

ENDI PRICILA ALVES

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES METABOLIZADOS POR *Pleurotus sajor-caju* A
PARTIR DE ÓLEO DE SOJA**

JOINVILLE – SC

2015

ENDI PRICILA ALVES

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES METABOLIZADOS POR *Pleurotus sajor-caju* A
PARTIR DE ÓLEO DE SOJA**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Engenharia de
Processos na Universidade da Região de
Joinville - UNIVILLE.
Orientadora: Dra. Elisabeth Wisbeck

JOINVILLE – SC

2015

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

A474a Alves, Endi Pricila
Avaliação da produção e caracterização de biossurfactantes
metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja / Endi Pricila
Alves; orientadora Dra. Elisabeth Wisbeck – Joinville: UNIVILLE, 2015.

82 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Processos –
Universidade da Região de Joinville)

1. Biossurfactante. 2. *Pleurotus sajor-caju*. I. Wisbeck, Elisabeth
(orient.). II. Título.

CDD 579

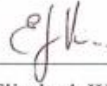
Termo de Aprovação

“Avaliação da produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja”

por

Endi Pricila Alves

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos, área de concentração Engenharia de Processos e Tecnologias Limpas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Engenharia de Processos.

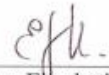


Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
Orientadora (UNIVILLE)

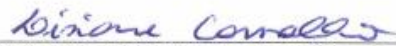


Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Coordenadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Processos (UNIVILLE)

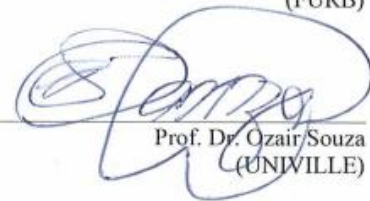
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Elisabeth Wisbeck
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dra. Lisiane Fernandes de Carvalho
(FURB)



Prof. Dr. Ozair Souza
(UNIVILLE)

Joinville, 25 de setembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, criador de tudo e senhor da minha vida, àquele que me proporciona o dom da vida e que sempre renova minhas forças.

Aos meus pais, Hermelinda e Arno, que sempre foram meu suporte e meu amparo ao longo de toda minha trajetória de vida. E ao meu irmão, Aricaue, que será sempre a minha ligação mais forte de família.

Ao meu amor, companheiro, marido e amigo, Sidnei, que sempre me apoiou e me acompanhou em todas as decisões, àquele que por várias vezes nos fins de semana me acompanhava nas idas ao laboratório, que aturou as minhas lamentações e frustrações quando algo não dava certo, e que me dava força pra tentar novamente e não desistir nunca. Muito obrigada, você é muito importante na minha vida, te amo.

À minha família, que sempre me deu apoio, e reconheceu meu potencial e me fazendo lembrar que eu sou capaz de alcançar tudo que eu quiser.

À minha orientadora, Dra. Elisabeth Wisbeck, que desde a iniciação científica, sempre foi muito atenciosa e por meio da sua experiência me fez amar a área da pesquisa. Só tenho a agradecer, por entender os percalços que tive e mesmo assim não deixar de acreditar no meu trabalho. Agradeço também, as várias horas dispensadas para a correção deste trabalho, seus questionamentos e sugestões foram de enorme importância.

Aos companheiros de laboratório, Bruna, Styfanie, João, Elias, Aline e todos os outros que de alguma forma, com uma palavra amiga ou algum gesto, me fizeram passar por mais essa etapa.

Agradeço também alguns mestres que tive bastante contato nesses anos na pesquisa como a Dra. Márcia Languê Silveira, por todos os dias em que sanasse alguma dúvida e por toda a força; a Msc. Jamile Rosa Rampinelli, pela disponibilização de tempo e dedicação para me auxiliar no estágio de docência; a Dra. Denise Abatti Kasper Silva pelo auxílio com as interpretações dos espectros de FTIR; a Dra. Mariane Bonatti Chaves e Dra. Regina Maria Miranda Gern por todos os ensinamentos e apoio.

Agradeço à FURB, pela realização de algumas análises, em especial à Professora Dra. Lorena Tavares, que foi o elo entre as instituições.

A doutoranda Kátia Luiza Herman e seu noivo Felipe, que por várias vezes transportaram minhas amostras entre Joinville e Blumenau, meu muito obrigada.

À Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, pela disponibilização do laboratório de Biotecnologia II, no qual realizei a parte experimental deste trabalho.

À Capes e à FAP/UNIVILLE, pela concessão da bolsa de estudos ao longo do curso de mestrado.

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos biológicos anfífilos produzidos extracelularmente ou como parte de membranas celulares de uma variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos a partir de várias substâncias, incluindo açúcares, óleos e resíduos. Muitos trabalhos publicados sobre a produção de biossurfactantes são com bactérias, porém, devido a possível natureza patogênica dos biossurfactantes de origem bacteriana, sua aplicação não é considerada adequada na indústria de alimentos e farmacêutica. Outros micro-organismos que aparecem nos trabalhos são as leveduras, e são poucos os trabalhos que empregam fungos filamentosos para a produção de biossurfactantes. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactantes pelo fungo basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. Um planejamento fatorial fracionário (2^{6-2}) foi utilizado variando-se a temperatura (26 e 34 °C), pH inicial (3,0 e 6,0), concentração de óleo de soja (5 e 10% v/v), de glicose (0 e 2% m/v), de KH_2PO_4 (0,6 e 3% m/v) e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 e 3,5% m/v), com triplicata do ponto central. Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio, agitados reciprocamente a 120 mim^{-1} por 14 dias. Uma estimativa da formação de biossurfactantes foi determinada pela variação da tensão superficial (ΔT) do meio de cultivo no tempo inicial (T_i) e a tensão superficial do caldo de cultivo no tempo final (T_f) e pela redução da tensão superficial ($RT\%$). Verificou-se que o experimento conduzido a 34 °C, pH 3,0, 10% de óleo de soja, sem glicose, fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) no nível superior (3,5%) e 0,6% de K_2HPO_4 apresentou a maior variação da tensão superficial do meio (6,2 mN/m) após 14 dias de cultivo, o que equivale a uma redução de tensão superficial (RT) de 16,8%. A tensão superficial ao final de 14 dias de fermentação foi de 30,7 mN/m, o que é um resultado promissor uma vez que, para um micro-organismo ser considerado produtor é necessário que este valor esteja em torno de 40 mN/m. Na ampliação de escala para biorreator de bancada com volume de trabalho de 4 L, as tensões superficiais mais baixas ocorreram com 6 dias de cultivo (144 h) (43,4 mN/m) no experimento B1 ($T=34^\circ\text{C}$, ph inicial de 3, agitação de 300 mim^{-1} , aeração de 0,25 L/mim e utilizando óleo de soja comercial) e com 8 dias (192 h) (40,7 mN/m) no experimento B2 ($T=34^\circ\text{C}$, ph inicial de 3, agitação de 300 mim^{-1} , aeração de 0,25 L/mim e utilizando óleo de soja residual de fritura). O índice de emulsificação para o experimento B1 em 6 dias foi de 66,6% e para o experimento B2 em 8 dias foi de 65,8%. Os biossurfactantes extraídos dos experimentos B1 e B2 apresentaram $12,0\% \pm 0,5$ e $10,6\% \pm 0,6$ de carboidratos, $7,4\% \pm 0,5$ e $7,7\% \pm 1,0$ de proteínas, respectivamente. Nas análises dos espectros de FTIR, tanto para o experimento B1 quanto para o B2, podem-se identificar bandas que confirmam a presença de carboidratos e proteínas e sugerem a presença de lipídeos. Portanto estima-se que a estrutura do biossurfactante seja um complexo que contenha carboidrato-proteína-lipídeo e possa ser utilizado como emulsionante.

Palavras-chave: Biossurfactantes, *Pleurotus sajor-caju*, cultivo submerso.

ABSTRAT

The biosurfactants are amphiphiles compounds biological produced extracellularly or as part of cell membranes of a variety of bacteria, yeast and filamentous fungi from various substances including sugars, oils and residues. Many papers on biosurfactants production are with bacteria, however, due to possible pathogenic nature of biosurfactants of bacterial origin, its application is not considered appropriate in the food and pharmaceutical industries. Other microorganisms that appear in the papers are yeasts, and there are few jobs that employ filamentous fungi to produce biosurfactants. Therefore, this study aimed to evaluate the production of biosurfactants by the fungus basidiomycete *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. A fractional factorial design (2^{6-2}) was used by varying the temperature (26 and 34 °C), initial pH (3.0 and 6.0), soybean oil concentration (5 to 10% v/v) of glucose (0 to 2% w/v), KH_2PO_4 (0.6 and 3% w/v) and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 and 3.5% w/v) with the center point triplicate. The experiments were performed in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml medium, shaken reciprocally at 120 min^{-1} for 14 days. An estimate of biosurfactants formation was determined by the variation of the surface tension (ΔT) of the culture medium at the initial time (T_i) and the surface tension of the culture broth at the end time (T_f) and by reducing the surface tension (RT%). It was observed that the experiment conducted at 34 °C, pH 3.0, 10% soybean oil, without glucose, a nitrogen source ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) on the top (3.5%) and 0.6% of K_2HPO_4 showed the greatest variation of the surface tension (6.2 mN/m) after 14 days of culture, which corresponds to a reduction of surface tension (RT) 16.8%. The surface tension at the end of 14 days of fermentation was 30.7 mN/m, which is a promising result as that for a microorganism to be considered produdor is necessary that this value is around 40 mN/m. The expansion of call for benchtop bioreactor with working volume 4 L, lower surface tensions occurred six days of cultivation (144 h) (43.4 mN/m) in the experiment B1 (T = 34 °C, ph Initial 3, agitation of 300 mim^{-1} , aeration of 0.25 L/ mim^{-1} and using commercial soybean oil) and 8 days (192 h) (40.7 mN/m) in B2 experiment (T = 34 °C, initial pH of 3, agitation of 300 mim^{-1} , aeration of 0.25 L/ mim^{-1} and using frying residual soybean oil). The emulsification index for the experiment B1 in 6 days was 66.6% and B2 for the experiment at 8 days was 65.8%. The biosurfactants extracted from experiments B1 and B2 showed $12.0\% \pm 0.5$ and $10.6 \pm 0.6\%$ carbohydrate, $7.4\% \pm 0.5$ and $7.7 \pm 1.0\%$ of protein, respectively. In the analysis of the FTIR spectra for both the experiment as B1 to B2 can be identified bands confirming the presence of carbohydrates and proteins and suggests the presence of lipids. Therefore it is estimated that the biosurfactant is a complex structure that contains carbohydrate-protein-lipid may be used as an emulsifier.

Keywords: Biosurfactants, *Pleurotus sajor-caju*, submerged cultivation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da estrutura de micelas água em óleo, óleo em água e a estrutura típica de uma molécula de tensoativo. 17
- Figura 2** - *Pleurotus sajor-caju* na natureza..... 27
- Figura 3** - Superfície de resposta da interação entre a glicose (%) e a temperatura (°C)..... 46
- Figura 4** - Gráfico em cubo da interação da temperatura (°C) com pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)..... 47
- Figura 5** - Superfície de resposta da interação entre o pH inicial e a concentração de glicose (%)..... 48
- Figura 6** - Variações das concentrações de biomassa micelial (g/L), da tensão superficial (mN/m) e do pH em função do tempo (h) no cultivo de *P. sajor-caju*, com óleo de soja comercial (A) e óleo de soja residual de fritura (B)..... 51
- Figura 7** - Comparação dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos biossurfactantes extraídos dos experimentos realizados com óleo de soja comercial (B1) e o com óleo de soja residual de fritura (B2)..... 56

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** - Macro e micronutrientes requeridos pelas células fúngicas 31
- Tabela 1** - Planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com ponto central para os experimentos utilizando *Pleurotus sajor-caju*. Os índices (-1) e (+1) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente. Utilizando replicatas do ponto central. 36
- Tabela 2** - Detalhamento do planejamento fracionário 2^{6-2} com triplicata do ponto central. 37
- Tabela 3** - Detalhamento do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} variando-se a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), o pH inicial, a concentração de óleo de soja, de glicose, de K_2HPO_4 e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%) e valores de T_i (Tensão superficial inicial), T_f (Tensão superficial final) e ΔT (mN/m). 44
- Tabela 4** - Efeitos calculados sobre ΔT (mN/m) do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , com um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). 45
- Tabela 5** - Índice de Emulsificação (E24) e Atividade Emulsificante (AEa/o) para o experimento B1 e para o experimento B2.. 53

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 OBJETIVO GERAL	16
1.1 Objetivos específicos	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Surfactantes	17
2.2 Biossurfactantes.....	19
2.2.1 Produção de biossurfactantes e parâmetros importantes	20
2.2.2 Micro-organismos produtores de biossurfactantes.....	24
2.3 O gênero <i>Pleurotus</i>	26
2.3.1 Cultivo de <i>Pleurotus</i>	28
2.4 Exigências nutricionais de fungos	30
2.5 Resíduos oleosos.....	32
2.5.1. Resíduos industriais	32
2.5.2. Óleo residual de fritura	33
3 METODOLOGIA	35
3.1 Manutenção do micro-organismo.....	35
3.2 Preparo do inóculo	35
3.3 Condução dos experimentos.....	35
3.3.1 Ensaio realizados em frascos agitados	35
3.3.2 Ensaio realizados em biorreator de bancada	37
3.4 Concentração de biomassa micelial.....	38
3.5. Tensão superficial (T)	38
3.6 Índice de Emulsificação (E24) e Atividade Emulsificante (AEa/o)	39
3.7 Extração do biossurfactante	40
3.7.1 Análise da composição química do biossurfactante	40
3.8 Análise Estatística.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Ensaio realizados em frascos agitados	43
4.2 Ensaio realizados em biorreator de bancada	50
4.3 Extração e caracterização dos biossurfactantes	55
CONCLUSÕES	59
PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS	79

INTRODUÇÃO

Todos os dias são descartados indevidamente óleos comestíveis residuais de residências, indústrias e estabelecimentos comerciais, que tem como destino os sistemas de esgoto, causando transtornos na rede de saneamento e poluição dos recursos hídricos (PITTA JUNIOR *et al.*, 2009; BESEN e STRASSBURG, 2011). Além disso, segundo Ferreira e Fernandes (2011), cada litro de óleo que chega na rede de saneamento tem capacidade de poluir cerca de um milhão de litros de água, encarecendo o tratamento de água em até 45%. Isso se deve ao fato de que, quando presente no meio ambiente de forma inadequada, o óleo, que apresenta menor densidade que a água, permanece na superfície, criando uma barreira que dificulta a entrada de luz e a oxigenação, comprometendo assim, a base da cadeia alimentar aquática (ALAMINI, NUNES e BARBADO, 2009).

Esse problema ambiental pode ser minimizado ou até mesmo evitado por meio de uma coleta adequada desse resíduo. O óleo residual de frituras pode ser reutilizado como matéria-prima na fabricação de diversos produtos, tais como biodiesel (COSTA NETO *et al.*, 2000; DIB, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011; BUMBA, OI e YAMAMURA, 2014), desengraxantes (THODE FILHO *et al.*, 2014), sabão e detergentes (COSTA, LOPES e LOPES, 2015), biossurfactantes (THANOMSUB *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2011), entre outros.

Os biossurfactantes são compostos biológicos anfifílicos produzidos extracelularmente ou como parte de membranas celulares de uma variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CHEN, WEI e CHANG, 2007) a partir de várias substâncias, incluindo açúcares, óleos e resíduos (RAHMAN e GAKPE, 2008), cujas propriedades podem possibilitar sua utilização como substituintes dos surfactantes sintéticos.

Algumas características que fazem dos biossurfactantes produtos de grande interesse tecnológico são a elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade (KOSARIC, 1992), elevado poder espumante, alta seletividade e estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e força iônica, além de condições brandas de produção

(ARUTCHELVI *et al.*, 2008). Essas características privilegiam a sua utilização nas áreas biomédicas, de higiene pessoal e cosméticos, de alimentos e de agricultura (BARROS *et al.*, 2007; RODRIGUES, BANAT e OLIVEIRA, 2006; BANAT *et al.*, 2010; NITSCHKE e PASTORE, 2002; ROSENBERG e RON, 1999), assim como em processos de remediação e biorremediação de solos contaminados com petróleo e ou outros tipos de óleos e por metais pesados, (MULLIGAN, 2005, MULLIGAN e WANG, 2006) além de processamento e recuperação de óleos lubrificantes e petróleo (DASTGHEIS *et al.*, 2008).

Atualmente, a grande maioria dos trabalhos publicados sobre produção de biossurfactantes é realizada com bactérias, porém devido a possível natureza patogênica dessas, o uso dos biossurfactantes de origem bacteriana na indústria de alimentos e nas áreas clínica e farmacêutica não são considerados adequados (SHEPHERD *et al.*, 1995 *apud* FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). Outros micro-organismos reportados pelos autores são as leveduras, sendo escassos os trabalhos que empregam fungos filamentosos.

Entre as espécies de leveduras, *Candida* spp. têm sido amplamente utilizada na produção de biossurfactantes a partir de fontes de carbono solúveis e insolúveis (SARUBBO, PORTO e CAMPOS-TAKAKI., 1999; SARUBBO, LUNA e CAMPOS-TAKAKI, 2006; LUNA, SARUBBO e CAMPOS-TAKAKI, 2009; GUSMÃO, RUFINO e SARUBBO, 2010). A presença do biotensioativo em leveduras é observada principalmente durante o crescimento no meio contendo substrato lipídico (DESAI e BANAT, 1997; GUSMÃO, RUFINO e SARUBBO, 2010; LUNA, SARUBBO e CAMPOS-TAKAKI, 2009). Entretanto já existem algumas indicações do uso de outros fungos para essa finalidade como o caso do basidiomiceto *Ustilago maydis* que foi estudado por Spoeckner *et al.* (1999) com produções relevantes de biossurfactante glicolípido, do ascomiceto *Curvularia lunata* que apresentou a produção de um potente emulsificante que foi estudado por Paraszkiwicz, Kanwal e Dlugonski (2002) e *Pseudozyma*, uma levedura heterobasidiomiceto citada por Marchant e Banat (2012).

