este capaz de afetar o rendimento da substância produzida. O calor liberado pode fazer com que a temperatura do meio alcance níveis considerados impróprios para o crescimento do fungo estudado. No entanto, o emprego de ar saturado favorece a transferência de calor dentro do reator, mantendo a temperatura no nível desejado (MULLIGAN, 2005). A aeração de $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, mostrou reduzir, em média, a atividade emulsificante ($p < 0,05$). Altas taxas de aeração no meio de cultivo podem causar abrasão e ruptura do micélio (COSTA, 1996). ADAMCZAK e BEDNARSKI (2000) verificaram retardamento no crescimento da levedura *C. antarctica* e diminuição da concentração do biosurfactante produzido ao ser incrementada aeração ao meio de cultivo.

A utilização de aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ mostrou ser adequada para a produção de biosurfactante, proporcionando maiores atividades emulsificantes, e possibilitando a redução de custos de processo. MARTINS et al (2006), em estudos de produção de biosurfactante utilizando o fungo *A. fumigatus*, verificou maior atividade emulsificante água em óleo ao se utilizar aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, farelo de arroz e óleo de soja.

Durante o processo fermentativo foi feito o acompanhamento do teor de umidade do meio de cultivo (Figura 4), em que se verificou aumento no período de 120 h para a maioria dos experimentos. Isto ocorre devido à diminuição na quantidade de matéria sólida (substrato) e à produção de água metabólica pela oxidação de carboidratos (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980). No período final da fermentação observou-se redução do teor de umidade para os diferentes experimentos, exceto para o experimento 3.

O meio constituído de farelo de trigo apresentou valores de umidade superiores aos encontrados com o meio constituído de farelo de arroz. A umidade para o farelo de arroz variou de 48,0 a 56,4% e para o farelo de trigo variou de 49,0 a 64,2%. Os substratos utilizados em fermentação em estado sólido devem possuir umidade suficiente na forma complexada ou absorvida, para permitir o crescimento e metabolismo dos microrganismos (PANDEY, 2003; RAGHAVARAO et al, 2003; ROBINSON et al, 2001).

O controle da umidade ao longo da fermentação é importante, uma vez que umidade em excesso pode compactar o substrato e diminuir a penetração de oxigênio. A adição de um suporte inerte, como a casca de arroz, ao meio tem favorecido a manutenção do teor de água, visto que o suporte além de proporcionar uma textura porosa ao meio aumenta a retenção de água e oferece maior firmeza ao meio.

O fato de o meio constituído por farelo de trigo apresentar maior conteúdo de água ao longo da fermentação pode estar relacionado ao fato de o microrganismo ter consumido de forma mais acentuada o carboidrato por estar em maior quantidade ou de forma mais disponível ao ataque pelo microrganismo, gerando maior quantidade de água pela reação de oxidação. Outra questão pode estar relacionada à utilização primária do carboidrato como fonte de carbono para a produção de biossurfactante e este quando presente no meio promove a formação de emulsão entre a água disponível no meio e a fonte lipídica, retendo maior quantidade de água. A formação de emulsão torna o óleo mais disponível ao ataque do microrganismo, favorecendo a produção de biossurfactante.

O pH permaneceu praticamente estável durante o processo fermentativo, ficando em torno de 5,5 no final do processo (dados não mostrados). Segundo LIMA (1996), a produção de biossurfactante está compreendida entre o final da fase exponencial e durante a fase estacionária de crescimento microbiano. Durante a fase exponencial ocorre a diminuição no pH do meio de cultivo, e à medida em que ocorre a desaceleração no crescimento, ocorre a redução das atividades metabólicas e morte celular provocando o aumento de pH.

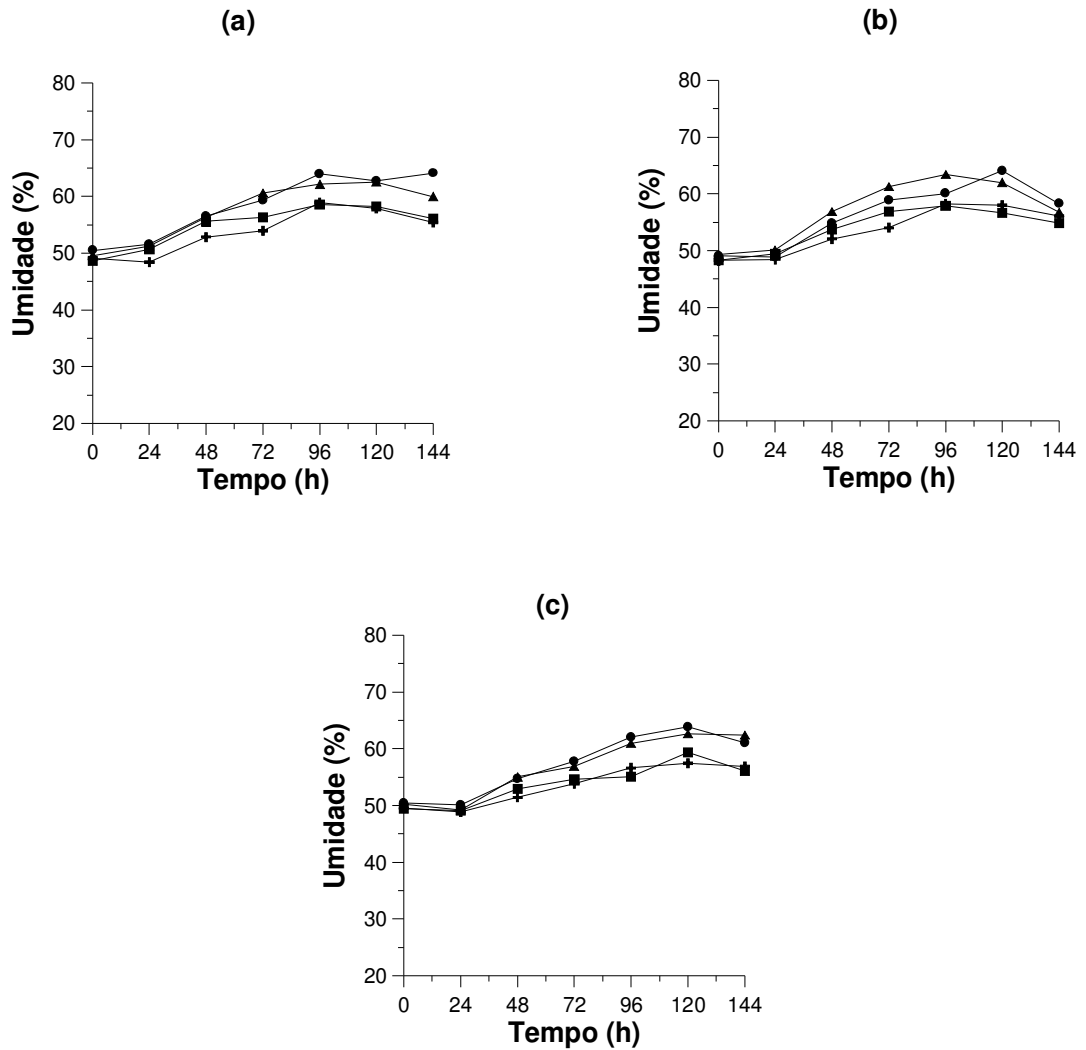


Figura 4: Teor de umidade (%) ao longo do tempo em diferentes condições de processo. **(a)** + Exp.1; ■ Exp. 2; ● Exp. 3; ▲ Exp. 4. **(b)** + Exp.5; ■ Exp. 6; ● Exp. 7; ▲ Exp. 8. **(c)** + Exp.9; ■ Exp. 10; ● Exp. 11; ▲ Exp. 12.

A Tabela 4 mostra os resultados de tensão superficial e interfacial mínimos obtidos nos experimentos realizados.

Tabela 4: Tensão superficial (TS) e interfacial (TI) mínima nos extratos de biossurfactante

Exp.	FAC	MF	AER (mL.g ⁻¹ .h ⁻¹)	TS (mN.m ⁻¹)	TI (mN.m ⁻¹)
1	OP	FA	60	46,2 ^a	19,7 ^a
2	OP	FA	100	40,3	18,2 ^b
3	OP	FT	60	39,6	17,8 ^{bc}
4	OP	FT	100	45,0	19,6 ^{ad}
5	OS	FA	60	46,5 ^a	20,6 ^d
6	OS	FA	100	49,0	22,0 ^e
7	OS	FT	60	36,2	15,5 ^f
8	OS	FT	100	38,3 ^b	17,3 ^{cg}
9	T	FA	60	41,3	20,0 ^d
10	T	FA	100	50,5	22,2 ^e
11	T	FT	60	37,1	16,0 ^f
12	T	FT	100	38,6 ^b	17,0 ^g

Exp.= Experimento; FAC = fonte adicional de carbono; MF = meio fermentativo; AER = aeração; OP = óleo de pescado bruto; OS = óleo de soja degomado; T = tolueno; FA = farelo de arroz; FT = farelo de trigo.

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para cada resposta estudada

Os menores valores de tensão superficial (36,2 mN.m⁻¹) e interfacial (15,5 mN.m⁻¹) foram obtidos no experimento 7 (Tabela 4), em que se utilizou óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹. Além disso, as referidas condições também proporcionaram, em média, mais altas atividades emulsificantes água em óleo. Em estudos realizados por ADAMCZAK e BEDNARSKI (2000), utilizando *C. antarctica* para a produção de biossurfactantes, foi verificado a redução da tensão superficial da água (72,25 mN.m⁻¹) para 37,0 mN.m⁻¹ quando a levedura foi cultivada durante 144 h em meio contendo óleo de soja. Segundo MULLIGAN (2005), surfactantes efetivos podem reduzir a tensão superficial da água de 72,0 a 35,0 mN.m⁻¹ e a tensão interfacial da água e n-hexadecano de 40,0 a 1,0 mN.m⁻¹.

No entanto, de acordo com a Tabela 4, verifica-se que as condições do experimento 11 (tolueno, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹) proporcionaram valores de tensão superficial de 37,1 mN.m⁻¹ e de tensão interfacial de 16,0 mN.m⁻¹,

valores próximos aos obtidos no experimento 7. Segundo a análise estatística, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os experimentos 7 e 11 em relação à tensão interfacial. Comparando com os demais, o experimento 11 apresentou valores reduzidos de tensão, bem como maior atividade emulsificante água em óleo e óleo em água. O surfactante produzido foi capaz de formar emulsões de diferentes naturezas (água em óleo e óleo em água) e reduzir a tensão superficial da água e tensão interfacial com hexadecano, mostrando grande potencial para aplicações diversas.

O experimento 10, em que se utilizou tolueno, farelo de arroz e $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, proporcionou a menor redução da tensão superficial ($50,5 \text{ mN.m}^{-1}$) e interfacial ($22,2 \text{ mN.m}^{-1}$), bem como a menor atividade emulsificante óleo em água ($36,16 \text{ UE.g}^{-1}$) e baixa atividade emulsificante água em óleo ($17,52 \text{ UE.g}^{-1}$).

A análise estatística mostrou que os fatores meio fermentativo, fonte adicional de carbono e aeração em relação à tensão superficial e interfacial, foram significativos ao nível de 95% de confiança. Em média, as condições que favoreceram a redução da tensão superficial e interfacial foram tolueno, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, as quais proporcionaram maiores atividades emulsificantes água em óleo e óleo em água.

3.2 Estabilidade do biosurfactante

Para a atividade emulsificante água em óleo, os experimentos 1 (pH 5,0; salinidade 3 e 10°C), 5 (pH 5,0; salinidade 3 e 30°C) e 8 (pH 9,0; salinidade 30 e 30°C) apresentaram valores mais elevados que o padrão ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$), sendo obtidos os valores de $26,64 \text{ UE.g}^{-1}$ (104,51%), $27,91 \text{ UE.g}^{-1}$ (109,49%) e $26,09 \text{ UE.g}^{-1}$ (102,35%), respectivamente (Tabela 5).

De acordo com a Figura 5, observa-se que os extratos quando submetidos a pH 5,0 e 9,0 apresentaram, em média, atividade emulsificante água em óleo inferior ao ensaio padrão ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$), sendo que o emprego de pH 5,0 proporcionou maior atividade quando comparado aos ensaios utilizando pH 9,0. O extrato quando submetido à salinidade de 3 e 30 e temperaturas de 10°C e 30°C , mostrou menores atividades emulsificante água em óleo relativa. A análise estatística mostrou que a variação do pH do nível inferior para o nível superior conduziu a um efeito mais pronunciado, quando comparado aos demais, apresentando em média aumento na atividade emulsificante água em óleo de $2,66 \text{ UE.g}^{-1}$ ao se utilizar pH 5,0 ($p < 0,05$). O extrato quando mantido em salinidade 30 e temperatura de 30°C , apresentou,

aumento na atividade emulsificante água em óleo ($p < 0,05$). O extrato submetido às diferentes condições do planejamento experimental mostrou manter a atividade surfactante através da medida da atividade emulsificante água em óleo.

Em trabalho realizado por ILORI et al (2005), foi verificado que temperaturas de 30 a 40 °C proporcionaram maior atividade emulsificante do biossurfactante produzido por *Aeromonas* spp. O emprego de 0, 0,5 e 1% de NaCl não apresentou diferença na resposta, entretanto, concentrações salinas acima de 5% causaram decréscimo na atividade emulsificante. SARUBBO et al (2006), verificaram que pH na faixa de 2 a 12 não apresentaram efeito significativo na atividade emulsificante do bioemulsificante produzido por *Candida glabrata* UCP 1002, embora pH 12 tenha ocasionado aumento na atividade.

COOPER e GOLDENBERG (1987), verificaram que emulsificante produzido por cepa de *Bacillus cereus* foi ativo somente em pH abaixo de 7,0. Emulsificante produzido por *Bacillus* sp. cepa IAF 343 mostrou maior atividade emulsificante água em óleo quando mantido em pH entre 4 e 8. Acima de 9 e abaixo de 3, o índice de emulsão foi reduzido 50% e emulsões não foram formadas acima de pH 11.

Com relação à atividade emulsificante óleo em água, as condições de pH 7,0, salinidade 16,5 e 20 °C promoveram aumento de 0,6% e 1,1% na resposta quando comparado ao padrão. Para os demais ensaios a atividade relativa variou de 75,94 a 90,69%, sendo a mais alta atividade ($53,06 \text{ UE.g}^{-1}$) obtida para o ensaio 6, em que se utilizou pH 9,0, salinidade 3 e 30 °C. Conforme mostrado na Figura 4, pH de 5,0 e 9,0, salinidade de 3 e 30 e temperatura de 10 e 30 °C mostraram menores atividades emulsificante óleo em água quando comparado com o padrão. De acordo com a análise estatística, o efeito mais pronunciado na atividade foi causado pelo fator salinidade ($3,84 \text{ UE.g}^{-1}$). A atividade emulsificante óleo em água aumentou ao utilizar pH 9,0, salinidade 3 e 10 °C ($p < 0,05$).

Tabela 5: Atividade relativa (%) emulsificante água em óleo, óleo em água, tensão superficial e interfacial para os experimentos do Planejamento Experimental 2³.

Exp	Atividade relativa (%)			
	AE w/o	AEo/w	TS	TI
1	104,51	87,61	91,04	99,76
2	73,36	82,98	114,26	117,36
3	90,43	78,60	106,45	101,65
4	92,94	87,16	108,30	97,26
5	109,49	85,81	114,01	107,74
6	80,46	90,69	108,81	117,50
7	86,54	79,10	103,39	102,31
8	102,35	75,94	106,07	101,84
9	98,35	100,65	98,07	100,24
10	98,35	100,65	98,75	100,71
11	98,46	101,09	98,07	100,42

Exp.= Experimentos; AEw/o = Atividade emulsificante água em óleo; AEo/w = Atividade emulsificante óleo em água; TS = Tensão superficial; TI = Tensão interfacial.

