



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

EUDOCIA CARLA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus* UTILIZANDO O
SISAL COMO SUBSTRATO**

SUMÉ-PB

2016

EUDOCIA CARLA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus* UTILIZANDO O
SISAL COMO SUBSTRATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Prof. Dr^a. Glauciane Danusa Coelho

SUMÉ-PB

2016

A659p

Araújo, Eudocia Carla Oliveira de.

Produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigantus* utilizando o sisal como substrato. / Eudocia Carla Oliveira de Araújo. - Sumé - PB: [s.n], 2016.

56 f.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Glauciane Danusa Coelho.

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

1. Biotecnologia. 2. Produção de Biossurfactente. 3. Sisal – *Agave sisalana*. I. Título.

CDU: 60 (043.3)

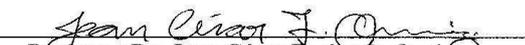
EUDOCIA CARLA OLIVEIRA DE ARAÚJO

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Aspergillus fumigatus* UTILIZANDO O
SISAL COMO SUBSTRATO

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

BANCA EXAMINADORA:


Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG


Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz
Examinador I – UAEB/CDSA/UFCG


Professor Dr. Aldre Jorge Morais Barros.
Examinador II – UAEB/CDSA/UFCG

Trabalho aprovado em: 02 de junho de 2016.

SUMÉ - PB

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha amada mãe Socorro, aos meus irmãos, minhas queridas tias, Cida e Branca e ao meu esposo Fábio por todo apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado durante esta caminhada. Sei que eles não mediram esforços pra que este sonho se realizasse, e que sem a compreensão, ajuda e confiança deles nada disso seria possível.

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me iluminou e abriu os caminhos para novas conquistas, que me deu sabedoria, paciência, saúde e força nessa jornada.

A minha querida mãe Socorro, por todo amor, carinho, dedicação e por todos os sacrifícios para atender e incentivar meus estudos, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos. Obrigada por tudo!

Ao meu esposo Fábio por todo amor, carinho, companheirismo e muita paciência ao longo desses cinco anos. Obrigada por sempre me apoiar e cuidar tão bem de mim.

As minhas tias Branca e Cida, e meu tio Paulo, que sempre me incentivaram e me apoiaram.

Aos meus queridos irmãos (Léa, Francinaldo, Zido e Sebastião) por todo apoio e confiança. Obrigada por compreender minhas ausências.

Ao meu querido cunhado Arthur Nunes por todo apoio, consideração, carinho e por estar sempre presente em todos os momentos.

A minha orientadora Glauciane Danusa Coelho que me acolheu de braços abertos e por toda ajuda na realização desse trabalho. Agradeço pelas palavras de incentivo, pelos conhecimentos adquiridos e amizade durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Jean Queiroz por toda ajuda, consideração e amizade.

Ao meu amigo Renato Guimarães toda a minha gratidão, consideração e minha amizade! Obrigada por sempre me acompanhar, me incentivar e me ajudar na realização desse trabalho.

As minhas amigas Isabella Rocha, Lúcia Cordeiro, Tamara Ramos, Arlene Silva e Laisa Rodrigues, obrigada por toda força, ajuda e pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

As minhas catilangas Analu Freitas, Tâmilis Silva, Jully Carvalho e Janúbia Ferreira por toda amizade, alegrias e momentos únicos compartilhados que jamais esquecerei.

Aos meus colegas de curso, Célia Gonçalves, Caroline Desireé, Alan Roger, Rafael Lima, Ozires, Fernanda, Denis e tantos outros especiais em minha vida.

A querida professora Fabiana Pimentel por todo apoio, consideração e amizade.

A professora Líbia Conrado pela oportunidade de trabalhar no LEB e por todas as contribuições.

Ao meu cunhado Ivandro Oliveira por toda ajuda em todos os momentos.

Ao pessoal do laboratório Adriano, Francisco, Cristiano, Mel, Izabel e Andreia.

Ao Professor Ranoel Gonçalves e a professora Zilderlânia pela oportunidade de trabalhar no LAFISA e por todo apoio e carinho de sempre.

A Geórgia pela ajuda na realização desse trabalho.

A João Farias, Maria Lucimar e Osvaldo pela amizade e por sempre me ajudar quando precisei.

Enfim, obrigada a todos que contribuíram nessa etapa tão importante da minha vida!

“Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em
seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos de superfície ativa, sintetizada 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 de baixo custo e resíduos industriais. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* a partir do caldo do sisal (*Agave sisalana*) o qual foi utilizado como fonte de carbono. Foi empregada fermentação submersa por período de 192 horas utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus*. Amostras foram coletadas a cada 24 horas após o inóculo. Analisamos a produção por meio do consumo do substrato, biomassa, Índice de Emulsificação (IE), Estabilidade após 24 horas e Atividade de Emulsificação. Obtivemos os melhores resultados no tempo de 144 horas de fermentação, mantendo uma estabilidade acima de 90% com valor de pH ácido em torno de 4,74, 17,65g.L⁻¹ de biomassa e Unidades Atividade de Emulsificação de 1,70. No planejamento fatorial 2², com triplicata no ponto central, foram analisadas as variáveis temperatura (4°C, 30°C, 45°C) e salinidade (0%, 5%, 10%) em presença de óleo diesel e querosene ao longo de 60 minutos sobre o comportamento do IE. Os resultados mostraram que em presença do óleo diesel nenhum dos parâmetros avaliados tiveram influência no comportamento do IE, e os Ensaios 2 e 4 obtiveram os melhores resultados em presença de querosene, sendo constatado que nos ensaios com o querosene a temperatura foi o fator que mais influenciou no comportamento do IE. Portanto, os resultados indicam que o caldo do sisal é um substrato adequado para a produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* apresentando potencial de aplicação em processos industriais e ambientais.

Palavras-chave: Surfactante. Biotecnologia. Índice de Emulsificação. *Aspergillus*.

ABSTRACT

The biosurfactants are surface active compounds, synthesized by various microorganisms and are receiving growing attention about advantages that have over chemical surfactants, such as biodegradability, low toxicity and low cost production from industrial waste sources. This study targeted to evaluate the production of biosurfactants by *Aspergillus fumigatus* from sisal broth (*Agave sisalana*) which was used as a carbon source. It was employed submerged fermentation for 192 hours period using the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Samples were collected every 24 hours after inoculation. We analyzed production through substrate consumption, biomass, Emulsification Index (EI), Stability after 24 hours and Emulsification Activity. We have obtained the best results at time of 144 hours fermentation, maintaining stability over 90% on acid pH value around 4.74, 17,65g.L⁻¹ biomass and 1.70 Emulsification Activity Units. In the factorial design 2², with triplicate at the midpoint, were analyzed the variables temperature (4°C, 30°C, 45°C) and salinity (0%, 5%, 10%) in the presence of diesel and kerosene after 60 minutes on the EI behavior. The results showed that in the presence of diesel none of the evaluated parameters influenced the IE behavior, and Experimental 2 and 4 obtained the best results in the presence of kerosene, and found that in tests with kerosene temperature was the factor that influenced in EI behavior. Consequently, the results indicate that sisal broth is a suitable substrate for biosurfactant production from *Aspergillus fumigatus* displaying potential to application on industrial and environmental processes.

Keywords: Surfactant. Biotechnology. Emulsification Index. *Aspergillus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bioma Caatinga.....	21
Figura 2 - Sisal (<i>Agave sisalana</i>).....	23
Figura 3 - Fluxograma de blocos para metodologia experimental.....	30
Figura 4 - Cultivo do fungo CDSA 71 em meio Ágar Sabouraud.....	31
Figura 5 - Cultivo do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> em meio contendo o caldo do sisal sob agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 37°C durante 192 horas.....	33
Figura 6 - Determinação dos Sólidos solúveis obtidos durante o processo fermentativo submerso em meio à base de caldo de sisal à 37°C, 150 rpm durante 192 h.....	37
Figura 7 - Curva de crescimento celular (g.L^{-1}) em função do tempo de fermentação utilizando o caldo do sisal em fermentação submersa durante 192 h.....	40
Figura 8 - Resultado do processo fermentativo determinado pelo Índice de Emulsificação produzido pelo fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> após cultivo submerso em meio a base de caldo de sisal por 192 horas à 37°C e 150 rpm.....	41
Figura 9 - Teste de emulsificação do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i>	42
Figura 10 - Índices de Emulsificação do isolado <i>Aspergillus fumigatus</i> obtidos com o óleo diesel ao longo de 60 minutos. Ensaio 1 (4°C, 0% de salinidade), Ensaio 2 (45°C e 0% de salinidade), Ensaio 3 (4°C e 10% de salinidade), Ensaio 4 (45°C e 10% de salinidade) e o Ponto Central (30°C e 5% de salinidade).....	43
Figura 11 - Índices de Emulsificação do isolado <i>Aspergillus fumigatus</i> obtidos com o querosene ao longo de 60 minutos. Ensaio 1 (4°C, 0% de salinidade), Ensaio 2 (45°C e 0% de salinidade), Ensaio 3 (4°C e 10% de salinidade), Ensaio 4 (45°C e 10% de salinidade) e o	

Ponto Central (30°C e 5% de salinidade)..... 44

Figura 12 - Diagrama de Pareto para planejamento fatorial 2^2 tendo como variáveis independentes a temperatura e salinidade e como variável resposta o comportamento do IE frente ao querosene (a) e ao diesel (b)..... 46

Figura 13 - Superfície de Resposta em função da salinidade e da temperatura no comportamento do IE frente ao querosene..... 47

Figura 14 - Curva de contorno em função da salinidade e da temperatura no comportamento do IE frente ao querosene..... 48

Figura 15 - Teste de emulsificação obtido do óleo diesel (A) e do querosene (B) ao longo de 60 minutos..... 49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Funções e aplicações industriais de surfactantes e biosurfactantes.....	28
Tabela 2 - Composição do meio de cultura BDA adaptado para ativação do fungo filamentososo da Caatinga.....	32
Tabela 3 - Fatores e níveis analisados no planejamento experimental 2 ²	35
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2 ² com triplicata no ponto central para otimização da produção de Biosurfactante.....	35
Tabela 5 - Caracterização do caldo do sisal quanto ao teor de SST e pH iniciais.....	37
Tabela 6 - Resultados dos testes quantitativos (IE) e qualitativos (AE), pH e crescimento celular durante o processo fermentativo pelo isolado <i>Aspergillus fumigatus</i> em cultivo submerso utilizando o caldo do sisal durante 192 h.....	39
Tabela 7: Análise de variância (Anova) para um planejamento 2 ² em um intervalo de 95% de confiança.....	45

ABREVIATURAS E SIGLAS

FSm	Fermentação Submersa
CDSA	Centro Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
pH	Potencial hidrogeniônico
TS	Tensão Superficial
IE	Índice de Emulsificação
AE	Atividade de Emulsificação
UAE	Unidade de Atividade de Emulsificação
SST	Sólidos solúveis totais
BDA	Batata Dextrose Ágar
rpm	Rotação por minuto
CMC	Concentração Micelar Crítica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 BIOMA CAATINGA	20
3.2 SISAL (<i>Agave sisalana</i>)	22
3.3 SURFACTANTES BIOLÓGICOS - BIOSSURFACTANTES	24
3.3.1 Produção de biossurfactantes	26
3.3.2 Aplicações	27
3.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS	28
3.4.1 Fermentação Submersa (FSm)	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Metodologia Experimental	30
4.2 MICRORGANISMO	30
4.3 MEIO DE CULTURA	31
4.3.1 Meio para ativação e manutenção do fungo filamentoso	31
4.4 MATÉRIA-PRIMA	32
4.4.1 Caracterização do Substrato	32
4.5 FERMENTAÇÃO	32
4.5.1 Caldo do sisal como substrato	32
4.6 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOSSURFACTANTES	33

4.6.1 Índice de Emulsificação (IE)	33
4.6.2 Estabilidade da emulsão	34
4.6.3 Atividade de emulsificação	34
4.6.4 Determinação da Biomassa	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	37
5.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES PELO ISOLADO <i>Aspergillus fumigatus</i>	38
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5.3.1 Índice de Emulsificação em relação à salinidade e à temperatura ao longo de 60 minutos	43
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A Biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos e fornece possibilidades para a formação de substâncias e melhorias de processos, apresentando soluções para atender a humanidade em seus inúmeros setores. Entre as substâncias produzidas uma se destaca por reduzir os custos dos processos industriais, os biossurfactantes. A necessidade de sustentabilidade ambiental e a busca crescente pela qualidade dos tensoativos que possam substituir os sintéticos derivados do petróleo motivam pesquisadores a desenvolverem estratégias rentáveis para a produção desta biomolécula (OLIVEIRA, 2014).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas produzidas a partir de organismos vivos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos que degradam substratos insolúveis em água (hidrocarbonetos sólidos e líquidos) por meio da produção de agentes surfactantes que auxiliam a disponibilizar esses compostos à célula microbiana, reduzindo a tensão interfacial e superficial dos líquidos (SINGH et al., 2007; LUNA, et al., 2009).