Dentre os basidiomicetos, os fungos do gênero *Pleurotus* são espécies cosmopolitas, que ocorrem naturalmente em florestas temperadas, subtropicais e tropicais (SOUZA e AGUIAR, 2004) e possuem um complexo enzimático

lignocelulolítico específico, com enzimas como celulases, ligninases, celobiasas, lacases e hemicelulases, que possibilitam a degradação de uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos (RAJARATHNAM, SHASHIREKA e BANO, 1992). Além de possuir propriedades terapêuticas como atividade antitumoral e antimicrobiana (BREENE, 1990), são eficientes em processos de biorremediação de solos (MARQUEZ-ROCHA, RODRIGUEZ e DUHALT, 2000). Estes fungos do gênero *Pleurotus* são cogumelos comestíveis e não apresentam risco de patogenicidade.

Muitos investigadores têm relatado que os ácidos graxos, óleos vegetais e tensoativos promovem a produção de metabólitos fúngicos, bem como, enzimas extracelulares (YANG, KE e KUO, 2000; PARCK *et al.*, 2002; REVERBERI *et al.*, 2004, HESS *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2006).

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). Ambos os cultivos, sólido e submerso, têm sido reportados na produção de biossurfactantes, sendo o segundo mais explorado pelos pesquisadores. Segundo Colla *et al.* (2010) os bioprocessos realizados por meio de cultivo em meio líquido tem uma melhor homogeneidade do meio de cultura e a facilidade de manutenção de parâmetros de processo, como pH, temperatura e transferência de oxigênio.

Para melhorar a eficiência da produção de biossurfactantes por microorganismos, com componentes de baixo custo no meio de cultivo, resíduos agroindustriais devem ser explorados, uma vez que representam cerca de 50% dos custos totais de produção (DANIEL e OTTO, 1999; HABA *et al.*, 2000).

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a potencialidade do fungo *Pleurotus sajor-caju* na produção de biossurfactantes usando óleo de soja como principal fonte de carbono.

1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencialidade do fungo *Pleurotus sajor-caju* na produção de biossurfactantes usando óleo de soja como principal fonte de carbono.

1.1 Objetivos específicos

- Quantificar o efeito da temperatura, pH inicial, concentrações de óleo de soja comercial, glicose, K_2HPO_4 e $(NH_4)_2SO_4$ na produção de biossurfactantes por *Pleurotus sajor-caju* em cultivo submerso (frascos agitados) e estabelecer as condições ideais de processo.
- Avaliar a cinética de crescimento microbiano e produção de biossurfactantes por *Pleurotus sajor-caju* em biorreator de mistura completa de bancada, utilizando as condições ideais estabelecidas nos experimentos anteriores.
- Comparar a produção de biossurfactantes a partir de óleo de soja residual de fritura e de óleo de soja comercial.
- Caracterizar a composição química dos biossurfactantes formado em termos de carboidratos e proteínas; e dos grupos funcionais através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

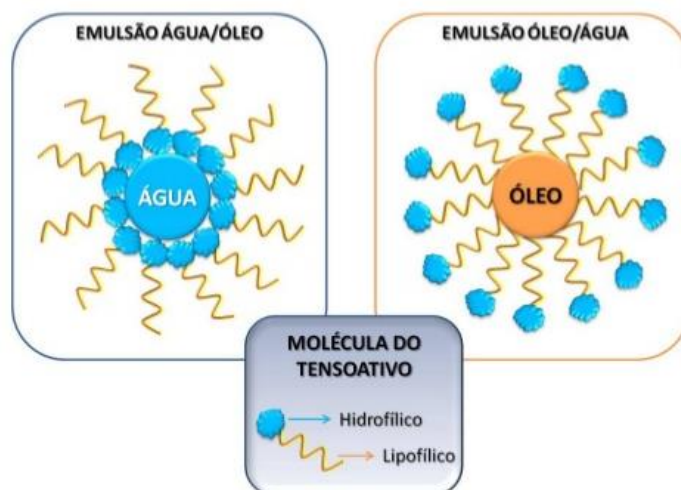
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. As principais características desses compostos são a capacidade de formar agregados micelares a partir de uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC), e reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos, permitindo-lhes se misturar ou dispersar prontamente como emulsão em água ou em outros líquidos. Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos que são aplicados em diversos setores da indústria (BANAT *et al.*, 2000; ALBUQUERQUE, FILETTI e CAMPOS-TAKAKI, 2006).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Essas propriedades conferem aos surfactantes a capacidade de reduzir a tensão interfacial e a tensão superficial através da formação de um filme molecular entre duas fases não miscíveis (Figura 1).

Figura 1 - Esquema da estrutura de micelas água em óleo, óleo em água e a estrutura típica de uma molécula de tensoativo.



Fonte: SARTORI, LOPES e GUARATINI, 2010

Esses compostos podem ainda formar emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou de água em hidrocarbonetos (LIMA, 2007). Além da atividade emulsificante, o uso dos surfactantes é assegurado por outras propriedades, tais como: formação de micelas, formação de macro e microemulsões, adsorção, dispersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou anti-espumante, solubilidade, solubilização, molhabilidade ou detergência (DESAI e BANAT, 1997; NISTCHKE e PASTORE, 2002).

A solubilidade dos surfactantes é responsável por sua adsorção à superfície de líquidos e a formação de micelas, que por sua vez favorece a redução da viscosidade e solubilização de compostos no meio. Entretanto, a adsorção dos surfactantes resulta em molhabilidade, emulsificação, formação de espumas, dispersão de partículas e detergência. Estas propriedades permitem que os surfactantes possam ser aplicados nos mais diferentes setores industriais, tais como: farmacêutico e de cosméticos, alimentício, área clínica, agroindustriais, indústria petroquímica (DESAI e BANAT, 1997; NISTCHKE e PASTORE, 2002).

O mercado mundial de surfactantes rende anualmente 7,1 bilhões de Euros, aumentando a uma taxa de 35% por ano (MARTINS, 2011). A maioria destes compostos são de origem petrolífera (entre 70 a 75%), os quais não são facilmente biodegradáveis e seus processos de fabricação e subprodutos podem ser ambientalmente perigosos.

O custo variável do petróleo, a possibilidade do seu esgotamento, o aumento da consciência ambiental e a rigorosa legislação fizeram a compatibilidade ambiental dos surfactantes um fator importante em várias de suas aplicações e nesse sentido vem estimulando a busca por tecnologias alternativas que possibilitem a produção comercial de agentes tensoativos biodegradáveis (biossurfactantes) a um custo competitivo (MAIER e SOBERON-CHAVEZ, 2000; ALBUQUERQUE, FILETTI e CAMPOS-TAKAKI, 2006; LIMA, 2007).

2.2 Biossurfactantes

Compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, reduzem a tensão superficial e interfacial, além de apresentarem capacidade emulsificante, são conhecidos como biossurfatantes ou biotensoativos (COSTA, NITSCHKE e CONTIERO, 2008).

Surfactantes naturais ou biossurfactantes são sintetizados por uma variedade de organismos vivos, tais como plantas (saponinas), animais (ácidos biliares) e micro-organismos (glicolipídeos) (BOGNOLO, 1999). Os biossurfactantes são produzidos por bactérias, leveduras e fungos e constituem um grupo diversificado de surfactantes que possuem aplicações variadas em setores industriais devido a sua versatilidade funcional (ISHIGAMI e SUZUKI, 1997).

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos incluem glicolipídeos de baixa massa molar, lipopeptídeos e polímeros de alta massa molar contendo lipídeos, tais como lipoproteínas, complexos proteicos e lipopolissacarídeos complexos de polissacarídeo-proteína-ácido graxo (RON e ROSENBERG, 2001). Os biossurfactantes de baixa massa molar apresentam uma maior eficiência em reduzir a tensão superficial e interfacial de meios líquidos, enquanto os surfactantes de alta massa molar demonstram uma maior eficiência em estabilizar emulsões óleo/água (ROSENBERG e RON, 1999).

Kosaric (1992) e Desai e Banat (1997) revisam a classificação dos biossurfactantes quanto a sua natureza química, em moléculas de baixa massa molecular: os glicolipídeos (trealoselipídeos, ramnolipídeos, soforolipídeos), lipopeptídeos (surfactina, gramicidina S e polimixina), os quais são eficientes na diminuição das tensões superficial e interfacial; e moléculas de maior massa molecular como: polissacarídeos, proteínas, lipoproteínas e biopolímeros, como complexos polissacarídeos-lipídeos, os quais são mais eficientes na estabilidade de emulsões, chamados de bioemulsificantes.

A produção das diferentes classes desses compostos, em sua maioria, dependente do tipo de micro-organismo utilizado no processo e do tipo de terminação hidrofílica, tem relação com o tipo de substrato utilizado e condições de processo (FIECHTER, 1992).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, elevada compatibilidade ambiental, biodigestibilidade e efetividade em condições extremas de temperatura, pH e força iônica (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; KOSARIC, 1992; COSTA, NITSCHKE e CONTIERO, 2008).

Entretanto, a vantagem mais importante dos biossurfactantes é a de serem produtos ecologicamente corretos, o que está diretamente relacionada com a sua aceitação pelos consumidores (LIMA, 2007). Estas características permitem a sua utilização na agricultura, cosméticos, produção de petrolífera, lubrificantes, entre outros (COSTA, NITSCHKE e CONTIERO, 2008). Como propriedades funcionais pode-se destacar a atividade emulsificante, molhabilidade, solubilização, emulsificação, inibição a corrosão, complexação de metais e redução da viscosidade de óleos pesados (FIECHTER, 1992).

Esses compostos biotensoativos podem possuir diferentes estruturas químicas e propriedades de superfície, uma vez que podem ser produzidos por uma grande variedade de micro-organismos em diferentes condições nutricionais e ambientais. Com base na diversidade dos biossurfactantes é razoável que apresentem diferentes aplicações específicas permitindo seu uso potencial nos mais variados setores da indústria (ROSENBERG e RON, 1999), como já mencionado.

A atividade do biossurfactante pode ser determinada medindo as alterações na tensão superficial e interfacial, na estabilização ou desestabilização da emulsão, e no equilíbrio hidrofílico-lipofílico. Uma emulsão é formada quando um líquido é disperso como gotículas microscópicas na outra fase contínua de líquido. Biossurfactantes podem estabilizar (emulsificantes) ou desestabilizar (de-emulsificante) a emulsão. A atividade de emulsificação (AE) é denominada pela capacidade do tensoativo para gerar turbidez, como resultado de hidrocarbonetos em suspensão, em um ensaio em sistema aquoso.

2.2.1 Produção de biossurfactantes e parâmetros importantes

Os biossurfactantes geralmente, são produzidos durante crescimento microbiano com adição de hidrocarbonetos, que são geralmente caros e, portanto, aumentam o custo global do processo (ALBUQUERQUE, FILETTI e CAMPOS-TAKAKI, 2006). No entanto, outros substratos mais baratos, solúveis

em água, tais como a glicose e etanol, são por vezes utilizados (DESAI e BANAT, 1997).

Apesar das vantagens apresentadas, os biossurfactantes não são amplamente utilizados pelas indústrias devido ao alto custo de produção, associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros (COSTA, NITSCHKE e CONTIERO, 2008). Uma possível estratégia para reduzir os custos da produção seria o uso de substratos alternativos, como os resíduos agroindustriais ou de indústrias alimentícias, que geralmente contêm altos níveis de carboidratos ou lipídios necessários para a biossíntese de biossurfactantes (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000)

Na busca de matérias-primas mais baratas para a produção de biossurfactante, efluentes industriais têm se mostrado uma boa promessa (DESAI e BANAT, 1997, DANIEL e OTTO, 1999; HABA *et al.*, 2000).

Muitos biossurfactantes e seus processos de produção foram patenteados, mas apenas alguns foram comercializados (DESAI e BANAT, 1997). O processo de fermentação possui a chave para melhorar a economia global do processo de produção de biossurfactante. Desenvolvimentos na área de otimização das condições de fermentação resultaram num aumento significativo de rendimento, tornando-os mais atraente comercialmente (DESAI e BANAT 1997).

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular for mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI e BANAT, 1997).

O tipo, a qualidade e o rendimento da produção de biossurfactantes dependem de vários parâmetros, tais como, pH, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio, aeração e agitação (SAHARAN, SAHU e SHARMA, 2011). As proporções relativas de diferentes elementos com o carbono, tais como C:N (Carbono:Nitrogênio), C:P (Carbono:Fósforo), C:Fe (Carbono:Ferro) ou C:Mg (Carbono:Magnésio) afeta a produção de biossurfactante (AMEZCUA-VEGA, VARALDO e GARCIA, 2007). Para obtenção de grande quantidade de biossurfactantes é de fundamental importância o estudo dos requerimentos

nutricionais do micro-organismo e das condições do processo (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

A fonte de carbono desempenha um papel importante no crescimento, bem como na produção de biosurfactantes pelos vários micro-organismos (BHARDWAJ, CAMEOTRA e CHOPRA, 2013). A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono. Cirigliano e Carmam (1984) mostraram que a levedura *Yarrowia lipolytica* produz biosurfactantes a partir de diferentes fontes de carbono, tais como hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão, sendo que com hexadecano obteve-se maior produção. Sarubbo *et al.* (2001) produziram biosurfactante com elevada atividade de emulsificação utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *Candida lipolytica* IA 1055. Estes autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes.

Apesar da produção de biosurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biosurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados (HOMMEL *et al.*, 1994). Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura. Segundo Fontes, Amaral e Coelho (2008) os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biosurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biosurfactante.

Albrecht *et al.* 1996 (*apud* FONTES, AMARAL e COELHO, 2008) relatam que a fonte de nitrogênio é um fator que influencia a produção de biosurfactantes. Os autores sugerem um mecanismo pelo qual a síntese de biosurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio. Esta condição causa um declínio na atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de NAD⁺ e NADP⁺), enzima responsável pela oxidação do isocitrato a α - cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico. Como o declínio da atividade leva a um acúmulo de isocitrato e subseqüente citrato na mitocôndria, ambos são transportados para dentro do citosol, onde o citrato é clivado pela

citrato sintase, originando acetil-coA, que é o precursor da síntese de ácido graxo aumentando, dessa forma, a produção de biossurfactante.

A fonte de nitrogênio é o segundo mais importante suplemento para a produção de biossurfactantes por micro-organismos. Várias fontes de nitrogênio, orgânicos e inorgânicos, já foram avaliados na produção de biossurfactantes (BHARDWAJ, CAMEOTRA e CHOPRA, 2013).

De acordo com Fontes, Amaral e Coelho (2008) o extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada para a produção de biossurfactantes, mas sua concentração varia de acordo com o micro-organismo e o meio de produção. A produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica* foi avaliada frente a diferentes fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, uréia e nitrato de sódio, e os resultados indicaram que sulfato de amônio e cloreto de amônio foram as fontes de nitrogênio que propiciaram maior atividade de emulsificação, enquanto que quando se utilizou nitrato de amônio e uréia esta atividade foi reduzida à metade (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Cooper e Paddock (1984) estudaram o efeito da fonte de nitrogênio, tais como nitrato de sódio, cloreto de amônio, nitrato de amônio, uréia e extrato de levedura, na produção de biossurfactante por *Torulopsis bombicola* em frascos agitados. Os autores observaram que o nitrato não é uma boa fonte de nitrogênio, pois resultou em redução na produção da biomassa. Já com o extrato de levedura (5 g/L), houve a maior produção de biossurfactante. Quando se substituiu o extrato de levedura por peptona, a concentração obtida de biossurfactante foi reduzida à metade e quando esta foi substituída por uréia a produção de biossurfactante foi muito baixa.

Com o objetivo de otimizar o meio de produção do biossurfactante por *C. lipolytica*, Albuquerque, Filetti e Campos-Takaki (2006) utilizaram um planejamento fatorial para investigar os efeitos e interações das concentrações de uréia, sulfato de amônio, di-hidrogênio fosfato de potássio e óleo de milho na atividade de emulsificação. A presença de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e óleo de milho teve uma influência positiva na atividade de emulsificação. Por outro lado, a uréia teve uma influência negativa.

O planejamento fatorial e análise de superfície de resposta é uma prática geralmente utilizada por diversos pesquisadores para a otimização das condições de cultivo no setor biotecnológico (ALBUQUERQUE, FILETTI e

CAMPOS-TAKAKI, 2006; BURKERT, MAUGERI e RODRIGUES, 2004; LUNA, SARUBBO e CAMPOS-TAKAKI, 2009; LIMA, 2007; SOUSA, 2008).

2.2.2 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Vários micro-organismos possuem capacidade de produzir moléculas com atividade interfacial (DESAI e BANAT 1997). O interesse em identificar e isolar novos micro-organismos produtores de moléculas tensoativas que apresentem boas características surfactantes, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação tem aumentado consideravelmente (ROSENBERG e RON, 1999).

Segundo Cooper e Paddock (1984), um organismo é considerado promissor produtor de biossurfactante quando produz compostos tensoativos com tensão superficial inferior a 40 mN/m. Todavia, para um biossurfactante ser considerado eficiente é necessário que este valor esteja abaixo de 35 mN/m.

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana. As bactérias produtoras mais reportadas são dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008). As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são capazes de sintetizar biossurfatantes conhecidos como ramnolipídios, que estruturalmente são glicolipídios contendo ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (NITSCHKE, COSTA e CONTIERO, 2005).

Chander *et al.* (2012) utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* MTCC 441 em cultivo submerso, com temperatura de 37°C e pH 7, para a produção de biossurfactantes, alcançaram resultados de alta atividade surfactante sobre o óleo de gergelim através do teste de zona de espalhamento e índice de emulsificação relativamente alto (71%).

Grande parte dos biossurfactantes é geralmente produzida quando as culturas microbianas alcançam a fase estacionária de crescimento (RON e ROSENBERG, 2001). Porém, algumas espécies podem apresentar uma pequena produção durante a fase exponencial de crescimento (SARUBBO *et al.*, 2001).

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicação em vários processos industriais. Os biossurfactantes

produzidos por *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *Bacillus subtilis* demonstraram bons resultados na remoção de piche em solos contaminados (BOGNOLO, 1999).