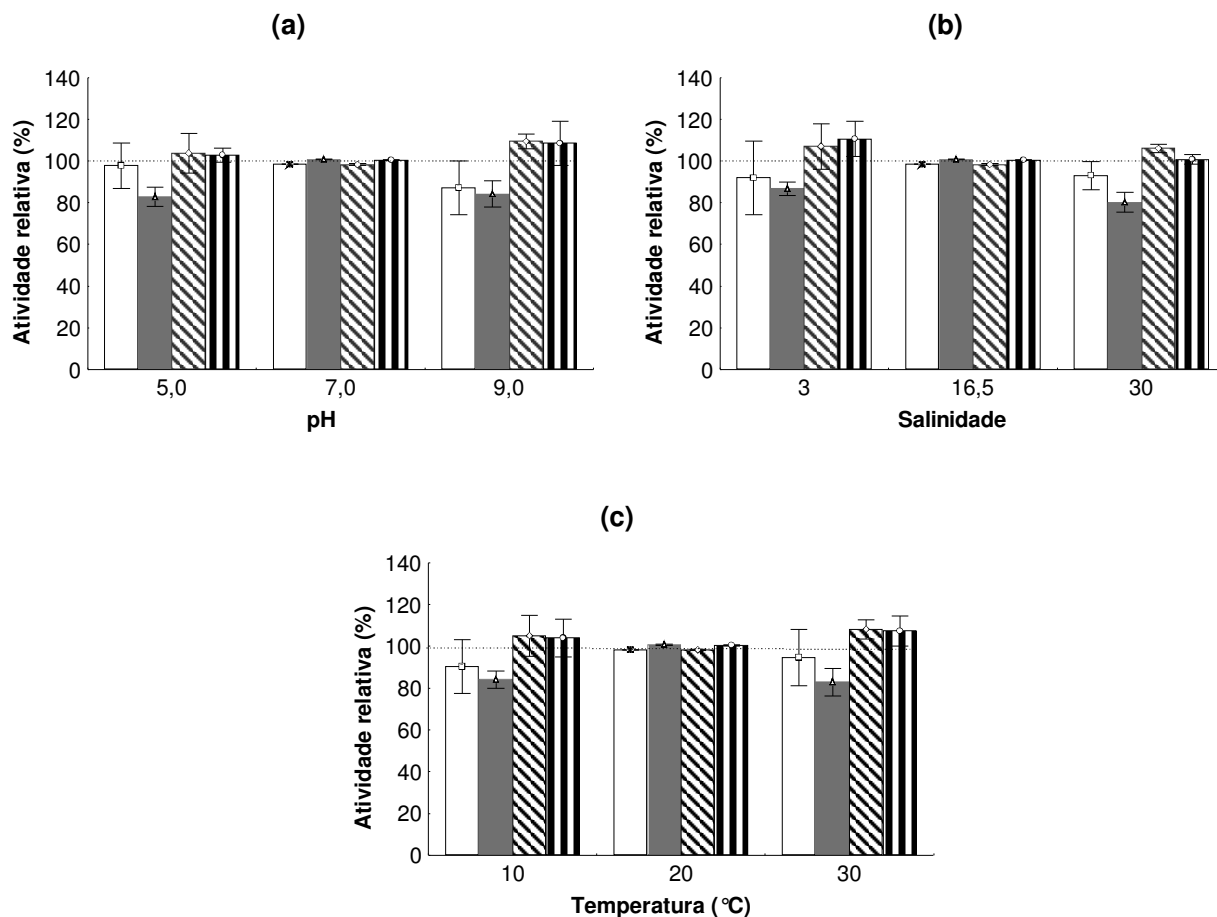


Figura 5: Atividade relativa média (%) e desvio padrão dos ensaios do planejamento experimental 2^3 . □ Atividade emulsificante água em óleo relativa. ■ Atividade emulsificante óleo em água relativa. ▨ Tensão superficial relativa (%). ▩ Tensão interfacial relativa. (a) pH 5,0 (ensaios 1, 3, 5, 7), 7,0 (ensaios 9, 10, 11) e 9,0 (ensaios 2, 4, 6, 8); (b) salinidade 3 (ensaios 1, 2, 5, 6), 16,5 (ensaios 9, 10, 11) e 30 (ensaios 3, 4, 7, 8); (c) temperatura 10°C (ensaios 1, 2, 3, 4), 20°C (ensaios 9, 10, 11) e 30°C (ensaios 3, 4, 7, 8).

Todos os ensaios, exceto o ensaio 1, apresentaram aumento na atividade de tensão superficial em relação ao padrão, mostrando ter havido perda de atividade surfactante. Os ensaios 2 a 8 apresentaram aumento da tensão superficial de 3,4 a 14,2% em relação à obtida no padrão. Já os ensaios 9, 10 e 11 apresentaram redução de 1,3 a 2,0% na atividade, indicando que estas são condições favoráveis para maior atividade surfactante. Valores de pH 5,0 e temperatura de 10°C proporcionaram

redução na tensão superficial ($p < 0,05$). Em estudos realizados por KIM et al (1997), o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* mostrou ser estável entre pH 5,0 a 9,5, havendo aumento da tensão em pH de 4,0 e 10,3. Biossurfactante produzido por *C. antarctica*, mostrou estabilidade em uma faixa de pH de 5,0 a 9,0, mostrando aumento na tensão em pH 4,0 e 10,0 (KIM et al, 2002).

De acordo com a Tabela 5, observa-se que houve aumento de até 17,3% na tensão interfacial nos ensaios realizados. Apenas os ensaios 1 (pH 5,0, salinidade 3 e 10°C) e 4 (pH 9,0, salinidade 30 e 10°C) apresentaram redução na tensão interfacial quando comparado ao padrão. Valores de pH 5,0, salinidade 30 e 10°C promoveram diminuição na tensão interfacial ($p < 0,05$). Os valores de tensões superficial e interfacial obtidos para os ensaios, mostraram haver aumento na resposta quando se utilizou pH 5,0 e 9,0, e encontrou-se próximo ao padrão ao utilizar-se pH 7,0.

Valores de pH 5,0 e salinidade 30 mostraram aumentar a atividade emulsificante água em óleo e reduzir a tensão superficial e interfacial. No entanto, valores de pH 9,0 e salinidade 3 mostraram aumentar a atividade emulsificante óleo em água. Temperatura de 10°C mostrou aumentar a atividade emulsificante óleo em água e diminuir a tensão superficial e interfacial. Já a temperatura de 30°C mostrou aumentar a atividade água em óleo.

Em relação às respostas estudadas, os experimentos em que se utilizou pH 7,0, salinidade 16,5 e 20°C apresentaram maior estabilidade em relação ao padrão, apresentando variação de 98,29 a 100,79% na atividade. O surfactante produzido quando submetido às diferentes condições de pH, temperatura e salinidade, apresentou capacidade de formar emulsões estáveis e reduzir a tensão superficial em relação à água ($72,25 \text{ mN.m}^{-1}$) e interfacial, havendo perda máxima de atividade (AEw/o) de 26,7%, nas condições do ensaio 2 (pH 9,0, salinidade 3 e 10°C).

4 CONCLUSÃO

A máxima atividade emulsificante água em óleo ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$) e atividade emulsificante óleo em água ($58,51 \text{ UE.g}^{-1}$) foram alcançadas em 144 h de cultivo, quando se utilizou tolueno como fonte adicional de carbono, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (experimento 11). A máxima redução na tensão superficial ($36,2 \text{ mN.m}^{-1}$) e interfacial ($15,5 \text{ mN.m}^{-1}$) foi obtida nas condições do experimento 7, em que se utilizou óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Os resultados demonstraram a capacidade do microrganismo *A. fumigatus* em produzir biossurfactantes em diferentes meios sólidos, fonte adicional de carbono e taxas de aeração. A utilização de resíduos agroindustriais e menores taxas de aeração favoreceram a produção de biossurfactante, indicando ser uma alternativa de grande interesse econômico.

O extrato de biossurfactante quando mantido em pH 7,0, salinidade 16,5 e 20°C apresentou maior estabilidade em relação ao padrão, apresentando em média, perda de atividade emulsificante água em óleo de 1,6%, óleo em água de 1,7%, tensão superficial de 0,79% e tensão interfacial de 0,45%. O surfactante obtido mostrou ser estável, demonstrando a possibilidade de utilização em diversos segmentos industriais, ambientais e biotecnológicos, podendo ser utilizado principalmente em tratamento de efluentes e biorremediação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMCZAK, M., BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, 22, 313-316, 2000.

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53, 495-508, 2000.

BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I., MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, 85, 1-8, 2004.

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C. Biossurfactantes. **Microbiologia ambiental**, Embrapa, 2ªEd., 2006.

BONILLA, M., OLIVARO, C., CORONA, M., VAZQUEZ, A., SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, 98, 456-463, 2005.

BRODERICK, L.S., COONEY, J.J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. **Contribution N°1149, Center for Environmental and estuarine studies of the University of Maryland.** 8, s/d.

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

COSTA, J.A.V. Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos.** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996.

COSTA, S.G.V.A.O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M.N., CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, 41, 483-488, 2006.

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

DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial Production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61, 1, 47-64, 1997.

FRANCY, D.S., THOMAS, J.M., RAYMOND, R.L., WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal Industry Microbiology**, 8, 237-246, 1991.

GOUVEIA, E.R., LIMA, D.P.A., DUARTE, M.S., LIMA, G.M.S., ARAÚJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes – Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30, 2003.

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

ILORI, M.O., AMOBI, C.J., ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, 61, 7, 985-992, 2005.

JOHNSON, V., SINGH, M., SAINI, V.S., ADHIKARI, D.K., SISTA, V., YADAV, N.K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, 14, 6, 487-490, 1992.

KIM, H.S., JEON, J.W., KIM, S.B., OH, H.M., KWON, T.J., YOON, D.B. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, 24, 1637-1641, 2002.

KIM, H.S., YOON, B.D., LEE, C.H., SUH, H.H., OH, H.M., KATSURAGI, T., TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of fermentation and bioengineering**, 84, 1, 41-46, 1997.

LIMA, A.S. Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica*. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996.

LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUBIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, 7, 258-265, 1985.

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

MARTINS, V.G., KALIL, S.J., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61, 9-10, 721-726, 2006.

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

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133, 183-198, 2005.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25, 772-776, 2002.

NITSCHKE, M., FERRAZ, C., PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, 81-85, 2004.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, 81-84, 2003.

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

RAGHAVARAO, K.S.M.S., RANGANATHAN, T.V., KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, 127-135, 2003.

RAHMAN, K.S.M., THAHIRA-RAHMAN, J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., BANAT, I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, 85, 257-261, 2002.

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. Culture method to study fungal grow in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology**, 9, 199-209, 1980.

ROBINSON, T., SINGH, D., NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55, 284-289, 2001.

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 249-252, 2002.

SARUBBO, L.A., LUNA, J.M., TAKAKI, G.M.C. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, 9, 4, 2006.

VOLLBRECHT, E., RAU, U., LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. **Lipid Fett**, 101, 10, 389-394, 1999.

ARTIGO II

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Aspergillus
fumigatus* CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO
UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO FIXO**

PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Aspergillus fumigatus* CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BIORREATOR DE LEITO FIXO

Vanessa Sacramento Cerqueira, Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

A demanda por enzimas de uso industrial, principalmente de origem microbiana, é crescente devido à sua aplicação em diferentes produtos e processos. As lipases fúngicas são vastamente utilizadas industrialmente e na sua grande maioria são classificadas como GRAS. Dentre os modos de produção, a fermentação em estado sólido se destaca por possibilitar a utilização de resíduos agroindustriais, constituindo-se em uma importante alternativa do ponto de vista econômico e ambiental. O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de lipase pelo fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido utilizando diferentes condições físicas e nutricionais. Foram testados dois meios fermentativos (farelo de arroz e farelo de trigo), duas taxas de aeração (60 e 100 mL.g⁻¹.h⁻¹) e três fontes adicionais de carbono (óleo de pescado bruto, óleo de soja degomado e tolueno). A maior produção de lipase (112,46 U.g⁻¹) foi obtida quando se utilizou farelo de trigo, aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹ e tolueno como fonte adicional de carbono. A máxima produtividade (1,222 U.g⁻¹.h⁻¹) foi alcançada ao se utilizar óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹. Os resultados demonstraram a possibilidade de produzir enzimas a partir dos rejeitos agroindustriais estudados com as menores taxas de aeração, contribuindo assim, para a redução de impactos ambientais e maiores rendimentos nos processos industriais.

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, fungo filamentoso, lipase

ABSTRACT

The demand for enzymes for industrial use, mainly with microbial origin, is increasing due to their application to different products and processes. Fungi lipases are widely used in industry and most of them are classified as GRAS. Among the production ways, solid state fermentation stands out because it make it possible to use agroindustrial residues, thus becoming an important alternative from the economical and environmental point of view. This paper aimed at studying the lipase production by the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* by means of solid state fermentation using different physical and nutritional conditions. Two fermentation media have been tested (rice and wheat bran), two aeration rates (60 and 100 mL.g⁻¹.h⁻¹) and three additional carbon sources (raw fish oil, degummed soybean oil, and toluene). The highest lipase production (112.46 U.g⁻¹) was achieved when wheat bran was used, aeration 100 mL.g⁻¹.h⁻¹ and toluene as additional carbon source. The highest yield (1,222 U.g⁻¹.h⁻¹) was achieved when using degummed soybean oil, wheat bran, and aeration 100 mL.g⁻¹.h⁻¹. The results have shown the possibility of producing enzymes from agroindustrial wastes studied with the lowest aeration rates thus contributing for reducing environmental impacts and increasing yield in industrial processes.

Key words: solid state fermentation, filamentous fungus, lipase

1 INTRODUÇÃO

As lipases compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface óleo-água, cuja função biológica é catalisar reações de hidrólise de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, diglicerídios, monoglicerídios e glicerol. Esta reação é reversível, pois as lipases também catalisam a formação de glicerídios a partir de ácidos graxos e glicerol na interface (CAVALCANTI et al, 2005; CIHANGIR e SARIKAYA, 2004; HATZINIKOLAOU et al, 1996).

As lipases são enzimas presentes em diversos organismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras. Fungos de diversos gêneros têm sido reconhecidos como bons produtores de lipases sendo vastamente estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. As lipases fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas, devido às suas melhores características em relação às lipases bacterianas, e pelo fato de que na sua grande maioria não são nocivas à saúde e são reconhecidas como GRAS (Generally Recognized as Safe) (FALONY et al, 2006; CARVALHO et al, 2005).

Diversas lipases fúngicas estão sendo comercializadas, podendo-se citar as provenientes de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* e das leveduras *Candida rugosa* e *Candida Antarctica* (LIU et al, 2006a; CIHANGIR e SARIKAYA, 2004; ELLAIAH et al, 2004).

As lipases são empregadas em diversos segmentos industriais como no processamento de alimentos, modificação de óleos e gorduras por reações de hidrólise e esterificação, formulação de detergentes, processos de síntese usados pela indústria química fina e farmacêutica, produção de cosméticos, indústria de combustíveis, auxiliares no tratamento de efluentes gordurosos, dentre outras aplicações (FALONY et al, 2006; CAVALCANTI et al, 2005).

Os fungos filamentosos são os microrganismos de maior importância industrial usados em fermentação em estado sólido, pois podem crescer naturalmente em frutas, grãos e resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais, sendo as condições de cultivo deste tipo de processo muito próximas às condições naturais de crescimento (NIGAM e SINGH, 1994). Existem outras características que tornam os fungos filamentosos mais atrativos para utilização na fermentação em estado sólido, como a facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e a capacidade destes em produzir esporos, o que facilita o preparo do inóculo e a estocagem das células, na forma vegetativa, por longos períodos de tempo (MITCHELL et al, 2000).

A seleção do substrato adequado para fermentação em estado sólido depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso (PANDEY et al, 2000). A utilização de resíduos agroindustriais como substrato principal para os cultivos em meio sólido, caracteriza-se como uma das principais vantagens, considerando o custo reduzido que o seu uso representa no processo. O reaproveitamento de resíduos é interessante do ponto de vista econômico e ambiental, pois além de reduzir custos, minimiza os problemas de poluição ambiental, causados pelo grande volume gerado (PANDEY et al, 2000).

Inúmeras fontes nutricionais alternativas e diferentes condições operacionais vêm sendo testadas, a fim de otimizar a produção enzimática. Muitos estudos têm mostrado efeito estimulante de surfactantes na produção de enzimas pelos microrganismos em fermentação em estado sólido. A maioria dos surfactantes utilizados são quimicamente sintetizados, apresentando efeitos diversos em diferentes enzimas. No entanto, o aumento com relação à preocupação ambiental tem levado a considerar o uso de surfactantes biológicos como alternativa aos produtos químicos (LIU et al, 2006b).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de lipase pelo fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido em biorreator de coluna de leito fixo, utilizando diferentes meios fermentativos, taxas de aeração e fonte adicional de carbono, bem como relacionar a produção de lipase com a produção de biosurfactante ao longo do período de fermentação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus*, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A linhagem foi mantida a 4°C em tubos de ensaio inclinado contendo meio ágar batata-dextrose (PDA), adicionado de 1% de glicerina e 0,5% de ágar-ágar (MARTINS et al, 2006).

2.2 Preparo do inóculo para a fermentação

A propagação do inóculo foi feita através da técnica de espalhamento em superfície, realizada em frascos de Roux contendo ágar batata-dextrose (PDA)

adicionado de 1% de glicerina e 0,5% de ágar-ágar. Os frascos de Roux foram mantidos em estufa a 30°C durante 7 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).

2.3 Preparo do meio de fermentação

Foram avaliados dois meios fermentativos, como fonte de carbono, o primeiro constituído de farelo de arroz desengordurado, e o segundo constituído de farelo de trigo. Foi adicionada ao meio, casca de arroz como inerte, e as proporções utilizadas foram 15% de casca e 85% de farelo. Previamente ao preparo do meio, foi realizada a moagem do farelo de arroz em moinho de facas, e posteriormente o peneiramento, onde foram recolhidas as partículas com granulometria entre 0,420 e 0,500 mm (Tyler 35 e 32, respectivamente). O farelo de trigo foi peneirado e recolhidas as partículas com granulometria entre 0,710 e 1,000 mm (Tyler 24 e 16, respectivamente).

Foi adicionada à mistura da casca e farelo, 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. O meio foi ajustado para umidade de 50% e pH 4,5. Foi avaliada a adição de três fontes adicionais de carbono (óleo de soja degomado, óleo de pescado bruto e tolueno) na proporção de 1% (v/p). A concentração inicial de microrganismo foi de 4×10^6 esporos/g de meio.