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais em relação aos surfactantes químicos, como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água, capacidade de atuação em condições drásticas de pH, temperatura ou salinidade e poder de produção a partir de substratos renováveis (ACCORSINI, 2010).

A possibilidade de produção de surfactante a partir de substratos renováveis é uma alternativa viável para aumentar a produção de biossurfactantes, permitindo a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades distintas, tornando-os comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência e reduzindo os custos da produção. Uma variedade de subprodutos ou resíduos, que incluem derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas podem ser utilizados na produção de muitos metabólitos microbianos (MAKKAR et al., 2011; OLIVEIRA, 2014).

Nesse sentido, processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para utilizar o caldo resultante do caule do sisal na produção de biossurfactantes, gerando produtos de alto valor econômico, agregando valor a esses produtos, bem como a geração de fonte de renda alternativa. Pela disponibilidade e baixo custo, o caldo do sisal pode ser utilizado como

substrato para microrganismos no processo de produção de biossurfactantes (ROSSMANN, 2008).

Considerando a possível redução no custo da matéria-prima utilizada no processo biotecnológico de produção de biossurfactantes, representada pelo aproveitamento do caldo resultante do caule do sisal, um isolado filamentosos pertencente à Coleção de Fungos do CDSA (Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido) do Laboratório de Microbiologia do CDSA da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) foi utilizado para avaliação da capacidade de produção de biossurfactante a partir da utilização do caldo do sisal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do fungo *Aspergillus fumigatus* em produzir biossurfactante utilizando o caldo do sisal como substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de biossurfactantes em caldo do sisal;
- Determinar o efeito da temperatura e da concentração salina, bem como a interação destes fatores no comportamento do Índice de Emulsificação produzido;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 BIOMA CAATINGA

A Caatinga é um bioma que compreende um tipo de vegetação que cobre a maior parte da região semiárida do Nordeste, ocupando uma área de aproximadamente 800.000 km², correspondendo a 10% do território brasileiro e se estendendo por grande parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte norte de Minas Gerais (SAMPAIO et al., 2002; CARDOSO; QUEIROZ, 2007).

De acordo com Alves e colaboradores (2007) o termo Caatinga tem origem que vem do tupi-guarani, CAA= mata e TINGA= branca, mata branca, o que caracteriza a paisagem no período de estiagem quando a vegetação perde as folhas e fica com um aspecto seco e sem vida.

A Caatinga é considerada o principal ecossistema existente na Região Nordeste. O clima na região semiárida apresenta como característica marcante a irregularidade do regime pluviométrico, com duas estações bem definidas: a estação chuvosa que dura de três a cinco meses e a estação seca que dura de sete a nove meses. As chuvas são intensas e irregulares no tempo e no espaço, provocando periodicamente a ocorrência de secas prolongadas (ANDRADE, 2008). A vegetação típica do semiárido é caracterizada pela formação de floresta seca composta de vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo com ampla variação de fisionomia e flora, resultando em uma grande diversidade de espécies (DRUMOND et al., 2000).

Antes se acreditava que a Caatinga seria o resultado da degradação de formações vegetais mais exuberantes, como a Mata Atlântica ou a Floresta Amazônica. Esse pensamento produziu à falsa ideia de que o bioma seria pobre em espécies e em endemismos. Entretanto, estudos apontam que a Caatinga é considerada rica em endemismos, diversidade de tipos vegetacionais, variação na composição florística, heterogeneidade e variação nos tipos de solo, conforme demonstrado na Figura 1 (TABARELLI e VICENTE, 2002; ALVES, 2007). Ambientes como a Caatinga representam núcleos de relevante importância para que seja preservada a biodiversidade, seja por apresentar uma imensa variedade de vida e um acentuado grau de endemismo, ou por sua singularidade e raridade, mas, ainda precisa ser

estudada mais detalhadamente para suprir a carência de informações atualizadas sobre esse bioma (ALVES e ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009).

Figura 1: Bioma da Caatinga



Fonte: Ministério do Meio Ambiente.

A Caatinga reúne características específicas e, às vezes, com poucas qualidades de sobrevivência para determinados seres, como por exemplo, clima seco, temperaturas elevadas e vegetação seca. Os fungos que fazem parte de um grupo de microrganismos heterótrofos são seres vivos que são encontrados na caatinga realizando a decomposição e reciclagem da matéria, principalmente, na decomposição de folhas e vegetais (CRUZ, 2008).

A necessidade de definir técnicas de conservação, bem como o conhecimento sobre a diversidade da microbiota do solo em diferentes regiões tem gerado diversos estudos em biomas brasileiros, e entre estes estudos está o bioma Caatinga (CAVALCANTI et al., 2006; SIMÕES; TAU-K-TORNISIELO, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que a região semiárida é propícia aos fungos filamentosos, tornando interessante o estudo em busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e/ou ambiental (MAIA e GIBERTONI, 2002; NASCIMENTO, 2013). Segundo Matsuzawa e colaboradores (2012), existem duas espécies de fungos recentemente descobertos que foram catalogadas da Caatinga. Entre estes estão os fungos filamentosos *Aspergillus caatingaensis* e *Aspergillus pernambucoensis*.

Dentre os estudos sobre a potencialidade dos microrganismos do bioma Caatinga destaca-se o trabalho de Cavalcanti (2014), que trabalhou com Bioprospecção de fungos produtores de biossurfactantes da Caatinga. Neste estudo foram utilizados 11 fungos filamentosos os quais foram avaliados em relação ao poder de ação emulsificante, condições extremas de temperatura, pH e salinidade tendo sido observado que os biossurfactantes produzidos pelos espécimes são estáveis em temperaturas de 3 e 60°C, em pH 5,0 e 7,0 e concentração salina de 10%, podendo ser aplicado em condições extremas.

3.2 SISAL (*Agave sisalana*)

O Sisal (*Agave sisalana*) é uma monocotiledônea, da Série Liliflorea, família *agavaceae*, gênero *Agave*. Planta originária da península de Yucatan no México, a *Agave* foi introduzida no Brasil por volta de 1903, pelo Comendador Horácio Urpia Júnior, difundindo-se inicialmente no estado da Paraíba e somente no final da década de 30 no estado da Bahia (SUINAGA e SILVA; COUTINHO, 2008).

A planta do sisal (Figura 2) é a principal fonte de extração de fibras duras vegetais do mundo. No Brasil, o cultivo ocupa extensa área na região semiárida dos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte (SILVA e COUTINHO, 2006). O sisal apresenta boa adaptação à região do semiárido nordestino. Esta facilidade de adaptação é pelo fato de ser caracterizada como uma planta semi-xerófila, que possui grande resistência a secas prolongadas, temperaturas elevadas e poucas chuvas (SANTOS, 2014).

O sistema radicular do sisal é do tipo fibroso, fasciculado, oriundo da base do pseudocaule (roseta) e possuem dois tipos de raízes, uma para fixação da planta ao substrato e outra para absorção de nutrientes. Esta planta não possui caule, sendo, então, acaulescente e, em seu lugar há um pseudocaule suculento e com uma espessa camada de lignina em que estão inseridas as folhas e o broto terminal. O pseudocaule pode atingir 1,20 m e 20 cm de diâmetro (SILVA et al., 2008).

A importância da cultura do sisal é atribuída à versatilidade da utilização da fibra presente nas folhas, que possui forma dura e grossa, conferindo maior resistência em relação às fibras de origem sintética, baixo custo e densidade, boas propriedades mecânicas e não toxicidade, podendo ser amplamente utilizada na produção de barbantes, cordas, cordões, cabos marítimos e de elevadores, nas indústrias alimentícias, automotivas e farmacêuticas,

para fins têxteis, forragem animal e fios agrícolas, utilizados pra amarrar feno e cereais para consumo animal, em países de inverno rigoroso (SILVA, 2010; ANDRADE et al., 2012).

O Brasil é o maior exportador e o maior produtor de sisal do mundo, com produção representando 56% da safra mundial, dos quais 53% correspondem ao estado da Bahia. A produção brasileira de sisal em 2014 foi estimada em 95,4 mil toneladas, sendo tal volume de 27,9% superior à produção de 2013 de 74,6 mil toneladas (CONAB, 2014). Esta surpreendente safra de 95,4 mil toneladas em 2014 confirma a assertiva de que a cultura do sisal é uma das únicas que resistem às adversidades do semiárido brasileiro, contribuindo significativamente para o desenvolvimento econômico da região e tem como efeito benéfico a fixação do homem à zona rural, empregando milhares de trabalhadores (SUINAGA; SILVA e COUTINHO, 2006).

Figura 2: Cultivo do Sisal (*Agave sisalana*)



Fonte: www.odiariodaregiao.com

O beneficiamento para a produção do sisal produz resíduos como pedaços de folhas e fibras de diferentes tamanhos. Além disso, no processo de beneficiamento da fibra é gerado um líquido que corresponde por mais de 90% da planta, usualmente conhecido como suco de sisal (ANDRADE, 2010). Esse resíduo líquido, resultante da extração da fibra do sisal é totalmente descartado no campo apresentando algumas restrições, ou seja, é formado por uma grande quantidade de fibra (bucha) e suco (seiva), que pode causar problemas em animais como fitocongressões, nefropatias e distúrbios nervosos.

A fração líquida é composta por água (em média 85%), tecido parenquimal, fibras curtas, metabólitos primários e secundários, compostos inorgânicos, proteínas e carboidratos fermentescíveis (BRANCO et al., 2010; SANTOS et al., 2013). A presença de alto teor de carboidratos no resíduo torna viável seu emprego em processos que envolvam modificações fermentativas, indicando seu potencial para ser transformado em produtos de alto valor agregado (NOGUEIRA; PIRAS, 2011).

O grande interesse por produtos naturais, principalmente, em substituição aos derivados fósseis, que apresentem vantagens ecológicas (o sisal é reciclável e renovável), sociais (o sisal é altamente dependente de mão de obra local da agricultura familiar) e econômicas (fibras naturais leves, resistentes e baratas) faz do sisal uma cultura estratégica e prioritária (RODRIGUES, 2009).

3.3 SURFACTANTES BIOLÓGICOS - BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactante e, consistem em subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras. Devido às suas propriedades de diminuir a tensão interfacial e formar micelas, os biossurfactantes podem alterar o comportamento interfacial, e também à relação de outras moléculas na interface e em solução (VAN HAMME et al., 2006).

Os microrganismos produzem biossurfactantes com finalidades fisiológicas, permitindo que cresçam em substratos hidrofóbicos, pela diminuição da tensão superficial, disponibilizando-os para o metabolismo (BARBOSA, 2011). A efetividade de um surfactante é determinada pela habilidade em baixar a tensão superficial, que é definida como a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. Quando a tensão superficial diminui, a concentração de biossurfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo à formação de micelas, moléculas anfipáticas que permitem que os hidrocarbonetos se solubilizem em água (SILVA, 2014).