Na agricultura, os biossurfactantes podem ser utilizados na hidrofilição de solos argilosos para a obtenção de boa umidade e distribuição uniforme de fertilizantes (FIECHTER, 1992). Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem as indústrias de papel, têxtil e cerâmica (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua possível natureza patogênica (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Enquanto o campo de produção de biossurfactantes por espécies de bactérias é bem explorada, relativamente poucos fungos filamentosos são conhecidos por produzir biossurfactantes (BHARDWAJ, CAMEOTRA e CHOPRA, 2013). As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificadores.

A produção de um novo biossurfactante em cultivo submerso por *Candida glabrata* UCP1002 foi estudada por Luna, Sarubbo e Campos-Takaki (2009) com o objetivo de avaliar a influência da concentração de óleo de semente de algodão, de glicose e de extrato de levedura. O melhor índice de emulsificação (66% após 96h de fermentação) foi observado pelos autores em meio contendo 7,5% de óleo de semente de algodão, 5% de glicose e 0,3% de extrato de levedura.

Entre as leveduras, espécies de *Candida* (*Yarrowia*) têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes. (CIRIGLIANO e CARMAN, 1984; MARÇAL, 1991; ROCHA 1996; SARUBBO, PORTO e CAMPOS-TAKAKI, 1999; SARUBBO *et al.*, 2001; VANCE-HARROP *et al.*, 1999; VANCE-HARROP, 2000, VANCE-HARROP *et al.*, 2003, ALBUQUERQUE, FILETTI e CAMPOS-TAKAKI, 2006).

Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*generally regarded as safe*) que muitas delas apresentam, como *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Organismos com *status* GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que

permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Dentre os fungos, as espécies *Aspergillus ustus* (KIRAN *et al*, 2009), *Ustilago maydis* (SPOECKNER *et al*, 1999), *Trichosporon ashii* (CHAMDRAN e DAS, 2010), *Curvularia lunata* (PARASZKIEWICZ, KANWAL e DLUGONSKI, 2002) e *Pseudozyma* (MARCHANT e BANAT, 2012) tem sido reportados na literatura como potenciais produtores de biotensioativos. Muitos deles são conhecidos por produzirem biossurfactante com matérias-primas de baixo custo. Os principais biossurfactantes produzidos por estas espécies são os do tipo glicolípídeos (BHARDWAJ, CAMEOTRA e CHOPRA, 2013).

Estudos recentes vêm mostrando um crescente aumento em pesquisa com micro-organismos da classe dos basidiomicetos, que incluem os cogumelos comestíveis, na produção de biossurfactantes. Velioğlu e Öztürk Ürek (2015) estudaram a produção de um biossurfactante por *Pleurotus ostreatus* em fermentação submersa e fermentação em estado sólido, com e sem agitação. A caracterização do biossurfactante através de análises químicas e espectroscopia de infravermelho (FTIR) indicaram a probabilidade da existência de complexos de carbono-peptídeo-lípídeo hidratados nas substâncias biossurfactantes produzidas por *Pleurotus ostreatus*.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2014) investigaram a produção simultânea e econômica de biossurfactantes e enzimas ligninolíticas (lacase, manganês peroxidase, e lignina peroxidase) por *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus sajor-caju* em fermentação em estado sólido em três diferentes meios de cultura. Durante o estudo, a eficiência de espalhamento do óleo, índice de atividades de emulsificação, da tensão superficial, e enzima foram avaliadas. Correlações entre atividades de biossurfactante e enzima foram investigados. Quando FTIR foi usado para confirmar os grupos funcionais, os resultados indicaram uma estrutura complexa de polissacarídeo-proteína-lípídeo para o biossurfactante produzido.

2.3 O gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus*, da classe dos Basidiomicetos, abriga várias espécies sendo todas comestíveis e são conhecidos como cogumelo ostra, devido à sua forma (JOSE e JANARDHANAN, 2000), como mostrado na

Figura 2. No Brasil são também chamados de cogumelo caetetuba, cogumelo gigante ou fungi. Trata-se de uma espécie que ocorre naturalmente em florestas temperadas, subtropicais e tropicais, podendo ser saprófito ou parasita em plantas previamente debilitadas, decompondo madeira e outros resíduos vegetais (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984).

Figura 2 - *Pleurotus sajor-caju* na natureza.



Fonte: LEI, Y., 2015

Juntamente com outros fungos, formam um grupo denominado de “fungos de podridão branca”, por produzirem um micélio branco e degradarem tanto a lignina como a celulose. Para tanto, possuem um complexo enzimático lignocelulotítico único com enzimas como celulase, ligninase, celobiase, lacase e hemicelulase que fazem com que estes fungos degradem uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos e resíduos orgânicos (BONONI e TRUFEM, 1995; ROSADO *et al.*, 2002; BONATTI *et al.*, 2004).

Devido a este complexo enzimático, além da aplicação direta como fonte de alimento de alto valor nutritivo (BONATTI *et al.*, 2004, COGORNI *et al.*, 2014) os fungos do gênero *Pleurotus* podem ser utilizados também em diferentes áreas, como por exemplo, na indústria de fármacos, na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, na degradação de poluentes ambientais e no tratamento de efluentes industriais, sendo capazes, inclusive, de bioacumular metais pesados (MARQUEZ-ROCHA, RODRIGUEZ e DUHALT, 2000).

2.3.1 Cultivo de *Pleurotus*

O tipo de sistema de cultivo de *Pleurotus* depende do produto desejado. O cultivo sólido pode ser utilizado para a produção de corpos frutíferos para fins alimentares (SILVEIRA, 2003; RAGUNATHAN e SWAMINATHAN, 2003; BONATTI *et al.*, 2004; SHASHIREKHA, RAJARATHNAM e BANO, 2005; HOLTZ *et al.*, 2009; RAMPINELLI *et al.*, 2010; COGORNI *et al.*, 2014), para a extração de enzimas como celulases e xilanases (GHOSH, MUKHERERE e NANDI, 1998; TSIKLARI *et al.*, 1999; ALEXANDRINO *et al.*, 2007), para extração de princípios terapêuticos (LAVI *et al.*, 2006; AJITH e JANARDHANAN, 2003; MORADALI *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2008; TONG *et al.*, 2009; DALONSO *et al.*, 2010; DE BARBA, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG e CHEUNG, 2011) e para a bioconversão de resíduos lignocelulósicos de um modo geral (THOMAS *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2007; SALES-CAMPOS *et al.*, 2010).

O gênero *Pleurotus* cresce em uma ampla variedade de resíduos agro-florestais, sem a necessidade de uma fermentação prévia do substrato, tais como serragem, papel, palhas de cereais, bagaço de cana de açúcar, milho, folhas de bananeira, resíduo de café, resíduo de agave, polpa de soja, etc. (BANO, RAJARATHNAM e STEINKRAUS, 1988).

A produção de *Pleurotus* em cultivo sólido envolve duas fases distintas, sendo a primeira caracterizada pelo crescimento micelial, por meio de divisão celular. Este período é de 20 a 30 dias e deve acontecer sem iluminação. Após a colonização do substrato pelo micélio fúngico e em função da presença de luz, maior aeração e às vezes choque térmico, ocorre a indução dos primórdios frutíferos, que são pequenas saliências de cerca de um milímetro, que em 3 a 4 dias formam os basidiomas que podem ser colhidos (MADAN, VASUDEVAN e SHARMA, 1987).

Outro tipo de cultivo destes fungos é em meio líquido. Este processo vem sendo estudado com o objetivo de utilizar o caldo de cultivo e biomassa de *Pleurotus* para a extração de substâncias com propriedades terapêuticas (WISBECK, ROBERT e FURLAN, 2002; ROSADO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004a; ZHANG *et al.*, 2004b; WANG *et al.*, 2005; TAO, ZHANG e ZHANG, 2009; LI *et al.*, 2008; WOLFF *et al.*, 2008; DALONSO *et al.*, 2010), produção de enzimas (PATRICK *et al.*, 2011; DÍAZ *et al.*, 2013; CHOWDHURY *et al.*, 2014;

KACHLISHVILI *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2014; QUEVEDO-HIDALGO *et al.*, 2015;) e mais recentemente, estudos sobre o potencial de produção de biossurfactantes (VELIOĞLU e ÖZTÜRK ÜREK, 2015; VELIOĞLU e ÖZTÜRK ÜREK, 2014).

No cultivo submerso, o estágio de frutificação não ocorre, mas a biomassa e as substâncias produzidas podem ser recuperadas. Além disso, a biomassa produzida pode ser diretamente utilizada como inóculo em novos processos produtivos, como fonte para a produção de metabólitos intermediários, como complemento alimentar ou em alimentos enriquecidos e para extração de aromas e sabores (MAZIERO, CAVAZZONI e BONOMI, 1999; SILVEIRA, 2003; ROSADO *et al.*, 2003).

Reverberi *et al.* (2004) observaram um aumento na produção de biomassa de basidiomicetos quando lipídeos foram adicionados a um meio de cultivo composto por extrato de malte. Hess *et al.* (2006) ao cultivarem *Pleurotus ostreatus* em meio de cultivo à base de extrato de malte adicionado de óleo de soja, óleo de oliva e ácido oléico em diferentes concentrações, observaram que dentre os meios testados, o meio contendo 10 g/L de óleo de soja teve a melhor produção de biomassa e polissacarídeos intra e extracelulares (22,86 g/L, 10,71 mg/g e 0,84 g/L, respectivamente). No entanto o aumento dessa concentração para 20 g/L de óleo de soja e o cultivo utilizando 10 g/L de óleo de oliva resultou na inibição do crescimento de *P. ostreatus*. De acordo com Yang, Ke e Kuo (2000), concentrações elevadas de óleos vegetais podem causar efeito inibitório no crescimento de alguns fungos.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2015) avaliaram a produção de biossurfactante durante 20 dias em cultivo submerso por *Pleurotus ostreatus* em meio mineral rico para basidiomicetos (pH 6.0; 0,724 g/L NH₄NO₃; 1,0 g/L de KH₂PO₄; 1,0 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,5 g/L de KCl; 0,5 g/L de extrato de levedura; 0,001 g/L de FeSO₄.7H₂O; 0.0028g/L de ZnSO₄.7H₂O; 0.033 g/L de CaCl₂.2H₂O, 10 g/L de peptona) acrescido de 10 g/L de glicose e 10 mL/L de óleo de semente de girassol. Os autores obtiveram valores para de tensão superficial de 40,7 ± 0,9 mN/m.

Embora muitos investigadores relataram resultados positivos em relação ao crescimento micelial de basidiomicetos, que empregam vários óleos vegetais, emulsificantes e ácidos graxos, ainda falta conhecimento sobre o efeito

estimulador desses ingredientes em processos fermentativos (PARCK *et al.*, 2002), principalmente na produção de biossurfactantes.

2.4 Exigências nutricionais de fungos

Fungos têm necessidades nutricionais relativamente simples e a maioria das espécies seria capaz de sobreviver bem em condições aeróbias se fornecido glicose, sais de amônio, íons inorgânicos e alguns fatores de crescimento (WALKER e WHITE, 2005). No Quadro 1 estão apresentados nutrientes necessários e suas respectivas funções para as células fúngicas.

Por serem quimiorganotróficos, necessitam de compostos orgânicos como fonte de carbono e energia. Os açúcares são amplamente utilizados para o crescimento dos fungos, podendo variar de monossacarídeos (glicose, galactose, frutose, manose) a polissacarídeos (celulose, hemicelulose, quitina, inulina etc). Não são fixadores do nitrogênio e, portanto, há necessidade de se fornecer compostos contendo nitrogênio, tanto na forma inorgânica como orgânica. Geralmente, o sulfato de amônio é utilizado como fonte de nitrogênio em meio de cultivo para fungos (WALKER e WHITE, 2005).

O fósforo é essencial para a biossíntese de ácidos nucleicos fúngicos, fosfolípidos, ATP e glicofosfatos. A disponibilidade de nitrogênio e fósforo pode ser um fator limitante do crescimento na natureza. Os fungos filamentosos têm evoluído certas estratégias bioquímicas e morfológicas, as quais vem permitindo a captura de quantidades de fósforo pouco disponíveis dentro do ambiente natural (WALKER e WHITE, 2005).

Diferentes quantidades de minerais, tais como, potássio, magnésio e diversos elementos traço são necessários para o crescimento dos fungos. K e Mg são macroelementos necessários em concentrações milimolares enquanto que outros microelementos (oligoelementos) são geralmente necessários na concentração micromolar. Entre eles estão o Mn, Ca Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Mo (WALKER e WHITE, 2005).

Quadro 1 - Macro e micronutrientes requeridos pelas células fúngicas

Elementos	Fontes	Função celular
Carbono	Açúcares	Elemento estrutural da célula fúngica em combinação com oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. Fonte de energia.
Hidrogênio	Prótons de ambientes ácidos	Transmembrana - força motriz fundamental para a nutrição de fungos. Intracelular - pH ácido (em torno de 5-6) necessários para metabolismo de fungos.
Oxigênio	Ar, O ₂	Substrato para respiração e outras funções oxidativas. Essencial para síntese de ácidos graxos insaturados e ergosterol.
Nitrogênio	Sais NH ⁴⁺ , uréia, aminoácidos.	Estrutural e funcionalmente como nitrogênio orgânico de aminoácidos, proteínas e enzimas.
Fósforo	Fosfatos	Transdução de energia, formação de ácidos nucléicos e estrutura da membrana.
Potássio	Sais K ⁺	Balanço iônico, cofator enzimático.
Magnésio	Sais Mg ²⁺	Cofator enzimático, estrutura celular e organelas.
Enxofre	Sulfatos, metionina	Aminoácidos sulfurados e vitaminas.
Cálcio	Sais Ca ²⁺	Possível segundo mensageiro nos sinais de transdução.
Cobre	Sais cúpricos	Pigmentos Redox.
Ferro	Fe ³⁺	Proteína Heme, Citocromo.
Manganês	Sais Mn ²⁺	Cofator enzimático.
Zinco	Sais Zn ²⁺	Cofator enzimático.
Níquel	Sais Ni ²⁺	Cofator da enzima urease.
Molibdênio	Na ₂ MoO ₄	Metabolismo do nitrato, vitamina B ₁₂ .

Fonte: WALKER e WHITE, 2005

2.5 Resíduos oleosos

2.5.1. Resíduos industriais

A produção mundial de óleos e gorduras é de cerca de 2,5 – 30 milhões de toneladas, dos quais 75% é derivado de plantas (HABA *et al.*, 2000). A maioria dos óleos e gorduras é utilizada na indústria de alimentos, o que gera grandes quantidades de resíduos. Podemos citar como exemplo de resíduos, sebo, banha, óleos marinhos ou estoque de sabão e ácidos graxos livres a partir da extração de óleos de sementes (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

O aproveitamento integrado de resíduos gerados na indústria alimentícia pode evitar o encaminhamento destes a aterros sanitários, permitindo o estabelecimento de novas alternativas empresariais minimizando o impacto ambiental do acúmulo destes resíduos (COSTA NETO *et al.*, 2000).

Entretanto, segundo Ferreira e Fernandes (2011) a maior parte deste resíduo ainda é descartada na rede de esgotos, sendo considerado um crime ambiental inadmissível. A pequena solubilidade dos óleos vegetais na água constitui um fator negativo no que se refere à sua degradação em unidades de tratamento de despejos por processos biológicos e, quando presentes em mananciais utilizados para abastecimento público, causam problemas no tratamento da água (FERREIRA e FERNANDES, 2011).

A presença deste material, além de acarretar problemas de origem estética, diminui a área de contato entre a superfície da água e o ar atmosférico impedindo a transferência do oxigênio da atmosfera para a água e, os óleos e graxas em seu processo de decomposição, reduzem o oxigênio dissolvido elevando a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), causando alterações no ecossistema aquático (DABDOUB, 2006).

Como a eliminação desse tipo de resíduo é um problema crescente, verifica-se um aumento no número de estudos que buscam usos alternativos, como a produção de biodiesel por transesterificação do óleo de fritura (COSTA NETO *et al.*, 2000) e o aumento do interesse na utilização de resíduos na transformação microbiana (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002).

Na região Nordeste do Brasil há uma grande quantidade de resíduos graxos (1.890 toneladas/ano) provenientes de refinarias de óleo vegetal que poderiam ser usados, com um grande potencial comercial, como fonte de

carbono em processos biotecnológicos (MIRANDA, SALGUEIRO e PIMENTEL, 1999; ASSUNÇÃO *et al.*, 2010).

2.5.2. Óleo residual de fritura

A reutilização de óleos vegetais residuais de processos de frituras de alimentos tem se mostrado atraente para a produção de biossurfactantes, pois, o reaproveitamento do óleo vegetal como fonte de carbono para as transformações microbianas após a sua utilização na cadeia alimentar resulta numa destinação alternativa a um resíduo de alimentos (MIELKE, 1992 *apud* LIMA, 2007).

A maior parte dos relatos encontrados na literatura sobre a utilização de produtos ou subprodutos agroindustriais, está relacionada a produtos puros como carboidratos e óleos vegetais (LIMA, 2007). No entanto, pouco se tem publicado sobre a utilização de resíduos hidrofóbicos de frituras de alimentos provenientes de óleos vegetais (BENICASA *et al.*, 2002). Podemos citar como exemplo de reúso desse tipo de resíduo, com valor agregado, a utilização de óleo de soja de fritura para produção de biodiesel através de transesterificação via catálise básica homogênea, proposto por Ferreira e Fernandes (2011), onde foram obtidos teores de éster acima de 80%.

A economia é frequentemente o maior desafio nos processos biotecnológicos, e não é diferente para a produção de biossurfactantes. O sucesso para a produção de biossurfactante depende do desenvolvimento de processos mais baratos e a utilização de matéria prima de baixo custo, as quais, não devem ultrapassar 10 a 30% dos custos do produto final (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

Thanomsub *et al.* (2004) utilizaram como fonte de carbono o óleo de soja, proveniente de fritura, para produção de um biossurfactante glicolipídico a partir de *Candida ishwadae*. Segundo os autores este biossurfactante exibiu alta atividade surfactante, no entanto, estes dados não foram publicados.