2.4 Fermentação em estado sólido

Os cultivos foram realizados em biorreatores encamisados tipo coluna de leito fixo, com dimensões internas 50 x 250 mm (diâmetro x altura), mantidos a 30°C durante 144 h. O ar fornecido ao sistema foi controlado através de rotâmetros previamente calibrados, sendo testadas aerações de 60 e 100 $mL \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. O esquema do aparato experimental utilizado está mostrado na Figura 1.

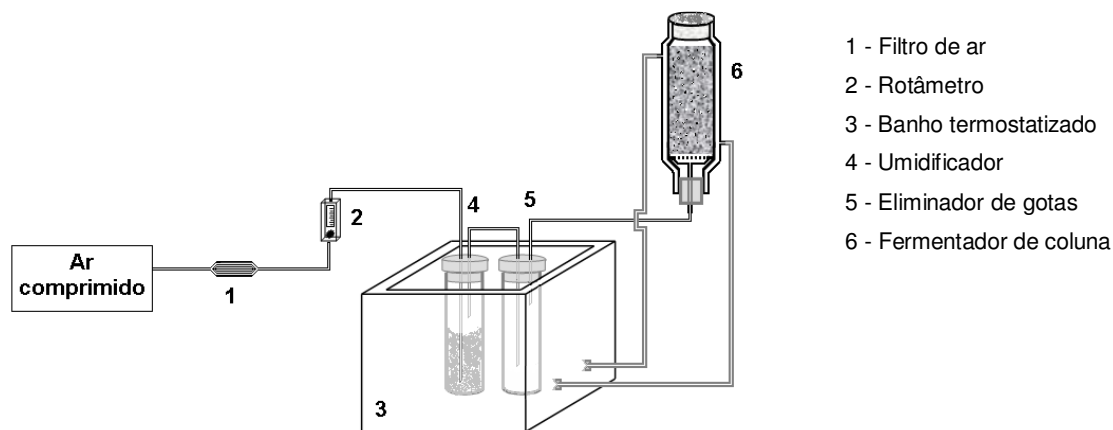


Figura 1: Esquema do aparato experimental.

2.5 Extração da enzima

A extração da enzima foi feita pela incubação de 1 g de meio fermentado com 10 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, submetida à agitação em incubadora rotativa (B. BRAUN CERTOMAT BS-1, Alemanha) a 200 rpm e 37°C durante 30 min. A amostra foi em seguida filtrada à vácuo.

2.6 Extração do biossurfactante

A extração do biossurfactante do farelo fermentado foi realizada a partir de 1 g de farelo fermentado utilizando água destilada a 90°C na proporção de 1:9 (uma parte de soluto para nove partes de solvente). Posteriormente, a amostra foi submetida à agitação em incubadora rotativa (B. BRAUN CERTOMAT BS-1, Alemanha) a 160 rpm e 50°C durante 30 min, sendo em seguida filtrada à vácuo. O extrato obtido foi utilizado na determinação da atividade emulsificante.

2.7 Determinações analíticas

Foram coletadas amostras a cada 24 h do processo fermentativo e as análises foram realizadas em triplicata.

2.7.1 Determinação de Umidade

A determinação do teor de umidade das amostras fermentadas foi feita segundo metodologia padrão da AOAC (1995).

2.7.2 Determinação da atividade lipolítica

Para a determinação da atividade lipolítica foi adotado o método descrito por BURKERT et al (2004). O método é baseado na titulação com NaOH 0,05 N dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no extrato enzimático da fermentação, sobre os triacilglicerídeos do óleo de oliva emulsionados em goma arábica.

A determinação da atividade lipolítica foi avaliada com uma emulsão de óleo de oliva, a qual é preparada com 25 mL de óleo e 75 mL de uma solução de goma arábica 7% em um homogeneizador por 5 min a 500 rpm. A mistura reacional continha 5 mL da emulsão de óleo de oliva, 2 mL do tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 1 mL do extrato enzimático. Esta mistura foi incubada a 37°C por 30 min sob agitação a 160 rpm. Após esse tempo, a reação foi interrompida imediatamente pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol 1:1 v/v e os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de NaOH 0,05 N. Uma unidade de atividade de lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto. A atividade enzimática foi expressa como unidade de atividade de lipase por massa seca de farelo fermentado ($U \cdot g^{-1}$). Os valores de atividade lipolítica são definidos pela Equação 1:

$$AL = ((V_a - V_b) \cdot N \cdot 1000 \cdot V_t) / (t \cdot V_c \cdot (m \cdot (1 - U))) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

AL = atividade lipolítica ($U \cdot g^{-1}$);

V_a = volume gasto de NaOH na titulação da amostra (mL);

V_b = volume gasto de NaOH na titulação do branco (mL);

N = normalidade do NaOH;

V_t = volume de solução tampão na extração;

V_c = volume da amostra usado na reação (mL);

t = tempo de reação (min);

m = massa da amostra úmida (g);

U = fração mássica da umidade.

2.7.3 Determinação da atividade emulsificante óleo/água ($AE_{o/w}$) e água/óleo ($AE_{w/o}$)

O extrato de biossurfactante juntamente com água destilada e óleo de soja foram colocados em tubos de ensaio e agitados durante 1 min em agitador vortex (Phoenix, AP56, Brasil) a 700 rpm. Após 60 min em repouso foi efetuada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Femto, 700 Plus, Brasil) a 610 nm para a determinação da atividade emulsificante óleo em água ($AE_{o/w}$) (JOHNSON et al, 1992). Nesta análise foi realizado um ensaio branco para cada amostra que consistiu na leitura da absorbância em espectrofotômetro a 610 nm do extrato do biossurfactante anteriormente à agitação.

Os tubos contendo as emulsões foram mantidos em repouso durante 24 h, e então determinada a atividade emulsificante água em óleo ($AE_{w/o}$) através da leitura da altura da emulsão formada e da camada de óleo remanescente formada (BRODERICK e COONEY, s/d). Nesta análise, ensaios brancos foram realizados consistindo na agitação de água e óleo de soja em agitador vortex, sem a presença do biossurfactante, e efetuada a leitura após 24 h em repouso.

Os valores de atividade emulsificante são definidos pelas Equações 2 e 3:

$$AE_{o/w} = (Abs * D) / (m * (1 - U)) \quad \text{(Equação 2)}$$

$$AE_{w/o} = (E * D) / (m * (1 - U)) \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

$AE_{o/w}$ = atividade emulsificante óleo em água ($UE.g^{-1}$);

$AE_{w/o}$ = atividade emulsificante água em óleo ($UE.g^{-1}$);

Abs = absorbância da suspensão do óleo em água;

D = diluição da amostra em água;

m = massa da amostra úmida (g);

U = fração mássica da umidade;

E = relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total.

A atividade emulsificante óleo em água ($AE_{o/w}$) foi expressa em Unidade Emulsificante por grama ($UE.g^{-1}$) e definida como a quantidade de biossurfactante necessário para aumentar a absorbância em 1,0 à 610 nm quando comparado com o branco.

A atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) foi expressa em Unidade Emulsificante por grama (UE.g⁻¹) e definida como a massa de farelo fermentado necessária para manter uma emulsão estável por um período de 24 h.

2.8 Análise Estatística

Para determinar as melhores condições de produção de lipase foram realizados 12 experimentos, onde foram estudados dois meios fermentativos (MF): farelo de arroz (FA) e farelo de trigo (FT); duas taxas de aeração (AER): 60 e 100 mL.g⁻¹.h⁻¹; e três fontes adicionais de carbono (FAC): óleo de peixe bruto (OP), óleo de soja degomado (OS) e tolueno (T). As respostas foram avaliadas através de Análise de Variância (ANOVA) das triplicatas das amostras, utilizando teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores máximos de atividade lipolítica obtidos durante o processo fermentativo para cada ensaio realizado, o tempo de máxima atividade lipolítica e valores de produtividade alcançados no tempo correspondente à máxima atividade lipolítica estão apresentados na Tabela 1.

A máxima atividade lipolítica foi obtida no experimento 12 (112,46 U.g⁻¹), em que se utilizou farelo de trigo, tolueno e taxa de aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹, no tempo de 96 h de fermentação. No entanto, de acordo com a análise estatística, o experimento 12 não diferiu dos demais ensaios utilizando tolueno (experimentos 9, 10 e 11), assim como do ensaio 7, no qual se utilizou óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹ (p>0,05).

Nos experimentos utilizando tolueno como fonte adicional de carbono, altas atividades lipolíticas foram obtidas em ambos meios e taxas de aeração. As máximas atividades foram alcançadas em tempos de 96 h (experimentos 11 e 12) e em 120 h (experimento 9 e 10) de processo, sendo a máxima produtividade (0,993 U.g⁻¹.h⁻¹) obtida para as condições do experimento 12 (p<0,05).

Tabela 1: Resultados de Atividade Lipolítica máxima ($AL_{\text{máx}}$), tempo de máxima Atividade Lipolítica e produtividade ($Prod_{AL}$) obtida no respectivo tempo de fermentação, para os ensaios realizados.

Exp.	FAC	MF	AER ($\text{mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	$AL_{\text{max.}}$ (U.g^{-1})	Tempo de fermentação (h)	$Prod_{AL}$ ($\text{U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
1	OP	FA	60	87,56 ^a	144	0,423 ^{ab}
2	OP	FA	100	88,66 ^a	144	0,408 ^a
3	OP	FT	60	101,32 ^b	144	0,516 ^c
4	OP	FT	100	83,91 ^a	144	0,401 ^a
5	OS	FA	60	90,73 ^a	144	0,433 ^{ac}
6	OS	FA	100	91,16 ^a	144	0,504 ^{bc}
7	OS	FT	60	105,68 ^{bc}	120	0,665 ^d
8	OS	FT	100	101,40 ^b	72	1,222
9	T	FA	60	110,46 ^c	120	0,771 ^{ef}
10	T	FA	100	104,42 ^{bc}	120	0,734 ^{de}
11	T	FT	60	103,74 ^{bc}	96	0,856 ^f
12	T	FT	100	112,46 ^c	96	0,993

Exp.= Experimento; FAC = fonte adicional de carbono; MF = meio fermentativo; AER = aeração; OP = óleo de pescado bruto; OS = óleo de soja degomado; T = tolueno; FA = farelo de arroz; FT = farelo de trigo.

Letras iguais indicam os ensaios que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) para cada resposta estudada

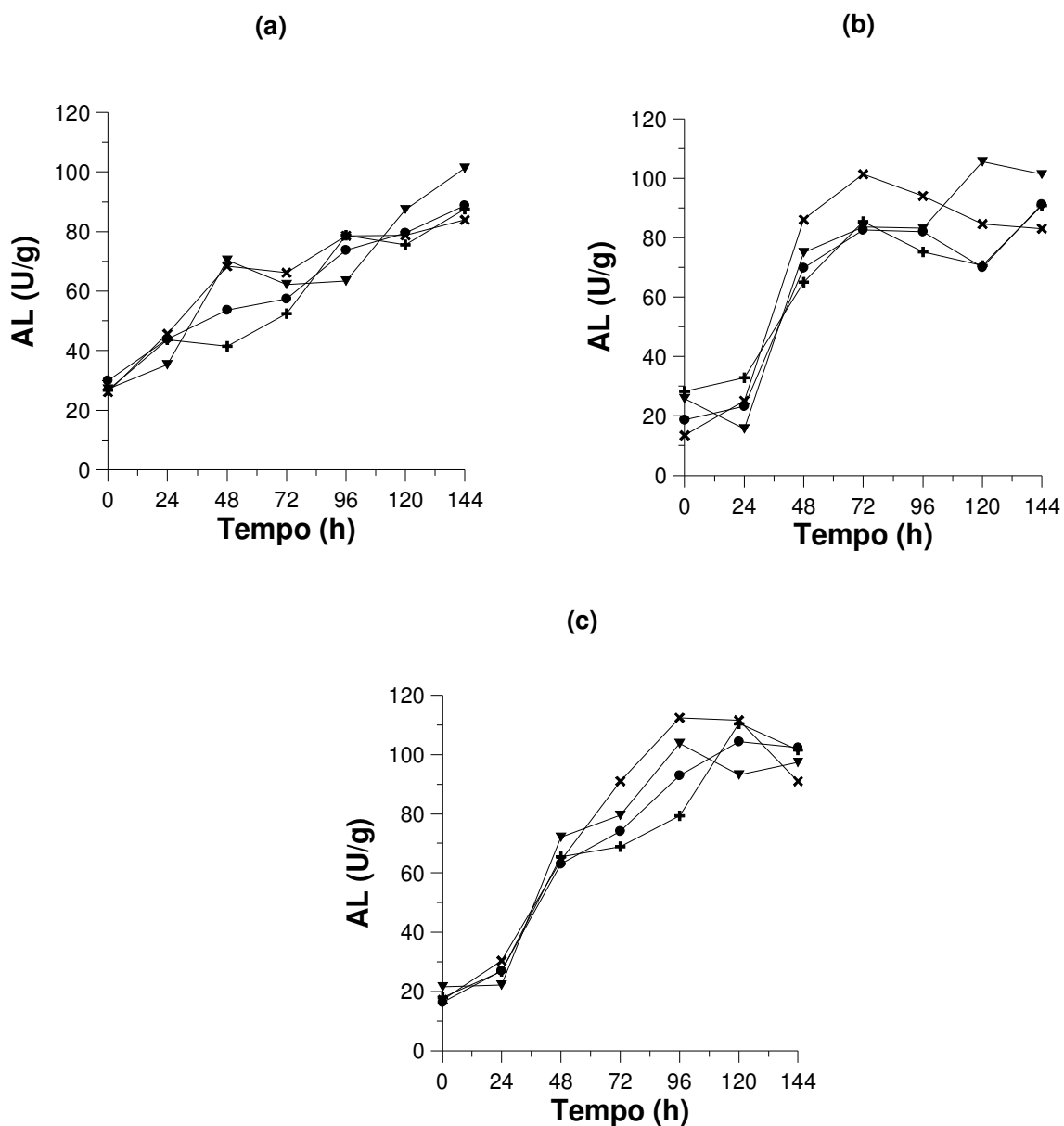


Figura 2: Atividade lipolítica ao longo do tempo em diferentes condições de processo. **(a)** + Exp. 1; ● Exp. 2; ▼ Exp. 3; × Exp. 4. **(b)** + Exp. 5; ● Exp. 6; ▼ Exp. 7; × Exp. 8. **(c)** + Exp. 9; ● Exp. 10; ▼ Exp. 11; × Exp. 12.

A utilização de tolueno como fonte adicional de carbono aumentou a produção de lipase, quando comparada às demais fontes adicionais de carbono ($p < 0,05$). A presença de uma fonte de origem mineral nos cultivos mostrou favorecer a produção de lipase e induziu à altas produtividades ($0,734$ a $0,993 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A melhor adaptação do microrganismo neste meio pode estar relacionada ao fato de o mesmo ter sido isolado de ambiente contaminado com hidrocarbonetos. Em estudos anteriores utilizando fungos cultivados em meio constituído de casca, farelo de arroz e

1% de óleo diesel em biorreatores tipo Erlenmeyer, foi verificada atividade lipolítica máxima de 105,70 U.g⁻¹ para o fungo *A. fumigatus* e 131,92 U.g⁻¹ para o fungo *Phialemonium sp.* A presença de óleo diesel favoreceu a produção quando comparada à presença de óleo de soja refinado e a ausência de fonte adicional de carbono (MARTINS, 2005).

Muitas lipases microbianas são somente produzidas na presença de um indutor (RAPP, 1995). De acordo com DOMÍNGUEZ et al (2003), a produção de lipase pode ser influenciada não só pela presença, mas pelo tipo de hidrocarboneto, uma vez que o mecanismo de biossíntese está ligado ao tipo de microrganismo em que se fornecem estas fontes. Muitas espécies do gênero *Aspergillus* utilizam compostos xenobióticos, como n-alcanos e hidrocarbonetos aromáticos como o tolueno, benzeno e xileno como fonte de carbono (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

O uso de hidrocarbonetos de petróleo como substratos potenciais para a produção microbiana de várias enzimas importantes comercialmente tem sido reportado. Em estudos realizados por KANWAR e GOSWAMI (2002) foi observado que *Pseudomonas pseudomallei* 12Sm produziu lipase extracelular durante crescimento em meio contendo n-hexadecano como única fonte de carbono. Segundo os autores, tem sido evidenciado que a produção de lipase por alguns microrganismos crescendo em substratos lipídicos tem sido inibida pela formação de produtos finais, como exemplos, glicerol e os ácidos graxos. A degradação de hexadecano geralmente leva a formação de acil-CoA o qual é metabolizado na célula para a formação de energia e crescimento celular. Assim, a possibilidade de inibição da produção de lipase pelos produtos finais parece ser nula.

A Figura 2 mostra que para os experimentos utilizando tolueno e óleo de soja degomado houve um aumento expressivo na atividade lipolítica entre 24 e 48 h de processo. Provavelmente, o microrganismo passou a utilizar de forma mais acentuada a fonte de carbono lipídica para o seu crescimento a partir de 24 h de cultivo. Na fase inicial de crescimento, o microrganismo tende a utilizar primeiramente os monossacarídeos provenientes do farelo, resultante da hidrólise ácida parcial sofrida durante o tratamento térmico de esterilização do farelo, sendo que a presença de uma fonte adicional de carbono (fonte lipídica) serve como um indutor na produção de lipase. Em torno de 48 h de processo, foi observado o início do crescimento de esporos nos meios fermentativos, provavelmente em decorrência da maior velocidade de biossíntese e metabolização de nutrientes do meio (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

O aumento expressivo da atividade lipolítica entre 24 e 48 h foi também observado em estudos anteriores utilizando *A. fumigatus* crescendo em meio constituído por casca e farelo de arroz e como fonte adicional de carbono, óleo diesel e óleo de soja, em bioreatores de coluna com taxas de aeração de 60 e 120 mL.g⁻¹.h⁻¹ (MARTINS, 2005).

