



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE AMOSTRAS DE *Rhizopus* NA  
PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS**

**Jaceline Maria de Negreiros Lima**

**RECIFE , 2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**

**Jaceline Maria de Negreiros Lima**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE AMOSTRAS DE *Rhizopus* NA  
PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO  
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Biológicas, área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Galba Maria de Campos - Takaki

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Kaoru Okada

**Recife, 2015**

Catálogo na fonte

Bibliotecária Elaine Cristina Barroso CRB 1728

**Lima, Jaceline Maria de Negreiros**

**Potencial biotecnológico de amostras de *Rhizopus* na produção de lipídios e biossurfactante utilizando resíduos agroindustriais como substratos / Jaceline Maria de Negreiros Lima- Recife: O Autor, 2017.**

**93 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Galba Maria de Campos-Takaki**

**Coorientador: Kaoru Okada**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Biotecnologia, 2017.**

**Inclui referências**

1. Zigomicetes 2. Lípidios 3. Biossurfactantes I. Campos-Takaki, Galba Maria de (orient.) II. Okada, Kaoru (coorient.) III. Título

579.53

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 419

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE AMOSTRAS DE *Rhizopus* NA PRODUÇÃO DE  
LIPÍDIOS E BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS  
COMO SUBSTRATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Pernambuco como pré-requisito para obtenção do grau de  
**Doutor** em Ciências Biológicas, área de concentração:  
Biotecnologia.

Data de Aprovação: 24/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki (Orientadora/UFPE)

---

Profa. Dra. Norma Buarque Gusmão – UFPE

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva – UNICAP

---

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco- UFRPE

---

Profa. Dra. Celuta Sales Alviano – UFRJ

## DEDICO

À Deus por ter permitido alcançar mais esta etapa na minha vida.

À minha família, João Lima, Jacira Lima, Jardilene Lima e Jorge Silva que sempre me apoiaram e incentivaram incondicionalmente para a conquista dos meus ideais.

À Minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Galba Takaki e a co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.  
Kaoru Okada, pelos exemplos e valiosos ensinamentos.

## **O Sonho**

Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser. Porque você possui apenas uma vida e nela só tem uma chance de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram.

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

**Clarice Lispector**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela constante presença em minha vida e pelo fortalecimento em todos os momentos.

Aos meus pais Jacira de Negreiros Lima e João Abílio de Lima pela oportunidade de proporcionar a realização deste curso e pelo amor e carinho recebidos.

À minha irmã, Jardilene Lima e ao meu esposo Jorge Silva, pelo companheirismo, paciência e compreensão em todos os momentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Takaki, orientadora deste trabalho, pelo apoio na organização e construção deste trabalho, expresso todo o meu carinho e sincero agradecimento;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kaoru Okada, co-orientadora deste trabalho, pela valiosa oportunidade que me concedeu, ao me aceitar como aluna desde minha graduação, muito contribuindo para meu aperfeiçoamento profissional.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Pe Pedro Rubens Ferreira Oliveira pela disponibilidade do espaço físico do Núcleo em Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB).

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na pessoa do seu Reitor Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação.

Aos coordenadores do curso de pós- graduação em Ciências Biológicas, Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra e Profa. Dra. Maria Tereza Santos Correia, obrigada por darem continuidade ao programa com muita dedicação e humanismo, pois é de grande relevância para a formação e qualificação de recursos humanos.

Aos Professores do Doutorado em Ciências Biológicas, Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon, Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães, Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra e Profa. Dra. Galba Maria de

Campos-Takaki pelos ensinamentos.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Sônia Maria de Souza, André Felipe Santos Lima e Severino Humberto Gomes de Almeida, que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Sônia Maria de Souza, André Felipe Santos Lima e Severino Humberto Gomes de Almeida, que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Sônia Maria de Souza, André Felipe Santos Lima e Severino Humberto Gomes de Almeida, que sempre se dispuseram a ajudar em todos os momentos;

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, pela força e amizade;

À Coordenação de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para realização do doutorado em Ciências Biológicas, pelo apoio financeiro;

À todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

Os lipídios são substâncias biológicas importantes, quimicamente constituídas moléculas polares e não polares, que podem ligar-se covalentemente a carboidratos e ou proteínas para formar glicolipídios e lipoproteínas, respectivamente. Em micro-organismos considerados acumuladores de lipídeos, constituem uma alternativa promissora na produção de insumos com alto valor agregado para as áreas médicas e farmacêutica, na indústria química, de tintas, de combustíveis, e como substratos para a produção de biossurfactantes. Neste sentido, estudos foram realizados com estirpes de *Rhizopus* isoladas de solos da caatinga de Pernambuco, Brasil, para a identificação morfológica, molecular, com a habilidade de crescimento em diferentes condições de pH, temperatura e salinidade, assimilação e fermentação das fontes de carbono e nitrogênio, detecção enzimática (amilase, protease, lipase, polifenoloxidase e tanase) pelo halo de produção e avaliação da produção de biomassa, lipídios e biossurfactante. A identificação foi através da visualização de esporângios, com amadurecimento, hifas não septadas, estolões e esporangiósporos com a presença dos rizóides. No teste de assimilação, observou-se a habilidade do *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *Rhizopus stolonifer* e o *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* em degradar e fermentar várias fontes de carbono e nitrogênio apresentando baixa degradação e produção de gás. As amostras de *Rhizopus* apresentaram maior crescimento no meio com pH 4,7 e 9, com diâmetro máxima de 82mm e na presença de 2,5% do NaCl observou-se o crescimento máximo de 52mm, a temperatura de 28°C. As amostras *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *R. stolonifer* e *R. microsporus* var. *microsporus* para a detecção de lipase foi observada apenas para *R. stolonifer* com índice enzimático de 1,4mm e 1,13mm, tendo como substratos os indutores Tween 20 e 80, respectivamente. A maior produção de biomassa, lipídios totais e biossurfactante foi apresentado por *R. microsporus* com a formulação do meio para 20% de milho, 3% de farelo de trigo e 5% de manipueira, apresentando 5,5g/L de biomassa, 69% de acumulação de lipídios. A composição química dos ácidos graxos indicou a presença dos ácidos palmítico (23,6%), esteárico (5,5%), oléico (27,2%), linoléico (37,6%) e gama-linolênico (6,2%). A produção do biossurfactante foi evidenciada pela redução da tensão superficial da água de 72 para 28,50 mN/mL, índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) de 90%, utilizando óleo de motor queimado, composição química por 59% de lipídeos, 20,90% de carboidratos e 16% de proteínas, tensão de superfície do biotensoativo produzido foram estáveis as temperaturas que variam de 0-100 (° C), pH (2-12) e os valores de concentração de NaCl (2-12% w / v) e o rendimento foi estimado em 3,64g / L. Os resultados obtidos indicaram que *R. microsporus*, é um micro-organismos promissor, considerando o potencial lipolítico, como fungo oleaginoso e produtor de molécula tensoativa, empregando meio de composição química alternativa, de baixo custo devido ao uso de substratos agroindustriais, além ampla aplicabilidade biotecnológica dos bioprodutos.