Souza Sobrinho (2007) estudou a possibilidade de co-utilização de dois resíduos industriais, a milhocina e resíduo de refinaria de óleo vegetal de soja como nutriente de baixo custo para produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. Neste estudo obteve resultados de redução de tensão superficial do meio para 26mN/m, com rendimento de 4,5 g/L em biossurfactante isolado após

144 h de cultivo em presença de 5,0% de resíduo oleoso e 2,5% de milhocina. Esse biossurfactante foi caracterizado como um glicolípido composto por 75% lipídeos e 25% carboidratos.

Zheng *et al.* (2011) estudaram a utilização de substratos renováveis e de baixo custo na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* DG30 e sua aplicação na indústria de petróleo. *Pseudomonas aeruginosa* DG30 cresceu em meio contendo 5% (m/v) de óleo vegetal usado e acumulou 15,56 g/L de biossurfactante em 72 h de cultivo.

3 METODOLOGIA

3.1 Manutenção do micro-organismo

A espécie *Pleurotus sajor-caju* obtida da Coleção de Culturas de Basidiomicetos do Instituto de Botânica (São Paulo/SP) sob o código CCB 019 foi mantido em meio YMA em placas de Petri contendo (m/v): 0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1% de glicose e 2% de ágar. As placas foram mantidas a 4 °C e a reativação do micro-organismo foram realizadas mensalmente (RUFINO *et al.*, 2011, RUFINO *et al.*, 2008).

3.2 Preparo do inóculo

Para os experimentos em frascos agitados os inóculos foram preparados em frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio YMB (0,3% de extrato de levedura, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 1% de glicose e água, percentuais em m/v) (RUFINO *et al.*, 2011). O meio foi esterilizado a 120 °C por 15 min e inoculado com dois discos de 9 mm de diâmetro de ágar contendo o micélio fúngico da cultura de manutenção. Os frascos foram, então, mantidos a 30 °C sob agitação recíproca de 120 min⁻¹ durante 7 dias (HESS *et al.*, 2006).

Para os experimentos em biorreator de mistura completa, o inóculo foi preparado em frasco de 2 L, da marca DURAN, contendo 400 mL de meio YMB esterilizado a 120 °C por 15 min. O frasco foi inoculado com micélio de 7 dias, contido em uma placa de Petri. Após a inoculação, o frasco foi incubado a 30 °C e mantido sob agitação recíproca de 105 min⁻¹, por sete dias. A fração de inóculo utilizada foi de 10%, ou seja, 400 mL para um volume final de 4 L (WISBECK, 2003).

3.3 Condução dos experimentos

3.3.1 Ensaio realizados em frascos agitados

Para o estudo da avaliação da produção de biossurfactantes por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019 foi utilizado um planejamento fatorial fracionário 2⁶⁻², com triplicata ponto central, variando-se a temperatura (°C), pH inicial, concentração de óleo de soja, de glicose, de K₂HPO₄ (%) e de (NH₄)₂SO₄ (%), totalizando 19

experimentos, como descrito na Tabela 1. Cada experimento foi realizado em duplicata.

Para os experimentos foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo meio YMB sem glicose e os outros nutrientes de acordo com a Tabela 1 e inoculados com 10% (v/v) de inóculo previamente descrito no item 3.2., totalizando 100 mL de meio de cultivo em cada frasco.

Tabela 1 - Planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com ponto central para os experimentos utilizando *Pleurotus sajor-caju*. Os índices (-1) e (+1) indicam o nível de cada variável como inferior e superior, respectivamente. Utilizando replicatas do ponto central.

Variável	Nível	
	-1	+1
Temperatura (°C)	26	34
pH inicial	3	6
Óleo de soja (% v/v)	5	10
Glicose (% m/v)	0	2
K ₂ HPO ₄ (% m/v)	0,6	3
(NH ₄) ₂ SO ₄ (% m/v)	0,5	3,5

Os meios de cultivo foram preparados de acordo com o planejamento experimental detalhado na Tabela 2, onde o meio base YMB foi baseado em Rufino *et al.* (2011); as concentrações de glicose, K₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄ baseadas em Albuquerque, Filetti e Campos-Takaki (2006); e a concentração de óleo de soja baseado em Hess *et al.* (2006).

Os componentes de cada meio foram dissolvidos em água destilada. O pH inicial foi ajustado com HCl 1M ou NaOH 1M para 3,0; 4,5 ou 6,0 de acordo com o experimento (Tabela 2). Os frascos foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

A fim de avaliar a variação da tensão superficial, amostras foram retiradas no tempo inicial (T_i) e no tempo final após 14 dias (T_f). As amostras foram filtradas a vácuo em papel Whatman nº 1 para a separação da biomassa fúngica e o caldo de cultivo foi congelado e utilizado posteriormente para a análise da tensão superficial. A variação da tensão superficial (ΔT) (item 3.5) do caldo de cultivo foi utilizada como medida indireta para avaliação da formação de biossurfactantes.

Tabela 2 - Detalhamento do planejamento fracionário 2⁶⁻² com triplicata do ponto central.

Experimento	Temp. (°C)	pH inicial	Óleo de soja (% v/v)	Glicose (% m/v)	K ₂ HPO ₄ (% m/v)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (% m/v)
1	26	3	5	0	0,6	0,5
2	34	3	5	0	3	0,5
3	26	6	5	0	3	3,5
4	34	6	5	0	0,6	3,5
5	26	3	10	0	3	3,5
6	34	3	10	0	0,6	3,5
7	26	6	10	0	0,6	0,5
8	34	6	10	0	3	0,5
9	26	3	5	2	0,6	3,5
10	34	3	5	2	3	3,5
11	26	6	5	2	3	0,5
12	34	6	5	2	0,6	0,5
13	26	3	10	2	3	0,5
14	34	3	10	2	0,6	0,5
15	26	6	10	2	0,6	3,5
16	34	6	10	2	3	3,5
17	30	4,5	7,5	1	1,8	2
18	30	4,5	7,5	1	1,8	2
19	30	4,5	7,5	1	1,8	2

3.3.2 Ensaio realizados em biorreator de bancada

A partir dos resultados obtidos dos experimentos em frascos agitados (item 3.3.1) foi definida, dentre as condições testadas, a melhor condição de cultivo para o *Pleurotus sajor-caju* em termos de redução da tensão superficial (**RT**) do caldo de cultivo e esta condição foi utilizada em biorreator.

Os cultivos foram realizados em duplicata, em regime descontínuo, em reator de mistura completa modelo B. BRAUN, com volume útil de 5,0 L e volume de trabalho de 4,0 L. O pH foi ajustado pela adição de soluções HCl 6M ou NaOH 6M, tendo acoplado ao biorreator um sensor de pH modelo 405/DPAS-K8S/325, INGOLD ELECTRODES.

A temperatura foi controlada automaticamente em 34 °C tendo acoplado no biorreator um sensor de temperatura (modelo PT 100, B.BRAUN). A vazão de ar foi mantida em 0,25 L/min e a frequência de agitação fixada em 300 min⁻¹, conforme Wisbeck (2003).

Foram conduzidos dois experimentos, um com óleo de soja comercial (B1) e outro com óleo de soja residual de fritura (B2). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Foram retiradas cerca de 50 mL de amostra (a cada 48 horas) para análise da concentração de biomassa e tensão superficial.

A biomassa micelial foi separada por filtração à vácuo em papel Whatman nº1. O caldo de cultivo livre da biomassa micelial foi deixado em repouso em um copo de Bécker por aproximadamente 20 minutos, a fim de separar o óleo que passou pela filtração, que foi removido com o auxílio de uma pipeta e de papel absorvente. Este caldo de cultivo sem óleo foi congelado em tubos Falcon, até a realização da análise de tensão superficial e atividade emulsificante. A remoção do óleo remanescente é necessária, pois para a análise da tensão superficial o óleo é interferente.

3.4 Concentração de biomassa micelial

A concentração da biomassa micelial foi determinada pelo método gravimétrico como segue: a biomassa micelial foi separada por filtração à vácuo em papel Whatman nº1, lavada com água destilada até a retirada total do óleo remanescente e transferida a cadinhos previamente pesados. A secagem deu-se a 105 °C até massa constante. A massa obtida foi dividida pelo volume da amostra, expressando-se assim a concentração celular em g/L.

3.5. Tensão superficial (**T**)

As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. A tensão superficial foi determinada em um Tensiômetro Interfacial KRÜSS K8, por meio do sistema de medidas com anel de platina Du Nouy, a 25°C, em triplicata, pelo laboratório de Alta tensão da Furb – Universidade Regional de Blumenau.

Uma estimativa da formação de biossurfactantes foi determinada pela variação da tensão superficial (ΔT) do meio de cultivo no tempo inicial (T_i) e a tensão superficial do caldo de cultivo no tempo final (T_f) (Equação 1) e pela redução da tensão superficial (RT) (Equação 2).

$$\Delta T \text{ (mN/m)} = (T_i - T_f) \quad (1)$$

$$RT (\%) = \frac{(T_i - T_f)}{T_i} * 100 \quad (2)$$

Onde: T_i (mN/m) é a tensão superficial do meio de cultivo no tempo inicial e T_f (mN/m) é a tensão superficial do caldo de cultivo no tempo final, sem a biomassa micelial.

3.6 Índice de Emulsificação (E_{24}) e Atividade Emulsificante ($AE_{a/o}$)

Nos ensaios em biorreator, as amostras de maior RT (%) foram submetidas às análises de E_{24} e $AE_{a/o}$.

Em um tubo de ensaio foram colocados 3,5 mL de amostra (previamente descongelada à temperatura ambiente e devidamente diluída) e 2,0 mL de óleo de soja e misturados em agitador tipo vórtex a 700 min^{-1} por 1 min. Após 24 h em repouso foi realizada a leitura da altura (mm) da emulsão água/óleo formada e da altura total.

O índice de emulsificação (E_{24} - %) é definido como a relação centesimal entre a altura da emulsão e a altura total de acordo com a Equação 3 (PINTO, MARTINS e COSTA, 2009).

$$E_{24(\text{amostra})} = \left(\frac{A_{\text{emulsão}}}{A_{\text{total}}} \right) * 100 \quad (3)$$

Onde:

$E_{24(\text{amostra})}$ = índice de emulsificação (%) ou relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total, utilizando amostra;

$A_{\text{emulsão}}$ = altura (mm) da emulsão;

A_{total} = altura (mm) total (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo).

A atividade emulsificante água em óleo ($AE_{a/o}$) é definida como a quantidade de biossurfactante necessária para manter a emulsão estável por 24 h, conforme a Equação 4 (PINTO, MARTINS e COSTA, 2009).

$$AE_{a/o} = (E_{24(\text{amostra})} - E_{24(\text{branco})}) * D \quad (4)$$

Onde:

$AE_{a/o}$ = atividade emulsificante água em óleo (UE);

$E_{24(\text{branco})}$ = relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total, utilizando água em vez de amostra;

D = diluição da amostra.

3.7 Extração do biossurfactante

Após o cultivo, a biomassa fúngica foi separada por filtração à vácuo, e o sobrenadante obtido foi acidificado até pH 2,0 usando-se HCl 6M, e foi mantido a 4 °C durante 12 h e centrifugado (6000 min⁻¹; 30 min, 4°C). O álcool (isopropanol) foi utilizado no sobrenadante para a precipitação do biossurfactante até a exaustão (JAIN *et al.*, 2012, modificado), estipulado 20 dias como tempo de exaustão. O precipitado resultante foi recolhido por centrifugação a 6000 min⁻¹, a 4 °C durante 30 min. O sobrenadante foi removido e 10 mL de clorofórmio e metanol (2:1, v/v) foi adicionado ao precipitado seguido de agitação rotativa a 200 min⁻¹, 30 °C durante 20 min. A mistura foi deixada em repouso para decantação, o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e o precipitado foi deixado em temperatura ambiente para evaporação do solvente e em seguida foi liofilizado (CHANDER *et al.*, 2012, modificado).

Foi realizado também o procedimento de extração no meio de cultura no tempo inicial, sem inoculação, para usá-lo como branco nas análises químicas e de grupos funcionais por FTIR.

A análise da tensão superficial foi realizada em uma solução com concentração de 1 g/L dos biossurfactantes extraídos para comparação com a tensão superficial da água destilada (72 mN/m) e verificar a redução da tensão superficial (RT).

3.7.1 Análise da composição química do biossurfactante

Após o processo de extração, a composição química do biossurfactante bruto foi determinada em termos de proteína (LOWRY *et al.*, 1951) e carboidrato total (DUBOIS *et al.*, 1956).

3.7.1.1 Proteína

O método de Folin-Lowry possui uma sensibilidade analítica de 0,1 a 0,3 mg/mL. Em condições alcalinas o íon de cobre divalente é capaz de formar um complexo com as ligações peptídicas, sendo reduzido ao íon monovalente (reação do biureto). O íon de cobre monovalente conjuntamente às cadeias laterais de alguns aminoácidos da proteína (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) levam à redução dos componentes ácidos presentes no reagente de Folin amplificando a coloração primeiramente obtida pela reação do biureto. Neste método a absorção máxima ocorre de 650 a 750 nm de comprimento de onda (MORAES, *et al.*, 2013). O procedimento completo é descrito a seguir:

- Em um tubo de ensaio foi adicionado 10 μ L de amostra, 190 μ L de água deionizada e 1 mL de solução do Reativo C (Anexo 1). Agitou-se e após 10 minutos adicionou-se 100 μ L de Reagente de Folin em todos os tubos. Agitou-se novamente. Colocou-se os tubos em ambiente escuro e após 20 minutos leu-se a absorbância em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1601PC) a 650 nm.
- para o preparo da curva padrão, foi substituída a amostra por soluções padrões de albumina bovina variando de 0,05 a 0,4 g/L; o equipamento foi zerado (ABS650=0) com uma solução na qual a amostra foi substituída por água deionizada.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, construiu-se uma curva de calibração cuja equação calculada por regressão linear permite calcular a concentração de proteínas totais nas amostras (Anexo 2).

3.7.1.2 Carboidrato total

O método fenol-sulfúrico baseia-se no fato de que os ácidos fortes (ácido sulfúrico) desidratam os glicídios, dando origem a aldeídos cíclicos (furfural ou derivados) que podem combinar-se com diversos fenóis formando compostos corados, cuja coloração é diretamente proporcional à concentração de açúcares solúveis no meio reativo (REMIÃO *et al.*, 2003). O procedimento completo é descrito a seguir:

- Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL da amostra a ser analisada devidamente diluída, 0,5 mL de uma solução de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, deixou-se reagir por 20 min em temperatura entre 25 e 30°C. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (LBK Biochrom Novaspec II), a 490 nm;
- Para o preparo da curva padrão, foi substituída a amostra por 0,5 mL de soluções padrão de glicose com concentrações variando de 0,001 a 0,1 g/L; o equipamento foi zerado ($ABS_{490}=0$) com uma solução na qual a amostra foi substituída por água deionizada.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, construiu-se uma curva de calibração cuja equação calculada por regressão linear permite calcular a concentração de açúcares totais nas amostras (Anexo 3).

3.7.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram registrados num espectrômetro PerkinElmer FTIR - FROMTIER na região espectral de 4000-400 cm^{-1} . O biossurfactante extraído e seco foi analisado e uma pastilha de KBr foi utilizada como referência de fundo.

3.8 Análise Estatística

Para a análise do planejamento fatorial foi utilizada a análise de variância por ANOVA e a análise de Pareto (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 1996) que permite a identificação e quantificação do efeito de cada um dos fatores e de suas interações nos experimentos realizados, sendo avaliada como resposta a diferença da tensão superficial (ΔT). O software Statistica® versão 12.0 (Statsoft Inc., USA) foi utilizado. Os resultados em triplicata da tensão superficial, do índice de emulsificação (E_{24}) e da atividade emulsificante ($AE_{a/o}$) dos ensaios em biorreator, foram submetidos à análise de variância dos valores médios das amostras, através do Teste de Tukey com nível de significância de 5% (ANOVA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios realizados em frascos agitados

Na Tabela 3 estão apresentados o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} detalhado e os resultados de T_i (mN/m), T_f (mN/m) e ΔT (mN/m) para cada experimento do planejamento fatorial 2^{6-2} . Observam-se valores positivos e negativos de ΔT que caracterizam cultivos que apresentaram queda e aumento da tensão superficial, respectivamente. Cabe lembrar que uma das principais características de um biossurfactante é reduzir a tensão superficial de líquidos (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; ALBUQUERQUE, FILETTI e CAMPOS-TAKAKI, 2006).

Na Tabela 3, pode-se observar que todos os experimentos realizados em pH 6,0 (3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 e 16) não apresentaram variação positiva da tensão superficial (ΔT), indicando que a provável formação de biossurfactantes, por fungos, se dá em pH mais ácido.

Bednarski *et al.* (2004) estudou a síntese de glicolipídeos por *Candida antarctica* e *Candida apícola* e verificou que mantendo o pH do meio em 5,5 obtiveram maior produção de glicolipídeos. Contudo, quando não ajustaram o pH no meio de cultura, um efeito negativo na eficiência de síntese foi obtido.

Um efeito similar foi observado por Luna *et al.*, (2005) *apud* Fontes, amaral e Coelho (2008) na produção de glicolipídeos por *Candida antarctica*, em processo de batelada alimentada. O melhor rendimento da produção foi com pH mantido em 4, sendo significativamente melhor quando comparado com a fermentação sem o controle do pH.

Tabela 3 - Detalhamento do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} variando-se a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), o pH inicial, a concentração de óleo de soja, de glicose, de K_2HPO_4 e de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%) e valores de T_i (Tensão superficial inicial), T_f (Tensão superficial final) e ΔT (mN/m).