A concentração de micelas é conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC), ou seja, é definida como a mínima concentração necessária para que as tensões sejam reduzidas ao máximo. Quanto menor o valor da CMC mais eficiente é considerado o biossurfactante, especialmente, do ponto de vista econômico (PIRÔLLO, 2006; SOBRINHO, 2007).

Diferentemente dos surfactantes que se classificam baseado no grupo polar, os biossurfactantes são classificados estruturalmente de acordo com a natureza bioquímica ou

com a espécie microbiana produtora, sendo influenciados pelas condições ambientais e pela natureza do substrato (MORAIS, 2012).

Os biossurfactantes podem ser classificados em glicolipídios, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, polímeros e biossurfactantes particulados. Os biossurfactantes de baixa massa molecular são, geralmente, glicolipídeos ou lipopeptídeos que são mais eficazes em reduzir a tensão interfacial e superficial. Os de alta massa molecular, que são polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteína anfipáticas, são estabilizadores eficazes de emulsões óleo/água (VAN HAMME et al., 2006).

Os biossurfactantes apresentam muitas vantagens quando comparados aos surfactantes de origem sintética, como: alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodigestibilidade, possibilidade de produção a partir de fontes de baixo custo e resíduos industriais, utilização em biorremediação de locais impactados por óleo, biodegradação e detoxicação de efluentes industriais, além de eficiência em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (PIRÔLLO, 2006). Como desvantagem os biossurfactantes apresentam baixos rendimentos devido à dificuldade na seleção de um resíduo com composição adequada de nutrientes que permita o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse, necessidade de grande investimento de capital, necessidade de um sistema esterilizado e alguns problemas no controle do processo, sendo necessária a padronização do processo biotecnológico (CALVO et al., 2009).

A acidez do meio pode ser considerada um parâmetro que se correlaciona com a eficiência na síntese de biossurfactantes. Sobrinho (2007) estudou a produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica* utilizando resíduos industriais (óleo de soja e milhocina) como substrato e em diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12). O autor constatou que a maior atividade emulsificante foi observada em pH 2,0, com índice de emulsificação de 60%.

Santana (2012) estudou o efeito do óleo de pequi (amêndoa e endocarpo) com presença e ausência de glicose na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*. O autor observou que os valores de pH mais ácidos (3,0 e 3,6) foram os que expressaram os melhores valores de tensão superficial para os dois óleos.

Resultados encontrados por Cavalcanti (2014) indicaram que a emulsão do produzida pelo líquido metabólico do CDSA71, em meio YEPD, manteve-se estável em todas as faixas de pH, e que em valores de pH básico, os IE tenderam a diminuir. Os resultados obtidos

sugerem que cada microrganismo apresenta um pH específico para o tipo de biossurfactante produzido (LUNA, 2010).

Como mostra a literatura, o pH é um importante parâmetro a ser estudado, pois afeta a produção e a qualidade dos biossurfactantes produzidos por microrganismos. De acordo com Fontes (2008) o pH é um fator de grande importância na síntese de biossurfactantes, podendo este variar grandemente devido às necessidades de cada microrganismo.

3.3.1 Produção de biossurfactantes

O sucesso da produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos fermentativos mais baratos e do uso de matérias-primas de baixo custo (BUENO e SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; EHRHARDT, 2015), podendo ser utilizados rejeitos industriais (RODRIGUES et al., 2006). Resíduos ricos em carboidratos ou lipídeos, com adequada relação carbono/nitrogênio e que apresentem altas concentrações de micronutrientes importantes para o metabolismo microbiano se caracterizam como os melhores substratos para o crescimento microbiano, como também para a produção de biossurfactantes (VANCE - HARROP et al., 1999; BARROS et al., 2008).

Uma possibilidade é a utilização de matérias-primas ou resíduos orgânicos provenientes das agroindústrias. Milhões de toneladas de resíduos são gerados a cada ano em todo o mundo, e no Brasil esse amplo setor agroindustrial garante uma enorme quantidade e variedade de rejeitos, o que resulta em problemas ambientais devido ao descarte e ao custo no tratamento (FARIA, 2010; EHRHARDT, 2015). Também é possível citar os derivados de óleos vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas que tem sido utilizados na produção de uma grande quantidade de metabólitos microbianos (BARROS et al., 2008; VAZ, 2013).

O desenvolvimento de bioprocessos eficientes, que incluam à otimização das condições de cultivo e o baixo custo associado ao processo de separação contribui para uma máxima produção e recuperação de biossurfactante (PACHECO, 2008; OLIVEIRA, 2014).

Os biossurfactantes podem ser produzidos extra ou intracelularmente durante o crescimento dos microrganismos em diferentes substratos, podendo estes variar desde carboidratos até hidrocarbonetos (TONINI et al, 2010). Nesse sentido, os biossurfactantes tem despertado grande interesse comercial e biotecnológico devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos, como

também seu papel na recuperação de ecossistemas (MARIANO, 2006; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Sendo que a produção ocorre principalmente durante o crescimento aeróbio ou na fase estacionária do desenvolvimento dos microrganismos (PIRÔLLO, 2006; OLIVEIRA, 2014).

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por microrganismos é influenciada pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, bem como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção, pH do produto, tamanho das partículas do substrato, permeabilidade do composto, composição dos indutores e substratos (FONTES; AMARAL; COELHO, 2008; CZAPLICKA; CHMIELARZ, 2009). Essa característica é extremamente importante porque abre caminhos para futuras descobertas de novos compostos e para potencializar a produção destes. Desta forma, um melhor conhecimento da composição química é necessária para entender plenamente os componentes ativos e ser capaz de modificá-los, a fim de melhorar suas propriedades. (OLIVEIRA, 2014).

3.3.2 Aplicações

O maior mercado para aplicação de biossurfactantes é a indústria petrolífera, tanto para a produção deste como para incorporação nas formulações de óleo, dispersão de derramamento de óleo em solo e no mar, remoção de lodo de óleo de tanques de estocagem, na recuperação melhorada de petróleo e na descontaminação ambiental por meio da biorremediação, tornando os poluentes biodisponíveis à biodegradação (BANAT et al., 2000; MATSUURA, 2004). Os biossurfactantes são eficientes em reduzir a tensão interfacial entre óleo e água nos poços de petróleo, reduzindo a viscosidade, e ainda facilitando a remoção ou recuperação antes do processamento (RUFINO, 2010).

Na indústria de alimentos os biotensoativos são amplamente utilizados como emulsificantes, exercendo um papel fundamental na formação da consistência e texturas exatas, assim como na dispersão de fases creme, manteiga, maionese, molho de saladas, salsichas, sorvetes, os quais são exemplos de emulsões em alimentos processados. A utilização em cosméticos é devido às propriedades umectantes, baixo grau de irritação e compatibilidade com a pele, assim como as propriedades espumantes, e na agricultura é utilizado em formulações de herbicidas e pesticidas, aumentando o efeito de agentes de biocontrole facilitando a penetração do agente de controle ou de seu produto nas células ou tecidos do organismo alvo (BANAT et al., 2000; SINGH et al., 2007). As aplicações têm se distribuído entre os mais diversos setores industriais (Tabela 1).

Tabela 1 – Funções e aplicações industriais de surfactantes e biossurfactantes.

Indústria	Aplicação	Função do surfactante
Petróleo	Limpeza de reservatório de óleo; aumento da recuperação de petróleo	Reduzir a viscosidade e formar emulsões, facilitando a remoção de óleos pesados depositados em fundos de reservatórios
Ambiental	Biorremediação; remediação de águas e solos	Emulsificação e remoção de hidrocarbonetos; metais; agente espumante; detergente;
Alimentícia	Emulsificação; ingrediente funcional	Emulsionar favorecendo a consistência e a textura; interação com lipídios, proteínas e carboidratos;
Agrícola	Biocontrole	Emulsionar pesticidas e herbicidas, facilitando a dispersão do composto ativo
Cosmética	Produtos de higiene e beleza	Emulsificantes, umectantes, espumantes, solubilizantes, mediadores da ação enzimática
Farmacêutica	Produtos terapêuticos	Inibir formação de coágulos; atividade antibacteriana e antifúngica; vacinas

Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2007.

Diversos estudos que comprovam a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes têm aberto novas perspectivas de utilização comercial. Por exemplo, podem ser utilizados na medicina, pois, além de possuírem elevada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, alguns biossurfactantes podem impedir o estabelecimento de agentes patógenos, o que torna a utilização interessante no tratamento de algumas doenças, atuando como agente terapêutico e probiótico (SINGH; CAMEOTRA 2004).

3.4 PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos podem ser classificados quanto à condução do processo (descontínuos, semicontínuos ou contínuos), quanto ao modo de cultivo, (processos em estado sólido ou submerso) e quanto ao suprimento de oxigênio (processos aerados ou não aerados).

3.4.1 Fermentação Submersa (FSm)

O processo fermentativo submerso tem como principal característica a utilização de um meio de cultura líquido, com nutrientes solúveis no qual o microrganismo se desenvolve

sob agitação (ALONSO, 2001). Esse processo fermentativo apresenta relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante o controle de fatores ambientais, tais como pH, temperatura e oxigenação, além de garantir a homogeneização de nutrientes, calor e células microbianas no meio de cultivo (COUTO; SANROMÁN, 2006).

A fermentação submersa quando comparada com o método de fermentação em estado sólido, apresenta as seguintes vantagens (REGULY, 2000; PRIETO, 2007):

- O meio de cultivo pode ser variado mais facilmente;
- A superfície celular do agente fica inteiramente exposta ao meio, facilitando as trocas (absorção e excreção);
- A esterilização de um meio líquido é mais fácil do que a de um meio semi-sólido;
- A aeração esterilizada de meio líquido em fermentador é menos dispendiosa e problemática do que a condução de muito maior volume de ar, também esterilizado, que seria necessário para aerar eficientemente um cultivo em estado sólido em bandejas;
- O cultivo submerso pode ser transformado em cultivo contínuo, quando a cinética o permite.

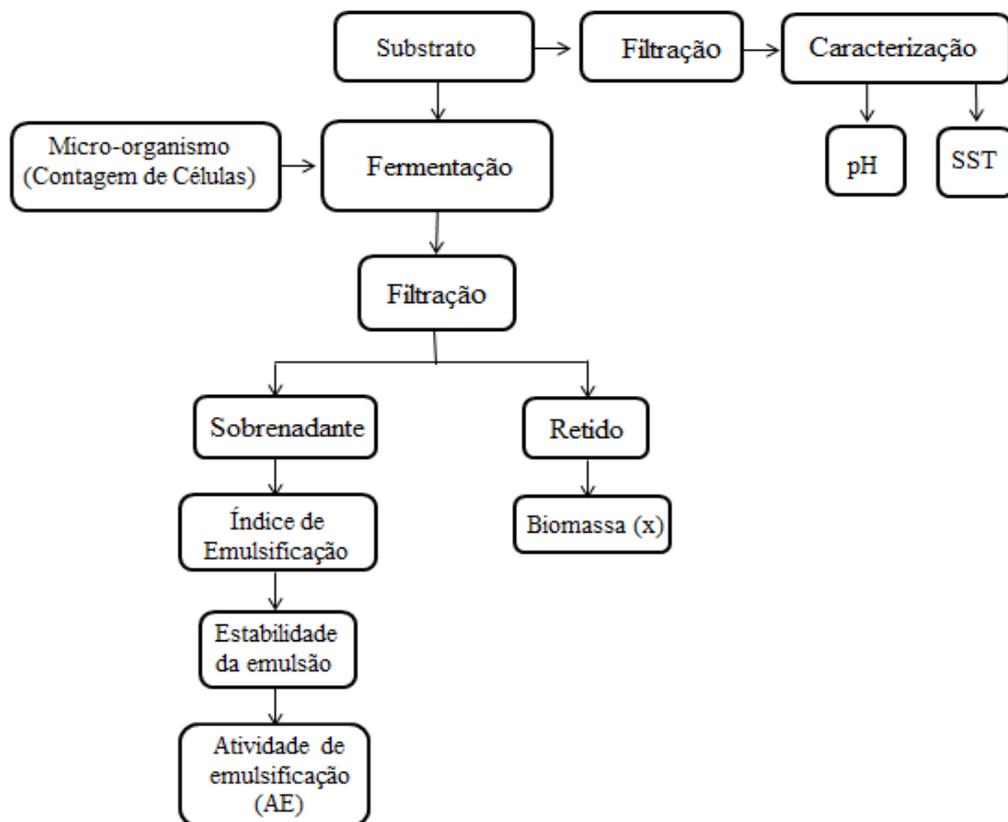
De acordo com Bezerra (2006), o êxito ou fracasso em um processo fermentativo começa com a escolha do microrganismo, ou seja, é necessário observar se o mesmo possui elevada eficiência na conversão do substrato em produto, pois, quanto maior a afinidade do microrganismo com o meio oferecido, maior será a eficiência de conversão, sendo assim, resulta no acúmulo do produto no meio, de forma a obter elevada concentração deste no caldo fermentado. Uma grande variedade de microrganismos tem a capacidade de produzir biossurfactantes, evidenciando que a quantidade e a qualidade são influenciadas pela natureza do substrato e as condições de cultivo (SILVA, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia Experimental

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do CDSA/UFCG. A Figura 3 apresenta um fluxograma com o objetivo de auxiliar na leitura para a metodologia aplicada.