**Palavras-Chave:** *Rhizopus microsporus*. Atividade lipolítica. Lipídios. Tensoativo. substratos agroindustriais.

## ABSTRACT

Lipids are important biological substances, chemically constituted polar and non-polar molecules, which can covalently bind to carbohydrates and or proteins to form glycolipids and lipoproteins, respectively. In microorganisms considered as lipid accumulators, they are a promising alternative in the production of high value-added inputs for the medical and pharmaceutical areas, the chemical industry, paints, fuels, and as substrates for the production of biosurfactants. In this sense, studies were carried out with *Rhizopus* strains isolated from soils of the caatinga of Pernambuco, Brazil, for morphological and molecular identification, with the ability to grow in different pH, temperature and salinity conditions, assimilation and fermentation of carbon sources and nitrogen, enzymatic detection (amylase, protease, lipase, polyphenoloxidase and tannase) by the production halo and evaluation of the production of biomass, lipids and biosurfactant. The identification was through the visualization of sporangia, with maturation, non-septate hyphae, stolons and sporangiospores with the presence of rhizomes. In the assimilation test, the ability of *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *Rhizopus stolonifer* and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* to degrade and ferment several carbon and nitrogen sources presenting low degradation and gas production. *Rhizopus* samples presented higher growth in the medium with pH 4.7 and 9, with a maximum diameter of 82mm and in the presence of 2.5% of NaCl, the maximum growth of 52mm was observed, at 28°C. The samples *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *R. stolonifer* and *R. microsporus* var. *microsporus* for the detection of lipase was observed only for *R. stolonifer* with enzymatic index of 1.4mm and 1.13mm, having as substrates the Tween 20 and 80 inducers, respectively. The highest production of biomass, total lipids and biosurfactant was presented by *R. microsporus* with the formulation of the medium for 20% of cornmeal, 3% of wheat bran and 5% of mango tree, presenting 5.5g / L of biomass, 69% accumulation of lipids. The chemical composition of fatty acids indicated palmitic (23.6%), stearic (5.5%), oleic (27.2%), linoleic (37.6%) and gamma-linolenic acids (%). The production of biosurfactant was evidenced by the reduction of the water surface tension from 72 to 28.50 mN / mL, emulsification index (E24) of 90%, using engine oil burned, chemical composition by 59% of lipids, 20,90 % of carbohydrates and 16% of proteins, surface tension of the biotensioativo produced were stable at temperatures ranging from 0-100 (° C), pH (2-12), and NaCl concentration values (2-12% w / The results indicated that *R. microsporus* is a promising microorganism, considering the lipolytic potential, as oleaginous fungus and tensioactive molecule producer, using an alternative chemical composition medium , low cost due to the use of agroindustrial substrates, and broad biotechnological applicability of bioproducts.

**Keywords:** *Rhizopus microspores*. Lipase activity. Lipids. Surfactant. Agro-industrial substrates.

# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 1

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Síntese de precursores de lipídios e biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substrato.                                                                          | 25 |
| <b>Figura 2:</b> Estrutura molecular do surfactante                                                                                                                                                   | 26 |
| <b>Figura 3.</b> Mapa do Brasil com os diferentes biomas                                                                                                                                              | 29 |
| <b>Figura 4.</b> Vegetação da Caatinga                                                                                                                                                                | 30 |
| <b>Figura 5.</b> Cepa de <i>Rhizopus</i> sp cultivado em placa de Petri contendo meio de Ágar Batata Dextrose (BDA) (A), Micrografia Eletrônica de Varredura de Esporângio de <i>Rhizopus</i> sp. (B) | 34 |
| <b>Figura 6.</b> <i>Rhizopus microsporus</i> cultivado em placa de Petri contendo meio de Ágar Batata Dextrose (BDA) (A), Micrografia óptica do <i>Rhizopus microsporus</i> (B)                       | 35 |