As oscilações apresentadas em diferentes tempos de fermentação, podem ser explicadas considerando-se os passos metabólicos de crescimento do microrganismo, onde os compostos de estruturas mais simples são primeiramente consumidos, enquanto os compostos de estrutura complexa, presentes no meio, necessitam sofrer a ação indireta do microrganismo, através da produção de enzimas, as quais hidrolisam o composto deixando-o na forma de energia disponível para o metabolismo de crescimento. A mudança na fonte predominante de carbono para seu metabolismo, promove ligeira queda nos valores de atividade. As quedas na atividade lipolítica durante o processo podem também ser relacionadas à produção de proteases no meio, uma vez que estas podem estar hidrolisando as lipases presentes (MARTINS, 2005).

As fontes de carbono de origem mineral e vegetal foram as que proporcionaram em média, as mais altas atividades e produtividades lipolíticas, diferindo estatisticamente ao nível de 95% de confiança. A maior produtividade (1,222 U.g⁻¹.h⁻¹) foi obtida nas condições do experimento 7 (óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹).

A utilização de óleo de pescado bruto como fonte adicional de carbono proporcionou as menores atividades lipolíticas e as menores produtividades (p<0,05). Dentre as condições empregadas, a utilização de farelo de trigo e taxa de aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹ (experimento 3), proporcionou maior atividade e produtividade lipolítica ao utilizar óleo de pescado bruto.

Durante o processo, foi realizado o acompanhamento da umidade nos meios fermentativos, sendo verificado aumento ao longo do tempo, mostrando teores de 48,0 a 56,4% e de 49,0 a 64,2% nos meios constituídos de farelo de arroz e farelo de trigo, respectivamente (ANEXO). Os meios constituídos de farelo de trigo apresentaram maiores valores em relação aos meios constituídos de farelo de arroz. Segundo RAIMBAULT e ALAZARD (1980), o aumento da umidade do meio durante a fermentação se deve à diminuição na quantidade de matéria sólida e à produção de água metabólica pela oxidação dos carboidratos.

De acordo com a análise estatística, em média, as mais altas atividades e produtividades lipolíticas, foram obtidas ao se utilizar farelo de trigo como meio fermentativo ($p < 0,05$), apresentando atividades máximas entre 72 e 144 h de processo. Verifica-se que o período de maior produção de lipase coincidiu com o período de maior conteúdo de água no meio, mostrando que a umidade pode ter favorecido a produção de lipase, uma vez que a presença de água livre no meio se torna de extrema importância para o metabolismo do microrganismo.

Em relação ao efeito de diferentes taxas de aeração nos processos fermentativos, verificou-se que o nível de aeração afetou a produção da enzima. A aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ proporcionou, em média, a maior produção de lipase ($p < 0,05$). No entanto, a condição de maior vazão ($100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) promoveu as mais altas produtividades ($p < 0,05$). A aeração do meio é importante para a manutenção do microrganismo, sendo este responsável pelo suprimento da demanda de oxigênio, remoção do CO_2 e constituindo-se ainda na forma mais eficiente para a remoção do calor do biorreator (MITCHELL et al, 2003; HASAN, 1998). A remoção do calor, gerado devido às atividades metabólicas que ocorrem no sistema, é de fundamental importância para o bom desenvolvimento da fermentação em termos de crescimento do microrganismo e de produção de enzima. A aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ mostrou ser suficiente para a produção de lipase, apresentando altas atividades lipolíticas.

Ao comparar a produção de lipase com a produção de biossurfactante verifica-se que a máxima atividade lipolítica ($112,46 \text{ U.g}^{-1}$) foi obtida nas condições do experimento 12 (tolueno, farelo de trigo e aeração de $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) diferentemente das obtidas para a máxima atividade emulsificante água em óleo ($25,49 \text{ UE.g}^{-1}$) e máxima atividade emulsificante óleo em água ($58,51 \text{ UE.g}^{-1}$), as quais foram obtidas nas condições do experimento 11 (tolueno, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). No entanto, de acordo com a análise estatística, verificou-se que em relação à atividade lipolítica o experimento 12 não diferiu do experimento 11 ($p < 0,05$).

As condições que mostraram favorecer a produção de biossurfactante e lipase foram a utilização de farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($p < 0,05$). O óleo de soja degomado mostrou, em média, aumentar a atividade emulsificante água em óleo ($p < 0,05$), e a utilização de tolueno mostrou aumentar a produção de lipase ($p < 0,05$). Com relação à atividade emulsificante óleo em água (AEo/w), o óleo de peixe mostrou, em média, maiores atividades, no entanto, não diferiu estatisticamente do tolueno ao nível de 95% de confiança.

Com a finalidade de comparar o comportamento cinético da produção de biossurfactante e de lipase, a Figura 3 mostra a atividade lipolítica, atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) e óleo em água (AEo/w) ao longo do tempo, para os experimentos 11 e 12, os quais apresentaram as mais altas atividades emulsificante e lipolítica, respectivamente.

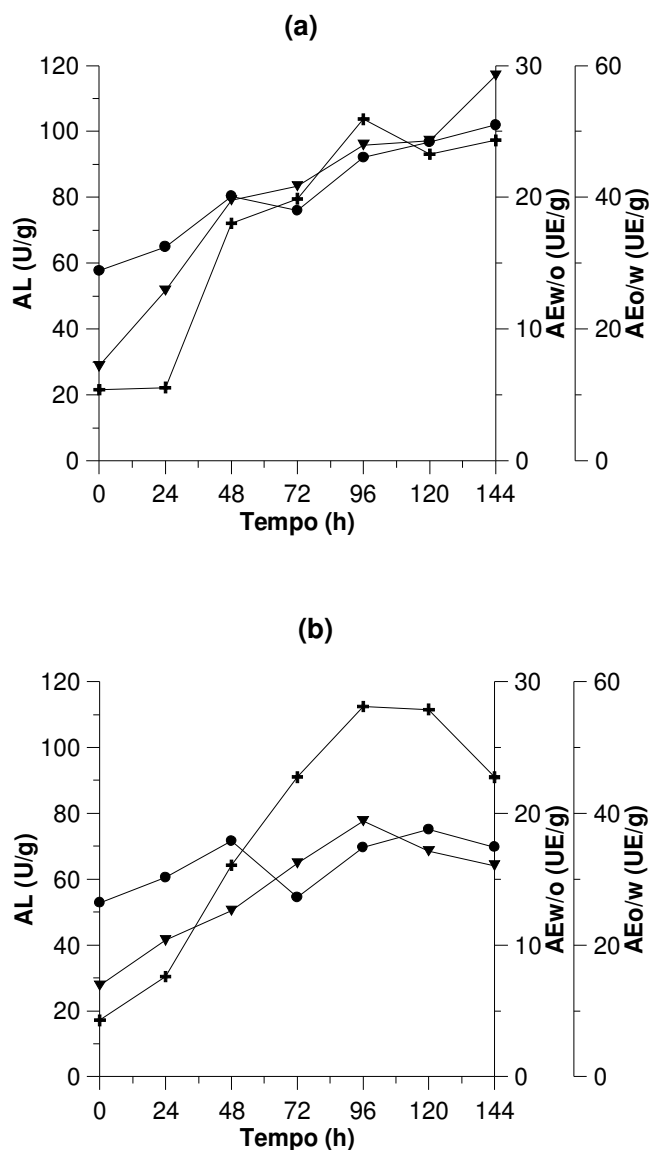


Figura 3: Atividade Lipolítica (+), Atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) (●), Atividade emulsificante óleo em água (AEo/w) (▼) ao longo do processo fermentativo. (a) Experimento 11 (tolueno, farelo de trigo, aeração de $60 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). (b) Experimento 12 (tolueno, farelo de trigo, aeração de $100 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

Verifica-se que ao longo do tempo, ambas tendem a apresentar comportamento crescente no intervalo de tempo estudado. No entanto, não foi verificada uma relação direta em relação às máximas atividades encontradas.

No experimento 11, a máxima atividade lipolítica foi obtida em 96 h, e as atividades emulsificantes água em óleo (AEw/o) e óleo em água (AEo/w) em 144 h de processo. Para as condições do experimento 12 (Figura 3(b)), as máximas atividades lipolítica e emulsificante óleo em água (AEo/w) foram obtidas em 96 h, e a atividade emulsificante água em óleo (AEw/o) em 120 h.

Estudos têm mostrado os efeitos estimulantes de surfactantes na produção de enzimas por microrganismos em fermentação em estado sólido. LIU et al (2006b) verificaram que a adição de ramnolipídios e Tween 80 favoreceu a produção de enzimas (celulase e xilanase) por *Trichoderma viride* cultivado em estado sólido, mostrando que o biosurfactante foi o mais efetivo. Os resultados indicaram que os efeitos do mesmo surfactante na produção de enzimas foram variados para diferentes enzimas produzidas pelo mesmo microrganismo.

Em decorrência do aumento da produção de lipase no meio, mais lipídio tende a ser quebrado facilitando a absorção pelo microrganismo e favorecendo a produção de biosurfactante. Com a presença de surfactante no meio, a água presente tende a se ligar ao lipídio que ainda não foi emulsificado, promovendo a formação de emulsão, favorecendo assim, o ataque microbiano e maior produção de lipase.

No caso dos experimentos 11 e 12, verifica-se que o comportamento cinético da atividade lipolítica e da atividade emulsificante óleo em água (AEo/w) apresentaram maior semelhança do que quando comparado à atividade emulsificante água em óleo (AEw/o).

4 CONCLUSÃO

A máxima atividade lipolítica ($112,46 \text{ U.g}^{-1}$) foi obtida quando se utilizou tolueno, farelo de trigo e aeração de $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A maior produtividade foi obtida nas condições do experimento 8 ($1,222 \text{ U.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), com óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Os resultados obtidos mostraram a capacidade do fungo filamentososo em produzir a enzima lipase nas diferentes condições de processo. A produção da enzima mostrou, entretanto, ser influenciada pelos fatores de estudo, mostrando que a utilização de farelo de trigo como meio fermentativo, tolueno

como fonte adicional de carbono e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ favoreceu a produção de lipase ($p < 0,05$).

Ao comparar a produção de lipase com a produção de biossurfactante, verificou-se que ambas apresentaram cinética associada, com comportamento crescente ao longo do intervalo de tempo estudado. As máximas atividades emulsificante água em óleo e óleo em água foram obtidas nas condições do experimento 11 (tolueno, farelo de trigo e aeração de $60 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e a máxima atividade lipolítica nas condições do experimento 12 (tolueno, farelo de trigo e aeração de $100 \text{ mL.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). De acordo com a análise estatística, verificou-se que o experimento 12 não diferiu do experimento 11 em relação à atividade lipolítica, mostrando que as condições do experimento 11 favoreceram ambas, produção de biossurfactante e lipase.

Os resultados evidenciaram a possibilidade da utilização de resíduos sólidos agroindustriais para a produção de lipases pelo fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, empregando menores taxas de aeração. Com isso, há uma contribuição importante no desenvolvimento de novas alternativas de utilização destes rejeitos e na redução dos custos de processo, além da valorização do meio ambiente com a adoção de processos voltados à diminuição dos impactos ambientais promovidos pelas atividades industriais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

BRODERICK, L.S., COONEY, J.J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. **Contribution N°1149, Center for Environmental and estuarine studies of the University of Maryland**. 8, s/d.

BURKERT, J.F.M., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp using factorial design. **Bioresource Technology**, 91, 77-84, 2004.

CARVALHO, P.O., CALAFATTI, S.A., MARASSI, M., SILVA, D.M., CONTESINI, F.J., BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, 28, 4, 614-621, 2005.

CAVALCANTI, E.D.C., GUTARRA, M.L.E., FREIRE, D.M.G., CASTILHO, L.R., JÚNIOR, G.L.S. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48, 79-84, 2005.

CIHANGIR, N., SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20, 193-197, 2004.

DOMÍNGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M.A., SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, 25, 1225-1229, 2003.

ELLAIAH, P., PRABHAKAR, T., RAMAKRISHNA, B., THAER TALEB, A., ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, 39, 5, 525-528, 2004.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Coleção Biotecnologia. Ed. Educacs, Caxias do Sul, 2004.

FALONY, G., ARMAS, J.C., MENDOZA, J.C.D., HERNÁNDEZ, J.L.M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, 44, 2, 235-240, 2006.

HASAN, S.D.M. Modelagem e simulação da transferência de calor em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1998.

HATZINIKOLAOU, D.G., MACRIS, J.B., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., KOLISIS, F.N., FOUNTOUKIDIS, G. Production and partial characterization of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, 18, 5, 547-552, 1996.

JOHNSON, V., SINGH, M., SAINI, V.S., ADHIKARI, D.K., SISTA, V., YADAV, N.K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, 14, 6, 487-490, 1992.

KANWAR, L., GOSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, 727-735, 2002.

LIU, C.H., LU, W.B., CHANG, J.S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochemistry**, 41, 1940-1944, 2006a.

LIU, J., YUAN, X., ZENG, G., SHI, J., CHEN, S. Effects of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, 41, 2347-2351, 2006b.

MARTINS, V.G. Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

MARTINS, V.G., KALIL, S.J., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61, 9-10, 721-726, 2006.

MITCHELL, D.A., KRIEGER, N., STUART, D.M., PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, 35, 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D.A., MEIEN, O.F.V., KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemistry Engineering Journal**, 13, 137-147, 2003.

NIGAM, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, 6, 405-423, 1994.

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

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. Culture method to study fungal grow in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology**, 9, 199-209, 1980.

RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfestum*. **Enzyme and Microbial Technology**, 17, 832-838, 1995.

ARTIGO III

**BIORREMEDIÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS
POR DERRAMES SIMULADOS DE ÓLEOS E
DERIVADOS**

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR DERRAMES SIMULADOS DE ÓLEOS E DERIVADOS

Vanessa Sacramento Cerqueira, Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: +55(53)3233-8653, e-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

Biorremediação é um processo no qual microrganismos são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir poluentes no ambiente. A utilização de biossurfactantes e nutrientes em processos de biorremediação de solos contaminados visa acelerar o processo de degradação através do aumento da atividade microbiana e biodisponibilidade do contaminante. Surfactantes de origem microbiana vêm recebendo grande interesse, devido suas vantagens frente aos de origem química. O presente trabalho teve por objetivo estudar o processo de biorremediação de solos contaminados por compostos de origem animal (óleo de pescado bruto) e mineral (tolueno), verificando a influência da adição de biossurfactantes e surfactantes químicos e de nutrientes (bioestimulação) no meio. Os experimentos foram realizados durante 90 dias e foram avaliadas a adição de dispersante químico ou biossurfactante obtido de *Aspergillus fumigatus* cultivado em estado sólido, e a adição de fertilizantes (uréia e superfosfato triplo) na proporção C:N:P de 100:15:3. Os resultados mostraram que a maior taxa de remoção do contaminante óleo de pescado foi de 59,47% obtido no experimento contendo biossurfactante e bioestimulante em 90 dias de processo. A maior taxa de remoção do contaminante tolueno (100%) foi obtido em 14 dias para os experimentos contendo biossurfactante, dispersante químico e biossurfactante com bioestimulação. A utilização de fertilizantes mostrou favorecer o crescimento microbiano e o emprego de surfactantes mostrou aumentar a biodisponibilidade do contaminante, devido a sua maior taxa degradativa.

Palavras-chave: bioestimulação, biorremediação, biossurfactante, fungo, óleo de pescado, tolueno

ABSTRACT

Bioremediation is a process in which microorganisms are technologically used for removing or reducing pollutants in the environment. The use of biosurfactants and nutrients in processes of contaminated soils bioremediation aims at accelerating the degradation process through increasing microbial activity and bioavailability of the contaminant. Microbial origin surfactants have been received great attention to due to their advantages when compared to chemical origin ones. This paper aimed at studying the process of bioremediation of soils contaminated by animal (raw fish oil) and mineral (toluene) origin compounds, verifying the influence of adding biosurfactants and chemical surfactants and nutrients (biostimulation) in the media. The experiments have been performed for 90 days and the addition of chemical spreading or biosurfactant obtained from *Aspergillus fumigatus* cultivated under solid state and the addition of fertilizers (urea and triple super phosphate) in the ratio C:N:P at 100:15:3 have been evaluated. The results have shown that the highest removal rate of fish oil contaminant was 59.47% obtained in the experiments containing biosurfactant and biostimulate in 90 days process. The highest removal rate of toluene contaminant (100%) was achieved in 14 days for experiments containing biosurfactant, chemical spreading and biosurfactant with biostimulation. The use of fertilizers has shown to favor microbial growth and the use of surfactants has shown to increase the contaminant bioavailability due to its higher degradation rate.