Figura 3: Fluxograma que descreve a metodologia utilizada neste trabalho.



Fonte: Autoria própria

4.2 MICRORGANISMO

O isolado utilizado neste trabalho foi o *Aspergillus fumigatus* (Figura 4) que faz parte da coleção de fungos filamentosos da Caatinga do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido – CDSA da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, desenvolvida pelo Prof. Dr. Jean César F. de Queiroz. A coleção possui atualmente 117 fungos filamentosos, isolados a partir de coletas de fungos do solo e de folhas de plantas do Bioma Caatinga no

município de Sumé-PB. Este isolado fúngico foi selecionado por apresentar potencial para a produção de biossurfactante em meio submerso (CAVALCANTI, 2014).

Figura 4: Cultivo do fungo *Aspergillus fumigatus* em meio Ágar Sabouraud.



Fonte: Autoria própria.

4.3 MEIO DE CULTURA

4.3.1 Meio para ativação e manutenção do fungo filamentoso

A ativação do isolado fúngico *Aspergillus fumigatus* foi realizada em meio BDA adaptado (Tabela 2). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C a 1 atm durante 20 minutos, e, posteriormente foi colocado 0,05 g.L⁻¹ de tetraciclina, a fim de evitar o crescimento de bactérias. A viabilidade do microrganismo foi mantida por meio de repiques periódicos à cada 90 dias em placas de petri contendo meio BDA adaptado. As placas foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura BDA adaptado para ativação do fungo filamentosos da Caatinga.

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Batata Inglesa (<i>Solanum tuberosum</i>)	200
Sacarose	20
Ágar	15

4.4 MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi o caldo do caule do Sisal, adquirido na zona rural do município de Sumé, Paraíba

Para o preparo do caldo de sisal as folhas da planta foram removidas, e em seguida foi retirado o caule, que após esse processo foi submetido a forno industrial de padaria por 30 minutos (300°C) para converter as fibras em açúcares fermentáveis. Após o processo de caramelização, o caule foi triturado e depois liquidificado em proporção de 500 g para cada 600 mL de água destilada. Em seguida, o caldo obtido foi filtrado em papel filtro com porosidade de 25 µm.

4.4.1 Caracterização do Substrato

O filtrado obtido foi caracterizado por meio da análise do pH e Teor de sólidos solúveis (SST) expresso em °Brix, utilizando-se refratômetro de bancada. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.5 FERMENTAÇÃO

4.5.1 Caldo do sisal como substrato

A produção de biossurfactante foi conduzida por meio de fermentação submersa utilizando o caldo do sisal filtrado sob agitação de 150 rpm (*shaker* Lucadema) e temperatura de 37°C durante 192 horas (Figura 5). Um volume de 50 mL de caldo de sisal foi inoculado com uma suspensão de esporos de *Aspergillus fumigatus* na concentração de 10⁷ esporos.mL⁻¹. O processo fermentativo foi interrompido a cada 24 horas. Os filtrados fermentados foram submetidos à análise de Índice de emulsificação (IE), Teor de Sólidos Solúveis (SST) e Atividade de Emulsificação (AE). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Figura 5: Cultivo do fungo *Aspergillus fumigatus* em meio contendo o caldo do sisal sob agitação orbital de 150 rpm e temperatura de 37°C durante 192 horas.



Fonte: Renato Guimarães.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOSURFACTANTES

4.6.1 Índice de Emulsificação (IE)

O índice de emulsificação é uma análise direta da presença de biosurfactante no caldo fermentado livre de células. A presença está relacionada com altos índices de emulsificação e estabilidade do emulsificado. À medida que estes processos estão associados a condições extremas, faz-se necessária uma avaliação da estabilidade desses biosurfactantes.

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

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

Sendo:

He: é a altura da emulsão;

Ht: é a altura total do líquido.

4.6.2 Estabilidade da emulsão

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

4.6.3 Atividade de emulsificação

A atividade de emulsificação (AE) avalia qualitativamente a emulsão produzida pelo biossurfactante presente no líquido metabólico, sendo que quanto maior for a AE, mais estável será a emulsão formada (SALGADO, 2013).

A atividade de emulsificação foi determinada utilizando 2 mL do meio fermentado, 2 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5.0) e 1 mL de querosene Cirigliano e Carman (1984). A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos, seguido de repouso por 10 minutos, logo após, foi realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando água destilada e também querosene, como branco da amostra. O resultado foi expresso em Unidade de Atividade de Emulsificação (UAE), de acordo com a Equação 2, que representa a leitura da absorvância multiplicada pelo fator de diluição (PAZ et al., 2006).

$$UAE = Abs \times 2 \quad \text{Eq (2)}$$

4.6.4 Determinação da Biomassa

A biomassa obtida da filtração foi seca em estufa a 100°C por 30 min. Após esse período, o material foi retirado da estufa e transferido para um dessecador permanecendo em repouso até seu total resfriamento. A biomassa foi determinada calculando a diferença da massa do papel filtro com células (massa 2) e sem células (massa 1), de acordo com a Equação 3. A curva de crescimento foi obtida durante um tempo de fermentação de 192 horas por meio da massa seca das células presentes num determinado volume de cultura.

$$X = Massa_2 - Massa_1 \quad \text{Eq (3)}$$

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um planejamento fatorial 2^k utiliza k fatores em dois níveis distintos. No presente estudo, foi utilizado como ferramenta para determinação da relação temperatura/salinidade, um planejamento fatorial 2^2 , em que se variou a concentração de sal e os níveis de temperatura, acrescido de três réplicas no ponto central, totalizando sete experimentos (Tabela 4). Os testes foram realizados para determinar o efeito das referidas variáveis no comportamento do índice de emulsificação obtido nos cultivos em todos os ensaios (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Fatores e níveis a serem analisados no planejamento experimental 2^2 .

Variáveis	-1	0	1
Temperatura	4	30	45
Salinidade	0	5	10

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central para otimização da produção de biossurfactante.

Experimentos	Temperatura	Salinidade
1	-1(4)	-1(0)
2	+1(45)	-1(0)
3	-1(4)	+1(10)
4	+1(45)	+1(10)
5	30	5
6	30	5
7	30	5

Neste procedimento para determinação do índice de emulsificação, os valores de salinidade do meio fermentado foram ajustados e, posteriormente, os frascos foram incubados

nas temperaturas indicadas na matriz do planejamento fatorial ao longo de 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram estabilizadas até temperatura ambiente para medição do índice de emulsificação. Neste caso, foram utilizados querosene e óleo diesel para determinar o melhor índice de emulsificação frente aos mesmos. A ação sinérgica da temperatura e da salinidade foi verificada a cada 20 minutos por meio do comportamento do Índice de Emulsificação durante um período de 60 minutos.

No diagrama de Pareto com nível de confiança de 95% foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (temperatura e salinidade) e as interações entre elas sobre a variável dependente (Índice de Emulsificação). O efeito dos fatores avaliados será apresentado no diagrama de Pareto, que representa os efeitos estimados das variáveis (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem), sobre a variável resposta em ordem de magnitude (PORTO, 2008).

Na análise do planejamento experimental fatorial foi utilizado um pacote computacional Statistic para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

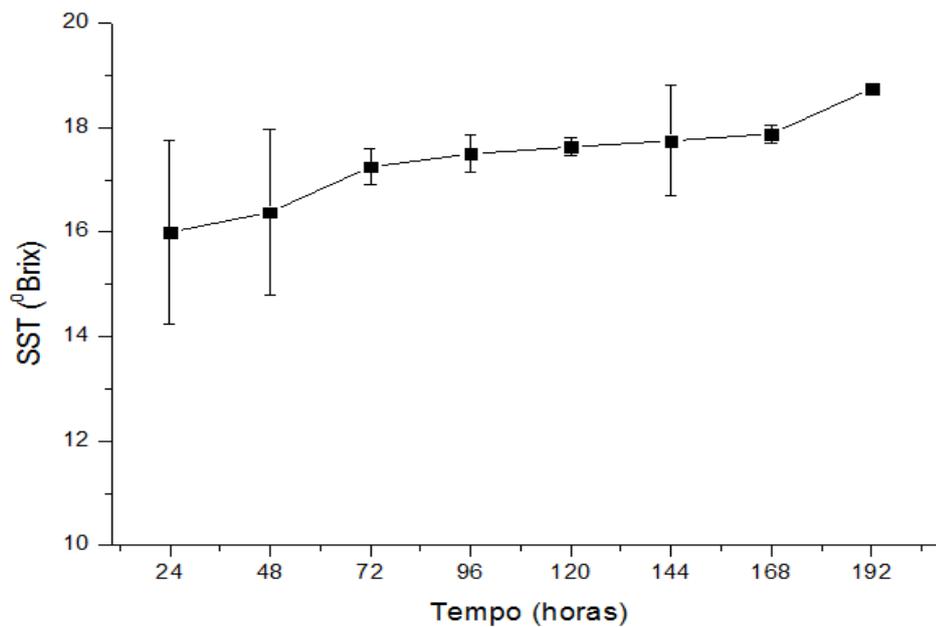
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

No presente trabalho foi utilizado o caldo do Sisal, líquido de baixo custo obtido do pseudocaule do sisal o qual corresponde por mais de 90% da planta. De acordo com Nogueira e Piras (2011), a presença do alto teor de carboidratos presentes no sisal torna viável o emprego em processos fermentativos, indicando o potencial para ser transformado em produtos de alto valor agregado. Os valores de Sólidos Solúveis Totais (SST) e de pH obtidos inicialmente para o caldo do sisal estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Caracterização do caldo do sisal quanto ao teor de SST e pH iniciais.

SST (° Brix)	pH
15,25	5,33

Figura 6: Determinação dos Sólidos solúveis obtidos durante o processo fermentativo submerso em meio à base de caldo de sisal à 37°C, 150 rpm durante 192 h.



Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na Figura 6, o caldo do sisal possui alto teor de sólidos solúveis totais e, que no decorrer do tempo de fermentação foi verificado um ligeiro aumento nesses valores, podendo-se inferir que esse aumento decorre, provavelmente, devido à produção de metabólitos pelo fungo empregado (BEZERRA, 2012). De acordo com esses resultados pode-se afirmar que, o caldo do sisal por ser rico em carboidratos solúveis pode ser capaz de fornecer os nutrientes necessários ao desenvolvimento de um microrganismo e pode, portanto, servir satisfatoriamente como substrato para o processo fermentativo, ocasionando uma expressiva atividade emulsificante. De acordo com Moraes (2011), os sólidos solúveis contidos compreendem o total de sólidos dissolvidos na água, como por exemplo, açúcares, sais, proteínas solúveis e ácidos.