## Capítulo 2

|                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> Macroscopic and Microscopic Observation of <i>Rhizopus</i>                                                                                                                                                                                    | 56 |
| <b>Figura 2</b> Colony radial growth (mm) of <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> (A) and <i>Rhizopus stolonifer</i> (B) and <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> (C) pH 4, pH 7 and pH 9 at 28 ° C for 96 hours                  | 57 |
| <b>Figura 3</b> Colony radial growth (mm) of <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> (A) and <i>Rhizopus stolonifer</i> (B) and <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>Microsporus</i> (C) in salinity 2.5% and 5% at 28 ° C for 96 hours              | 58 |
| <b>Figura 4</b> Colony radial growth (mm) of <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> (A) and <i>Rhizopus stolonifer</i> (B) and <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> ( C) in temperatures of 28 ° C, 37 ° C and 45 ° C for 96 hours. | 58 |

## Capítulo 3

|                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Citoquímica do fungo <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304 cultivada no meio de composição definida para Mucorales (A) e meios agroindustriais (milhocina 20%, manipueira 5% e farelo de trigo 3%) (B) com aumento de 40x         | 60 |
| <b>Figura 2:</b> Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de Biomassa por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304 em meio contendo manipueira, milhocina e farelo de trigo após 96hs de fermentação à 28°C por 150rpm | 69 |
| <b>Figura 3:</b> Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de lipídios totais por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304 em meio contendo                                                                             | 69 |

manipueira, milhocina e farelo de trigo após 96hs de fermentação por 150rpm

**Figura 4:** Atividade antioxidante de lipídios totais obtido a partir do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 cultivado em meio agroindústrias (milhocina 20%, farelo de trigo 3% e manipueira 5%)

72

#### Capítulo 4

**Figura 1:** diagrama de Pareto para a redução da tensão superficial (mN / m), as estimativas de efeitos que foram estatisticamente significativas ( $p = 0,5$ ) são indicados pela linha tracejada

82

**Figura 2:** Cinética do crescimento, tensão superficial e o pH utilizando resíduos agroindustriais (20% de milhocina, 5% de manipueira e 3% de farelo de trigo)

83

**Figura 3:** Índice de emulsificação (E24) em diferentes substratos hidrofóbicos

84

**Figura 4:** Estabilidade do biossurfactante produzido por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 usando (20% de milhocina, 5% de manipueira e 3% de farelo de trigo)

85

**Figura 5** – Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 avaliado pela medição da tensão superficial

86

# LISTA DE TABELA

## Capítulo 1

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores                     | 27 |
| <b>Tabela 2:</b> Valores Médios para a caracterização de resíduos líquidos da industrialização da mandioca | 37 |
| <b>Tabela 3:</b> Composição típica de milhocina.                                                           | 38 |

## Capítulo 2

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1</b> Identification of samples <i>Rhizopus</i> isolated from soil of the Caatinga-PE                                                                                                                     | 56 |
| <b>Table 2</b> Fermentation of carbon <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> and <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> isolated from soil of Caatinga - PE   | 57 |
| <b>Table 3</b> Nitrogen assimilation by <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> and <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> isolated from soil of Caatinga - PE | 57 |
| <b>Table 4</b> Assimilation of carbon <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> and <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> isolated from soil of Caatinga - PE   | 57 |

## Capítulo 3

|                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Matriz do Planejamento Fatorial Completo $2^3$                                                                                                                                                                             | 64 |
| <b>Tabela 2.</b> Planejamento Fatorial $2^3$ , tendo como variáveis Milhocina (%), Farelo de Trigo (%) e Manipueira (%) variável resposta a produção de Biomassa e Lipídios por estirpes de <i>Rhizopus</i> isolados do solo da Caatinga/PE | 64 |
| <b>Tabela 3:</b> Crescimento de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304 (biomassa g/L), produção de lipídios totais (%) e pH do meio contendo manipueira, milhocina e farelo de trigo após 96hs de fermentação à 28°C        | 68 |
| <b>Tabela 4.</b> Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em meio agroindustriais (milhocina, farelo de trigo e manipueira 20, 3, 3%), <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304 a 28° C, em 96h      | 71 |

## Capítulo 4

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Matriz do Planejamento Fatorial Completo $2^3$                                                                                                                                                                              | 80 |
| <b>Tabela 2.</b> Planejamento Fatorial $2^3$ , tendo como variáveis Milhocina (%), Farelo de Trigo (%) e Manipueira (%) variável resposta a produção de Biossurfactante e pH por <i>Rhizopus microsporus</i> isolados do solo da Caatinga/PE | 81 |
| <b>Tabela 3:</b> Os resultados de produção de biossurfactante por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP 1304, utilizando planejamento fatorial completo $2^3$ com repetições do ponto central, às 96 horas de crescimento        | 82 |

# SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO I .....</b>                                                                                                                                                                                                                                           | <b>15</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                                                                                                                          | <b>16</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                          | <b>18</b> |
| 2.1 Geral.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 18        |
| 2.2 Específicos.....                                                                                                                                                                                                                                              | 18        |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                                                                                                                                                                                               | <b>19</b> |
| 3.1 Lipídios.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 19        |
| 3.2 Mercado global dos lipídios .....                                                                                                                                                                                                                             | 20        |
| 3.2.1 Mercado dos lipídios no Brasil.....                                                                                                                                                                                                                         | 20        |
| 3.3 Micro-organismos oleaginosos .....                                                                                                                                                                                                                            | 21        |
| 3.4 Demanda global de lipídios microbianos .....                                                                                                                                                                                                                  | 22        |
| 3.5 Metabolismo de micro-organismos via de produção de lipídios e biossurfactante .....                                                                                                                                                                           | 23        |
| 3.6 Surfactantes .....                                                                                                                                                                                                                                            | 25        |
| 3.7 Biossurfactante.....                                                                                                                                                                                                                                          | 26        |
| 3.7.1 Vantagens do uso dos biossurfactantes.....                                                                                                                                                                                                                  | 28        |
| 3.7.2 Aplicação de biossurfactantes.....                                                                                                                                                                                                                          | 28        |
| 3.8 Caatinga.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 29        |
| 3.9 Solo .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 31        |
| 3.10 Zygomycetes.....                                                                                                                                                                                                                                             | 32        |
| 3.11 Aspectos gerais dos <i>Rhizopus spp</i> .....                                                                                                                                                                                                                | 33        |
| 3.11.1 <i>Rhizopus microsporus</i> .....                                                                                                                                                                                                                          | 34        |
| 3.12 Rejeitos agroindustriais .....                                                                                                                                                                                                                               | 35        |
| 3.12.1 Manipueira.....                                                                                                                                                                                                                                            | 36        |
| 3.12.2 Milhocina.....                                                                                                                                                                                                                                             | 38        |
| 3.12.3 Farelo de trigo.....                                                                                                                                                                                                                                       | 39        |
| <b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>41</b> |
| <b>CAPÍTULO 2 .....</b>                                                                                                                                                                                                                                           | <b>53</b> |
| Isolation, Identification and Phenotypic Characterization of <i>Rhizopus microspores</i> var. <i>chinensis</i> , <i>Rhizopus microspores</i> var. <i>microspores</i> and <i>Rhizopus stolonifer</i> isolated from soil of the Caatinga in Pernambuco, Brazil..... | 53        |