Key words: biostimulation, bioremediation, biosurfactant, fungus, fish oil, toluene

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ar, solos, sedimentos, águas subterrâneas e superficiais por compostos orgânicos tóxicos tornou-se um dos maiores problemas enfrentados pelo mundo industrializado. Nas últimas décadas, uma ampla variedade de substâncias tóxicas e perigosas tem sido introduzidas no meio ambiente, em especial, aquelas decorrentes de despejos de efluentes industriais e as provenientes de acidentes envolvendo derrames de petróleo e seus derivados. O aumento dos problemas ligados à poluição ambiental tem acarretado em uma maior conscientização quanto à importância da restrição de lançamentos indiscriminados de poluentes, e da necessidade de remediar esses locais impactados (BOOPATHY, 2000).

Os resíduos líquidos gerados pelas indústrias químicas e de alimentos apresentam grande complexidade física e química, o que dificulta o seu tratamento, podendo causar riscos ao meio ambiente onde são descartados.

Em relação aos compostos de origem mineral, os derrames, tanto na exploração quanto no transporte, e os rejeitos produzidos nas atividades de refino, se incorporam ao meio ambiente natural em grandes volumes, ocasionando o acúmulo de uma grande quantidade de contaminantes (CURY, 2002). A gasolina, por exemplo, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos com diferentes graus de volatilização, como compostos alifáticos (alcanos, cicloalcanos e alquenos), aromáticos (benzeno, etilbenzeno, tolueno e xilenos - BTEX) e aditivos, com cadeias carbônicas compreendidas na faixa de 5 a 10 carbonos por molécula. Dentre os hidrocarbonetos, os monoaromáticos BTEX têm maior solubilidade em água e, portanto, são os poluentes que primeiro irão atingir o lençol freático (MORAIS e TAUK-TORNISIELO, 2004). Os compostos BTEX podem causar sérios riscos à saúde humana, principalmente devido ao caráter tóxico, mutagênico e carcinogênico.

A elevada potencialidade do uso de microrganismos como agentes degradadores das mais diversas substâncias, aliada ao emprego da biotecnologia, indicam o tratamento biológico como um dos mais eficientes métodos de reduzir os efeitos adversos dos contaminantes sobre o meio ambiente (RIZZO et al, 2006). A tecnologia de biorremediação consiste em um processo tecnológico pelo qual sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental por meio da degradação dos poluentes. Este processo vem se destacando pois além de eliminar o poluente de forma menos agressora, é também tipicamente mais econômico do que métodos tradicionais de tratamento (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

O processo de biorremediação pode ser realizado por dois métodos, bioaugmentação e bioestimulação. O processo de bioaugmentação envolve a introdução de microrganismos para degradar o contaminante. O processo de bioestimulação envolve a introdução de nutrientes adicionais, como nitrogênio e fósforo, na forma orgânica e/ou inorgânica no sistema contaminado, o qual aumenta a população de microrganismos endógenos (SARKAR et al, 2005).

Evidências sugerem que em ambientes aquáticos e terrestres, os microrganismos são os principais agentes para a biodegradação de moléculas de interesse ambiental. Bactérias e leveduras parecem ser os degradadores dominantes em ecossistemas aquáticos, enquanto fungos e bactérias são os principais degradadores em solos. No entanto, a degradação de contaminantes parece envolver o consórcio de microrganismos, incluindo formas eucarióticas e procarióticas, e não somente uma única espécie de microrganismo (BALBA et al, 1998).

A intensidade de biodegradação pode ser influenciada por diversos fatores, tais como nutrientes, oxigênio, pH, características químicas e físicas dos ambientes contaminados, e composição, concentração e biodisponibilidade dos contaminantes (MULLIGAN et al, 2001). A baixa disponibilidade de muitos dos contaminantes do solo aos microrganismos é um dos principais fatores que interferem no processo de biodegradação. Uma alternativa de incremento da metabolização e da possibilidade de biodegradação dos contaminantes é aumentar a solubilização destes substratos empregando-se, surfactantes e emulsificantes.

Surfactantes são moléculas orgânicas que usualmente consistem de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, e apresentam a capacidade de atuar na interface de compostos de diferentes naturezas (VOLKERING et al, 1998). Os surfactantes, em particular, podem interagir com os compostos presentes e aumentar a solubilidade dos mesmos em água. Desta forma, a presença de surfactantes, naturais ou sintéticos, aumenta a disponibilidade dos contaminantes aos microrganismos, e conseqüentemente à biorremediação (RIZZO et al, 2006).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a biorremediação de solos contaminados por derrames simulados de tolueno e óleo de pescado bruto, avaliando o efeito da adição de biosurfactante e surfactante químico e da adição de nutrientes (bioestimulação) no meio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras de solo

A coleta do solo foi realizada no Estuário da Lagoa dos Patos, junto ao terminal portuário da empresa COPESUL (Companhia Petroquímica do Sul), Rio Grande, Brasil, localizado na região sul do Estado do Rio Grande do Sul, latitude 32°04'09''S e longitude 52°05'15''W.

2.2 Caracterização do solo

A classificação geral do solo foi feita segundo metodologia proposta por SUGUIO (1973). O peneiramento do solo foi realizado utilizando peneiras com Tyler entre 8 e 200 (2,360 e 0,075 mm, respectivamente), sendo a massa retida em cada uma das peneiras comparada à Escala de Wentworth (SUGUIO, 1973).

2.3 Montagem dos experimentos

Foram simulados derrames de compostos de diferentes naturezas, óleo de pescado bruto e tolueno, na proporção de 4% em relação ao peso seco de solo. Os ensaios de biorremediação de óleo de pescado totalizaram 6 experimentos e os de tolueno totalizaram 7 experimentos, conforme mostrado na Tabela 1, ao longo de 90 dias. O experimento 7 foi realizado utilizando solo estéril. A esterilização do solo foi realizada em autoclave a 121 °C durante 90 min.

Para a realização dos ensaios, os solos foram colocados em recipientes de vidro com dimensões 0,25 x 0,25 x 0,25 m, contendo uma altura de solo de 0,07 m.

O conteúdo de água adicionado aos experimentos foi ajustado para que todos os experimentos apresentassem o mesmo teor inicial de umidade (12%). A cada 7 dias, os solos foram revolvidos, para fornecer oxigênio ao meio. Os experimentos foram mantidos em local protegido de intempéries, e a temperatura monitorada ao longo do tempo.

Tabela 1: Experimentos de biorremediação realizados em solos para cada composto estudado

Experimento	Surfactante	Bioestimulação
1 (Controle)	Ausência	Ausência
2	Ausência	Presença
3	Biossurfactante	Ausência
4	Surfactante químico	Ausência
5	Biossurfactante	Presença
6	Surfactante químico	Presença
*7 (Branco)	Ausência	Ausência

*Experimento realizado somente na biorremediação de tolueno utilizando solo estéril

2.4 Surfactante

Foram testados surfactantes de diferentes naturezas, microbiológico (biossurfactante) e químico (dispersante). A quantidade de surfactante adicionado foi calculado com base na sua atividade emulsificante (50%) determinada ao início dos experimentos.

2.4.1 Produção de biossurfactante

2.4.1.1 Microrganismo

O biossurfactante foi obtido a partir do fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O microrganismo foi mantido a 4°C em tubos de ensaio inclinado contendo meio ágar batata-dextrose (PDA), adicionado de 1% de glicerina e 0,5% de ágar-ágar (MARTINS et al, 2006).

2.4.1.2 Preparo do inóculo para a fermentação

A propagação do inóculo foi feita através da técnica de espalhamento em superfície realizada em frascos de Roux contendo ágar batata-dextrose (PDA) adicionado de 1% de glicerina e 0,5% de ágar-ágar. Os frascos de Roux foram mantidos em estufa a 30°C durante 7 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).

2.4.1.3 Fermentação em Estado Sólido

O meio fermentativo foi constituído por casca de arroz e farelo de trigo nas proporções 15 e 85%, respectivamente. O farelo de trigo foi peneirado e foram recolhidas as partículas com granulometria entre 0,710 e 1,000 mm (Tyler 24 e 16, respectivamente). Foi adicionada à mistura da casca e farelo, 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 em 1 litro de água destilada. O meio foi ajustado para umidade de 50% e pH 4,5. Foi adicionado ao meio, 1% de tolueno como fonte adicional de carbono. Após o preparo do meio foi realizada, em ambiente asséptico, a inoculação do microrganismo na concentração de 4×10^6 esporos/g de meio.

As fermentações foram realizadas em biorreatores tipo coluna de leito fixo, com dimensões internas 50 x 250 mm (diâmetro x altura), durante 144 h, mantidos a 30 °C, pela circulação de água através do encamisamento do biorreator. O ar fornecido ao sistema foi controlado através de rotâmetros previamente calibrados, utilizando taxa de aeração de $60 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

2.4.1.4 Extração do biossurfactante

A extração do biossurfactante do farelo fermentado foi realizada com água destilada a 90 °C na proporção de 1:9 (uma parte de soluto para nove partes de solvente). Posteriormente, a amostra foi submetida à agitação em incubadora rotativa (B. BRAUN CERTOMAT BS-1, Alemanha) a 160 rpm e 50 °C durante 30 min, sendo em seguida filtrada à vácuo.

2.4.2 Dispersante químico

Foi utilizado dispersante químico comercial com permissão do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) para ser utilizado em possíveis derramamentos (PETROBRAS N-2530, 1995). A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas do dispersante químico. O dispersante foi diluído em água para proporcionar a mesma atividade emulsificante do biossurfactante.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do dispersante químico utilizado

Propriedade	Característica
Aspecto	Líquido amarelado
pH, solução aquosa 5%, 25 °C	6
Densidade, 20 °C, g/cm ³	0,99
Viscosidade BKF, 20 °C, cP	100 máx.
Matéria ativa, %	35
Ponto de fulgor, VF (°C)	73,2

2.5 Bioestimulação

Nos experimentos em que os solos foram bioestimulados foi feita a adição dos fertilizantes uréia (46% de N) e TSP (Superfosfato triplo, 46% de P₂O₅) na proporção de 100:15:3 (C:N:P), tendo como base a quantidade de carbono do derrame. Os fertilizantes foram moídos e posteriormente diluídos em água destilada estéril.

2.6 Amostragem

Os experimentos de biorremediação foram realizados durante 90 dias, sendo coletadas amostras nos dias 0, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 para a análise de degradação do óleo de peixe, nos dias 0, 4, 7, 14, 21, 30, 60 e 90 para a análise de degradação do tolueno, nos dias 0, 7, 15, 30, 60 e 90 para a análise microbiológica e nos dias 0, 45 e 90 para a análise do conteúdo de nitrogênio e fósforo total.

As amostras foram coletadas a partir da superfície até uma profundidade de 70 mm em cinco pontos distintos, sendo posteriormente homogeneizadas. As amostras para a análise microbiológica foram acondicionadas em frascos de vidro estéreis e processadas no mesmo dia. As amostras para verificar a degradação dos compostos foram armazenadas em frascos de vidro estéreis, congeladas no caso da degradação de óleo de peixe, e refrigeradas no caso da degradação do tolueno e processadas posteriormente. Durante a amostragem foi realizado o controle da temperatura ambiente.

2.7 Análises de biodegradação dos compostos

Para a determinação da degradação do óleo de pescado, as amostras de solo foram descongeladas à temperatura ambiente e secas a 105°C por 1 h. A extração do óleo foi realizada em extrator de Soxhlet por 6 h, sendo utilizado hexano como solvente. Posteriormente, no extrato lipídico seco realizou-se a saponificação e esterificação (metilação) para a obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, seguida de Cromatografia Gasosa, a fim de se determinar o perfil de ácidos graxos do óleo (AOCS, 1997).

A determinação dos ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás modelo 3400-VARIAN equipado com Detector de Ionização de Chama e coluna capilar modelo CPSil 88. O gás de arraste foi hidrogênio UP fluxo a 1,0 mL.min⁻¹. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões, e quantificados por normalização de áreas. Foram utilizados padrões diluídos em hexano e foi injetado 1µL.

A análise de degradação do tolueno foi realizada junto à empresa COPESUL (Triunfo-RS). A determinação da concentração de tolueno foi feita em cromatógrafo à gás equipado com Detector de Ionização de Chama e coluna capilar de metil silicone, utilizando amostrador Headspace (EPA 8015-B-96 e EPA 5021-96, 1996). A concentração dos componentes da amostra foi calculada por padronização externa, a partir de uma mistura padrão, preparada em matriz de natureza similar a da amostra e concentração próxima a dos constituintes a serem determinados.

A partir dos resultados de concentração do composto nos diferentes tempos de amostragem, foi calculada a eficiência de remoção do composto através da Equação 1.

$$\text{Eficiência (\%)} = ((C_x - C_y) / C_x) * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

C = concentração do composto (mg.Kg⁻¹);

x e y = tempo de amostragem (dias).

2.8 Análises microbiológicas

A contagem de microrganismos no solo foi estimada através do método de NMP (Número mais provável), segundo BRADDOCK e CATTERALL (1999). Primeiramente, a amostra de solo foi homogeneizada com água destilada estéril na proporção de 1:9 em Blender durante 2 min. Posteriormente procederam-se diluições até 10^{-8} em placas de cultivo de 24 poços.

Para a determinação de microrganismos heterotróficos totais, foi utilizado o meio R2A (250 μ L) em placas de cultivo de 96 poços, adicionado de 10 μ L de cada diluição. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias, e o crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria. Para a determinação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos foi utilizado o meio Bushnell-Hass e uma solução de cloreto de tetrazólio (TTC) como indicador. Após a inoculação (10 μ L) de cada diluição, as placas foram inoculadas com 10 μ L de tolueno. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias, e o crescimento microbiano foi determinado por desenvolvimento de cor violeta (indicando redução do indicador via respiração) (BENTO et al, 2005). Para a determinação de fungos foi utilizado o meio Czapek's, adicionado de 10 μ L de cada diluição. As placas foram incubadas a 30 °C durante 14 dias, e o crescimento microbiano foi determinado por turbidimetria. A população microbiana foi então determinada usando tabelas de NMP (American Public Health Association, 1995).

2.9 Análises de nitrogênio e fósforo total

A determinação de nitrogênio total foi realizada pelo método de Micro-Kjeldhal e a determinação de fósforo total através de método colorimétrico utilizando molibdato de amônio (AOAC, 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de biorremediação de solos foram realizados em sistemas abertos e em local protegido de intempéries. A temperatura local foi monitorada ao longo do processo, sendo a mínima temperatura local 14 °C e a máxima 28 °C.

O solo utilizado nos experimentos foi classificado como areia fina, com composição de 3,44% de grão, 1,15% de areia muito grossa, 18,43% de areia grossa, 14,20% de areia média, 59,01% de areia fina e 3,77% de areia muito fina.

3.1 Análises microbiológicas

A população microbiana presente nos solos foi monitorada durante 90 dias de experimento. A Tabela 3 mostra os valores encontrados da enumeração de microrganismos heterotróficos totais e fungos para a biorremediação de óleo de pescado bruto. A Tabela 4 mostra os valores encontrados de microrganismos heterotróficos totais, fungos e microrganismos degradadores de hidrocarbonetos para os experimentos de biorremediação de solos contaminados com tolueno.

As maiores densidades populacionais foram encontradas nos tempos entre 15 e 60 dias de processo para os solos contaminados com tolueno e entre 30 e 90 dias para os solos contaminados com óleo de pescado. No período de 60 a 90 dias foi verificada redução na concentração de microrganismos. A faixa ideal de umidade do solo para processos de biorremediação está compreendida entre 12 e 30% (EPA, 1994). Inicialmente a umidade do solo dos experimentos foi ajustada a 12%. No entanto, ao longo dos dias foi verificado aumento da temperatura local, variando de 14 a 28°C, o que pode ter favorecido a evaporação da água do solo. Além disso, semanalmente o solo foi revolvido para promover aeração ao meio, o que pode também ter auxiliado no processo de evaporação da água e favorecido a redução da concentração de microrganismos.

A população microbiana encontrada no experimento 1 (controle) de ambos os compostos mostrou freqüentemente ser menor que nos demais experimentos, ao longo do processo. Nas primeiras semanas não foi verificada redução considerável dos microrganismos indicando que estes não foram afetados de forma negativa com a presença dos contaminantes. Os experimentos contendo fertilizantes apresentaram as maiores densidades microbianas, mostrando que a adição de fontes de nitrogênio e fósforo aos solos estimulou o crescimento dos microrganismos.

Tabela 3: Contagem de microrganismos heterotróficos totais e fungos nos experimentos de biorremediação de solos contaminados com óleo de pescado bruto

Exp.	microrg. (NMP/g)	Tempo (dias)					
		0	7	15	30	60	90
1	HT.	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
	Fungos	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
2	HT.	$2,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
	Fungos	$1,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
3	HT.	$2,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	Fungos	$2,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$
4	HT.	$2,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
	Fungos	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
5	HT.	$2,3 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
	Fungos	$2,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$
6	HT.	$2,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
	Fungos	$1,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$

Exp. = experimento; microrg. = microrganismo; NMP = número mais provável; HT = microrganismos heterotróficos totais.

Os experimentos adicionados de surfactantes mostraram aumento da população de microrganismos quando comparado ao experimento 1 (controle). A maior concentração de fungos foi encontrada nos experimentos contendo biossurfactante. Foi verificado o crescimento de *Aspergillus fumigatus* nos experimentos 3 e 5, o que pode ser relacionado ao fato de o biossurfactante adicionado aos solos não ter sofrido etapa prévia de esterilização, podendo ter permanecido esporos de *Aspergillus fumigatus* no extrato surfactante.