O valor de sólido solúvel obtido nesse trabalho foi superior ao encontrado por (SANTANA; SILVA; ALMEIDA, 2009) em estudos da produção de biossurfactantes por *Candida guilliermondii* onde utilizaram como substrato a polpa do fruto da palma forrageira e obtiveram valores de Sólidos solúveis totais de 12,15 °Brix. De acordo com os autores, a análise dos SST mostrou que houve desenvolvimento do microrganismo, porém de maneira pouco satisfatória, ou seja, ocorreu um decaimento da concentração de substrato ao longo do tempo de fermentação atingindo uma fase na qual não houve aumento significativo do número de células.

5.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES PELO ISOLADO *Aspergillus fumigatus*

Neste item serão discutidos os resultados provenientes do processo de fermentação que foi conduzido de forma submersa. Testes quantitativos e qualitativos em duplicata foram realizados a cada 24 horas de fermentação para indicar a produção de biossurfactantes. Os resultados apresentados na Tabela 6 correspondem às médias obtidas.

A Tabela 6 mostra os resultados das análises dos testes quantitativos (IE) e qualitativos (AE), de sólidos solúveis totais (°Brix), pH do substrato e crescimento celular durante o processo fermentativo.

Tabela 6: Resultados dos testes quantitativos (IE) e qualitativos (AE), pH e crescimento celular durante o processo fermentativo pelo isolado *Aspergillus fumigatus* em cultivo submerso utilizando o caldo do sisal durante 192 h.

Tempo (horas)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)	Índice de Emulsificação - IE (%)	Estabilidade (%)	Atividade de Emulsificação - AE (nm)
24	5,33	10,05	47,61	100,0	1,70
48	4,59	14,29	47,61	95,0	1,19
72	4,72	15,37	47,61	95,0	1,23
96	4,74	16,26	47,61	100,0	1,02
120	4,78	16,52	47,61	100,0	1,34
144	4,74	17,65	52,38	90,9	0,94
168	4,68	17,13	52,38	100,0	1,38
192	4,63	10,75	52,38	100,0	1,20

De acordo com a Tabela 6, a evolução do pH durante a fermentação mostra que houve um ligeiro decréscimo do pH à partir das 48 h de fermentação e após esse período valores que oscilaram entre 4,59 e 4,78. Acredita-se que a diminuição do pH tenha ocorrido devido a diversidade de metabólitos excretados pelo microrganismo durante o processo de fermentação.

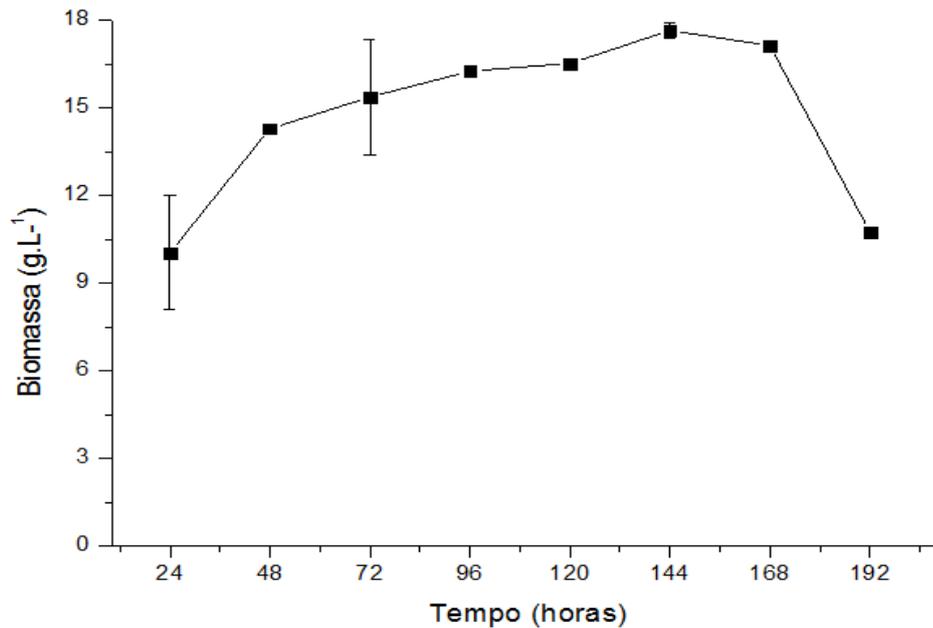
Santana (2012), ao produzir biossurfactante usando *Candida lipolytica* em meio contendo óleo da amêndoa de pequi, observou que os melhores valores de tensão superficial (30,51 mN.m⁻¹) foram obtidos com pH na faixa ácida, em torno de 2,64, com uma produção de biomassa de 0,4396 g.L⁻¹.

Observa-se que os líquidos metabólicos formaram emulsões em todos os ensaios e que mantiveram estabilidades maiores que 90% em todos os ensaios, sendo esse parâmetro utilizado para realizar os testes de atividade de emulsificação. A atividade de emulsificação foi determinada a partir das emulsões que mantiveram 50% de estabilidade após 24 horas. Na Tabela 6, é possível observar que as máximas atividades de emulsificação foram obtidas nos líquidos metabólicos obtidos com 24h e 168h horas de fermentação, apresentando AE de 1,70 UAE e 1,32 UAE respectivamente, sendo considerado satisfatório. Em estudo realizado com o mesmo organismo, Cavalcanti (2014) obteve um valor máximo de 0,991 UAE.

Bueno e Colaboradores (2010) utilizando óleo diesel obtiveram 11,11% e 44,40 % de atividade emulsificante a partir de cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis*, respectivamente, com 72 h de fermentação. Estes resultados mostram que existe uma grande variabilidade com relação à atividade emulsificante, sendo esta dependente dos tipos de biossurfactantes que estão sendo produzidos no meio de cultivo.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que há uma relação com a produção de biossurfactantes com uma maior concentração de biomassa.

Figura 7: Curva de crescimento celular (g.L^{-1}) em função do tempo de fermentação utilizando o caldo do sisal em fermentação submersa durante 192 h.



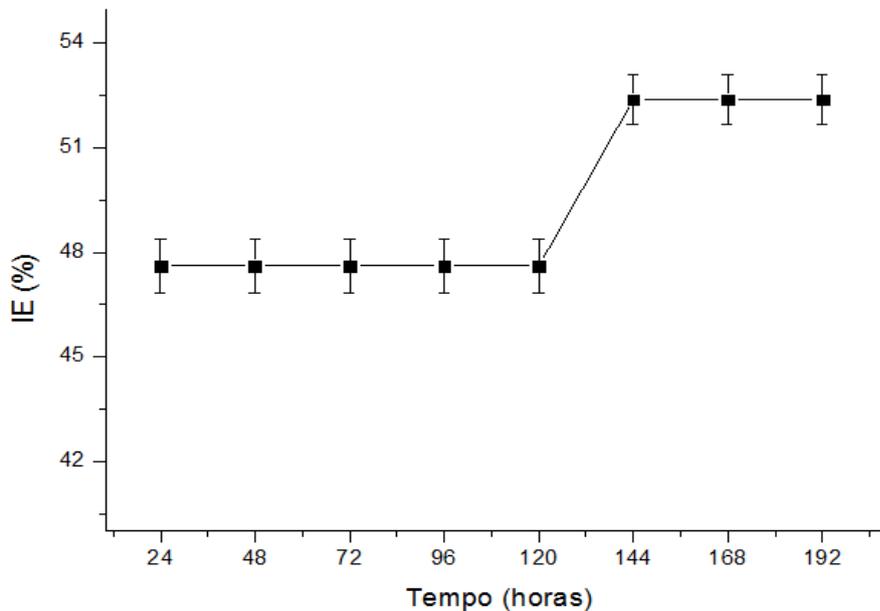
Fonte: Autoria própria.

Conforme mostra a Figura 7, é possível observar aumento da concentração de biomassa ao longo do tempo, até as 168 h de cultivo. Dessa forma, pode-se afirmar que o caldo de sisal mostrou ser favorável para o crescimento da biomassa, verificando-se concentração de $10,05 \text{ g.L}^{-1}$ para 24 horas de cultivo e de 14 g.L^{-1} para 48h, verificando-se uma tendência de aumento na concentração de células, com máximo crescimento observado com 144 horas de cultivo correspondendo a aproximadamente $17,65 \text{ g.L}^{-1}$. Rufino (2006) obteve uma concentração de biomassa de 11 g.L^{-1} em 50 horas de cultivo com *Candida*

lipolytica com o pH (5,7) e este crescimento praticamente permaneceu inalterado durante o processo fermentativo.

Os ensaios de índice de emulsificação foram realizados com os líquidos metabólicos obtidos da fermentação submersa em caldo de sisal. Os cultivos foram interrompidos a cada 24 h durante 8 dias. De acordo com a Tabela 6, foram observados IE de 47,61% nos tempos de 24 h a 120 h e para os períodos de fermentação de 144 h a 192 h foram verificados IE de 52,38%, sendo que os líquidos metabólicos mantiveram 100% de estabilidade em praticamente todos os tempos avaliados.

Figura 8: Resultado do processo fermentativo determinado pelo Índice de Emulsificação produzido pelo fungo *Aspergillus fumigatus* após cultivo submerso em meio a base de caldo de sisal por 192 horas à 37°C e 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com a Figura 8, observa-se que a produção de biossurfactante foi verificada a partir das 24 horas de cultivo, onde foi verificada uma tendência a se manterem inalterados até o período de 120 horas. A produção de biossurfactante atingiu valores máximos em 144 horas de cultivo alcançando valores para o IE de 52,38%, correspondendo ao momento em que a biomassa alcançou a concentração de 17,65 g.L⁻¹ na fase estacionária de crescimento. Segundo Bezerra (2012) à medida que o microrganismo consome o substrato, há aumento da biomassa e a síntese do biossurfactante.

Os biossurfactantes presentes nos líquidos metabólicos do *Aspergillus fumigatus* merecem destaque por apresentar Índice de Emulsificação e estabilidade alta, indicando à habilidade do biossurfactante para formar emulsão e permanecer sem mudanças sob condições específicas de tempo e temperatura.

Em estudo realizado por Cavalcanti (2014) utilizando o mesmo microrganismo foi verificado valores de IE de 25% em presença de querosene, em meio YEPD. Sendo que nesse caso, a estabilidade da emulsão foi de 16%. Essas informações aliadas ao fato de que vários trabalhos na literatura reportam o efeito positivo de fontes de carbono hidrofílicas na produção de biossurfactantes por microrganismos (CAMERON et al.1988; LUKONDEH et al. 2003; MORITA et al. 2007; CIAPINA et al. 2007) reforçam a relevância do uso do caldo de sisal para a produção de biossurfactante.

Sarubbo e Colaboradores (2001) produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *Candida lipolytica* o qual apresentou alta atividade de emulsificação quando comparados à produção com substratos hidrofóbicos (hexadecano e óleo de oliva) em que a produção não foi favorecida. Estes autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de biossurfactante, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

Dessa forma, biossurfactantes produzidos pelo isolado *Aspergillus fumigatus* apresentaram um excelente poder de emulsificação (Figura 7), mantendo uma estabilidade acima de 90%.

Figura 9: Teste de emulsificação do fungo *Aspergillus fumigatus*.