|                                                                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 3 .....</b>                                                                                                                                                    | <b>59</b> |
| Produção de lipídios por fungo oleaginoso <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP1304 em<br>condição de crescimento usando substratos agroindústrias ..... | <b>60</b> |
| <b>CAPÍTULO 4 .....</b>                                                                                                                                                    | <b>76</b> |
| Produção de Biossurfactante por <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> UCP1304utilizando<br>resíduos agroindustriais.....                                     | <b>77</b> |
| <b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>                                                                                                                                             | <b>93</b> |

## CAPÍTULO I



## 1 INTRODUÇÃO

---

O estudo de micro-organismos para a produção de lipídios é uma alternativa para a substituição de fontes convencionais de óleos e gorduras. Uma vez que estes lipídios apresentam composição semelhante aos óleos vegetais, poderiam ser empregados para fins alimentares, combustíveis alternativos, bem como na produção de compostos específicos de uso limitado, como produtos farmacêuticos e cosméticos (HYDE et al., 2010).

Os biossurfactantes são moléculas produzidas por micro-organismos, possuem estrutura molecular anfifílica e apresentam potencial em aplicações comerciais de petróleo, produtos farmacêuticos, indústria de alimentos e cosméticos (JUKYOUNG *et al.*, 2009; KHOPADE *et al.*, 2012; JARA *et al.*, 2013; SHARMA e SAHARAN, 2014).

Os fungos são organismos muito versáteis no que diz respeito às condições ambientais, entre os produtores de lipídios e surfactante, destacam-se os Zygomycetes, considerando o rápido crescimento e a habilidade de utilizar diferentes substratos, demonstrando alto potencial biotecnológico na produção de moléculas de alto valor agregado. Contudo, suas atividades metabólicas podem ser alteradas em resposta a variações das condições físicas e químicas do meio ambiente (ALEXOPOULOS et al., 1996). Na síntese de lipídios por fungos atuam fatores ambientais, como fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e pH. Estes fatores quando controlados podem acarretar maior acréscimo desses compostos na biomassa fúngica.

Oliveira et al., (2005) ressaltam que a utilização de substratos agroindustriais de baixo custo torna-se muito interessante, pois além da facilidade de aquisição apresenta um custo relativamente baixo.

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida a uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é usada principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (DOMINGOS, 2009).

Como o consumo do trigo não se dá de forma direta, os grãos precisam ser processados através da moagem e refinamento para obtenção da farinha de trigo. É do interior dos grãos que é extraído a farinha. Neste processo, o resíduo gerado é a casca do grão, também conhecido como farelo de trigo. A farinha é comercializada para fins industriais e alimentícios enquanto o farelo é comercializado, sendo incorporado em rações animais, tendo em vista ser um material rico em fibras e proteínas (SILVA, 2006).

A manipueira é oriundo do processo da produção de farinha, de mandioca prensada, sendo esse efluente descartado sem nenhum tratamento, causando a poluição dos cursos de água (rios e riachos) com grandes prejuízos à natureza. A toxidade desse efluente está relacionada a dois componentes com forte potencial poluidor, destacando-se a matéria orgânica biodegradável e o ácido cianídrico (MESEL e PIMENTEL, 2007).

Neste sentido, pretende-se realizar a avaliação biotecnológica de amostras de *Rhizopus* spp utilizando rejeitos agroindustriais (milhocina, manipueira e farelo de trigo) na produção de lipídios e biossurfactante.

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1 Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de amostras de *Rhizopus* spp isolados do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil na produção de lipídios e biossurfactante utilizando diferentes resíduos agroindustriais como substrato (milhocina, manipueira e farelo de trigo), através de um planejamento experimental completo 2<sup>3</sup>.

### 2.2 Específicos

- Isolar, identificar e caracterizar morfológicamente linhagem de *Rhizopus* spp.;
- Realizar a cinética de crescimento *Rhizopus* spp nos substratos agroindustriais;
- Realizar a produção de biomassa por *Rhizopus* spp nos meios contendo diferentes concentrações dos substratos agroindustriais utilizando um planejamento experimental completo 2<sup>3</sup>;
- Investigar a influência da concentração dos meios formulados em resíduos agroindustriais na produção de lipídios pelo fungo;
- Isolar e caracterizar lipídios totais e ácidos graxos utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>;
- Investigar a produção do biossurfactante utilizando resíduos agroindustriais em um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>;
- Caracterizar físico quimicamente o biossurfactante;
- Avaliar os resultados obtidos através de análise estatística.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 3.1 Lipídios

O termo lipídio, tradicionalmente, tem sido usado para descrever uma variedade de compostos naturais, incluindo os ácidos graxos e seus derivados, esteróides, terpenos, carotenóides e ácidos biliares, que têm em comum a solubilidade em solventes orgânicos, tais como: hexano, benzeno, clorofórmio ou metanol (SILVA, 2011; DIGBY WREDE et al., 2014).