Experimento	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	pH inicial	Óleo de soja (% v/v)	Glicose (% m/v)	K_2HPO_4 (% m/v)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% m/v)	$T_i \pm \text{desvio}$ (mN/m)	$T_f \pm \text{desvio}$ (mN/m)	ΔT (mN/m)
1	26	3	5	0	0,6	0,5	$45,53 \pm 0,1527$	$42,07 \pm 0,0577$	3,46
2	34	3	5	0	3	0,5	$45,57 \pm 0,1155$	$43,83 \pm 0,1527$	1,74
3	26	6	5	0	3	3,5	$34,30 \pm 0,2000$	$36,47 \pm 0,3786$	-2,17
4	34	6	5	0	0,6	3,5	$39,53 \pm 0,1155$	$40,57 \pm 0,2082$	-1,04
5	26	3	10	0	3	3,5	$44,93 \pm 0,1155$	$42,17 \pm 0,3214$	2,76
6	34	3	10	0	0,6	3,5	$36,87 \pm 0,1155$	$30,67 \pm 0,3786$	6,20
7	26	6	10	0	0,6	0,5	$32,97 \pm 0,2517$	$38,83 \pm 0,2082$	-5,86
8	34	6	10	0	3	0,5	$33,10 \pm 0,1000$	$36,03 \pm 0,0577$	-2,93
9	26	3	5	2	0,6	3,5	$37,97 \pm 0,2082$	$40,00 \pm 0,0000$	-2,03
10	34	3	5	2	3	3,5	$43,73 \pm 0,4163$	$44,10 \pm 0,1000$	-0,37
11	26	6	5	2	3	0,5	$37,80 \pm 0,2646$	$44,13 \pm 0,0577$	-6,33
12	34	6	5	2	0,6	0,5	$36,93 \pm 0,1155$	$42,20 \pm 0,3000$	-5,27
13	26	3	10	2	3	0,5	$40,03 \pm 0,1155$	$40,13 \pm 0,2082$	-0,10
14	34	3	10	2	0,6	0,5	$38,47 \pm 0,0577$	$43,70 \pm 0,1032$	-5,23
15	26	6	10	2	0,6	3,5	$35,00 \pm 0,2000$	$35,60 \pm 0,2646$	-0,6
16	34	6	10	2	3	3,5	$32,97 \pm 0,1155$	$35,20 \pm 0,1000$	-2,23
17	30	4,5	7,5	1	1,8	2	$43,67 \pm 0,1527$	$37,53 \pm 0,1527$	6,14
18	30	4,5	7,5	1	1,8	2	$44,23 \pm 0,2517$	$37,00 \pm 0,1000$	7,23
19	30	4,5	7,5	1	1,8	2	$43,95 \pm 0,1509$	$37,26 \pm 0,1127$	6,69

Ainda, observa-se que os experimentos 9, 10, 13 e 14, apesar de serem conduzidos em pH 3,0, também não apresentaram variação positiva da tensão superficial (ΔT) (Tabela 3). No entanto, estes experimentos utilizaram além do óleo de soja, glicose como fonte de carbono. Isto pode ter inibido a formação de biossurfactantes. Zinjarde e Pant (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fontes de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C10 – C18) os autores detectaram a produção de bioemulsificante.

Com os dados de ΔT (mN/m) da Tabela 3 foram calculados os efeitos das variáveis, apresentados na Tabela 4. Um efeito positivo significa que o valor da variável aumenta na direção do nível superior e um efeito negativo que o valor da variável aumenta na direção do nível inferior.

Tabela 4 - Efeitos calculados sobre ΔT (mN/m) do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , com um nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

Variáveis	Efeitos \pm erro padrão	
	ΔT (mN/m)	p
(1) Temperatura ($^{\circ}C$)	0,2167 \pm 0,2733	0,5110
(2) pH inicial	-4,1083 \pm 0,2733*	0,0044
(3) Óleo de soja (%)	0,5000 \pm 0,2733	0,2088
(4) Glicose (%)	-3,0417 \pm 0,2733*	0,0079
(5) K_2HPO_4 (%)	0,0917 \pm 0,2733	0,7692
(6) $(NH_4)_2SO_4$ (%)	2,6333 \pm 0,2733*	0,0106
Interação entre (1) e (2)	0,6583 \pm 0,2733	0,1376
Interação entre (1) e (3)	-0,3167 \pm 0,2733	0,3663
Interação entre (1) e (4)	-1,2250 \pm 0,2733*	0,0463
Interação entre (1) e (5)	0,2917 \pm 0,2733	0,3976
Interação entre (1) e (6)	0,9333 \pm 0,2733	0,0761
Interação entre (2) e (4)	2,4333 \pm 0,2733*	0,0123
Interação entre (2) e (6)	0,9583 \pm 0,2733	0,0726
Interação entre (1), (2) e (4)	0,0667 \pm 0,2733	0,8300
Interação entre (1), (2) e (6)	-2,0583 \pm 0,2733*	0,0172

* Efeitos estatisticamente significativos.

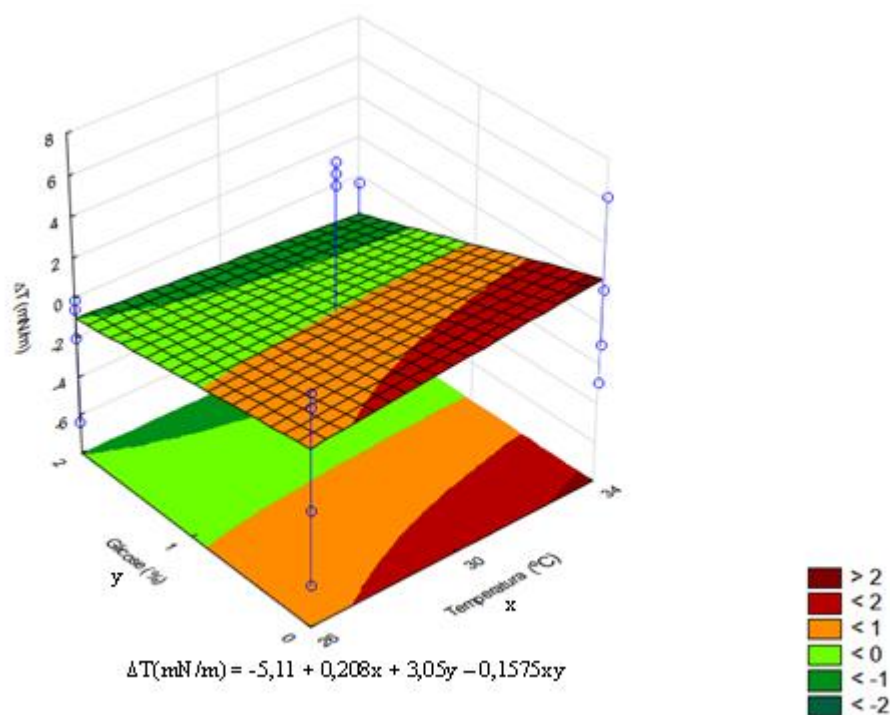
Analisando-se a Tabela 4, verifica-se que o parâmetro pH inicial teve influência negativa significativa, $p < 0,05$, indicando que o pH menor é o mais apropriado para a produção de biossurfactantes por *Pleurotus sajor-caju* neste meio de cultivo. Quanto utiliza-se pH no nível inferior (3,0) tem-se até cerca de 4 mN/m de queda na tensão superficial do meio.

Na Tabela 4, verifica-se, também, que a concentração de glicose (%) teve efeito negativo significativo sobre ΔT , ou seja, quando realiza-se os experimentos no nível inferior de glicose há uma queda de tensão superficial de cerca de 3,0 mN/m. A concentração de glicose no nível inferior é zero, ou seja, um substrato que pode ser retirado do meio de cultivo.

Os resultados da Tabela 4 mostram, ainda, que a fonte de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou efeito positivo significativo sobre ΔT . Em outras palavras, a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no nível superior (3,5%) favorece a queda da tensão superficial em torno de 2,6 mN/m.

Verifica-se, também, na Tabela 4, que a temperatura isoladamente não apresentou efeito significativo, no entanto na interação com a glicose obteve efeito significativo. A Figura 3 apresenta o gráfico de superfície de resposta da interação entres estes parâmetros.

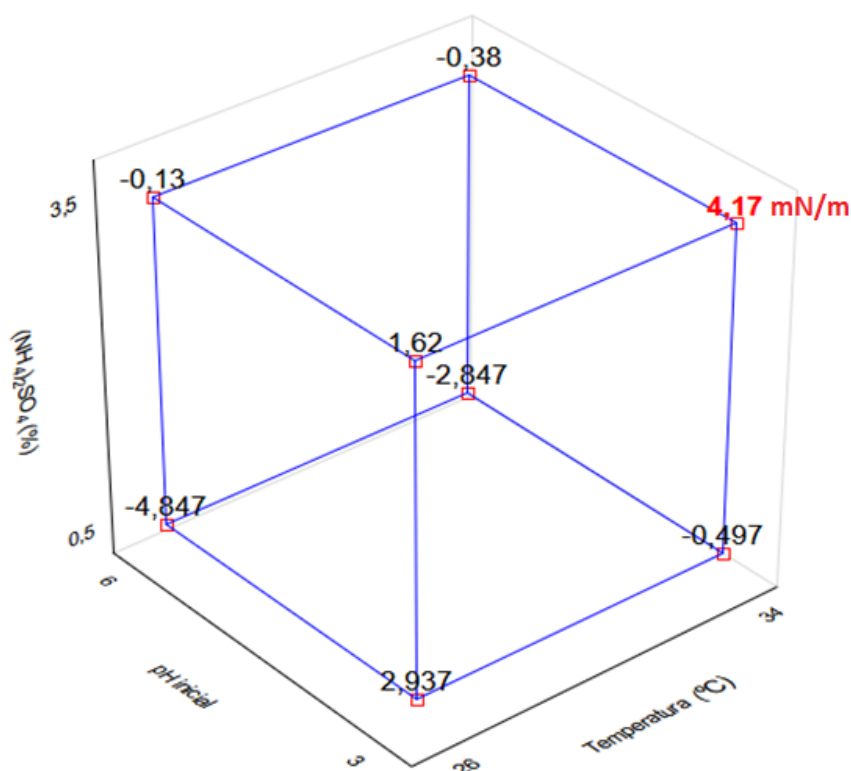
Figura 3 - Superfície de resposta da interação entre a glicose (%) e a temperatura (°C).



Claramente na Figura 3 verifica-se que a temperatura no nível superior (34 °C) favorece a queda da tensão superficial ΔT (mN/m). Corroborando a isso, como a temperatura média máxima no verão da região Nordeste de SC varia de 30 °C a 32 °C (MACHADO, 2015), uma temperatura de 34 °C será mais facilmente controlada no processo. Foi observado durante a condução dos experimentos em frascos agitados que a temperatura no nível superior (34°C) foi controlada mais facilmente.

Ainda, verifica-se na Tabela 4, mais uma interação significativa envolvendo a temperatura, é a interação entre temperatura, pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%), apresentada na Figura 4.

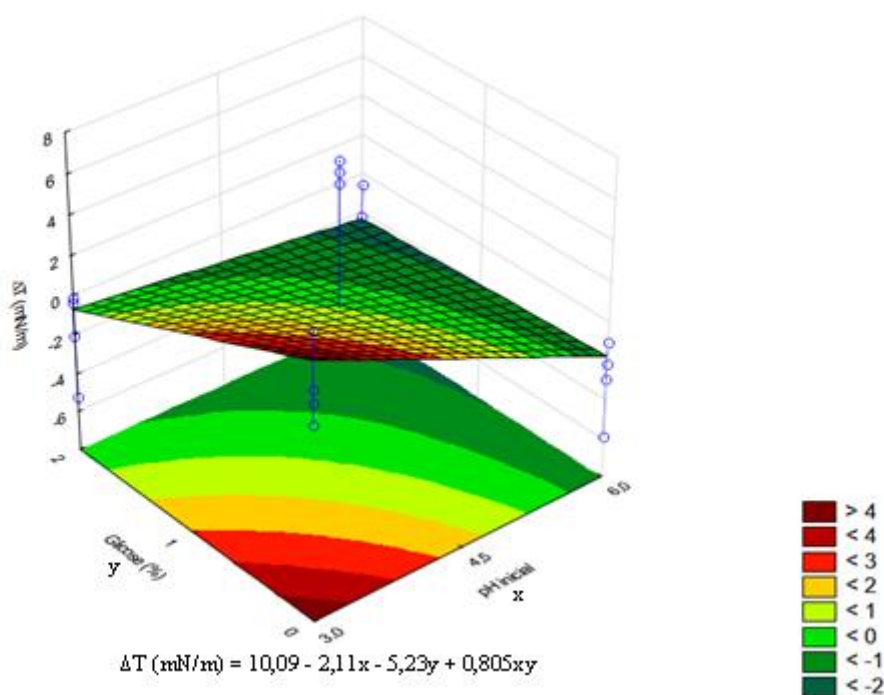
Figura 4 - Gráfico em cubo da interação da temperatura (°C) com pH inicial e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%).



Na Figura 4 verifica-se a maior queda da tensão superficial ΔT (4,17 mN/m) quando a temperatura está no nível superior (34 °C), o pH no nível inferior (3,0) e a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no nível superior (3,5%).

A interação entre pH inicial e glicose (%) também foi significativa (Tabela 4) e na Figura 5 pode-se observar esta interação e o que isoladamente cada parâmetro já apresentava, efeito significativo para o nível inferior tanto para pH inicial (3,0) quanto para a concentração e glicose (0%).

Figura 5 - Superfície de resposta da interação entre o pH inicial e a concentração de glicose (%).



Uma vez que, tanto o óleo de soja quanto a fonte de fosfato (K_2HPO_4) não apresentaram efeito significativo nem isoladamente e nem na interação com algum outro parâmetro (Tabela 4), a concentração destes parâmetros foi definida em função das melhores condições de condução do processo.

A concentração de óleo de soja no nível superior (10% v/v) pode mostrar-se mais interessante devido ao fato de, futuramente, poder utilizar-se uma maior quantidade de óleo de soja residual de fritura e conseqüentemente reduzir o custo do meio de cultivo. Da mesma forma, uma menor concentração de K_2HPO_4 reduzirá o custo do processo.

Albuquerque, Filetti e Campos-Takaki (2006) com o objetivo de aperfeiçoar o meio de produção do bioemulsificante por *Candida lipolytica*, utilizaram planejamento fatorial para investigar efeitos e interações das concentrações de uréia, sulfato de amônio, di-hidrogênio fosfato de potássio e óleo de milho na atividade de emulsificação. A presença de KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e óleo de milho teve uma influência positiva na atividade de emulsificação. Por outro lado, a uréia teve uma influência negativa.

Observando-se os resultados da Tabela 3, verifica-se que o experimento 6, conduzido em temperatura de 34 °C, pH 3,0, sem glicose, 10% de óleo de soja, fonte de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) no nível superior (3,5%) e 0,6% de K_2HPO_4 (Tabela 3) apresentou uma das maiores quedas da tensão superficial do meio (6,20 mN/m). Este valor equivale a uma redução de tensão superficial (RT) de 16,8%, sendo a maior redução de todos os experimentos realizados.

Assim sendo, o experimento 6 atende às condições de processo, discutidas anteriormente, ficando definido para a continuidade deste trabalho.

Se levarmos em conta apenas o valor da redução da tensão superficial do experimento 6 (16,82%), nota-se que este resultado é similar ao que já foi reportado na literatura para outros micro-organismos. Por exemplo, Decesaro *et al.* (2013) alcançou a maior redução de tensão superficial tanto para *Pseudomonas aeruginosa* como para *Bacillus pumilus* utilizando óleo de soja como indutor na concentração de 1% e sem adição de sulfato de amônio, porém, a redução da tensão superficial para *Pseudomonas* foi de 20%, enquanto que para o *Bacillus* foi na ordem de 33%, obtendo-se tensão superficial final de 35,67 mN/m em 4 dias de fermentação.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2015) utilizando *Pleurotus ostreatus* em meio mineral rico para basideomicetos (pH 6; 0,724 g/L NH_4NO_3 ; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L de KCl; 0,5 g/L de extrato de levedura; 0,001 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0028g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,033 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L de peptona) acrescido de 10 g/L de glicose e 10 mL/L de óleo de semente de girassol em fermentação submersa por 20 dias, alcançou o valor de $40,7 \pm 0,9$ mN/m de tensão superficial.

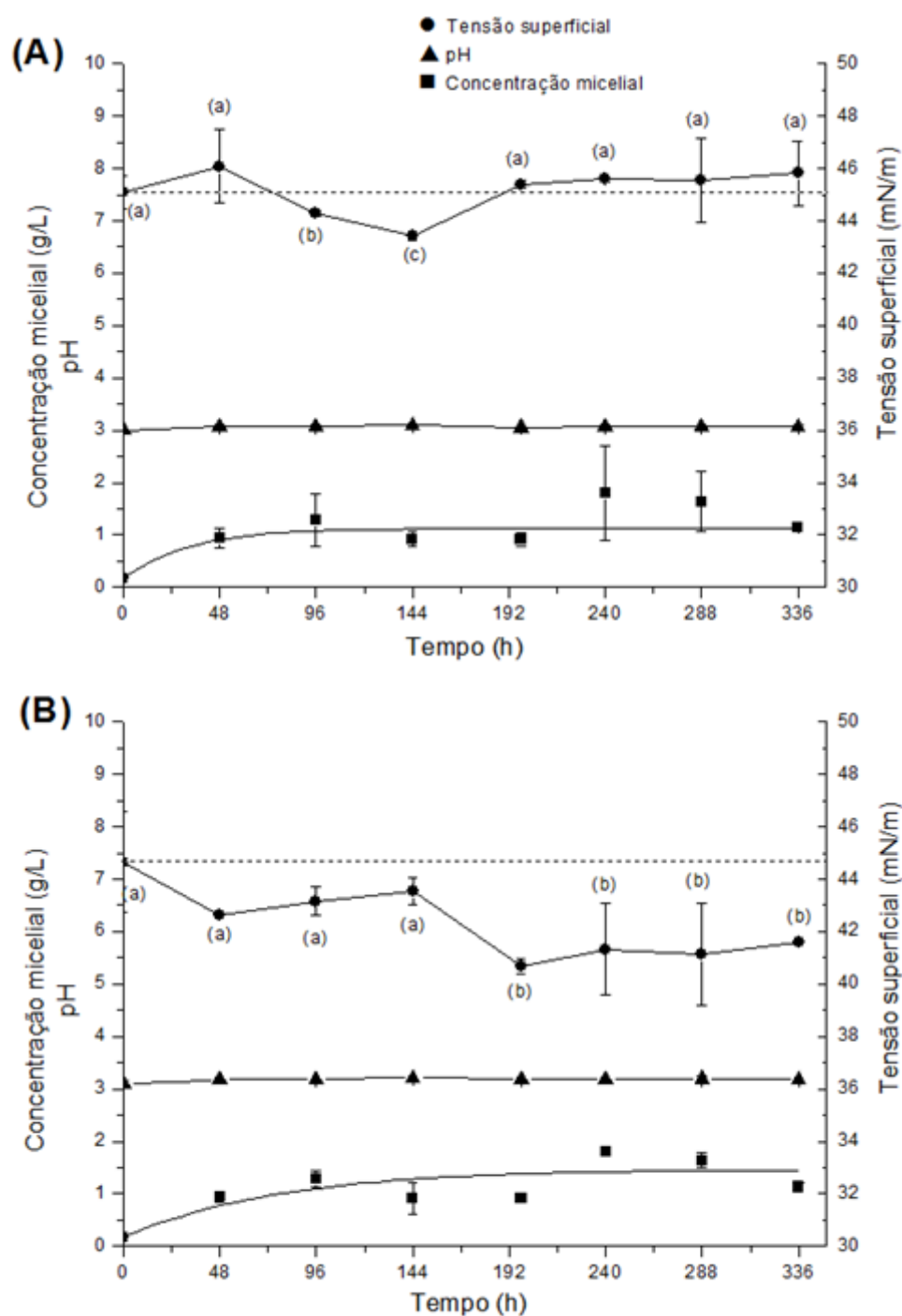
Velioğlu e Öztürk Ürek (2014) avaliaram a fermentação em estado sólido, em meio contendo 5 g de cascas de sementes de girassol, umidecidas com 10 mL de meio mineral rico para basideomicetos (0,724 g/L NH_4NO_3 ; 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L de KCl ; 0,5 g/L de extrato de levedura; 0,001 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0028g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,033 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L de peptona acrescido de 10 g/L de glicose e 10 mL/L de óleo de semente de girassol. Quando este meio foi inoculado com micélio fúngico de *Pleurotus djamor*, incubado por 20 dias a 29 °C, foi encontrada uma tensão superficial de $29,79 \pm 0,5$ mN/m em 13 dias. Já, quando o mesmo meio foi inoculado com *P. sajor-caju* a tensão superficial foi de $41,93 \pm 0,7$ mN/m nas mesmas condições de cultivo e após 16 dias de fermentação.