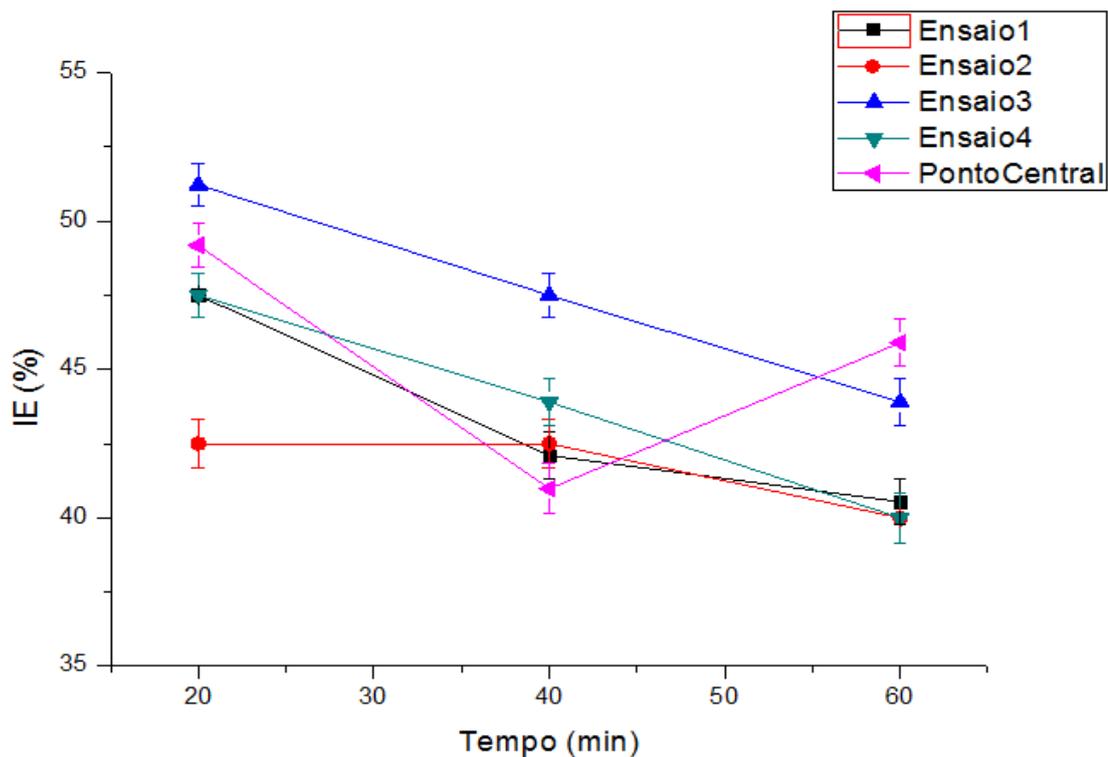
Fonte: Renato Guimarães.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.3.1 Índice de Emulsificação em relação à salinidade e à temperatura ao longo de 60 minutos.

Os testes foram realizados utilizando o caldo fermentado obtidos nos cultivos em todos os ensaios. Os valores de salinidade (0%, 5% e 10%) do meio fermentado foram ajustados e, posteriormente, os frascos foram incubados nas temperaturas (4°C, 30°C e 45°C) indicadas na matriz do planejamento fatorial por 20 min, 40 min e 60 min para testar o comportamento do IE produzido. Foram utilizados querosene e óleo diesel para analisar o melhor comportamento do Índice de Emulsificação em tempos diferentes.

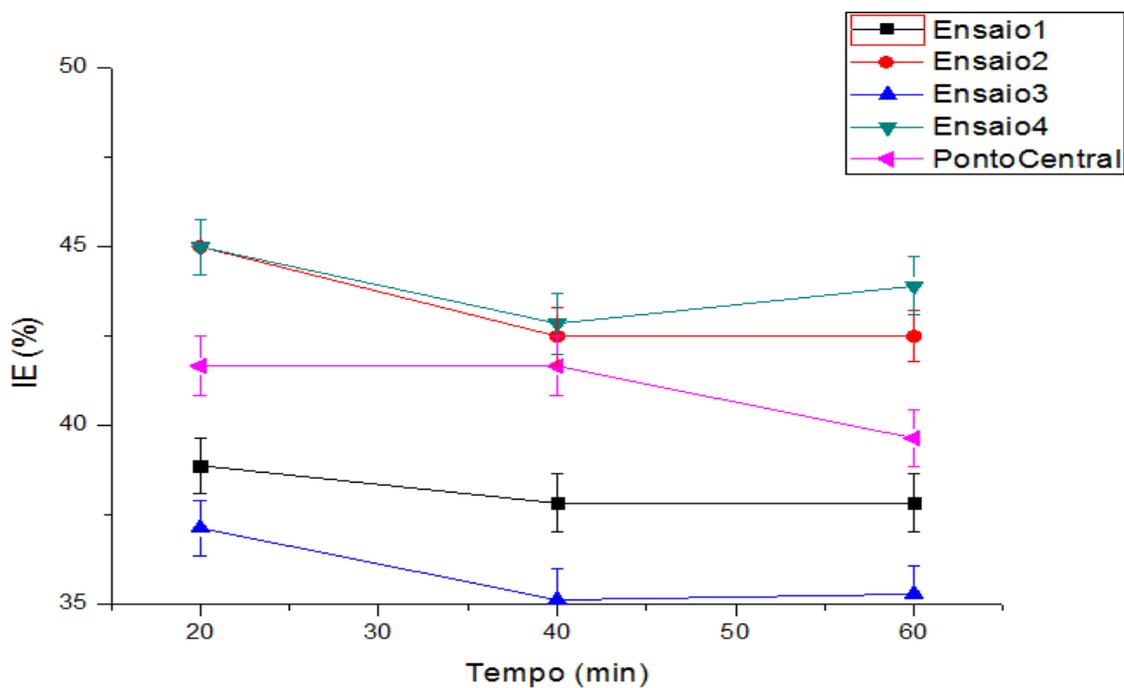
Figura 10: Índices de Emulsificação do isolado *Aspergillus fumigatus* obtidos com o óleo diesel ao longo de 60 minutos. Ensaio 1 (4°C, 0% de salinidade), Ensaio 2 (45°C e 0% de salinidade), Ensaio 3 (4°C e 10% de salinidade), Ensaio 4 (45°C e 10% de salinidade) e o Ponto Central (30°C e 5% de salinidade).



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 10, observa-se que os valores do IE após 20 minutos foram maiores, tendo em seguida uma pequena redução nos tempos de 40 e 60 minutos. De acordo com a Figura 10 é possível afirmar que o Ensaio 3 (4°C e 10% de salinidade) foi o que apresentou os melhores resultados do IE em presença do óleo diesel quando comparado aos demais, porém, no ponto central (30°C e 5% de salinidade) observa-se que, no tempo de 40 minutos ocorreu uma queda brusca dos valores do IE, o que provavelmente ocorreu em virtude de erros nas medições.

Figura 11: Índices de Emulsificação do isolado *Aspergillus fumigatus* obtidos com o querosene ao longo de 60 minutos obtidos no Ensaio 1 (4°C, 0% de salinidade), Ensaio 2 (45°C e 0% de salinidade), Ensaio 3 (4°C e 10% de salinidade), Ensaio 4 (45°C e 10% de salinidade) e o Ponto Central (30°C e 5% de salinidade).



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 11, os Ensaios 2 (45°C e 0% de salinidade) e 4 (4°C e 10% de salinidade) obtiveram os melhores valores em presença de querosene. Observa-se também que no tempo de 20 minutos foram obtidos os maiores valores para o IE em todos os ensaios, e que no decorrer do tempo os valores permaneceram com pouca variação. No ponto central (30°C e 5% de salinidade), observa-se que este segue os parâmetros dos demais ensaios, demonstrando que no tempo de 40 minutos foram obtidos os maiores valores para o IE.

Ao analisar as Figuras 10 e 11, observa-se que os valores de IE obtidos apresentaram ligeira variação ao longo do tempo quando submetidos a diferentes níveis de temperatura (4, 30 e 45°C) e salinidade (0%, 5% e 10%).

Esses resultados demonstram a capacidade dos biossurfactantes em se manter estáveis em alta temperatura (Ensaio 2 e 4) por um determinado período de tempo. Essa análise é importante, uma vez que, os biossurfactantes são sugeridos para o uso em aplicações industriais e ambientais, sendo estes processos frequentemente associados a condições extremas de pH, salinidade e temperatura, que influenciam a atividade e a estabilidade de um biossurfactante. Em virtude disso, torna-se necessário o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicação desses compostos (MULLIGAN, 2005; OLIVEIRA, 2014).

A análise de variância (Tabela 7), o gráfico de Pareto, os gráficos de superfície de resposta apresentaram coeficiente de determinação $R^2 = 0,99923$, o valor do R^2 apresentado é admissível, pois este coeficiente mede o quanto a variável resposta é explicada pelo modelo. Com o valor de R^2 acima de 70%, o modelo está explicando bem a variação na variável resposta. De acordo com a literatura, valores de R^2 próximos de 1 representam modelos melhores para previsões.

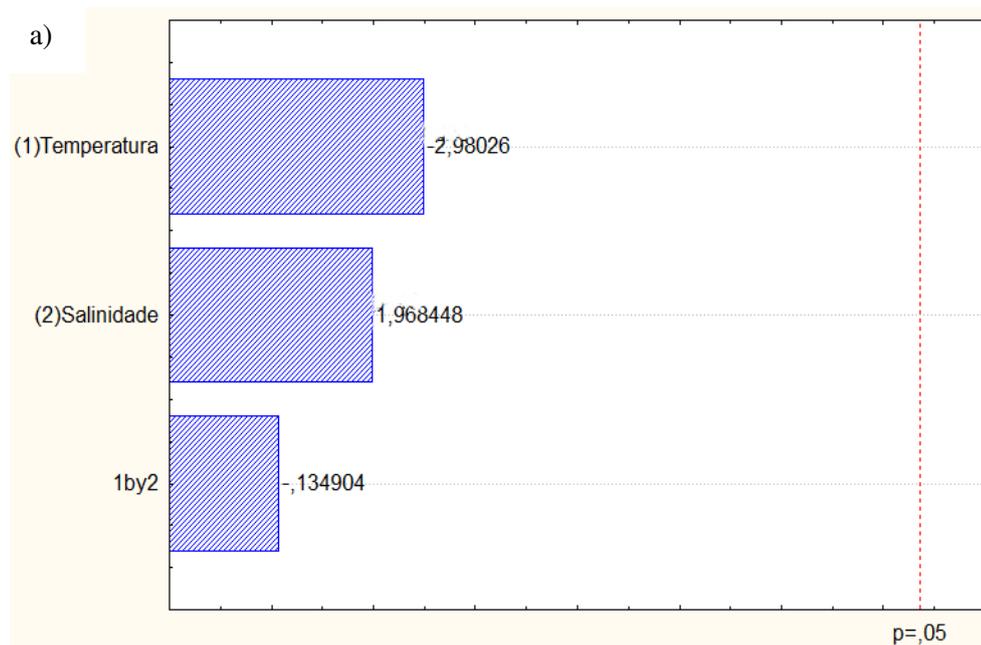
Tabela 7: Análise de variância (Anova) para um planejamento 2^2 em um intervalo de 95% de confiança.

Fator	Soma	Graus de	Média	F	P
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
Temperatura	43,93487	1	43,93487	1211,958	0,018282
Salinidade	0,76064	1	0,76064	20,982	0,136833
1 by 2	2,12773	1	2,12773	58,694	0,082629
Erro Puro	0,03625	1	0,03625		
Total	46,85948	4			

A análise de variância mostra que a variável que teve influência sobre o comportamento do IE foi a variável temperatura, a análise ainda mostra que a variável salinidade, bem como a interação entre as variáveis estudadas no processo fermentativo (1by 2) não tiveram influência sobre o comportamento do IE, ou seja, não foram significativas.

A Figura 12 mostra o diagrama de Pareto para análise da variável dependente Índice de Emulsificação.