Lipídios (óleos e gorduras) constituem os principais componentes insolúveis em água presentes em alimentos, sendo encontrados quase sempre na forma de triglicérides (ARAÚJO, 2008). Compostos por ácidos graxos, os triglicérides desempenham importante papel na qualidade sensorial dos alimentos e em seu valor nutritivo por serem fontes de energia, de ácidos graxos essenciais (principalmente o ácido linoleico) e de vitaminas lipossolúveis (MASUCHI et al., 2008).

São classificados como simples, quando são constituídos por ácidos graxos e alcoóis; como compostos, quando são constituídos por outros grupos na molécula, além de ácidos graxos e álcoois. Os lipídios são derivados de substâncias obtidas por hidrólise de lipídios simples e compostos (RUAN et al., 2014). Os ácidos graxos podem estar ligados ao glicerol, bases de cadeias longas esfingolipídios, ácidos fosfóricos (fosfolipídios), açúcares ou outros componentes, considerados mais complexos (AZAD et al., 2014).

Estes compostos possuem funções imprescindíveis para o bom funcionamento do organismo tais como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormônios e mensageiros intracelulares. Na dieta humana, os lipídios são responsáveis por liberarem a maior parte da energia necessária para a manutenção das vias metabólicas (cerca de 9 kcal/g), fornecendo duas vezes mais energia que outras fontes como carboidratos e proteínas. Outras funções atribuídas aos lipídios são: vitaminas lipossolúveis A, D, E e K; mediadores celulares como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanas; isolamento térmico de animais e o de conferir sabores a diversos alimentos (OYAMA et al., 2001; VALSTA et al., 2005).

Os lipídios constituem o material de reserva em animais, plantas e micro-organismos, sendo que, no caso dos eucariontes, os triglicérides são os principais responsáveis por este papel. São também constituintes da membrana celular, como os fosfolipídios, participando dos processos fotossintéticos e também, de outros processos geradores de energia (SILVA, 2011; KARATAY E DÖNMEZ, 2011; ZHENHUA RUAN et al., 2014).

### 3.2 Mercado global dos lipídios

Os principais óleos comercializados são os vegetais entre eles o óleo de soja que apresenta o mais rápido crescimento no mercado (produção é cerca de 187.106t); óleo de palma com 147.106t com expansão de produção continua na Malásia e Indonésia chegando a um total de 20,84 milhões de toneladas. O óleo de colza (97.106t) também está se expandindo, principalmente devido o aumento do cultivo na Europa e Canadá. A variedade sob o cultivo é a baixa (ou zero) de ácido erúico (20:1) óleo que é permitido para o fabricação de alimentos (BASIRON e IBRAHIM, 1994; LEONARD, 1994).

A produção total de óleos vegetais e animais é aumentada em cerca de 3% ao ano; a produção em 1992/93 foi de cerca de 857.106t e é esperado para chegar a 1057,106t até o ano 2000 (MIELKE, 1992). Os Preços destes óleos permanece altamente competitivo como a maioria dos produtos que utilizem óleos pode alternar entre os vários tipos de acordo com o preço do dia. A média de preços para os principais óleos é cerca de US\$ 500-550 por t embora o óleo de amendoim, por exemplo, é sempre significativamente maior do que a média em US\$ 800-850 por t. O óleo de azeite é um dos óleos vegetais mais caro chegando o seu a US \$ 1.500-2.000 por t, seu preço depende da sua qualidade.

Os óleos de animais (sebo e banha) têm diminuiu de forma constante do consumo durante a última década e são susceptíveis de cair ainda mais cerca de 20% do total do mercado (SHUKLA, 1994). Seus preços são, portanto, geralmente igual ou inferior ao nível do índice médio. As tendências no fornecimento de petróleo mundial e gorduras estão sob vigilância constante e são frequentemente revisto em várias publicações.

#### 3.2.1 Mercado dos lipídios no Brasil

A produção brasileira anual de óleos vegetais é de aproximadamente 3,5 milhões de toneladas, enquanto o consumo doméstico é ao redor de 2,5 milhões de toneladas ao ano. O óleo de soja responde por cerca de 95% do consumo total, sendo também produzidos os óleos de algodão, amendoim, palmiste, rícino, girassol, milho, canola, palma e gordura de babaçu (HAUMANN et al., 1995). O óleo de soja é responsável por 98% da produção brasileira de óleos vegetais, o que equivale a 4,05 milhões de toneladas métricas. O Brasil é o segundo produtor mundial de óleo de soja (3.833 milhões de toneladas métricas por ano) e o décimo terceiro país produtor de óleo de palma (95 mil toneladas métricas por ano).

Os óleos de algodão, milho e palma provêm mais do que 90.00 toneladas métricas cada, sendo seguidos pelos óleos de amendoim, palmiste e girassol. Apesar de ter a maior área mundial com condições adequadas, ou seja, área equatorial virgem, o Brasil produziu apenas 85.000 toneladas de óleo de palma em 1997. Espera-se que a produção brasileira deste óleo seja aumentada durante os próximos 20 anos para cerca de 500.00 toneladas métricas anuais, com a maior parte sendo utilizada para o uso alimentício (D' AGOSTINI, 2001).