4.2 Ensaio realizados em biorreator de bancada

Os experimentos utilizando óleo de soja comercial (B1) e óleo de soja residual de fritura (B2), conduzidos em biorreator de bancada com volume útil de 4 L, foram analisados em termos de tensão superficial, concentração de biomassa micelial e atividade emulsificante. A Figura 6 corresponde aos resultados obtidos no experimento B1 (Figura 6A) e no experimento B2 (Figura 6B).

Pode-se observar na Figura 6A que não houve redução na tensão superficial ao longo do cultivo (336 horas), porém, no tempo de 144 h (6 dias) de cultivo, observa-se o maior valor de queda de tensão superficial (de 45,1 para 43,42 mN/m) e que equivale a uma redução de 3,73%. Para o experimento B2, que foi realizado com óleo de soja residual de fritura (Figura 6B) houve a maior redução da tensão superficial (de 44,65 para 40,68 mN/m) após 192 h (8 dias) de cultivo, e esta queda equivale a uma redução da tensão superficial de 8,89%. Os valores de **RT**, tanto do experimento B1 quanto do B2, são inferiores ao do experimento 6 em frascos agitados (Tabela 3) que foi 16,8% em 14 dias de cultivo. Essas diferenças podem ser atribuídas à ampliação de escala. Sabe-se que em frascos agitados não há controle de aeração, diferente dos experimentos em biorreator, onde a aeração foi mantida em 0,25 L/min e a agitação em 300 min^{-1} (WISBECK, 2003).

Figura 6 - Variações das concentrações de biomassa micelial (g/L), da tensão superficial (mN/m) e do pH em função do tempo (h) no cultivo de *P. sajor-caju*, com óleo de soja comercial (A) e óleo de soja residual de fritura (B). Os pontos equivalem aos valores médios da duplicata dos ensaios e as barras ao desvio médio. A linha tracejada foi utilizada para auxiliar na visualização da variação da tensão superficial. Médias com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



Bezerra (2006) utilizando uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de poços de petróleo de Canto do Amaro/Moçoró/RN, sob o código de AP029/GLVIA e cultivado em um meio mineral, pH 7, obteve como melhor resultado o ensaio, com agitação de 100 min^{-1} e razão de aeração (definida pela razão entre o volume do meio e o volume do frasco – V_m/V_f) 0,4, onde a redução de tensão superficial de 40,59% em 8 h de cultivo, foi verificada. O autor ainda ressaltou que as variáveis que mais contribuíram para esse resultado foram a razão de aeração e a velocidade de agitação. O valor da tensão superficial de 40,59% obtida por Bezerra (2006) é similar à tensão de 40,68% do experimento B2, em 192 horas (8 dias) de processo.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2014) utilizando *Pleurotus sajor-caju* em cultivo sólido, alcançaram uma tensão superficial de $41,93 \pm 0,7 \text{ mN/m}$ após 16 dias de fermentação. Esse valor foi similar ao encontrado no experimento B1 ($43,42 \pm 0,15 \text{ mN/m}$) e no experimento B2 ($40,68 \pm 0,78 \text{ mN/m}$), no entanto em menores tempos de cultivo, 6 e 8 dias, respectivamente.

Observa-se ainda na Figura 6 que a utilização do óleo de soja residual de fritura (Figura 6B) proporcionou maior redução da tensão superficial que o óleo de soja comercial, sugerindo que este tipo de resíduo pode ser utilizado na produção de biossurfactantes por *P.sajor-caju*.

O valor máximo de biomassa encontrado para o experimento B1 foi de $1,79 \pm 0,91 \text{ g/L}$ (Figura 6A) e para o experimento B2 foi de $1,08 \pm 0,09 \text{ g/L}$ (Figura 6B), esses valores são inferiores ao reportado por outros autores. Borges *et al.*, (2013), utilizando *Pleurotus djamor* UNIVILLE 001, cultivado em meio POL em pH 3, aeração mantida em 0,25 L/min, agitação em 300 min^{-1} , e com 40 g/L de glicose, obtiveram aproximadamente 8 g/L de biomassa ao fim de 14 dias (336 h) de fermentação. Apesar de nos experimentos B1 e B2 terem sido encontrados baixos valores de concentração micelial, esse fato não deve ser atribuído ao valor de pH, visto que Borges *et al.*, (2013) também utilizou um pH ácido igual a 3 porém com o emprego de glicose. Ainda, observa-se que o pH não variou durante o cultivo, tanto nos experimentos B1 e B2, como no experimento de Borges *et al.*, (2013), cujo valor foi controlado em 3 durante todo o processo.

Na Tabela 5 estão os resultados do Índice de Emulsificação (E_{24}) e da Atividade Emulsificante ($AE_{a/o}$) para o experimento B1 em 144 h (6 dias) e para o experimento B2 em 192 h (8 dias).

Tabela 5 - Índice de Emulsificação (E_{24}) e Atividade Emulsificante ($AE_{a/o}$) para o experimento B1 e para o experimento B2. Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Experimentos	E_{24} (%)	$AE_{a/o}$ (Unidades emulsificantes - UE)
B1	66,6% \pm 0,0 ^a	28,2 \pm 2,8 ^a
B2	65,8% \pm 2,8 ^a	27,3 \pm 2,8 ^a

Velioğlu e Öztürk Ürek (2014) utilizando *Pleurotus sajor-caju* em cultivo sólido, alcançaram um valor de índice de emulsificação sobre óleo de soja de 54,55% \pm 4,00 após 16 dias de fermentação. Velioğlu e Öztürk Ürek (2015) cultivando *Pleurotus ostreatus* em cultivo submerso, obtiveram valor máximo de índice de emulsificação sobre óleo de soja de 60% \pm 5,00 após 13 dias de fermentação. Esses valores são inferiores ao encontrado no presente trabalho (Tabela 5), cujos índices de emulsificação foram alcançados em menor tempo de cultivo.

Luna, Sarubbo e Campos-Takaki (2009) utilizando a levedura *Candida glabrata* UCP 1002 em meio contendo 7,5% de óleo de semente de algodão, 5% de glucose e 0,3% de extrato de levedura, alcançaram valor máximo de índice de emulsificação sobre n-hexadecano de 66% em 96 h de fermentação.

Pereira *et al.* (2013), utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (PA1) cultivada em meio salino contendo 37,5 g/L glicerol bruto, obtiveram índice de emulsificação sobre n-hexadecano de 60% após 120 h de fermentação.

Costa, Nitschke e Contiero (2008) utilizando cepas isoladas de solo contaminado com diesel, identificadas como sendo do gênero *Pseudomonas* (LMI 6c e LMI 7a), obtiveram valores de índice de emulsificação sobre óleo de soja de aproximadamente 95%, com o caldo de cultivo após 120 h.

Ao avaliar o índice de emulsificação do caldo fermentado de *Candida lipolytica* UCP 0988 após 72 h de fermentação sobre óleo de motor, óleo de milho e n-hexadecano, Rufino *et al.*, (2008) obtiveram o valor de 79% de emulsificação

sobre óleo de motor, no entanto para os outros dois hidrocarbonetos não houve emulsificação.

O índice de emulsificação pode ser alterado de acordo com a afinidade do biossurfactante produzido pelo micro-organismo e o hidrocarboneto utilizado para a emulsificação. Por esse fato é que existem tantas variações de índice de emulsificação reportados na literatura.

As atividades emulsificante água em óleo ($AE_{a/o}$) médias do experimento B1 em 144 h (6 dias) e do experimento B2 em 192 h (8 dias) foram de $28,2 \pm 2,8$ (UE) e $27,3 \pm 2,8$ UE, respectivamente (Tabela 5).

Pinto *et al.*, (2009), cultivando a bactéria *Corynebacterium aquaticum*, obtiveram o valor máximo de $AE_{a/o}$ ($24,84 \pm 2,47$ UE) em 60 h de fermentação, valor muito semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Colla *et al.*, (2010) cultivando o fungo *Aspergillus sp.* em cultivo submerso, alcançaram $42,67 \pm 6,65$ UE de valor máximo de $AE_{a/o}$ em 72 h de fermentação. Nos estudos de Costa (2015), no qual foi utilizado o fungo *Aspergillus niger* isolado de um resíduo oleoso, o valor máximo de $AE_{a/o}$ foi de $7,51 \pm 0,75$ UE/g, que foi obtido após 7 dias de cultivo sólido contendo cascas e farelo de arroz.

Decesaro *et al.* (2013) cultivando *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus pumilus* isolados de solo contaminado com óleo diesel, obtiveram atividade emulsificante água em óleo de 201,6 UE em 5 dias e 154,5 UE em 2 dias de fermentação, respectivamente. Estes valores são bem superiores aos encontrados no presente trabalho. Isso deve-se ao fato de que para estes dois micro-organismos existem vários estudos de otimização de produção de biossurfactante (DECESARO *et al.*, 2013; CHANDER *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2011; COSTA, NITSCHKE e CONTIERO, 2008; DASTGHEIS *et al.*, 2008; BEZERRA, 2006; BENINCASA *et al.*, 2002), enquanto que para o gênero *Pleurotus* ainda são poucos os estudos referentes a produção de tensoativos (VELIOĞLU e ÖZTÜRK ÜREK, 2014; VELIOĞLU e ÖZTÜRK ÜREK, 2015).

Sendo a atividade emulsificante água em óleo ($AE_{a/o}$) definida como a quantidade de biossurfactante necessária para manter a emulsão estável por 24 h, pode-se sugerir que o meio de cultivo e o micro-organismo proposto neste trabalho tem potencial para produção de biossurfactante.

4.3 Extração e caracterização dos biossurfactantes

Após decorrido o tempo de fermentação (14 dias), a biomassa e o óleo foram separados do caldo de cultivo. O caldo foi submetido à extração, conforme item 3.7, e o biossurfactante obtido foi caracterizado em termos de carboidratos, proteínas e grupos funcionais.

Uma alta concentração de biossurfactante é importante, bem como um biossurfactante ativo. O rendimento de produção e a atividade do biossurfactante são baseados em requisitos nutricionais dos micro-organismos e de parâmetros de crescimento (VELIOĞLU e ÖZTÜRK ÜREK, 2014). No presente trabalho obteve-se $0,70 \pm 0,03$ g/L de biossurfactante para o experimento utilizando óleo de soja comercial (B1) e $0,63 \pm 0,04$ g/L para o experimento utilizando óleo de soja residual de fritura (B2).

O meio de cultivo no tempo inicial (branco) que foi submetido à extração dos biossurfactantes, não apresentou precipitação de nenhum composto. Assim, pode-se afirmar que o composto extraído (biossurfactante) dos experimentos B1 e B2 foi formado durante o cultivo submerso de *P. sajor-caju*.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2014) obtiveram concentrações de biossurfactantes de $2,8 \pm 0,2$ g/L; $2,4 \pm 0,2$ g/L e $4,0 \pm 0,3$ g/L produzidos em cultivo sólido de *Pleurotus djamor*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus sajor-caju*, respectivamente.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2015), cultivando *Pleurotus ostreatus* em cultivo sólido com e sem agitação, alcançaram $4,7 \pm 0,2$ g/L e $4,1 \pm 0,2$ g/L de biossurfactantes, respectivamente. Velioğlu e Öztürk Ürek (2014 e 2015), obtiveram concentrações de biossurfactantes superiores às encontradas no presente trabalho.

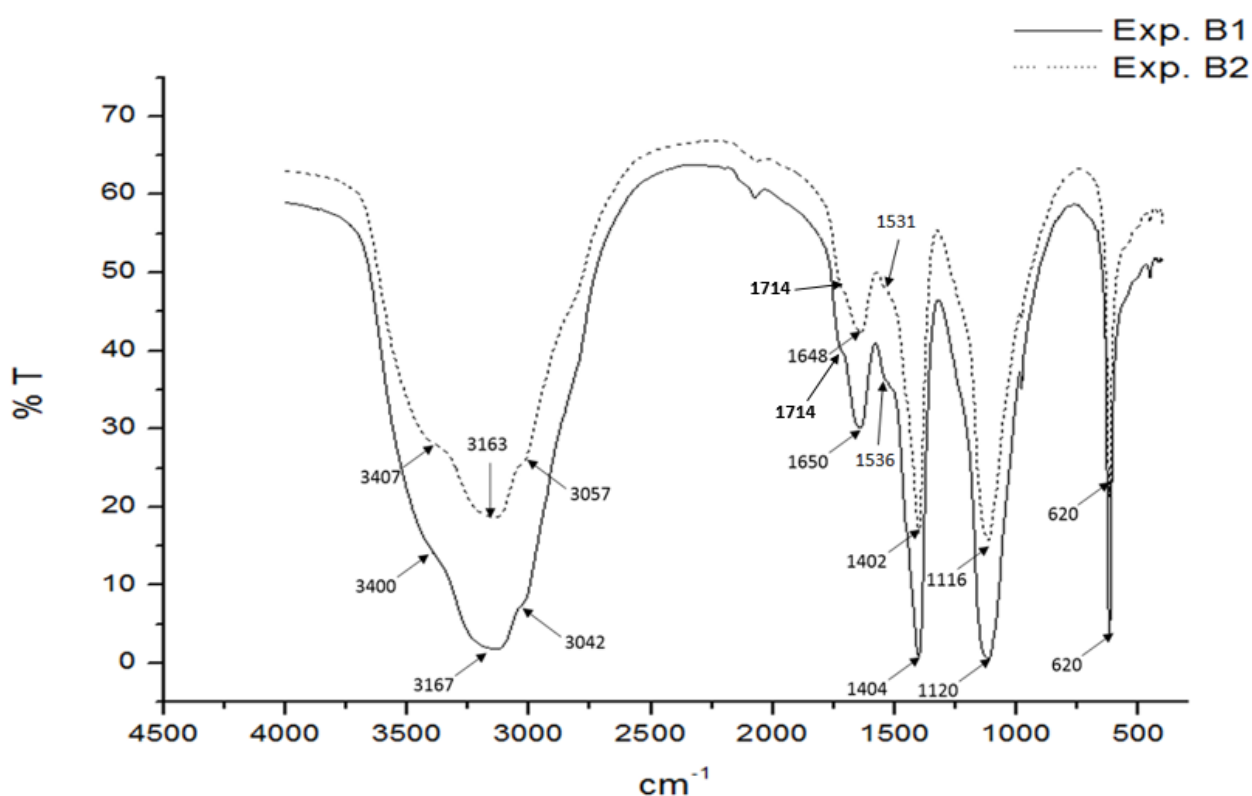
Velioğlu e Öztürk Ürek (2015) também relatam que a composição química do biossurfactante extraído foi de $12,5 \pm 0,9\%$ de carboidrato e $19,1 \pm 1,1\%$ de proteínas, o que indica uma estrutura complexa para o biossurfactante. No presente trabalho, os biossurfactantes extraídos dos experimentos B1 e B2 apresentaram $12,0 \pm 0,5\%$ e $10,6 \pm 0,6\%$ de carboidratos, $7,4 \pm 0,6\%$ e $7,7 \pm 1,0\%$ de proteínas, respectivamente. Estes valores são similares aos encontrados por Velioğlu e Öztürk Ürek (2015).

Ao analisar a tensão superficial das soluções de 1 g/L dos biossurfactantes extraídos, obteve-se os valores de $54,2 \pm 0,1$ mN/m e $49,9 \pm$

0,05 mN/m para os biossurfactantes dos experimentos B1 e B2, respectivamente. Quando esses valores são comparados com o valor da tensão superficial da água destilada (72 mN/m), a redução da tensão superficial é de 24,76% (B1) e 30,74% (B2). Esses resultados corroboram com a sugestão da troca do óleo de soja comercial por óleo de soja residual de fritura.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos biossurfactantes extraídos dos experimentos realizados com óleo de soja comercial (B1) e com óleo de soja residual de fritura (B2) podem ser visualizados na Figura 7. No Anexo 4 pode-se visualizar que os espectros das duplicatas dos cultivos mostraram-se muito semelhantes.

Figura 7 - Comparação dos espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) dos biossurfactantes extraídos dos experimentos realizados com óleo de soja comercial (B1) e o com óleo de soja residual de fritura (B2).