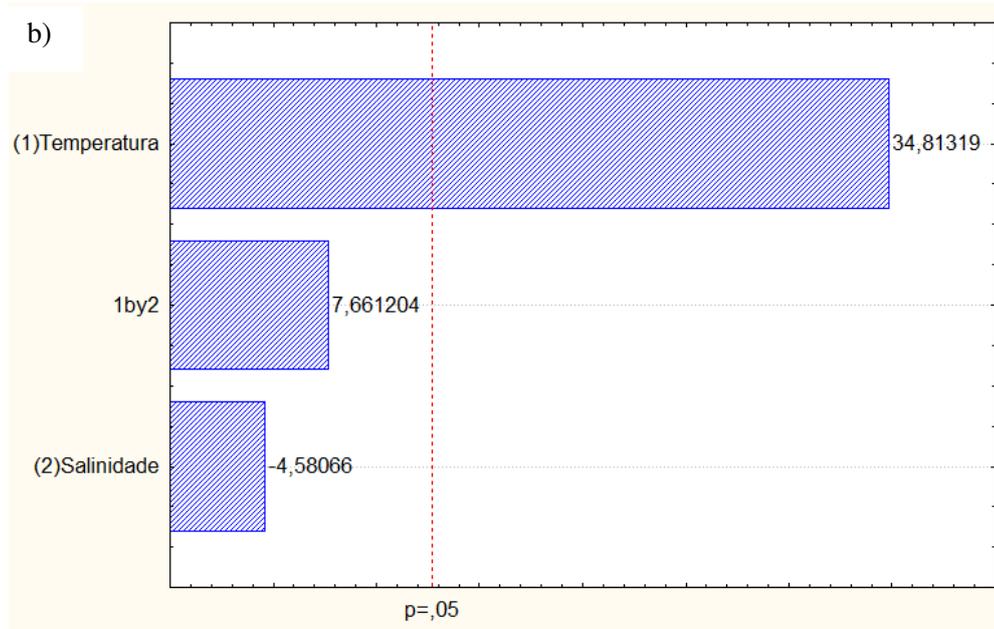
Figura 12: Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial 2^2 tendo como variáveis independentes a temperatura e salinidade e como variável resposta o comportamento do IE em relação ao diesel (a) e ao querosene (b).



Fonte: Autoria própria.

O diagrama de Pareto fornece o efeito quantitativo que cada variável possui sobre o IE, estabelecendo quais destes efeitos encontram-se dentro do intervalo de confiança estabelecido para a análise estatística (95%). De acordo diagrama de Pareto (Figura 12a), a análise estatística demonstrou que, para o óleo diesel não houve interferência significativa de nenhuma das variáveis testadas sobre o comportamento do IE.

A partir da Figura 12b é possível inferir que a temperatura é o fator que influenciou o IE, confirmando que o fungo utilizado nesse trabalho apresentou valores de IE satisfatórios mesmo quando submetido a variações de temperatura. Os resultados obtidos confirmam que o comportamento do IE depende da afinidade do biossurfactante produzido pelo hidrocarboneto testado, e da influência dos parâmetros temperatura e salinidade.

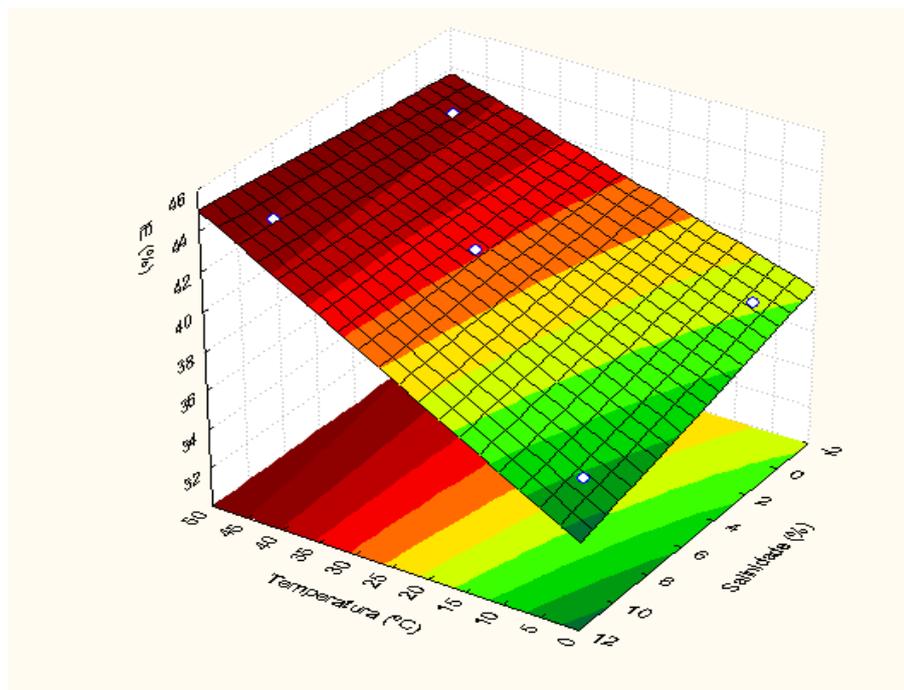


Fonte: Autoria própria.

As Figuras 13 e 14 representam a Superfície de Resposta e as Curvas de contorno para mostrar o comportamento do IE em presença de querosene.

A Superfície de resposta ilustra o efeito e permite visualizar a variação da resposta em função das variáveis independentes dentro das faixas utilizadas, salinidade e temperatura sobre o comportamento do IE, no período de fermentação de 192 horas.

Figura 13: Superfície de Resposta em função da salinidade e da temperatura no comportamento do IE frente ao querosene.

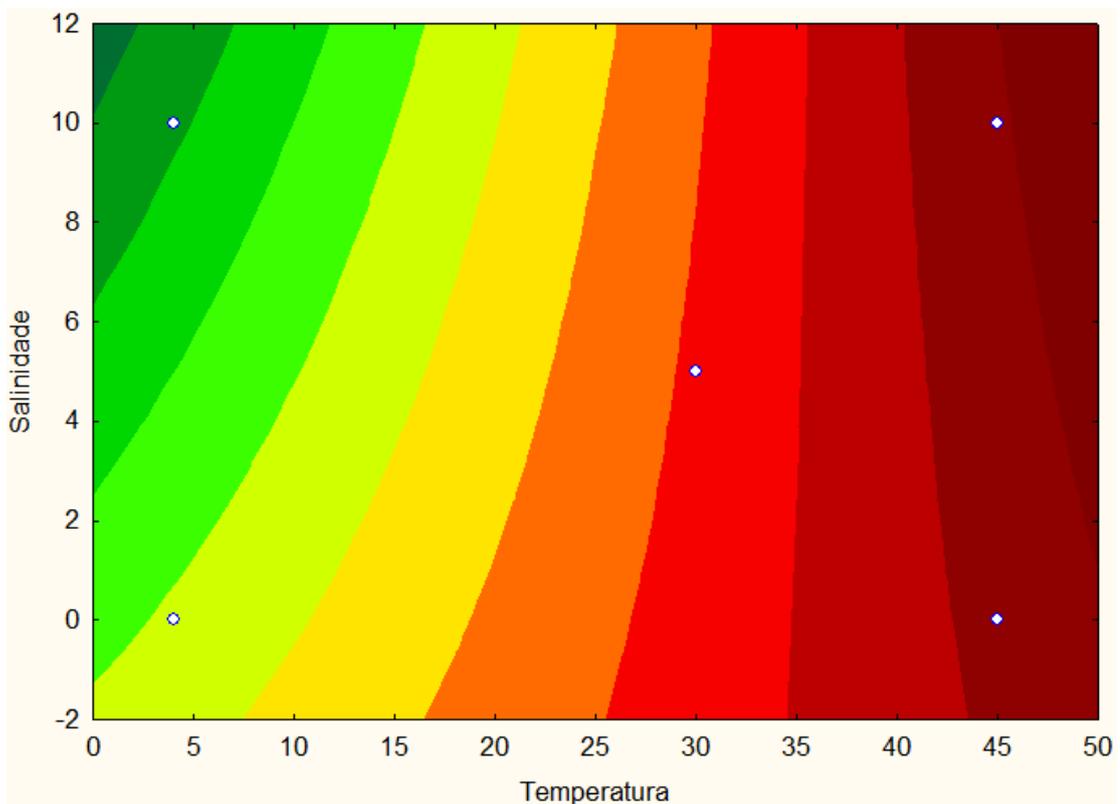


Fonte: Autoria própria.

A influência da temperatura sobre o IE na presença de querosene pode ser confirmada observando-se o gráfico de superfície de resposta (Figura 13) que demonstra que os maiores valores de IE foram observados na temperatura de 45°C.

Cavalcanti (2014) ao estudar o comportamento do IE produzido pelo isolado aqui estudado e em concentrações de 5% e 10% de salinidade observou que o biossurfactante presente no líquido metabólico não foi estável na concentração de 5% de NaCl, porém formaram emulsão na concentração de 10%, com IE inferiores ao teste padrão. Nesse sentido, os resultados obtidos utilizando o caldo do sisal quando comparados demonstram que o líquido metabólico apresentou IE de 49,18% na salinidade de 5%, e IE de 51,21 na salinidade de 10%.

Figura 14: Curva de contorno em função da salinidade e da temperatura no comportamento do IE frente ao querosene.

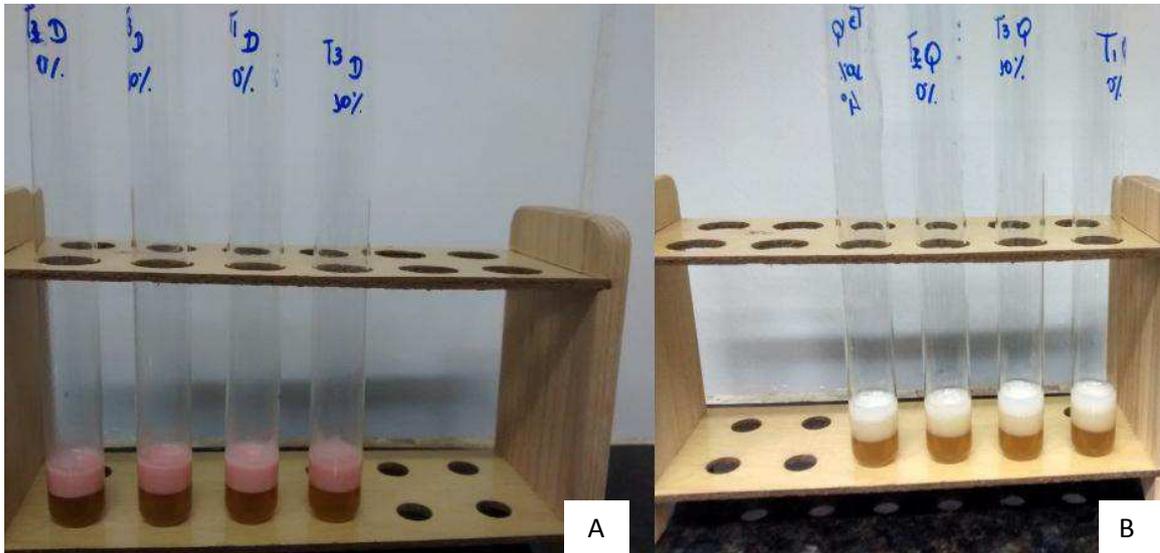


Fonte: Autoria própria.

As curvas de contorno confirmam a análise dos efeitos, e as faixas de temperatura (30°C e 45°C) proporcionaram os melhores resultados para o IE. Por meio das análises feitas é

possível inferir que a temperatura foi o único fator que realmente influenciou no comportamento do IE produzido por *A. fumigatus* em meio contendo caldo de sisal.

Figura 15: Teste de emulsificação obtido do óleo diesel (A) e do querosene (B) ao longo de 60 minutos.



Fonte: Renato Guimarães.

Como mostra a Figura 14, o biossurfactante obtido neste trabalho emulsionou o substrato testado, permanecendo estável quando submetido a variações de temperatura e salinidade.