A Malásia é o maior produtor e exportador mundial de óleo de palma principalmente, apresentando 54% da produção mundial (10,55 milhões de toneladas métricas por ano). O maior país produtor da América Latina é a Colômbia ( 440 mil toneladas métricas por ano), figurando como o quarto maior país produtor de óleo de palma a nível mundial (BRUNCKHOST, 2000).

### 3.3 Micro-organismos oleaginosos

Os micro-organismos têm recebido cada vez mais atenção por causa da sua alta produtividade de lipídios podendo acumular mais do que 20-25% da sua biomassa celular sendo assim considerado como micro-organismo oleaginoso (FIDLER et al., 1999; SUBRAMANIAM et al., 2010; Yang et al., 2014).

Certas estirpes e espécies de levedura e fungos filamentosos são conhecidos por produzir quantidades elevadas de óleos e gorduras. Lipídios de fungos e os seus ácidos graxos têm sido bem reconhecido desde o final do século XIX (DE BK e KUMAR T, 2005; BIJAY KRISHNA DE e SHIKHA VERMA, 2011). Estudos foram feitos para determinar o potencial de aplicação de fungos para a produção de lipídios. A produção de lípidos e ácidos graxos a partir de fontes microbianas tem sido investigada e relatado por vários pesquisadores (BAJPAI et al. 1991; SHIMIZU et al., 1988; SAXENA et al., 1998; CHAUDHURI et a., 1997; DE e KUMAR, 2005). Bajpai et al (1991) e Shimizu et al (1988) investigaram a produção e otimização de araquidônico e ácido eicosapentaenóico no fungo do gênero *Mortierella*. De e Kumar (2005) otimizaram a produção de lipídios e ácidos graxos polinsaturados especialmente em alguns fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Mucor*. A eficácia da produção de lípidos dos fungos *Aspergillus oxysporum* (76.60%), *A. solani* (45,80%), *A. ustus* (38,00%) e *A. semitectum* (37,80%) foi relatado por Naqvi et al (1997).

Geralmente lipídios microbianos são acumulados como armazenamento de energia, quando o crescimento celular torna-se limitado devido à escassez de nitrogênio ou outros nutrientes,

enquanto fonte de carbono excessivo ainda está disponível (PINZI e DORADO, 2012). Na maioria dos casos, a partir de lípidos destes microrganismos são em forma de triglicéridos, que são também o principal componente dos óleos vegetais e animais (ROSILLO-CALLE et al., 2009). Entre estes diferentes microrganismos oleaginosos, fungos filamentosos têm algumas propriedades favoráveis. Células de fungos filamentosos, em geral, são mais facilmente colhidas, especialmente quando crescem na forma de peletes ou micélio (DORADO et al., 2003). Algumas espécies de fungos, tais como *Mortierella sp.*, Pode acumular os lipídios intracelulares como 80% com base no peso seco (KOUTINAS A. A e PAPANIKOLAOU S, 2011) no entanto, eles não podem ser caracterizado como microorganismo oleaginoso quando se acumula o óleo microbiano inferior a 20% do seu peso seco total celular. A acumulação de óleo microbiano apresenta a mesma composição de ácidos graxos semelhante aos óleos vegetais através de condições limitantes de crescimento como, por exemplo, os gêneros de leveduras (*Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Trichosporon*) e os fungos (*Mortierella*, *Cunninghamella*) (MENG et al., 2009).

Os óleos microbianos apresentam um alto valor agregado podendo substituir os óleos vegetais e animais para as indústrias oleoquímicas, entre elas, indústrias de cosméticos, produtos farmacêuticos, tintas, lubrificantes e aditivos de polímero (KOUTINAS et al., 2014).

### 3.4 Demanda global de lipídios microbianos

Alguns produtos de lípidos microbianos têm sido produzidos e as perspectivas comerciais parecem não estarem muito longe como por exemplo o lipídio de bactéria, poli-b-hidroxibutirato (RATLEDGE, 1993).

Em contrapartida os óleos de plantas ou animais apresentam um domínio econômico fora do normal, fazendo com que os óleos microbianos tenham dificuldades de atingir o mercado (LEONARD, 1994).

Estudos revelam que os lipídios microbianos equivalem em composição com os óleos de plantas, porém a elevada valorização só existe se forem produzidos por biotecnologia que é quase impossível para os micro-organismos por apresentarem um alto valor de produção (RATLEDGE, 1993; MENG et al., 2009).

No entanto, há sempre a possibilidade de produzir óleo microbiano como um co-adjuvante para alguns resíduos de processo de tratamento, de modo similar ao que frequentemente é usado para produzir as proteínas microbianas (SCP) utilizadas para a

alimentação animal a partir de alguns substratos indesejados. Óleos microbianos - que poderia, então, ser referida como célula única (óleo intracelular) produtora de óleos - teria a dupla vantagem sobre as proteínas microbianas em que eles provavelmente poderiam vender por um preço bem maior (RATLEDGE, 2004).

### **3.5 Metabolismo de micro-organismos via de produção de lipídios e biossurfactante**

As vias de biossíntese de lipídios e biossurfactante em micro-organismos são equivalentes àquelas encontradas em animais e plantas, os micro-organismos realizam a síntese de seus compostos celulares com grande velocidade e consequentemente respondem a mudanças ambientais da mesma forma (BANAT et. al., 2010; SILVA, 2011; PAPANIKOLAO e AGGELIS, 2011).

Nos micro-organismos, os lipídios e biossurfactante são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição, qualidade e quantidade de lipídios variam de espécie para espécie de acordo com as condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento (SILVA, 2011; RATLEDGE, 2008).