Observa-se na Figura 7, que os espectros dos experimentos B1 e B2 são muito semelhantes, diferenciando-se apenas pela intensidade dos picos.

Verifica-se que o alongamento de =C-H (3042 cm^{-1} para B1 e 3057 cm^{-1} para B2) combinado com alongamento de C=C (1650 cm^{-1} para B1 e 1648 cm^{-1}

para B2) (STUART, 2004; LOPES e FASCIO, 2004) e flexão de =C-H fora do plano (620 cm^{-1} para B1 e B2) (STUART, 2004) caracterizam a presença da cadeia de um alceno. Observa-se também a presença da banda do alongamento de C-O-C (1120 cm^{-1} para B1 e 1116 cm^{-1} para B2) (STUART, 2004; METHACANON *et al.*, 2011 *apud* DALONSO, GOLDMAN e GERN, 2015) que caracteriza a presença de carboidratos.

A banda característica de alongamento C-C alifático (1404 cm^{-1} para B1 e 1402 cm^{-1} para B2) está presente em ambos os espectros e pode estar relacionada com a cadeia de polissacarídeo do biossurfactante (KOZARSKI *et al.*, 2014). Também está presente a banda do alongamento simétrico de NH_2 (3167 cm^{-1} para B1 e 3163 cm^{-1} para B2) que sugere a presença do grupo funcional amida (STUART, 2004) e a banda do alongamento de C=O, presentes no espectro em 1714 cm^{-1} (KOZARSKI *et al.*, 2014; MOHACEK-GROSEV *et al.*, 2001 *apud* DALONSO, GOLDMAN e GERN, 2015; LOPES e FASCIO, 2004), que sugere a presença de éster de lipídeo. Observa-se no espectro um ombro que pode ser atribuído à banda de N-H (1531 cm^{-1} para B1 e 1536 cm^{-1} para B2), o que sugere a presença de proteínas (DALONSO *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ *et al.*, 1996 *apud* DALONSO, GOLDMAN e GERN, 2015).

As bandas do alongamento de O-H em (3400 cm^{-1} para B1 e 3407 cm^{-1} para B2) podem ser encontradas no espectro de ambos experimentos (STUART, 2004; WANG e ZHANG, 2009; LOPES e FASCIO, 2004). Observou-se também que ambos os espectros não apresentaram bandas características de heteroátomos. Sugere-se que a estrutura do biossurfactante extraído em ambos os experimentos (B1 e B2) seja um complexo que contenha carboidrato-proteína-lipídeo.

Velioğlu e Öztürk Ürek (2015), analisaram por meio de FTIR os biossurfactantes extraídos do micélio do cultivo sólido com e sem agitação de *Pleurotus ostreatus*, e identificaram bandas associadas a resíduos de açúcares, e também a presença de proteínas por meio das bandas de C=O (1659 cm^{-1}) e N-H (1530 e 1535 cm^{-1}). Também identificaram a banda característica de cadeia de hidrocarboneto ($1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$). Os autores sugerem que os biossurfactantes extraídos apresentam características de uma estrutura

complexa de carboidrato-peptídeo-lipídeo. Essa estrutura é característica da classe de biossurfactantes poliméricos, os quais são mais eficientes na estabilidade de emulsões, chamados de bioemulsificantes (DESAI e BANAT, 1997; ROSENBERG e RON, 1999)

Velioğlu e Öztürk Ürek (2014), analisaram por FTIR os biossurfactantes extraídos do micélio do cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju*, e identificaram bandas associadas a lipídeos e resíduos de açúcares, e também a função carbonila presente em radicais carboxilato ou amidas de proteínas e aminas peptídicas. Os autores sugerem que o biossurfactante extraído possui uma estrutura complexa de proteína-polissacarídeo-lipídeo.

Dalonso *et al.*, (2010) ao caracterizar um extrato proveniente de corpos frutíferos de *Pleurotus sajor-caju* identificaram bandas características de carboidratos (C-O-C de 900 a 1200 cm^{-1}) e proteínas (1664 e 1527 cm^{-1}). No entanto, devido a complexidade do espectro, os autores acreditam que a composição dos extratos pode ser uma mistura de polissacarídeos, incluindo a possibilidade de heteropolímeros.

CONCLUSÕES

As análises dos resultados do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , mostraram que o experimento conduzido em temperatura de 34 °C, pH 3,0, sem glicose, 10% de óleo de soja, 3,5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,6% de K_2HPO_4 apresentou uma das maiores quedas da tensão superficial do meio ($\Delta T = 6,20$ mN/m) e conseqüentemente foi selecionado como as condições ideais de produção de biossurfactantes. Este valor de ΔT equivale a uma redução de tensão superficial (**RT**) de 16,8% em relação a tensão inicial do meio de cultivo (T_i).

No cultivo em biorreator de mistura completa utilizando óleo de soja comercial observou-se redução da tensão superficial (**RT**) máxima de 3,7% com 6 dias de cultivo. Quando o experimento foi realizado com óleo de soja residual de fritura esta redução aumentou para 8,9% com 8 dias de cultivo. Esses resultados sugerem que este tipo de resíduo pode ser utilizado na produção de biossurfactantes por *P.sajor-caju*.

O índice de emulsificação e a atividade emulsificante água em óleo ($\text{AE}_{a/o}$) após 24 h (66,6% e 28,2 EU, respectivamente, no experimento com óleo de soja comercial, e 65,8% e 27,3 EU, respectivamente, no experimento com óleo de soja residual de fritura), são similares aos valores reportados na literatura para o mesmo gênero de micro-organismo, utilizando óleo de soja como hidrocarboneto. O índice de emulsificação pode ser alterado de acordo com a afinidade do biossurfactante pelo hidrocarboneto utilizado, sendo a atividade emulsificante água em óleo ($\text{AE}_{a/o}$) definida como a quantidade de biossurfactante necessária para manter a emulsão estável por 24 h. Pode-se sugerir que o meio de cultivo e o micro-organismo proposto neste trabalho tem potencial para produção de biossurfactante.

Nas análises dos espectros de FTIR pode-se identificar bandas que confirmam a presença de carboidratos e proteínas e sugere a presença de lipídeos. Portanto sugere-se que a estrutura do biossurfactante seja um complexo que contenha carboidrato-proteína-lipídeo e possa ser utilizado como emulsionante, assim como reportado na literatura.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para trabalhos futuros pode-se deixar como sugestão a otimização do meio de cultivo para obter-se uma maior concentração de biossurfactantes nesse meio, visto que a concentração foi baixa em relação ao reportado na literatura.

Avaliar o biossurfactante produzido em relação a atividade antimicrobiana, atividade antitumoral e toxicidade.

Avaliar a influência de outros resíduos oleosos na produção de biossurfactantes por *Pleurotus sajor-caju*.

Sugere-se, ainda, verificar se os polissacarídeos produzidos em meio POL (meio indicado para a produção de polissacarídeos intra e extracelulares) (CAVAZZONI e ADAMI, 1992) apresentam, também, atividade emulsificante.

REFERÊNCIAS

- AJITH, T. A.; JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 84, p. 157-162, 2003.
- ALAMINI, B. A. U. S.; NUNES, V.; BARBADO, N. Promovendo atitudes responsáveis na coleta e destinação do óleo de fritura usado. **In: II Congresso Internacional de Sustentabilidade**, Foz do Iguaçu, Anais Foz do Iguaçu: União Dinâmica de Faculdades Cataratas, p. 12, 2009.
- ALBUQUERQUE, C. D. C., FILETTI, A. M. F., CAMPOS-TAKAKI, G. M., Optimizing the medium components in bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* with response surface method. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 52, p. 575–583, 2006.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M., PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 2, p. 364-368, 2007
- ASSUNÇÃO, F. C. R.; CARIOCA, J. O. B; ALMEIDA, M. F. L.; SEILD, P. R. **Química verde no Brasil: 2010 - 2030 - Edição revisada e atualizada** - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, p. 139-174, 2010.
- AMEZCUA-VEGA, C. A.; VARALDO, P. H. M.; GARCIA, F. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 237-240, 2007.
- ARUTCHELVI, J. I.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Mannosylerythritol lipids: a review, *Journal Industry of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p.1559-1570, 2008.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, p. 427–444, 2010.

BANO, Z. A.; RAJARATHNAM, S.; STEINKRAUS, K. H. *Pleurotus* mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, v. 27, n. 2, p. 87-158, 1988.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 299p., 1996.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PŁASZCZYK, M. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technology*, v. 95, p. 15–18, 2004.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, v. 54, p. 283 - 288, 2002.

BESEN, A. G.; STRASSBURG, R. C. Coleta e reciclagem do óleo de cozinha residual proveniente de frituras para a produção de biodiesel. In: **Congresso latino americano de suinocultura e sustentabilidade ambiental**, 2011, Foz do Iguaçu. Anais. Foz do Iguaçu, 2011.

BEZERRA, M. S. **Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação de escala da produção de biossurfactantes utilizando melão como fonte de carbono**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2006.

BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Biosurfactants from Fungi: A Review. *Journal Petroleum & Environmental Biotechnology*, v. 4, n. 6, 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A*, v. 52, p. 41 - 52, 1999.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M.; FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, v. 88, p. 425-428, 2004.

BORGES, G. M.; SCHIEBELBEIN, A. P.; BARBA, F. F. M.; PEREIRA, B. P.; CHAVES, M. B.; SILVEIRA, M. L. L.; PINHO, M. S. L.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Extracellular polysaccharide production by a strain of *Pleurotus djamor* isolated in the south of Brazil and antitumor activity on Sarcoma 180. *Brazilian Journal of Microbiology* (Impresso), v. 44, p. 1059-1065, 2013.

BREENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*, v. 53, p. 883-894, 1990.

BUMBA, M. A. C.; OI, R. K.; YAMAMURA, H. Produção de biodiesel a partir do óleo de fritura: uma alternativa sustentável. **In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014, Florianópolis. Anais, Florianópolis, 2014.

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

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

CAVAZZONI, V., ADAMI, A. Exopolysaccharides produced by mycelial edible mushrooms. *Italian Journal Food Science*, n1, p.9-15, 1992.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.48, n.4, p. 747–50, 1984.

CHANDER, C.R.; LOHITNATH, T.; MUKESH KUMAR, D.J.; KALAICHELVAN, P.T. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio-preservative. *Advances in Applied Science Research*, v. 3, p. 1827–1831, 2012.

CHEN, S.Y.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 67-74, 2007.

CHOWDHURY, P.; HARI, R.; CHAKRABORTY, B.; MANDAL, B.; NASKAR, S.; DAS, N. Isolation, culture optimization and physic-chemical characterization of laccase enzyme from *Pleurotus fossulatus*. *Pakistan Journal os Biological Sciences*, v. 12, n. 2, p. 173-181, 2014.

COGORNI, P. F. B. O.; SCHULZ, J. G.; ALVES, E. P.; GERN, R. M. M.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. The production of *Pleurotus sajor-caju* in peach palm leaves (*Bactris gasipaes*) and evaluation of its use to enrich wheat flour. *Food Science and Technology*, v. 34, n. 2, p. 267-274, 2014.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8308–8314, 2010.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 47, p. 173–176, 1984.

COSTA, T. M. **Obtenção de biocompostos por *Aspergillus niger* em sistema de fermentação em estado sólido**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química) – Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, 2015.

COSTA, D. A.; LOPES, G. R.; LOPES, J. R. Reutilização do óleo de fritura como uma alternativa de amenizar a poluição do solo. *Revista Monografias Ambientais*

– REMOA, *Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM*, Santa Maria, v.14, p. 243-253, 2015.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 1, p. 34-38, 2008.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S.; ZAGONEL, G. F.; RAMOS, L. P. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química Nova*, v. 23, n. 4, p. 531-537, 2000.

DABDOUB, M.J. Biodiesel em casa e nas Escolas: Programa coleta de óleos de fritura, Ribeirão Preto, *SUPERA*, 2006.

DALONSO, N.; GOLDMAN, G. H.; GERN, R. M. M. β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6) Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 19, p. 7893-7906, 2015.

DALONSO, N.; SOUZA, R.; SILVEIRA, M. L. L.; RUZZA, A. A.; WAGNER, T. M.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A. Characterization and antineoplastic effect of extracts obtained from *Pleurotus sajor-caju* fruiting bodies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 8, p. 2265- 2274, 2010.

DANIEL, H.J.; OTTO, R.T. Production of sophorolipids by whey. *Biotechnology Letters*, v. 20, p. 1153–1156, 1999.

DASTGHEIS, S.M.M.; AMOOZEGAR, M.A.; ELAHI, E.; ASAD, A.; BANAT, I.M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potencial applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnology Letters*, v. 30, p. 263-270, 2008.

DE BARBA, F. F. M. **Estudo da Atividade Antitumoral de Substâncias Bioativas de *Pleurotus djamor* sobre Sarcoma 180 *in vivo***. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

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

DÍAZ, R.; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; SÁNCHEZ, C.; BIBBINS-MARTÍNEZ, M. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; SORIANO-SANTOS, J. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentations. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 4. 2013.

DIB, F. H. **Produção de biodiesel a partir de óleo residual reciclado e realização de testes comparativos com outros tipos de biodiesel e proporções de mistura em um moto-gerador.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

FERREIRA, L. C.; FERNANDES, G. Etanolise do óleo residual de fritura para produção de biodiesel utilizando diferentes catalisadores. *FAZU em Revista*, v. 8, p. 95-99, 2011.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*, v. 10, p. 208-217, 1992.

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

GHOSH, M.; MUKHERERE, R.; NANDI, B. Production of extracellular enzymes by two *pleurotus* species using banana pseudostem biomass. *Acts Biotechnology*, v. 18, n. 3, p. 243-254. 1998.

GUSMÃO, C.A.B.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 1683–1692, 2010.

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*, v. 88, p. 379–387, 2000.

HESS, D. S.; SILVA, L. A.; FURLAN, S. A.; GERN, R. M. M. Avaliação da produção de biomassa e polissacarídeospor *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 cultivado em meio contendo lipídeos. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 7, p. 21-26, 2006.

HOLTZ, M.; BORGES, G. M.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 3, n.1, p. 37-51, 2009.

HOMMEL, R. K.; WEBER, L.; WEISS, A.; HIMMELREICH, U.; RIKE, O.; KLEBER, H. P. Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *Journal of Biotechnology*, v. 33, n. 2, p. 147-155, 1994.

HSIEH, C.; LIU, C.J.; TSENG, M.H.; LO, C.T.; YANG, Y.C. Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 434–439, 2006.

ISHIGAMI, Y., SUZUKI, S., Development of biochemical-functionalization of biosurfactants and natural dyes, *Progress in Organic Coatings*, v. 31, p. 51 – 61, 1997.

JAIN, R.M; MODY, K.; MISHRA, A; JHA, B. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 2320– 2326, 2012.

JOSE, N., JANARDHANAN, K.K. Antioxidant and antitumour activity of *Pleurotus florida*. *Current Science*, v. 79, n. 7, p. 941-943, 2000.

KACHLISHVILI, E.T.; JOKHARIDZE, T.Z.; BERIKASHVILI, V.SH.; METREVELI, E.M.; ELISASHVILI, V.I. White-rot basidiomycetes lignocellulolytic enzymes activity in fermentation of plant raw materials. *Annals of Agrarian Science*, v. 12, n. 3, p. 59-65, 2014.

KIRAN, G. S.; HEMA, T. A.; GANDHIMATHI R.; SELVIN J.; THOMAS T. A. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surfaces: B Biointerfaces*, v. 73, p. 250-256, 2009.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Pure & Applied Chemistry*. v. 64, n. 11, p. 1731-1737, 1992.

KOZARSKI, M. S.; KLAUS, A. S.; NIKŠIĆ, M. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; VRVIĆ, M. M.; JAKOVLJEVIĆ, D. M. Polysaccharides of higher fungi: biological role, structure and antioxidative activity. *Hemijaska industrija (Chemical Industry)*, v. 68, n. 3, p. 305–320. 2014.

LAVI, I.; FRIESEM, D.; GERESH, S.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti- proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters*, v. 244, p. 61-70, 2006.

LEI, Y. *Pleurotus sajor-caju*. Disponível em: <<http://www.pbase.com/chinham/image/59787166>> Acessado em 10/04/2015. 2015.

LI, Y. R.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible

mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1780, p. 51-57, 2008.

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

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p, 265-276, 1951.

LUNA, J.M. SARUBBO, L.A. CAMPOS-TAKAKI. G.M., A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

MACHADO, M. Climas que ocorrem no Brasil. Disponível em: <<http://www.brcactaceae.org/clima.html>> Acessado em: 15/05/2015. 2015.

MADAN, M.; VASUDEVAN, P.; SHARMA, S. Cultivation of *Pleurotus sajor-caju* on different wastes. *Biological Wastes*, v. 22, p. 241-250, 1987.

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

MARÇAL, M.C.R. **Produção de Biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, coco, dendê)**. Dissertação (Mestrado em Nutrição) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 1991.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, v. 34, p.1597–1605, 2012.

MARQUEZ-ROCHA, F.J.; RODRIGUEZ, V.Z.H.; DUHALT, R.V. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by White-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 469-472, 2000.

MARTINS, A.C.G., **Valorização de borra de café através da produção de biossurfactantes**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2011.

MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 77-84, 1999.

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*, v. 58, p. 428–434, 2002.

MELO, M. P.; RAMPINELLI, J. R.; GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; SILVEIRA, M. L. L.; FURIGO JR, A.; BONATTI-CHAVES, M.; FURLAN, S. A. Influência da utilização da água de imersão de palha de bananeira sobre a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

MIRANDA, O.A.; SALGUEIRO, A.A.; PIMENTEL, M.C.B., Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*, v. 69, p. 145–147, 1999.

MORADALI, M.F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, v. 7, p. 701-724, 2007.

MORAES, C. S.; OLIVEIRA JUNIOR, F. O. R.; MASSON, G.; REBELLO, K. M.; SANTOS, L. O.; BASTOS, N. F. P.; FARIA, R. C .R. **Métodos experimentais no estudo de proteínas**. In. *Série em biologia celular e molecular*. 1º ed., IOC - Instituto Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 84 p. 2013.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C.N.; WANG, S. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by rhamnolipid foam. *Engineering Geological*, v. 85, n. 1-2, p. 75-81, 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress*, Washington, DC, v. 21, n. 6, p. 1593-1600, 2005.