O experimento 7 (branco), realizado apenas para o estudo de biorremediação de solos contaminados com tolueno, tinha por finalidade verificar as perdas abióticas durante o processo. No entanto, de acordo com o mostrado na Tabela 4, verifica-se que em 7 dias de experimento foi detectada a presença de microrganismos heterotróficos totais e fungos. Isso ocorreu muito provavelmente, devido à exposição do solo ao ambiente local.

Tabela 4: Contagem de microrganismos heterotróficos totais, fungos e degradadores de hidrocarbonetos nos experimentos de biorremediação de solos contaminados com tolueno

Exp.	microrg. (NMP/g)	tempo (dias)					
		0	7	15	30	60	90
1	HT.	$2,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
	Fungos	$1,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
	DHC	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
2	HT.	$2,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$	$3,5 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
	Fungos	$1,5 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
	DHC	$1,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
3	HT.	$2,3 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
	Fungos	$1,1 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
	DHC	$2,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
4	HT.	$2,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
	Fungos	$1,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	$2,1 \times 10^3$
	DHC	$2,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
5	HT.	$2,5 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$3,9 \times 10^6$
	Fungos	$1,6 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
	DHC	$2,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$	$4,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$
6	HT.	$2,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$3,8 \times 10^6$
	Fungos	$1,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
	DHC	$2,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$6,4 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
7	HT.	$<3,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$
	Fungos	$<3,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$<3,0 \times 10^2$
	DHC	$<3,0 \times 10^2$	$<3,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$<3,0 \times 10^2$	$<3,0 \times 10^2$

Exp. = experimento; microrg. = microrganismo; NMP = número mais provável; HT = microrganismos heterotróficos totais; DHC = microrganismos degradadores de hidrocarbonetos.

3.2 Análises de nutrientes

O conteúdo de nitrogênio total nos ensaios de bioestimulação (2, 5 e 6) apresentou queda pronunciada nos primeiros 45 dias de experimento. Em alguns ensaios houve aumento no conteúdo de nitrogênio no tempo entre 45 e 90 dias de processo. Este aumento pode ser relacionado à provável produção, pelos microrganismos presentes no solo, de metabólitos secundários extracelulares ao longo do tempo.

O conteúdo de nitrogênio total nos solos contaminados com óleo de peixe (Figura 1a), no período de 90 dias reduziu 0,25% ao utilizar-se bioestimulação (experimento 2), 0,20% quando utilizou-se bioestimulação e dispersante (experimento 6) e 0,11%, com bioestimulação e biossurfactante (experimento 5). As maiores taxas de redução foram 66,66% e 64,10% para os ensaios 6 e 2, respectivamente. Em relação aos solos contaminados com tolueno (Figura 1b) reduções de 0,50%, 0,43% e 0,37% no conteúdo de nitrogênio em 90 dias foram obtidas nos experimentos 5, 2 e 6, respectivamente. As maiores taxas de redução foram obtidas para o ensaio 2 (89,58%) e ensaio 5 (87,72%).

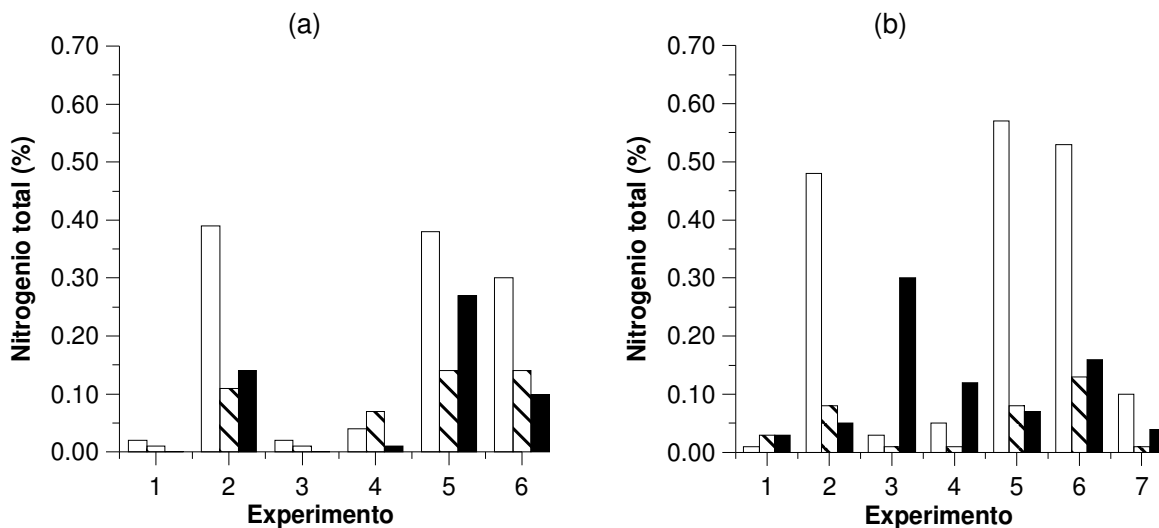


Figura 1: Conteúdo de nitrogênio total nos experimentos de biorremediação (a) solos contaminados com óleo de peixe. (b) solos contaminados com tolueno. □ 0 dia, ▨ 45 dias e ■ 90 dias.

O conteúdo de fósforo total nos ensaios 5 e 6 reduziu ao longo do tempo. Foi observado taxas de redução de 12,5%, para o experimento contendo dispersante e bioestimulação nos solos contaminados com óleo de peixe, e 14,28% e 23,08%, para os ensaios 5 e 6, respectivamente, nos solos contaminados com tolueno (Figura 2). No período de 0 a 45 dias de processo, foi verificado aumento no conteúdo de fósforo no experimento 6 de biorremediação de tolueno, o que pode ser devido a presença de metabólitos secundários no solo, como citado anteriormente. O ensaio 5 (biossurfactante e bioestimulação) apresentou altas reduções nos conteúdos de nitrogênio e fósforo, e alta população microbiana, indicando que as fontes de nitrogênio e fósforo no meio foram utilizadas pelos microrganismos e assim favorecendo o seu desenvolvimento.

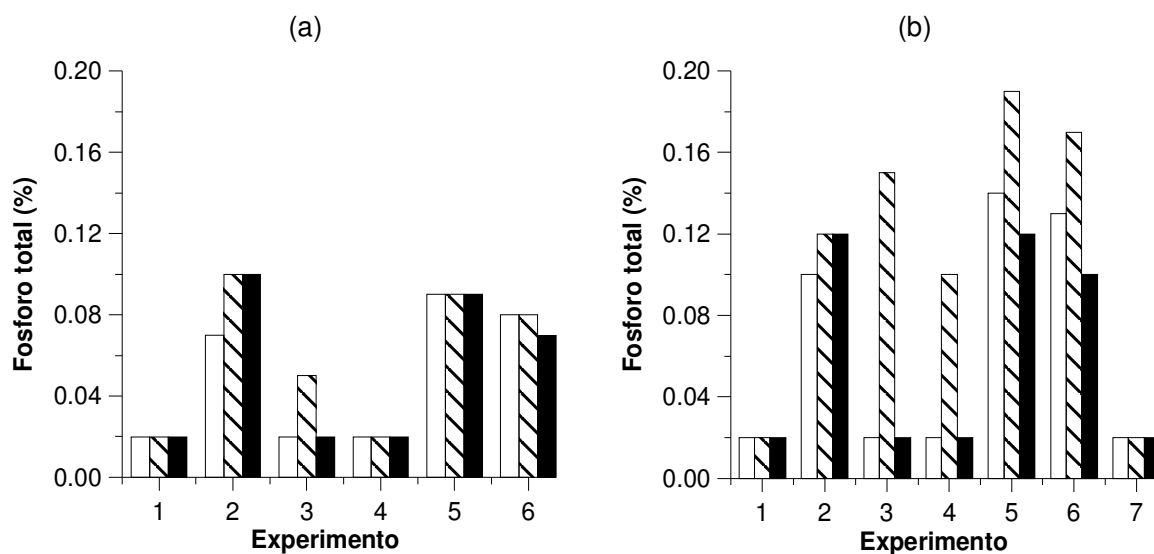


Figura 2: Conteúdo de fósforo total nos experimentos de biorremediação (a) solos contaminados com óleo de peixe. (b) solos contaminados com tolueno. □ 0 dia, ▨ 45 dias e ■ 90 dias.

Os microrganismos necessitam de fontes de nutrientes para o seu crescimento. Nitrogênio, fósforo e potássio são os principais nutrientes inorgânicos adicionados durante os processos de biorremediação. O nitrogênio pode ser adicionado na forma de uréia, cloreto de amônio ou nitrato de amônio. Estas fontes de nitrogênio são facilmente assimiladas pelo metabolismo microbiano. Já o fósforo pode

ser adicionado na forma de fosfato de sódio, fosfato de potássio, sais orto-fosfórico e polifosfato (RIZZO et al, 2006).

3.3 Degradação dos contaminantes

A Figura 3 apresenta o conteúdo de lipídios totais ao longo do tempo nos ensaios de biorremediação de solos contaminados com óleo de pescado bruto. Para avaliar o nível de degradação do óleo nos ensaios, foi levado em consideração o ensaio controle (experimento 1), o qual apresentou redução de 23,07% de lipídios totais ao longo de 90 dias de processo. Assim, os experimentos 2, 3 e 4 apresentaram redução total de 23,57; 15,47 e 17,38%, respectivamente, no conteúdo de lipídios totais.

A análise de ácidos graxos (Tabela 5) nos extratos lipídicos mostrou haver modificação na estrutura do óleo, uma vez que apresentou redução dos teores da maioria dos ácidos graxos analisados. As reduções dos teores de ácidos graxos variaram de 0,02 a 1,05%. Para os ensaios 1, 2, 3 e 4 o ácido graxo de maior quantidade presente nos extratos lipídicos no início do processo foi o ácido palmítico (C16:0). A maior redução no conteúdo de ácidos graxos ao longo do tempo para o experimento 2 foi de 0,73% de ácido palmítico (C16:0) e 0,50% de ácido oléico (C18:1) para os experimentos 3 e 4. Os ensaios 5 e 6 apresentaram as maiores taxas de degradação ao longo de 90 dias, alcançando reduções de 59,47% e 40,21% no conteúdo de lipídios totais, respectivamente. O maior decréscimo no conteúdo de ácidos graxos para os experimentos 5 e 6 foi obtido para o ácido oléico (C18:1), os quais apresentaram reduções de 1,05% e 0,98%, respectivamente.

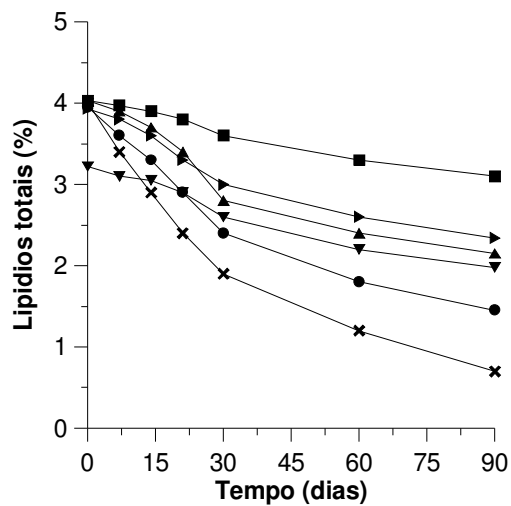


Figura 3: Teor de lipídios totais ao longo do processo de biorremediação de óleo de pescado bruto ■ Controle; ▲ Bioestimulação; ▼ Biossurfactante; ► Dispersante químico; x Biossurfactante e Bioestimulação; ● Dispersante químico e Bioestimulação.

Tabela 5: Composição (%) de ácidos graxos do óleo de pescado bruto no tempo de 0 e 90 dias de biorremediação para os diferentes experimentos

Exp.	tempo (dias)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
1	0	0,24	1,36	0,65	0,48	1,12	nd	0,15	0,03
	90	0,26	1,39	0,36	0,34	0,63	0,03	0,09	0,03
2	0	0,23	1,40	0,65	0,42	1,14	0,02	0,15	0,03
	90	0,09	0,67	0,27	0,19	0,71	0,06	0,13	0,02
3	0	0,17	1,00	0,56	0,30	1,00	0,03	0,14	0,02
	90	0,11	0,81	0,25	0,23	0,50	nd	0,07	0,02
4	0	0,24	1,37	0,63	0,47	1,04	0,02	0,14	0,03
	90	0,16	1,00	0,30	0,24	0,54	0,02	0,06	0,01
5	0	0,18	1,17	0,67	0,45	1,27	0,05	0,20	0,03
	90	0,02	0,24	0,06	0,10	0,22	0,02	0,03	0,01
6	0	0,17	1,17	0,67	0,35	1,30	0,05	0,21	0,03
	90	0,04	0,61	0,08	0,26	0,32	0,05	0,06	0,03

Ácidos graxos: C14:0, ácido mirístico; C16:0, ácido palmítico; C16:1; ácido palmitoleico, C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oléico; C18:2, ácido linoléico; C18:3, ácido linolênico; C20:0, ácido araquídico. nd = não detectado

A utilização de dispersante químico favoreceu o processo de degradação do óleo de pescado quando comparado à utilização de biossurfactante. No entanto, ao utilizar-se biossurfactante juntamente com o bioestimulante, verificou-se maior taxa de degradação. A utilização de dispersante químico juntamente com o fertilizante pode ter causado alguma reação química, causando o retardamento do processo de degradação.

Os ensaios utilizando fertilizantes mostraram maior contagem de microrganismos, indicando que os nutrientes estimularam o crescimento microbiano. De acordo com a análise de nutrientes, verifica-se que as maiores reduções de nitrogênio foram obtidas nos experimentos 2 (bioestimulação) e 6 (bioestimulação e dispersante químico) em 90 dias de processo e para os ensaios 2 e 5 (bioestimulação e biossurfactante) em 45 dias. A utilização de biossurfactante juntamente com bioestimulante, mostrou favorecer o processo de degradação, apresentando maior redução do conteúdo de óleo quando comparado aos demais tratamentos.

Os experimentos de biorremediação de solos contaminados com tolueno foram realizados durante 90 dias, sendo que em 21 dias de experimento a concentração de tolueno encontrada foi reduzida significativamente a valores menores que 3 mg/Kg (Figura 4).

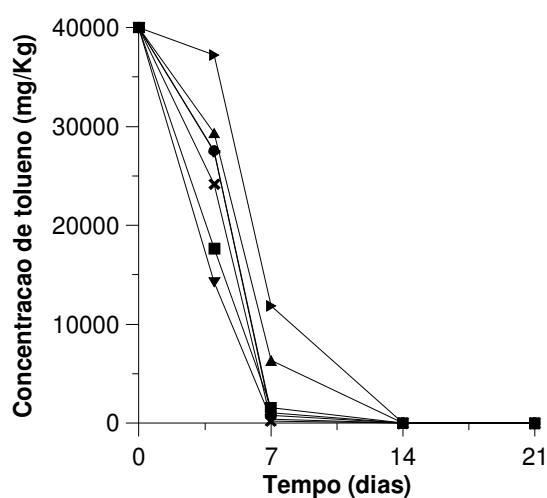


Figura 4: Concentração de tolueno ao longo do processo de biorremediação ■ Controle (Exp.1); ▲ Bioestimulação (Exp.2); ▼ Biossurfactante (Exp.3); ► Dispersante químico (Exp.4); ✕ Biossurfactante e Bioestimulação (Exp.5); ● Dispersante químico e Bioestimulação (Exp.6); + Branco (Exp.7)

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos da degradação do tolueno ao longo do tempo.

Tabela 6: Concentração de tolueno (mg/Kg) nos experimentos de biorremediação em solos

Tempo (dias)	Controle	Bioest.	Bios.	Disp.	Bios.	Disp.	Branco
					e Bioest.	+ Bioest.	
0	40000	40000	40000	40000	40000	40000	40000
4	17660	29347	14259	37219	24164	27497	27471
7	1574	6332	393	11850	194	1083	798
14	9	4	<3	<3	<3	<3	6
21	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3

O experimento 1 foi realizado com o objetivo de verificar a capacidade dos microrganismos endógenos do solo em degradar o contaminante e o experimento 7 a fim de verificar a quantidade de tolueno evaporada. O experimento 1 apresentou redução da concentração de tolueno ao longo do tempo, por vezes maior que os demais experimentos. O experimento 7 apresentou diminuição da concentração de tolueno ao longo do tempo, indicando que houve perdas por volatilização do composto. Durante o processo de biorremediação foi feito o controle da temperatura local. Nos primeiros 14 dias, a temperatura variou de 14 a 22°C, sendo que as mais altas temperaturas alcançadas foram de 24 e 28°C, no final do processo. As temperaturas ótimas de biodegradação de hidrocarbonetos usualmente são entre 15 e 30°C (THOMASSIN-LACROIX et al, 2002). No entanto, devido ao fato de os experimentos serem mantidos em local aberto, estando pois expostos à contaminação, parte desta redução pode ter ocorrido por atividade microbiana e não somente por perdas abióticas. Segundo a análise microbiológica, crescimento microbiano foi detectado em 7 dias de experimento.