Acumulação de lipídios e produção de biossurfactante nos micro-organismos oleaginosos tem sido observada quando nutriente no meio (por exemplo, o nitrogênio ou a fonte de fósforo) torna-se limitada quando a fonte de carbono está presente em excesso. Limitação de nitrogênio é a condição mais eficiente para induzindo a lipogênese. Durante a fase de crescimento, o azoto é necessário para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, enquanto que o fluxo de carbono é distribuído entre energético e processos anabólicos rendendo hidratos de carbono, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. Quando o nitrogênio fica limitada, a taxa de crescimento abranda e a síntese de proteínas e ácidos nucleicos tende a cessar. Em espécies não oleaginosas, o excesso de carbono permanece inutilizado ou é convertido em polissacáridos de armazenamento, enquanto que, em espécies oleaginosas, é preferencialmente canalizado para a síntese de lipídios, levando ao acúmulo de triacilgliceróis intracelular, corpos lipídicos (GRANGER et al., 1993; RATLEDGE e WYNN, 2002).

A via bioquímica da biossíntese de lipídios não é muito diferente entre os organismos eucariontes e não difere dos fungos oleaginosos e não oleaginosas. A capacidade de acumular altas teores de lipídios depende principalmente da regulação da biossíntese através do



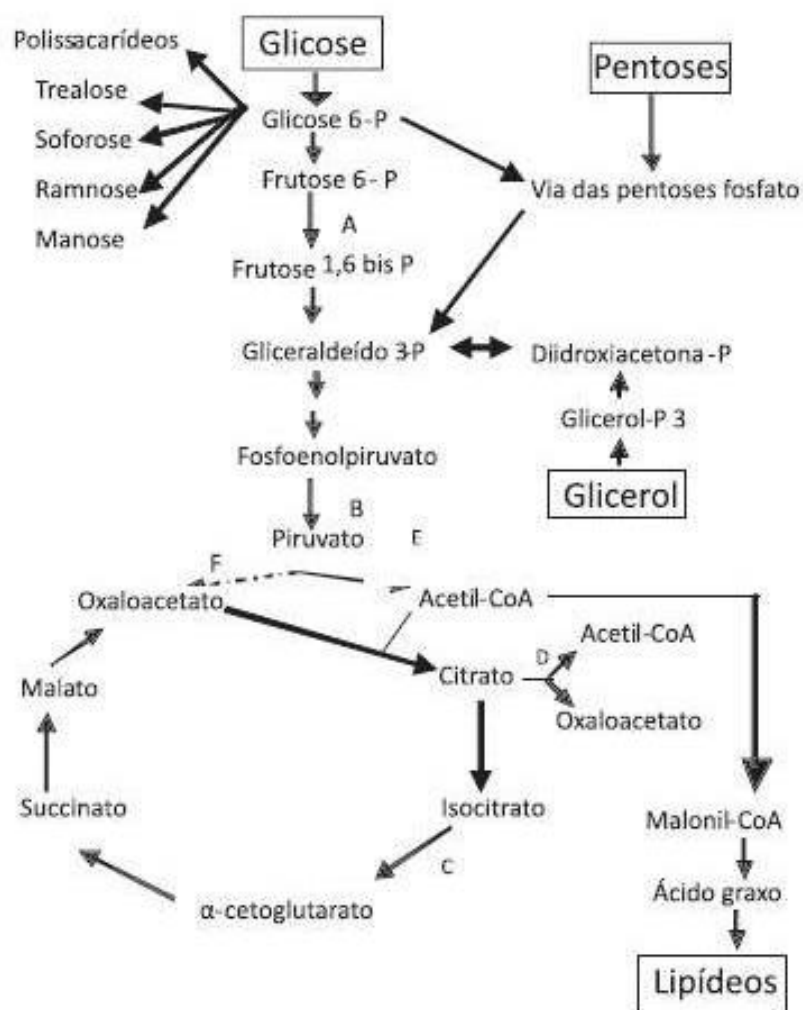
fornecimento dos precursores (acetil-CoA, malonil-CoA, e glicerol-3 fosfato) e o cofator NADPH (BEOPOULOS et al., 2009; KOHLWEIN, 2010).

Esses compostos são sintetizados por duas vias metabólicas responsáveis pela síntese dos grupos hidrofóbico e hidrofílico da molécula: a via dos hidrocarbonetos e a via dos carboidratos (DESAI e BANAT, 1997; FONTES et al., 2008). As vias para a síntese dos dois grupos de precursores são diversas e utilizam conjuntos específicos de enzimas (CAMEOTRA et al., 2010).

Hidrocarbonetos e carboidratos estão envolvidos diretamente na síntese das porções hidrofóbicas e hidrofílicas dos tensoativos. No entanto, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes por micro-organismos são obtidas quando se utiliza substratos hidrofóbicos. Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel e um carboidrato, como constituintes do meio de produção (LIMA et al., 2010; XU et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012).

Para a síntese da porção polar do biossurfactante e para o metabolismo celular, os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbonica do biossurfactante. O substrato hidrofílico utilizado como glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante (Figura 1). Para a produção de lipídeos, presentes na porção hidrofóbica, a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (FONTES et al., 2008).

**Figura 1:** Síntese de precursores de lipídios e biosurfactante a partir da utilização de carboidratos como substrato.

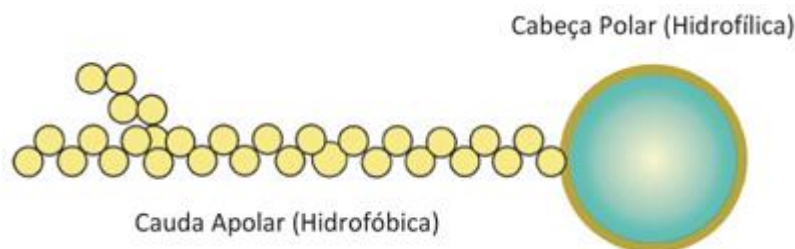


**Fonte:** Fontes et al., 2008

### 3.6 Surfactantes

Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos, são sintéticos em sua grande maioria, produzidos por processos químicos a partir de derivados do petróleo (RUFINO et al., 2014). Sua estrutura necessita de uma atenção especial para permitir a melhor escolha diante de sua aplicação (KHOPADE et al., 2012).