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

OLIVEIRA, M.A.; DONEGA, M.A.; PERALTA, R.M.; SOUZA, C.G.M. Produção de inóculo de cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 84-87, 2007.

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

PARCK, J.P.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; CHO, Y.J.; YUN, J.W. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 250–255, 2002.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 50, p. 10166-10177, 2011.

PEREIRA, A. G.; PACHECO, G. J.; TAVARES, L. F.; NEVES, B. C.; KRONENBERGER, F. A.; REIS, R. S.; FREIRE, D. M. G. Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 1271–1278. 2013.

PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Bacteria biosurfactants production kinetic evaluation. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2104–2108, 2009.

PITTA JUNIOR, O. S. R.; NOGUEIRA NETO, M. S.; SACOMANO, J. B.; LIMA, J. L. A. Reciclagem de óleo de cozinha: uma contribuição para aumentar a produtividade do processo. **In: 2° International Workshop Advances in Cleaner Production**, Anais. São Paulo, 2009.

QUEVEDO-HIDALGO, B.; NARVÁEZ-RINCÓN, P. C.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; VELÁSQUEZ-LOZANO, M. E. Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum*, v. 20, n. 1, p. 117-127, 2015.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus spp.* grown on various agro-wastes. *Food Chemistry*, v. 80, p. 371-375, 2003.

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

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M.N.; BANO, Z., Biopotentialites of the basidiomacromycetes. *Advances in Applied Microbiology*, v. 37, p. 223-361, 1992.

RAMPINELLI, J. R.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; FURLAN, A. S.; NINOW, J. L.; WISBECK, E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. *Alimentos e Nutrição*, v. 21, n. 2, p. 197-202, 2010.

REMIÃO, J. O.R.; SIQUEIRA, A.J.S.; AZEVEDO, A.M.P. **Bioquímica. Guia de aulas práticas**. EDIPUCRS: Porto Alegre, 214 p., 2003.

REVERBERI M.; DI MARIO, F.; TOMATI, U. β -Glucansynthase in mushrooms grow on olive mill wastematers. *Applied Microbiology and Biothechnology*, v. 66, p. 217-225, 2004.

ROCHA, J.A. Estudos preliminares da produção de bio- emulsificantes através de *Candida lipolytica* utilizando óleo de babaçu como fonte de carbono. **In: 5° Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental – ENAMA**, Resumo, Fortaleza, 1996.

RODRIGUES, L.; BANAT, I. M.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 609–618, 2006.

RODRIGUES, G. T.; ALMEIDA, G. M.; ALVES, R. S. V.; OLIVEIRA, H. S. N. Estudo da viabilidade econômica de implantação de uma Indústria de produção de biodiesel utilizando óleo de cozinha saturado no município de Campos dos Goytacazes. *Perspectivas online*, v. 5, n. 17, 2011.

RON, E.Z.; ROSENBERG, E., Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001.

ROSADO, F.R.; GERMANO, S.; CARBONERO, E.R.; DA COSTA, S.M.; IACOMINI, M.; KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* SING and *Pleurotus ostreatus* “florida” (Jack.:Fr.) KUMMER. *Journal of Basic Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 230-237, 2003.

ROSADO, F.R.; CARBONERO, E.R.; KEMMELMEIER, C.; TISCHER, C.A.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1→4)-linked β -D-galactan and β -D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* SING. *FEMS Microbiology Letters*, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z., High and low molecular mass microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M., Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 84, p. 1-5, 2011.

RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; NETO, B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M., Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, p. 907–914, 2008.

SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, v. 97, p. 336–341, 2011.

SALES-CAMPOS, C.; OLIVEIRA, L. A.; ARAUJO, L. M.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Análise físico-química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Interciencia*, v. 35, n. 1, p.70-76, 2010.

SARTORI, L. R.; LOPES, N. P.; GUARATINI, T. **A química no cuidado da pele**. Coleção química do cotidiano, v. 5. São Paulo, Sociedade Brasileira de Química, 92 p. 2010. Acessado em: 04/05/15. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/fullscreen/fatimacomiotto/05-cosmeticos-final2/2>>

SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 9, p. 400-406, 2006.

SARUBBO, L.A.; MARÇAL, M.C.; NEVES, M.L.C.; SILVA, M.P.C.; PORTO, A.L.F.; AND TAKAKI, G.M.C. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 95, p. 1–9, 2001.

SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 423–426, 1999.

SHASHIREKHA, M. N.; RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chemistry*, v. 92, p. 255–259, 2005.

SILVEIRA, M. L. L. **Comparação entre o desempenho de inóculo sólido e inóculo líquido para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SOUSA, J.R. **Produção de biossurfactantes a partir da glicerina obtida da produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, 2008.

SOUZA SOBRINHO, H. B. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) Universidade Católica de Pernambuco, 2007.

SOUZA, H.Q.; AGUIAR, I.J.A. Diversidade de *Agaricales* (Basidiomycota) na Reserwan Biológica Walter Egler, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 43-51, 2004.

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

STUART, B. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. Editora: John Wiley & Sons, 208 p., 2004.

TAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, L. Chemical modification and antitumor activities of two polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus tuber-regium*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, p. 109–115, 2009.

THANOMSUB, B.; WATCHARACHAIPONG, T.; CHOTELERSAK, K.; ARUNRATTIYAKORN, P.; NITODA, T.; KANZAKI, H.; Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast *Candida ishiwadae*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 588-592, 2004.

THODE FILHO, S.; SENA, M. F. M.; PAIXÃO, C. P. S.; MARANHÃO, S. F.; SILVA, E. R. Bioprodutos a partir do óleo vegetal residual: desengraxantes baseados em resíduos de rochas e carvão vegetal. *Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET, Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM*, Santa Maria, v. 18, p. 19-23, 2014.

THOMAS, G.V.; PRABHU, S.R.; REENY, M.Z.; BOPAIAH, B.M. Evaluation of lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation os

Pleurotus sajor-caju (Fr.) SINGER. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 14, p. 879-882. 1998.

TONG, H.; XIA, F.; FENG, K.; SUN, G.; GAO, X.; SUN, L. JIANG, R.; SUN, D. T. X. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology*, v.100, p.1682-1686, 2009.

TSIKLAURI, N. D.; KHardzIANI, T. SH.; KACHLISHVILI, E. T.; ELISASHVILI, V. I. Cellulase and xylanase activities of higher basidiomycetes during bioconversion of plant raw material depending on the carbon source in the nutrient medium. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 291–295, 1999.

VANCE-HARROP, M. H. **Influência das fontes de carbono, D - glicose e óleo de babaçu no crescimento de *Candida lipolytica* e na produção de biossurfactantes**. Dissertação (Mestrado em Biologia de fungos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2000.

VANCE-HARROP, M.H.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. New emulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D - glucose and babassu oil as carbon source. *Brazilia Journal of Microbiology*, v. 34, p. 120–123, 2003.

VANCE-HARROP, M.H.; SARUBBO, L.A.; CARNEIRO DA CUNHA, M.G.; BUARQUE GUSMÃO, N.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Produção de Biossurfactante em meio de cultura de baixo custo suplementado com óleo de milho por *Candida lipolytica*. *Revista Symposium* , v. 2, p. 23–27, 1999.

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

VELIOĞLU, Z.; ÖZTÜRK ÜREK, R., Concurrent biosurfactant and ligninolytic enzyme production by *Pleurotus* spp. in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 174, p. 1354–1364, 2014.

WALKER, GRAEME M.; WHITE, NIA A. **Introduction to fungal physiology.** In: KAVANAGH, KEVIN. *Fungi: biology and applications*. England: John Wiley & Sons Ltd, p. 1-34, 2005.

WANG, J.; ZHANG, L. Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 105–112. 2009.

WANG, J.C.; HU, S.H.; LIANG, Z.C.; YEH, C.J. Optimization for the production of water-soluble polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus* in submerged culture and its antitumor effect. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 67, p.759-766, 2005.

WISBECK, E. **Estudo do cultivo submerso de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 para a produção de biomassa e de exopolissacarídeos.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

WISBECK, E.; ROBERT, A.P.; FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do gênero *Pleurotus*. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 3, n. 2, p. 07-10, 2002.

WOLFF, E. R. S.; WISBECK, E.; SILVEIRA, M. L. L.; GERN, R. M. M.; PINHO, M. S. L.; FURLAN, S. A. Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 151, p. 402-412, 2008.

YANG, F.C.; KE, Y.F.; KUO, S.S. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, p. 295-301, 2000.

ZADRAZIL, F.; KURTZMAN, J.R.H. **The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics.** In: CHANG, S.T., QUIMIO, T.H. *Tropical Mushrooms*. Hong Kong, The Chinese Univ. Press. 493p, p. 277-278, 1984.

ZHANG, BO-BO; CHEUNG, P. C. K. Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by

submerged fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 1210–1216, 2011.

ZHANG, M.; ZHU, L.; CUI, S. W.; WANG, Q.; ZHOU, T.; SHEN, H. Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus geesteranus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, p. 5–12. 2011.

ZHANG, M.; CHEUNG, P.C.K.; ZHANG, L.; CHIU, C.M.; OOI, V.E.C. Carboxymethylated β -glucans from mushroom sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as novel water-soluble anti-tumor agent. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 319–325, 2004 (a).

ZHANG, M.; ZHANG, L.; CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Molecular weight and anti-tumor activity of the water-soluble polysaccharides isolated by hot water and ultrasonic treatment from the sclerotia and mycelia of *Pleurotus tuber-regium*. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 123–128, 2004 (b).

ZHENG, C.; LUO, Z.; YU, L.; HUANG, L.; BAI, X. The utilization of lipid waste for biosurfactant production and its application in enhancing oil recovery. *Petroleum Science and Technology*, v. 29, p. 282–289, 2011.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 67–73, 2002.

ANEXOS

Anexo 1

Metodologia análise de proteína – Método de Folin-Lowry

Preparação dos reagentes

- Solução padrão de Albumina 1 mg/mL

Dissolveu-se 20 mg de albumina bovina em 20 mL água deionizada. Após, separou-se a solução em alíquotas de 1 mL (em frascos eppendorfs) e acondicionou-se em freezer.

- Reativo A

Ferveu-se 1L de água deionizada e deixou-se esfriar. Após adicionou-se 4g de NaOH e 20g de Na₂CO₃, ficando em solução a concentração de 0,10N e 2%, respectivamente. A solução foi estocada em geladeira (4°C).

- Reativo B₁

Acicionou-se 1g de CuSO₄ em 100mL de água deionizada. Após a solubilização, a solução foi estocada em frasco âmbar na geladeira (4°C).

- Reativo B₂

Adicionou-se 2g de tartarato de sódio e potássio a 100mL de água deionizada. Após a solubilização, a solução foi estocada em frasco âmbar na geladeira (4°C).

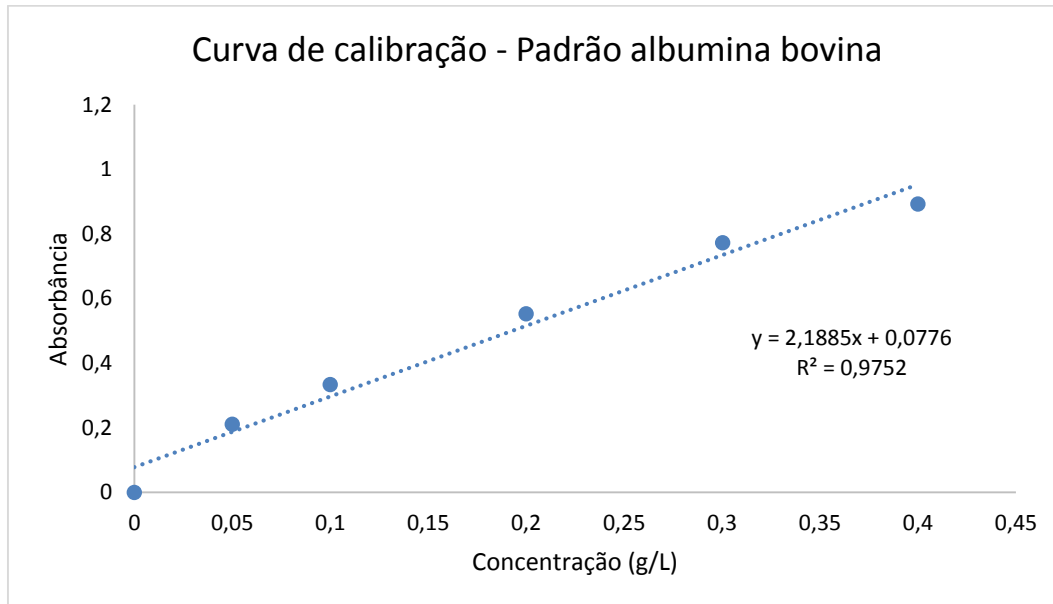
- Preparo do reativo C

50 partes de reativo A + 1 parte de reativo B (B₁ + B₂).

Adicionou-se em tubos de ensaio os padrões de albumina bovina nas concentrações desejadas e 1 mL do reativo C.

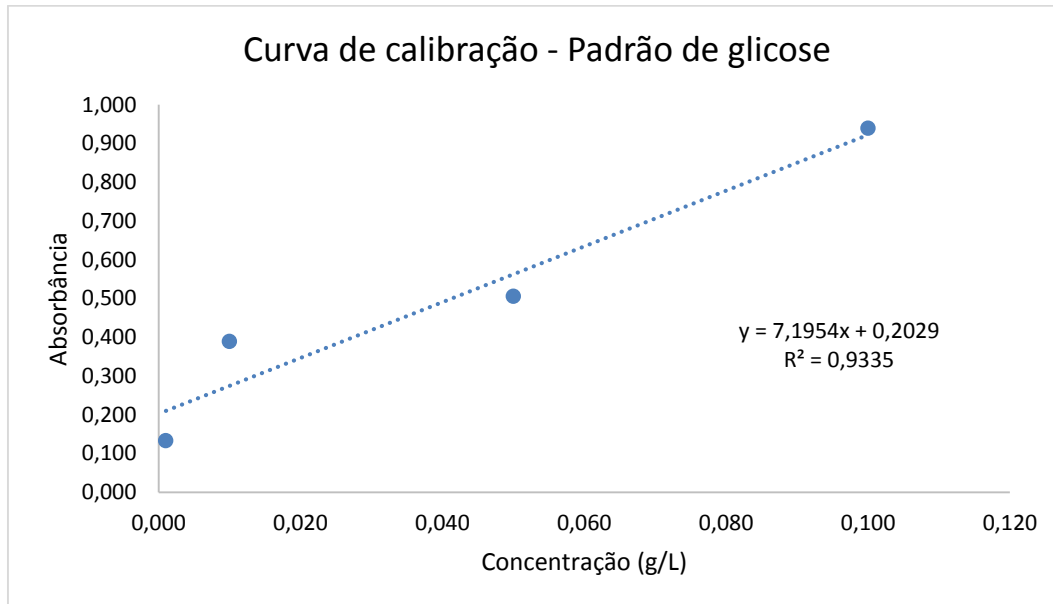
Agitou-se e após 10 minutos adicionou-se 100 µL de Reagente de Folin em todos os tubos. Agitou-se novamente. Colocou-se os tubos em ambiente escuro e após 20 minutos leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 650 nm.

Com base nas leituras obtidas com os padrões, construiu-se uma curva de calibração cuja equação calculada por regressão linear permite calcular a concentração de proteínas nas amostras.

Anexo 2**Curva de calibração utilizada para análise de proteínas**

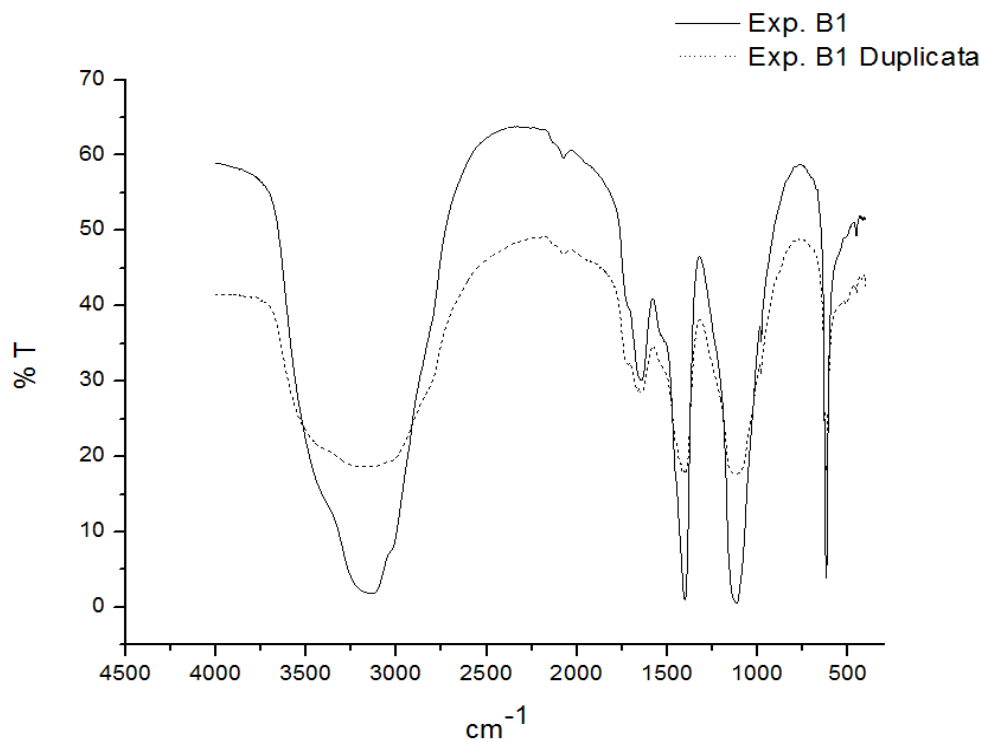
Anexo 3

Curva de calibração utilizada para análise de carboidratos



Anexo 4

Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) dos biossurfactantes extraídos dos experimentos realizados com óleo de soja comercial.



Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) dos biossurfactantes extraídos dos experimentos realizados com óleo de soja residual de fritura.