A Figura 5 mostra a eficiência de remoção do tolueno para os períodos de 0 a 4 dias, 4 a 7 dias, e 7 a 14 dias de processo. Nos primeiros 4 dias de experimento, os solos mostraram maiores taxas de redução na concentração de tolueno nos experimentos 3 (64,35%) e no experimento 1 (55,85%) e apresentou baixa eficiência de remoção (6,95%) no experimento 4 (dispersante químico).

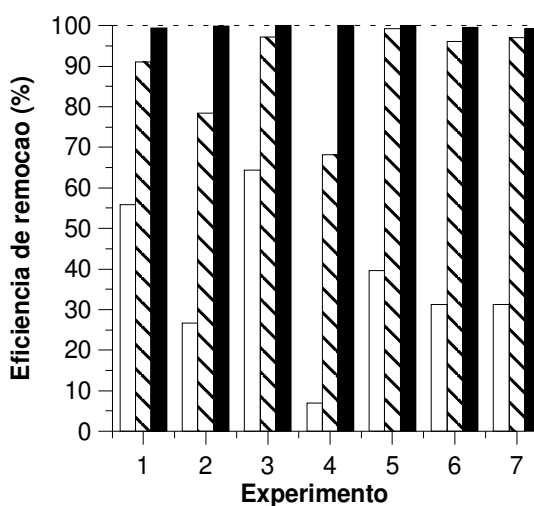


Figura 5: Eficiência de remoção de tolueno para diferentes intervalos de tempo. □ 0 a 4 dias; ▨ 4 a 7 dias; ■ 7 a 14 dias.

Entre 4 e 7 dias de processo, verifica-se que maior taxa de degradação foi obtida para os experimentos 3 (biossurfactante) e 5 (biossurfactante e bioestimulação), obtendo valores de 97,24 e 99,19%, respectivamente. A menor taxa de remoção foi obtida para o experimento utilizando dispersante químico (experimento 4), o qual apresentou redução de 68,16%. No período de 7 a 14 dias, redução de 100% foi obtida para os experimentos 3 (biossurfactante), 4 (dispersante) e 5 (biossurfactante e bioestimulação).

Avaliando o processo apenas durante os primeiros 7 dias, verifica-se que a maior remoção de tolueno foi obtido quando se utilizou biossurfactante (99,01%) e para o experimento com biossurfactante e bioestimulação (99,52%). O experimento com solo estéril (branco) apresentou remoção de 98,00% enquanto que o experimento 1 apresentou remoção de 96,06%. Os experimentos utilizando biossurfactante apresentaram, portanto, as mais altas taxas degradativas em 4, 7 e 14 dias de processo.

Diferentes surfactantes têm sido testados em diferentes solos e poluentes e têm mostrado estimular a degradação de poluentes orgânicos (VOLKERING et al, 1998). A capacidade de um surfactante em aumentar rapidamente a biodegradação de um composto orgânico depende do grau para o qual a biodisponibilidade orgânica é aumentada pelo surfactante. Falatko e Novak (1992) citado por MILLER (1995) verificaram leve aumento na biodegradação induzido por biossurfactantes para 4 constituintes testados da gasolina (tolueno, m-xileno, naftaleno e 1,2,4-trimetilbenzeno), sendo a maior degradação observada para o 1,2,4-trimetilbenzeno, o qual foi degradado em 7 dias na presença de biossurfactante e em 12 dias para o controle.

No período de 7 dias, a taxa de remoção de tolueno ao utilizar-se bioestimulação foi de 84,17%, com dispersante químico foi 70,37%, e com dispersante químico juntamente com bioestimulação foi 97,29%. Ao utilizar-se biossurfactante ou dispersante químico juntamente com bioestimulação, a taxa de remoção aumentou quando comparado com os experimentos em que se utilizou somente surfactantes. A maior população de microrganismos foi encontrada nos experimentos contendo surfactantes e bioestimulação, quando comparado aos experimentos contendo apenas surfactantes. A adição de biossurfactantes mostrou aumentar a biodisponibilidade do contaminante ao microrganismo, uma vez que na sua presença houve aumento da degradação do composto. Além disso, altas reduções no conteúdo de nitrogênio foram encontradas para os experimentos contendo surfactantes e bioestimulação.

Os dados mostraram que a adição de nutrientes ao meio favoreceu o crescimento microbiano. Em estudos de biorremediação de solos contaminados com 5% (p/p) de borra oleosa proveniente da indústria de petróleo, foi alcançada taxa de degradação de 66% em 90 dias de processo ao se utilizar tratamento com nutrientes inorgânicos (VASUDEVAN e RAJARAM, 2001). A adição de fertilizantes inorgânicos como fonte de nutrientes para uso em biorremediação é interessante, pois fornece nutrientes ao solo de forma menos agressora e mais econômica. Muitos estudos têm relatado que a adição de nitrogênio e fósforo aumenta a biodegradação de diversos compostos, sem que sejam observados danos ao meio ambiente. No entanto, em estudos realizados por Soriano (2001) citado por RIZZO et al (2006) visando o estabelecimento das relações nutricionais adequadas para a biorremediação de solos contaminados, foi verificado que dosagens excessivas de nutrientes, principalmente de nitrogênio, podem interferir negativamente no processo de biodegradação. Diversos estudos vêm sendo realizados para determinar as concentrações ótimas de nutrientes a ser adicionados. A taxa ótima reportada na literatura é 100:15:3 de carbono, nitrogênio e fósforo, respectivamente, para a biodegradação de hidrocarbonetos (SARKAR et al, 2005; LIEBEG e CUTRIGHT, 1999). Em estudos de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, foi verificada taxas de redução de 94,5% no experimento controle (solo contaminado) e de 95,5 e 96,8% em solos com adição de fertilizantes inorgânicos (SARKAR et al, 2005).

O estudo da biorremediação de compostos tóxicos como o tolueno é importante visto que os maiores problemas de contaminação de solos e aquíferos causados por derramamentos de gasolina são atribuídos aos hidrocarbonetos denominados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Estes são os constituintes da gasolina mais solúveis e com maior potencial de lixiviação (BARKER et al, 1990).

Ao analisar os processos de biorremediação de solos contaminados com tolueno e óleo de peixe bruto, verifica-se que em ambos os processos, obteve-se maior remoção dos compostos ao utilizar-se biossurfactante juntamente com bioestimulante. A utilização de fertilizantes aumentou a população microbiana, mostrando ser uma alternativa interessante para processos de bioestimulação. O processo de descontaminação dos solos ocorreu mais rapidamente para o composto de origem mineral do que o de origem animal. No caso de um derramamento de tolueno, a utilização da técnica de biorremediação *in situ* mostra-se mais adequada, tendo em vista a curta duração do processo. Do ponto de vista econômico, o

tratamento no próprio local do derrame apresenta-se mais vantajoso. O composto de origem animal demorou mais tempo para ser removido quando comparado ao de origem mineral, no entanto, o processo de biorremediação mostrou-se eficiente para sua remoção.

4 CONCLUSÃO

A utilização de biossurfactante produzido por fermentação em estado sólido a partir do fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* favoreceu o processo de degradação de compostos de origem mineral e animal em solos contaminados, mostrando taxas de remoção de 100% para tolueno e 15,47% para o óleo de pescado bruto, em 14 e 90 dias de processo, respectivamente.

O processo de bioestimulação mostrou favorecer o crescimento de microrganismos endógenos do solo e aumentar a taxa degradativa dos compostos. A maior eficiência de remoção do tolueno (100%) foi obtida nos ensaios contendo biossurfactante, dispersante químico e biossurfactante com bioestimulação. A maior eficiência de remoção para o óleo de pescado bruto foi alcançada no experimento contendo biossurfactante e bioestimulação (59,47%).

O biossurfactante foi eficaz no processo de descontaminação de solos, favorecendo a remoção do poluente quando utilizado juntamente com bioestimulante. Tendo em vista sua menor toxicidade e a possibilidade de obtenção a partir de substratos renováveis e de baixo custo, a utilização de biossurfactantes quando comparado aos surfactantes químicos, apresenta-se vantajosa tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, “**Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**”, 19th ed. APHA, Washington, D.C., 1995.

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

AOCS. **Official Method Ce 1f-96**. Determination of *cis*- and *trans*- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, 1997.

BALBA, M.T., AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, 32, 155-164, 1998.

BARKER, J.F., HUBBARD, C.E., LEMON, L.A. The influence of methanol and MTBE on the fate and persistence of monoaromatic hydrocarbons in groundwater. **Ground Water Management**, 4, 113-127, 1990.

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, 96, 1049-1055, 2005.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, 74, 63-67, 2000.

BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, 3, 81-84, 1999.

CURY, J.C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. **Dissertação de Mestrado em Agronomia**, área de concentração solos e nutrição de plantas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

EPA 510-B-94-003, EPA 510-B-95-007, EPA 510-R-04-002. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers**, 1994.

EPA 5021. Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, 1996.

EPA 8015B-96. Nonhalogenated organics using GC/FID, 1996.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Coleção Biotecnologia. Ed. Educacs, Caxias do Sul, 2004.

LIEBEG, E.W., CUTRIGHT, T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 44, 55-64, 1999.

MARTINS, V.G., KALIL, S.J., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61, 9-10, 721-726, 2006.

MILLER, R.M. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. Em TURCO, R.F., SKIPPER, H.D. **Bioremediation, Science and Applications**. SSSA Special Publication, 43, 1995.

MORAIS, E.B., TAU-K-TORNISIELO, S.M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina. **Arquivos do Instituto biológico**, 71, 272-274, 2004.

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

PETROBRÁS. **Critérios para Homologação de Dispersantes Químicos**. CONTEC-Comissão de Normas Técnicas – N 2530– Março de 1995. Rio de Janeiro, RJ. 13pp., 1995.

RIZZO, A.C.L., LEITE, S.G.F., SORIANO, A.U., SANTOS, R.L.C., SOBRAL, L.G.S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

SARKAR, D., FERGUSON, M., DATTA, R., BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136, 187-195, 2005.

SUGUIO, K. **Introdução à Sedimentologia**. Ed. Edgard Blücher; 1973.

THOMASSIN-LACROIX, E.J.M., ERIKSSON, M., REIMER, K.J., MOHN, W.W. Biostimulation and bioaugmentation for on site treatment of weathered diesel fuel in Artic soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 551-556, 2002.

VASUDEVAN, N., RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International**, 26, 409-411, 2001.

VOLKERING, F., BREURE, A.M., RULKENS, W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, 8, 401-417, 1998.

**CAPÍTULO IV –
CONCLUSÕES GERAIS**

6 CONCLUSÕES GERAIS

O fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* mostrou capacidade de produção de biossurfactante nos diferentes meios sólidos, fonte adicional de carbono e taxas de aeração. As máximas atividades emulsificantes água em óleo (25,49 UE.g⁻¹) e óleo em água (58,51 UE.g⁻¹) foram alcançadas em 144 h de cultivo, quando se utilizou tolueno como fonte adicional de carbono, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹. A maior redução na tensão superficial (36,2 mN.m⁻¹) e interfacial (15,5 mN.m⁻¹) foi obtida quando se utilizou óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹. Em média, aumento na atividade emulsificante e redução da tensão superficial e interfacial foram obtidas ao utilizar farelo de trigo e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹ (p<0,05).

O biossurfactante produzido foi estável em diferentes condições físico-químicas, apresentando maior estabilidade quando mantido em pH 7,0, salinidade 16,5 e 20°C, mostrando, em média, perda de atividade emulsificante água em óleo de 1,6%, óleo em água de 1,7%, tensão superficial de 0,79% e tensão interfacial de 0,45%.

No estudo de produção de lipase, a máxima atividade lipolítica (112,46 U.g⁻¹) foi obtida quando se utilizou tolueno, farelo de trigo e aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹. A máxima produtividade (1,222 U.g⁻¹.h⁻¹), foi obtida com óleo de soja degomado, farelo de trigo e aeração de 100 mL.g⁻¹.h⁻¹. De acordo com a análise estatística, as condições que mostraram, em média, aumentar a produção de lipase foram farelo de trigo, tolueno e aeração de 60 mL.g⁻¹.h⁻¹. Ao comparar a produção de lipase com a produção de biossurfactante, verificou-se que ambas apresentaram cinética associada, com comportamento crescente ao longo do intervalo de tempo estudado.

O melhor gerenciamento de resíduos agroindustriais é de extrema importância, sendo a produção de biossurfactantes e lipases uma alternativa interessante, visto sua contribuição no desenvolvimento de novas tecnologias e de redução de custos de processo. O biossurfactante obtido mostrou estabilidade quando mantido em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade, demonstrando a possibilidade de utilização em diversos segmentos industriais, ambientais e biotecnológicos.

No estudo de biorremediação, a utilização de biossurfactante produzido por fermentação em estado sólido favoreceu o processo de degradação de compostos de origem mineral e animal em solos contaminados, mostrando taxas de remoção de 100% para tolueno e 15,47% para o óleo de pescado bruto, em 14 e 90 dias de processo, respectivamente. O processo de bioestimulação mostrou favorecer o crescimento de microrganismos endógenos do solo e aumentar a taxa degradativa dos

compostos. Os experimentos que apresentaram maior eficiência de remoção do tolueno (100%) foram os ensaios contendo biossurfactante, dispersante químico e biossurfactante com bioestimulação. Em relação ao óleo de pescado, a maior eficiência de remoção foi alcançada no experimento contendo biossurfactante e bioestimulação (59,47%).

O biossurfactante foi eficaz no processo de descontaminação de solos, favorecendo a remoção do poluente quando utilizado juntamente com bioestimulante. Tendo em vista sua menor toxicidade e a possibilidade de obtenção a partir de substratos renováveis e de baixo custo, a utilização de biossurfactantes quando comparado aos surfactantes químicos, apresenta-se vantajosa tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros, propõe-se:

- estudar diferentes concentrações de fonte adicional de carbono;
- avaliar o efeito da adição de glicose no início do processo fermentativo;
- estudar a produção de biossurfactante em fermentação submersa e comparar à produção através de fermentação em estado sólido;
- estudar métodos de purificação do biossurfactante;
- determinar a biomassa fúngica durante o processo;
- avaliar a produção de outras enzimas, em especial proteases, durante o processo fermentativo;
- estudar o aumento de escala para a produção de biossurfactante em fermentação em estado sólido utilizando biorreatores de coluna;
- fazer uma análise econômica do processo;
- estudar diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo durante o processo de biorremediação;
- testar o processo de bioaugmentação em biorremediação de solos;
- testar a aplicação de biossurfactantes em efluentes industriais.

**CAPÍTULO V –
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-RUWAIDA, A.S., BANAT, I.M., HADITIRTO, S., SALEM, S., KADRI, M. Isolation of biosurfactant producing bacteria-product characterization and evaluation. **Acta Biotechnology**, 11, 315-324, 1991.

ADAMCZAK, M., BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, 22, 313-316, 2000.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, “**Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**”, 19th ed. APHA, Washington, D.C., 1995.

AOAC. **Official Methods of Analysis of International**. 16th Edition. Arlington. Virginia. USA, 1995.

AOCS. **Official Method Ce 1f-96**. Determination of *cis*- and *trans*- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, 1997.

ÁSCON-CABRERA, M.A., LEBEAULT, J.M. Interfacial area effects of a biphasic aqueous-organic system on growth kinetic of xenobiotic-degradating microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43, 1136-1141, 1995.

ATLAS, R.M. **Handbook of Microbiological Media**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1993.

ATLAS, R.M. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, 31, 4-12, 178-182, 1995.

BALBA, M.T., AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, 32, 155-164, 1998.

BANAT, I.M., MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53, 495-508, 2000.

BARKER, J.F., HUBBARD, C.E., LEMON, L.A. The influence of methanol and MTBE on the fate and persistence of monoaromatic hydrocarbons in groundwater. **Ground Water Management**, 4, 113-127, 1990.

- BENINCASA, M., ABALOS, A., OLIVEIRA, I., MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, 85, 1-8, 2004.
- BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., GAYLARDE, C.C. Biosurfactantes. **Microbiologia ambiental**, Embrapa, 2ªEd., 2006.
- BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, 96, 1049-1055, 2005.
- BICCA, F.C., FLECK, L.C., AYUB, M.A.Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, 30, 231-236, 1999.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces: Physicochemical and Engineering Aspects**, 152, 41-52, 1999.
- BONILLA, M., OLIVARO, C., CORONA, M., VAZQUEZ, A., SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, 98, 456-463, 2005.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, 74, 63-67, 2000.
- BRADDOCK, J.F., CATTERALL, P.H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, 3, 81-84, 1999.
- BRODERICK, L.S., COONEY, J.J. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. **Contribution N°1149, Center for Environmental and estuarine studies of the University of Maryland**. 8, s/d.
- BURKERT, J.F.M., MAUGERI, F., RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp using factorial design. **Bioresource Technology**, 91, 77-84, 2004.
- CAMEOTRA, S.S., MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50, 520-529, 1998.

CAMEOTRA, S.S., BOLLAG, J.M. Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 30, 2, 111-126, 2003.

CAMERINI, F., CHANIN, C. Produção de biossurfactante fúngico por fermentação em estado sólido. **Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

CARDENASA, F., CASTRO, M.S., SANCHEZ-MONTEROB, J.M., SINISTERRAB, J.V., VALMASEDAA, M., ELSONA, S.W., ALVAREZA, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, 28, 145-154, 2001.