6 CONCLUSÕES

- O fungo filamentoso da Caatinga *Aspergillus fumigatus* apresentou habilidade de crescer e produzir biossurfactante em meio contendo o caldo do sisal como substrato;
- De acordo com os resultados obtidos o biossurfactante produzido foi capaz de formar emulsões em todas as condições, apresentando Índices de Emulsificação variando de 47% a 52%;
- No estudo da estabilidade para o biossurfactante produzido por *A. fumigatus* observou-se que as emulsões apresentaram estabilidade acima de 90%;
- Dentro das condições estudadas no planejamento foi possível verificar que em presença de óleo diesel nenhum dos parâmetros avaliados teve influência no comportamento do IE;
- Em presença de querosene os melhores valores de IE foram observados nos ensaios em que se utilizaram as temperaturas mais altas, 2 (45°C e 0% de salinidade) e 4 (45°C e 10% de salinidade), e que nesse caso a temperatura foi o único fator que influenciou o comportamento do IE;

REFERÊNCIAS

- ACCORSINI, F. R. **Isolamento de leveduras de um consórcio especializado e avaliação de seu potencial na produção de biossurfactantes em fontes alternativas de carbono.** Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal - São Paulo, 2010.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682).** Dissertação (mestrado) Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 2001.
- ALVES, J. J. A. **Geoecologia da caatinga no semiárido do Nordeste brasileiro.** CLIMEP: Climatologia e Estudos da Paisagem, Rio Claro, v.2, n.1, p. 58-71, 2007.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. **Degradação da Caatinga:** Uma investigação ecogeográfica. Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) - Caatinga (Mossoró, Brasil), v.22, n3, p 126-135, julho/setembro 2009.
- ANDRADE, R. L.; SOUTO, J. S.; SOUTO, P. C.; BEZERRA, D. M. **Deposição de serrapilheira em área de caatinga na RPPN “Fazenda Tamanduá”,** Santa Terezinha – PB, Caatinga, Mossoró, Brasil, v. 21, n. 2, p. 223-230, 2008.
- ANDRADE, Wilson. **O Sisal Do Brasil.** Disponível em: <<http://www.braziliansisal.com/?pageid=17&lang=pt>> Acesso em: 25 nov. 2015.
- ANDRADE, R.; JORNELAS, J.; BRANDÃO, W. **Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento.** Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/pdf/3_comunicacao01v9n1.pdf>. Acesso em: 28 de nov 2015.
- ANDRADE, M.; PARRA, J. B.; HARO, M.; MESTRE, A. S.; CARVALHO, A. P.; ANIA, C. O. **Characterization of the different fractions obtained from the pyrolysis of rope industry waste.** Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. V.95, p.31-37, 2012.
- ANTUNES, A. A.; ARAÚJO, H. W. C.; SILVA, C. A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. C. **Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes.** Universidade Federal do Pernambuco (UFPE) – Recife (PE), Brasil, 2013.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. **Potential commercial application of microbial surfactants.** Applied Microbiology Biotechnology, 53, 495-508, 2000.
- BARBOSA, S.A. **Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima.** (Tese) Renorbio - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, São Cristóvão - SE 2011.
- BARBOSA, A. P. A.; GONDIM, A. L. N.; PAZ, M. C. F. **Remoção do corante preto pirazol por *Pseudomonas aeruginosa*.** In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, 2007.

BARROS, F. F. C. **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 106 p. Campinas, 2007.

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

BARROS, F. F. C.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5 a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, 1071–1078, 2008.

BEZERRA, M. S. **Levantamento e Avaliação de Critérios para a Ampliação de Escala da Produção de Biossurfactante utilizando melão como substrato**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Departamento de Engenharia Química, Natal/RN, 2006.

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

BRANCO, A.; SANTOS, J. D. G.; PIMENTEL, M. A. M.; OSUNA, J. T. A.; LIMA, L. S.; DAVID, J. M. d-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial crops and products**, v. 32, n. 3, p. 507-510, 2010.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - São José do Rio Preto – SP, 2010.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The Mannooprotein of the *Saccharomyces cerevisiae* is a effective bioemulsifier. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p. 1420-1425, 1988.

CARDOSO, D. B. O. S; QUEIROZ, L. P. **Diversidade de Leguminosae nas Caatingas de Tucano, Bahia: IMPLICAÇÕES PARA A FITOGEOGRAFIA DO SEMI-ÁRIDO DO NORDESTE DO BRASIL**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Depto. de Ciências Biológicas, Feira de Santana, Bahia, Brazil, 2007.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados de solo em municípios na região do Xingó – Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 831-837, 2006.

CAVALCANTI, R. M. F. **Bioprospecção de biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos da caatinga**. Universidade Federal de Campina Grande. Sumé - PB: [s.n], 2014.

CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTAANNA, L. M. M, SANTOS, A. S., FREIRE D. M. G. PEREIRA, N. J. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, n. 1-3, pp. 880-886, 2007.

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

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, 2006.

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

CRUZ, A. C. R. **Fungos conidiais do bioma caatinga no semiárido brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Botânica) Feira de Santana – Bahia, 2008.

CZAPLICKA, M.; CHMIELARZ, A. Application of biosurfactants and non-ionic surfactants for removal of organic matter from metallurgical lead-bearing slime. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 645-649, 2009.

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; NASCIMENTO, C. E. S.; ALBUQUERQUE, S. G.; OLIVEIRA, V. R. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da Caatinga**. In: M. Tabarelli. (Org.). Biodiversidade da Caatinga: áreas prioritárias para conservação. Brasília, 341-346 pp, 2000.

EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Campinas - São Paulo, 2015.

FARIA, A. F. **Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual**. 2010. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará – Departamento de Engenharia Química – Fortaleza, 2012.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. **Produção de biossurfactante por levedura**. Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

NAVES, IVO. Sisal. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_02_12_11_46_10_sisaljaneiro2014.pdf . Acesso em: 03/12/2015.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N.J. ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, pp. 715 – 720, 2003.

LUNA, J. M; SARUBBO, L. A. CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability an application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 785-793, 2009.

LUNA, J. M. **Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biossurfactante de baixo custo Lunasan produzido por *Candida sphaerica* UCP 0995**. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

MAIA, L. C.; GIBERTONI, T. B. **Fungos registrados no semiárido nordestino**. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J, GAMARRA-ROJAS, C. F. L. (eds) *Vegetação e flora da Caatinga*, APNE/CNIP, Recife, p. 163-176, 2002.

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

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – São Paulo, 2006.

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

MATSUZAWA, T.; TAKAKI, G.; YAGUCHI, T.; OKADA, K.; GONOI, T.; HORIE, Y. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. **Mycoscience**, 2013.

MORAES, R. R. Refratometria, 2011. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>>. Acesso em: 12 março 2016.

MORAIS, R. K. S. **Produção de biossurfactantes a partir de substratos de baixo custo**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia, Maceió, 2012.

MORITA, T.; KONISHI, M. FUKUOKA, T.; IMURA, T.; KITAMOTO, D. Microbial Conversion of Glycerol into Glycolipid Biosurfactants, Mannosylerythritol Lipids, by a Basidiomycete Yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317T. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 1, pp. 78-81, 2007.

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

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

NOGUEIRA, J. P.; PIRAS, P. R. F. **Prospecção para a produção de leveduras e etanol a partir do suco de sisal.** Universidade Estadual de Feira de Santana – Bahia, 2011.

OLIVEIRA, J. G. **Utilização de melão, maniveira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e sua aplicação em biorremediação de solo.** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP, 2014.

PACHECO, G. J. **Produção de biossurfactantes por *Rhodococcus erythropolis* e sua aplicação na remoção de óleo de sedimentos arenosos.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2008.

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

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos.** Dissertação (Mestrado) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Rio Claro, 2006.

PORTO, T. S. **Extração da ascorbato oxidase de *Cucurbita maxima* por processo descontínuo e contínuo em coluna de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas.** Tese (Doutorado) em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica. Universidade de São Paulo, 2008, 123pp.

PRIETO, L. M. **Produção, caracterização parcial e aplicação ambiental de ramnolipídios de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de resíduos de pescado.** Dissertação (Mestrado) Departamento de Química - Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2007.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos.** Vol. 3, Pelotas/RS, Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2000.

ROCHA, M. V. P; MENDES, J. S; GIRO, M. E. A; GONÇALVES, L. R. B. **Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju.** Universidade Federal do Ceará – 4º PDPETRO, Fortaleza, 2007.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low cost fermentative médium biosurfactant production by probiotic bactéria. **Biochemical Engeneering Journal**, 32, 135-142, 2006.

RODRIGUES, R. **Cultura do sisal é prioridade do governo.** In: O sisal do Brasil – Brazilian Sisal, Salvador, BA: APEX/SINDIFRIBRAS, 2009.

ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melão e maniveira.** Dissertação (Mestrado) – UFV, Minas Gerais, 2008.

RUFINO, R. D. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica*.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco – Ciências Biológicas – Recife, 2006.

- RUFINO, R. D. **Produção otimizada do biossurfactante Rufisan por *Candida lipolytica* e aplicações biotecnológicas.** Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco – Ciências Biológicas – Recife, 2010.
- SALGADO, J. P. **Produção de biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 utilizando resíduos industriais e substratos de baixo custo.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual da Paraíba – UEPB – Centro de Ciências e Tecnologias, 2013.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. **Vegetação e flora da caatinga.** Associação Plantas do Nordeste, APNE/CNIP, Recife, p. 176, 2002.
- SANTANA, C. P.; SILVA, F. L. H.; ALMEIDA, M. M. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando como substrato o fruto da palma forrageira.** Unidade Acadêmica de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande – PB, 2009.
- SANTANA, W. J. **Produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* (upc 0988) utilizando óleo de pequi como fonte alternativa de carbono.** Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas, 2012.
- SANTOS, J. D. G.; ESPELETA, A. F.; BRANCO, A.; ASSIS, A. A. Aqueous extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v.92 p. 1997-2001, 2013.
- SANTOS, K. S. **Estudo genético e citogenético em espécies do gênero *agave* (agavaceae).** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana - Bahia, 2014.
- SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. P.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. **Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 95, 2001.
- SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. **Cultivo do Sisal.** EMBRAPA: Sistemas de Produção. n. 5, dez. 2006.
- SILVA, S. L. **A Gestão Social no Território do Sisal: Uma análise do Conselho Regional de Desenvolvimento Rural Sustentável da região Sisaleira da Bahia – CODES SISAL.** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Humanas da Universidade do Estado da Bahia, 2008.
- SILVA, F. P. M. A problemática da produção do sisal em pequenas propriedades familiares: O caso de Conceição do Coité na Bahia. In: **Anais V SOBER Nordeste / XI Semana de Economia da Urca.** Crato – Ceará, 2010.
- SILVA, M. A. **Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus lincheniformis*.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, PE, 2011.
- SILVA, E. J. **Caracterização de um biossurfactante produzido por *Pseudomonas cepacia* CCT6659 e sua aplicação em solo impactado por derivados do petróleo.** Dissertação (Mestrado) Universidade Católica de Pernambuco – Programa de Pós-Graduação em desenvolvimento de processos ambientais, Recife, 2014.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical science. **TRENDS in Biotechnology**, 22, 3, 142-146, 2004.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. **Application aspects. Biotechnol. Adv.** 25: 99-121, 2007.

SIMÕES, M. L. G.; TAUK-TORNISIELO, S. M. Optimization of xylanase biosynthesis by *Aspergillus japonicus* isolated from a “Caatinga” area in the Brazilian state of Bahia. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, p. 1135-1141, 2006.

SOBRINHO, H. B. S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, ólica de Pernambuco - Recife, 2007.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do sisal na região semiárida do Nordeste brasileiro**. Embrapa Algodão. Sistemas de Produção, 5, novembro de 2006.

SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. F. da; COUTINHO, W. M. A história do sisal no Brasil. In: ANDRADE, Wilson. (Org.). **O sisal do Brasil**. Salvador: SINDIFIBRAS/APEX, v. p. 16-21, 2008.

TABARELLI, M.; VICENTE, A. **Lacunas de conhecimento sobre as plantas lenhosas da caatinga**. In: Vegetação e flora da caatinga. Recife: Ed. da UFPE, 2002. p. 25-35.

TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por Bactérias: revisão. **Oecologia Australis** 14(4): 1025-1035, Dezembro, 2010.

VAN-HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology advances**. V. 24, p. 604-620, 2006.

VANCE-HARROP, M. H.; SARUBBO, L. A.; CARNEIRO DA-CUNHA, M. G.; BUARQUE DE GUSMÃO, N. E CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho *Candida lipolytica*. **Revista Symposium**, Ciências Humanidades e Letras, ano 3, n. 2, p. 23, 1999.

VAZ, G. O. **Produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* usando farelo de trigo como substrato**. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, 2013.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. **Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms**. Department of Botany and Microbiology, University of Oklahoma and Department of Petroleum Engineering, University of Oklahoma, Norman, OK, USA, April, 2004.