CARRILLO, P.G., MARDARAZ, C., PITTA-ALVAREZ, S.I., GIULIETTI, A.M. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 12, 1, 82-84, 1996.

CARVALHO, P.O., CALAFATTI, S.A., MARASSI, M., SILVA, D.M., CONTESINI, F.J., BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, 28, 4, 614-621, 2005.

CASTIGLIONI, G. Modelagem e simulação da produção de biossurfactante e lipase por fermentação em estado sólido. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

CAVALCANTI, E.D.C., GUTARRA, M.L.E., FREIRE, D.M.G., CASTILHO, L.R., JÚNIOR, G.L.S. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 48, 79-84, 2005.

CHAMPION, J.T., GILKEY, J.C., LAMPARSKI, H., RETTERER, J., MILLER, R.M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, 170, 569-574, 1995.

CIHANGIR, N., SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20, 193-197, 2004.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), Resolução nº269, de 12 de Janeiro de 2001, **Regulamento para uso de dispersantes químicos em derrames de óleo no mar.**

COOPER, D.G. Biosurfactants. **Microbiological Sciences**, 3, 5, 1986.

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

COSTA, E. Produção de biossurfactante por fermentação em estado sólido utilizando fontes de carbono fóssil e não fóssil. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos.** Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2004.

COSTA, J.A.V. Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos.** Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996.

COSTA, S.G.V.A.O., NITSCHKE, M., HADDAD, R., EBERLIN, M.N., CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, 41, 483-488, 2006.

COSTA, R.J., PEREIRA, M.R., NASCIMENTO, D.S. Biorremediação de ambientes aquático e terrestre utilizando biossurfactante produzido através de fermentação em estado sólido. **Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos.** Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

COUTO, S.R., SANROMAN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, 76, 3, 291-302, 2006.

CRAPEZ, M.A.C., BORGES, A.L.N., BISPO, M.G., PEREIRA, D. Biorremediação: Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**. 30/179, 32-37, 2002.

CURY, J.C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. **Dissertação de Mestrado em Agronomia**, área de concentração solos e nutrição de plantas na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2002.

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

DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial Production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61, 1, 47-64, 1997.

DOMÍNGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M.A., SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, 25, 1225-1229, 2003.

ELLIAH, P., PRABHAKAR, T., RAMAKRISHNA, B., THAER TALEB, A., ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, 39, 5, 525-528, 2004.

EPA 510-B-94-003, EPA 510-B-95-007, EPA 510-R-04-002. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers**, 1994.

EPA 5021. Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, 1996.

EPA 8015B-96. Nonhalogenated organics using GC/FID, 1996.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Coleção Biotecnologia. Ed. Educacs, Caxias do Sul, 2004.

FALONY, G., ARMAS, J.C., MENDOZA, J.C.D., HERNÁNDEZ, J.L.M. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, 44, 2, 235-240, 2006.

FERNANDES, F.S., COSTA, L.R., KRONKA, E.A.M., COPPEDE, J.S., BENINCASA, M. Estudo do Efeito da Concentração de Nitrogênio na Produção de Biossurfactantes Ramnolipídicos em Substrato Contendo Resíduos do Refino de Óleos Vegetais como Única Fonte de Carbono. **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, Recife, Pernambuco, 2005.

FRANCY, D.S., THOMAS, J.M., RAYMOND, R.L., WARD, C.H. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal Industry Microbiology**, 8, 237-246, 1991.

GANDRA, E.A., FONSECA, G.G., CORRÊA, A.P.A., SCLOWITZ, L.F. Produção de cogumelos comestíveis utilizando resíduos agroindustriais. **Trabalho de Conclusão**

de Curso em Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2000.

GOUVEIA, E.R., LIMA, D.P.A., DUARTE, M.S., LIMA, G.M.S., ARAÚJO, J.M. Bactérias produtoras de biossurfactantes – Produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 30, 2003.

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

HASAN, S.D.M. Modelagem e simulação da transferência de calor em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos.** Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1998.

HATZINIKOLAOU, D.G., MACRIS, J.B., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., KOLISIS, F.N., FOUNTOUKIDIS, G. Production and partial characterization of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, 18, 5, 547-552, 1996.

ILORI, M.O., AMOBI, C.J., ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, 61, 7, 985-992, 2005.

JAEGER, K.E., REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, 16, 1998.

JOHNSON, V., SINGH, M., SAINI, V.S., ADHIKARI, D.K., SISTA, V., YADAV, N.K. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, 14, 6, 487-490, 1992.

KANWAR, L., GOSWAMI, P. Isolation of a *Pseudomonas* lipase in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, 727-735, 2002.

KIM, H.S., JEON, J.W., KIM, S.B., OH, H.M., KWON, T.J., YOON, D.B. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, 24, 1637-1641, 2002.

KIM, H.S., YOON, B.D., LEE, C.H., SUH, H.H., OH, H.M., KATSURAGI, T., TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of fermentation and bioengineering**, 84, 1, 41-46, 1997.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. **Pure and Applied Chemistry**, 64, 11, 1731-1737, 1992.

KOSARIC, N., CAIRNS, W.L. **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987.

LIEBEG, E.W., CUTRIGHT, T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 44, 55-64, 1999.

LIMA, A.S. Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica*. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996.

LINDE, G.A. Produção de pectinase por fermentação semi-sólida em biorreator de coluna. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2000.

LIU, C.H., LU, W.B., CHANG, J.S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochemistry**, 41, 1940-1944, 2006a.

LIU, J., YUAN, X., ZENG, G., SHI, J., CHEN, S. Effects of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, 41, 2347-2351, 2006b.

LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., BUBIATMAN, S., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology Technology**, 7, 258-265, 1985.

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

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 18, 37-42, 1997.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 27, 3, 675-683, 2005.

MARTINS, A., DINARDI, A.L., FORMAGI, V.M., LOPES, T.A., BARROS, R.M., CONEGLIAN, C.M.R., BRITO, N.N., SOBRINHO, G.D., TONSO, S., PELEGRINI, R. Biorremediação. **III Fórum de Estudos Contábeis**, Faculdades Integradas Claretianas, Rio Claro, SP, 2003.

MARTINS, V.G. Produção de biosurfactante por fermentação em estado sólido e sua utilização em biorremediação. **Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

MARTINS, V.G., KALIL, S.J., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V. Solid state biosurfactant production in a fixed-bed column bioreactor. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61, 9-10, 721-726, 2006.

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

MILLER, R.M. Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. Em TURCO, R.F., SKIPPER, H.D. **Bioremediation, Science and Applications**. SSSA Special Publication, 43, 1995.

MITCHELL, D.A., KRIEGER, N., STUART, D.M., PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, 35, 1211-1225, 2000.

MITCHELL, D.A., MEIEN, O.F.V., KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemistry Engineering Journal**, 13, 137-147, 2003.

MORAES, A.F. Enriquecimento protéico do farelo de arroz por fermentação semi-sólida em biorreator de leito fixo. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1999.

MORAIS, E.B., TAUKE-TORNISIELO, S.M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina. **Arquivos do Instituto biológico**, 71, 272-274, 2004.

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

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, 133, 183-198, 2005.

NANDINI, C.D., SALIMATH, P.V. Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapatti/roti (Indian flat bread) making quality. **Food Chemistry**, 73, 2, 197-203, 2001.

NIGAM, P., SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, 6, 405-423, 1994.

NITSCHKE, M., PASTORE, G.M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25, 772-776, 2002.

NITSCHKE, M., FERRAZ, C., PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, 81-85, 2004.

PAES, C.L.T. Avaliação do tempo de residência de derrames de óleo no mar, através do monitoramento de parâmetros geoquímicos - Testes laboratoriais. **Trabalho de conclusão de Curso em Engenharia de exploração e produção de petróleo**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Macaé, RJ, 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, 81-84, 2003.

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

PASTORE, G.M., COSTA, V.S.R., KOBLITZ, M.G.B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 23, 2, 135-140, 2003.

PETROBRÁS. **Critérios para Homologação de Dispersantes Químicos**. CONTEC- Comissão de Normas Técnicas – N 2530– Março de 1995. Rio de Janeiro, RJ. 13pp., 1995.

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

RAGHAVARAO, K.S.M.S., RANGANATHAN, T.V., KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 13, 127-135, 2003.

RAHMAN, K.S.M., THAHIRA-RAHMAN, J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., BANAT, I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, 85, 257-261, 2002.

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. Culture method to study fungal grow in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology**, 9, 199-209, 1980.

RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, 17, 832-838, 1995.

REGULY, J.C. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos**. V.1. Editora e Gráfica Universitária - UFPEL. Pelotas, RS, 1996.

REGULY, J.C. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos**. V.3. Editora e Gráfica Universitária - UFPEL. Pelotas, RS, 2000.

RIZZO, A.C.L., LEITE, S.G.F., SORIANO, A.U., SANTOS, R.L.C., SOBRAL, L.G.S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. **Série tecnologia Ambiental**. STA-37, CETEM/MCT, 2006.

ROBINSON, T., SINGH, D., NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 55, 284-289, 2001.

RODRIGUES, R.C., PIAIA, J.C., JÚNIOR, C.G., VENDRUSCULO, F. Produção de biossurfactante utilizando o processo de fermentação em estado sólido. **Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2003.

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, 13, 249-252, 2002.

SAMPAIO, R.M. Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação em óleo diesel comercial. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1995.

SANTOS, L.O., MAGNANI, G., COLLA, E. Amiloglicosidade e pectinases via fermentação semi-sólida em fermentador de tambor rotativo. **Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2001.

SARKAR, D., FERGUSON, M., DATTA, R., BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, 136, 187-195, 2005.

SARUBBO, L.A., LUNA, J.M., TAKAKI, G.M.C. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, 9, 4, 2006.

SCHMIDT, C.A.B. Aplicação de técnica eletrocinética em laboratório a dois tipos de solos argilosos. **Tese de doutorado em Ciências em Engenharia Civil**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SILVA, M.A., SANCHES, C., AMARANTE, E.R. Farelo de arroz: composição e propriedades. **Revista Óleos e Grãos**, 2001.

SILVA, W.O.B., MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, 40, 321-326, 2005.

SPOECKNER, S., WRAY, V., NIMTZ, M., LANG, S. Glicolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. **Applied Microbiology Biotechnology**, 51, 33-39, 1999.

SUGUIO, K. **Introdução à Sedimentologia**. Ed. Edgard Blücher; 1973.

THOMASSIN-LACROIX, E.J.M., ERIKSSON, M., REIMER, K.J., MOHN, W.W. Biostimulation and bioaugmentation for on site treatment of weathered diesel fuel in Artic soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 551-556, 2002.

TREICHEL, H., WENDT, R., SARAIVA, C., OGRODOWSKI, R. Estudo de um biorreator tipo tambor rotativo para o enriquecimento protéico do farelo de arroz. **Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos**. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 1998.

VAN DYKE, M., LEE, H., TREVORS, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, 9, 241-252, 1991.

VARGAS, G.D.L.P. Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos**. Universidade Regional do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim, 2004.

VASUDEVAN, N., RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. **Environment International**, 26, 409-411, 2001.

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

VOLKERING, F., BREURE, A.M., RULKENS, W.H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, 8, 401-417, 1998.

VOLLBRECHT, E., RAU, U., LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. **Lipid Fett**, 101, 10, 389-394, 1999.

ANEXOS

ANEXO A1: Acompanhamento do teor de umidade do meio fermentado ao longo do tempo para os diferentes experimentos correspondentes aos artigos 1 e 2

Tabela A1.1: Teor de umidade ao longo do tempo de fermentação para os experimentos 1 a 4.

Tempo (h)	Umidade (%)			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
0	49,08	48,66	50,52	49,61
24	48,45	50,68	51,61	51,23
48	52,87	55,60	56,54	56,33
72	53,98	56,36	59,33	60,62
96	58,91	58,58	64,03	62,14
120	57,95	58,29	62,77	62,49
144	55,40	56,07	64,15	59,99

Tabela A1.2: Teor de umidade ao longo do tempo de fermentação para os experimentos 5 a 8.

Tempo (h)	Umidade (%)			
	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
0	48,27	48,33	49,08	49,36
24	48,47	49,43	48,83	50,15
48	52,09	53,79	54,86	56,88
72	54,03	56,90	58,95	61,28
96	58,28	57,93	60,10	63,39
120	58,03	56,71	64,06	62,02
144	56,09	54,83	58,30	56,81

Tabela A1.3: Teor de umidade ao longo do tempo de fermentação para os experimentos 9 a 12.

Tempo (h)	Umidade (%)			
	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12
0	49,52	49,50	50,41	50,24
24	48,92	49,14	50,14	49,20
48	51,44	52,93	54,78	55,04
72	53,81	54,63	57,82	56,88
96	56,62	55,05	62,03	60,96
120	57,47	59,36	63,83	62,61
144	56,93	56,13	61,06	62,44

ANEXO A2: Escala de Wentworth usada para a classificação do solo

Tabela A2.1: Escala de Wentworth

Peneira (mm)	Escala (diâmetro)	Classificação
4,00	-2,00	Grão
3,36	-1,75	
2,83	-1,50	
2,38	-1,25	
2,00	-1,00	
1,68	-0,75	Areia muito grossa
1,41	-0,50	
1,19	-0,25	
1,00	0,00	
0,84	0,25	Areia grossa
0,71	0,50	
0,59	0,75	
0,50	1,00	
0,42	1,25	Areia média
0,35	1,50	
0,30	1,75	
0,250	2,00	
0,210	2,25	Areia fina
0,177	2,50	
0,149	2,75	
0,125	3,00	
0,105	3,25	Areia muito fina
0,088	3,50	
0,074	3,75	
0,062	4,00	

Fonte: SUGUIO, 1973.

ANEXO A3: Meios para contagem de microrganismos nos ensaios de biorremediação

Tabela A3.1: Composição do meio Bushnell-Hass

Reagente	Quantidade (g.L⁻¹)
MgSO₄.7H₂O	0,2
CaCl₂	0,02
KH₂PO₄	1,0
K₂HPO₄	1,0
NH₄NO₃	1,0
FeCl₃	0,05

Fonte: ATLAS, 1993.

Cloreto de tetrazólio (TTC) = 0,025% (m/v)

Tabela A3.2: Composição do meio R2A

Reagente	Quantidade (g.L⁻¹)
Extrato de levedura	0,5
Peptona proteose	0,5
Casaminoácidos	0,5
Glicose	0,5
Amido solúvel	0,5
Piruvato de sódio	0,3
K₂HPO₄	0,3
MgSO₄.7H₂O	0,05

Fonte: ATLAS, 1993

Tabela A3.3: Composição do meio Czapek's

Reagente	Quantidade
NaNO₃	3,0 g/L
K₂HPO₄	1,0 g/L
MgSO₄.7H₂O	0,5 g/L
KCl	0,5 g/L
FeSO₄.7H₂O	1,0 mL/L
Sacarose	30,0 g/L

Fonte: ATLAS, 1993

ANEXO A4: Monitoramento da temperatura ao longo dos ensaios de biorremediação

Tabela A4.1: Monitoramento da temperatura mínima e máxima ao longo do tempo dos ensaios de biorremediação

Tempo (dias)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)
0	14	21
7	15	20
14	16	22
21	15	21
30	19	22
60	17	22
90	24	28

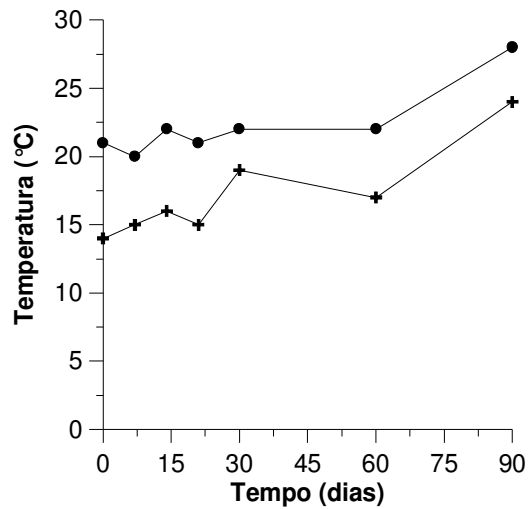


Figura A4.1: Monitoramento da temperatura ao longo do tempo. + temperatura mínima; ● temperatura máxima.

ANEXO A5: Fotos dos experimentos de produção de biossurfactante e lipase, e de biorremediação de solos

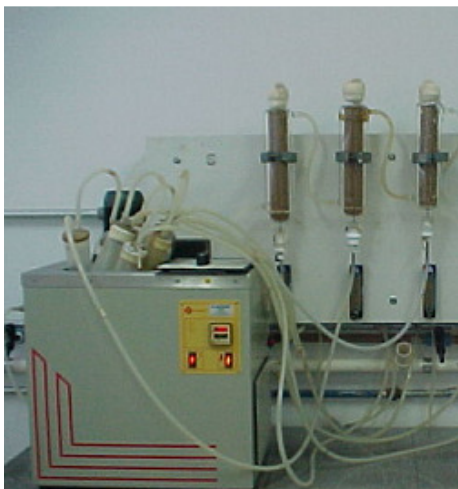


Figura A5.1: Aparato experimental utilizado para a produção de biossurfactante e lipase



Figura A5.2: Aparato experimental utilizado no estudo de biorremediação de solos