As moléculas tensoativas possuem um grupamento polar com afinidade por água (e outros compostos polares), denominado grupo hidrofílico. Na mesma molécula há também o grupo hidrofóbico, que por sua natureza apolar, possui afinidade por substâncias oleosas (substâncias apolares) chamado de grupamento hidrofóbico ou lipofílico (Figura 2) (JARA et al., 2013).

**Figura 2:** Estrutura molecular do surfactante

Fonte: <http://www.ecosafety.com.br>

A porção hidrofílica é constituída de grupamentos polares como grupos carboxilato, sulfato, sulfonato, amônio quaternário, betainicos ou cadeias polioxietilénicas. O grupo hidrofóbico (apolar) do surfactante é constituído por cadeia hidrocarbonica de 10 - 20 átomos de carbono aromático ou alifático, em linha reta ou ramificada e carbonos reduzidos provenientes de gorduras e óleos naturais, frações de petróleo, polímeros e álcoois sintéticos (LUNA et al., 2012)

### 3.7 Biossurfactante

Os biossurfactantes são biomoléculas tensoativas produzidos por células vivas, principalmente por micro-organismos. Eles são compostos bioquímicos anfifílicos que contêm tanto porções hidrófobas e hidrófilas que permitem a partição na interface entre as regiões polares e não polares (FRANZETTI et al., 2011). Eles são produzidos por uma variedade de micro-organismos, principalmente de bactérias, fungos e leveduras (SATPUTE et al., 2009). A porção hidrofóbica de um biossurfactante pode ser uma proteína ou um peptídeo, com grandes cadeias hidrofóbicas (BANAT et al., 2010; FRANZETTI et al., 2010; SARAFIN et al., 2014). Geralmente possui uma cadeia de ácidos graxos com 10 a 20 átomos de carbonos como nos surfactantes sintéticos. Já a porção hidrofílica pode ser um grupo éster, uma hidroxila, um fosfato, um ácido carboxílico ou um carboidrato (WHANG et al., 2008; ANYANWU et al., 2011). A diferença dos constituintes de cada porção hidrofóbica e hidrofílica de um biossurfactante conduz a uma grande variedade de biossurfactantes diferentes (MUTHUSAMY et al., 2008; LIMA et al., 2010; NAWAWI et al., 2010; JANEK et al., 2012; SHARMA et al., 2014).

A classificação dos biossurfactantes é baseada na sua estrutura química e pela espécie microbiana produtora e também pelo seu peso molecular, embora o potencial de produção seja determinado também pela genética dos micro-organismos e a natureza do substrato empregado que também influenciam. O tipo de biossurfactante é muito específico podendo variar de acordo com a

especie do micro-organismo produtor e de acordo com a composicao quimica da molécula (RODRIGUES et al., 2006; LUNA et al., 2009; JANEK et al., 2012).

Segundo Singh (2012) as principais classes dos biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos, lipídios neutros fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos e particulados (Tabela 1).

**Tabela 1** - Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos produtores

| Classe                                                                                   | Micro-organismos                                                                                                                                                                                                                                                                      | Biossurfactante                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glicolipídeos                                                                            | <i>Pseudomonas</i> , <i>Torulopsis</i> ,<br><i>Arthrobacter</i> , <i>Nocardia</i> ,<br><i>Mycobacterium</i><br><i>Candida sphaerica</i>                                                                                                                                               | Ramnolipídeos,<br>Soforolipídeos,<br>Trealolipídeos<br>Lunasan                                               |
| Peptídeos e lipopeptídeos                                                                | <i>Candida lipolytica</i><br><br><i>Bacillus</i>                                                                                                                                                                                                                                      | Rufisan<br><br>Surfactina                                                                                    |
| Ácidos graxos,<br>Fosfolipídeos e Lipídeos<br>neutros<br>Biossurfactantes<br>poliméricos | <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,<br><i>Aspergillus</i> , <i>Arthrobacter</i> ,<br><i>Pseudomonas</i> ,<br><i>Acinetobacter</i><br><i>calcoaceticus</i> , <i>Candida</i><br><i>lipolytica</i> , <i>Saccharomyces</i><br><i>cerevisiae</i> , <i>Schizonella</i><br><i>malanogramma</i> | Fosfatidiletanolamina<br><br>Emulsan, liposan,<br>Manoproteínas,<br>Complexo de<br>Polissacarídeo - proteína |

**Fonte:** Singh (2012) adaptada

Os glicolipídios apresentam baixo peso molecular, são carboidratos ligados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidróxi-alifáticos. Dentre os principais destacam-se os ramípolídeos, trealolipídios e soforolipídios (RON e ROSENBERG, 2002). Os lipopeptídios caracterizam-se pelo baixo peso molecular, pela ampla atividade biológica como antibióticos, atividade antiviral e estimulam a atividade dos macrófagos (DESAI e BANAT, 1997; WHANG et al., 2008). Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídeos neutros são representados por uma classe com baixo peso molecular composta por grande quantidade de fosfolipídios e ácidos graxos (DESAI e BANAT, 1997;

ROSENBERG e RON, 1998). Os biossurfactantes polimericos são constituídos por variados grupos químicos, possuem alto peso molecular. Os biossurfactantes particulados são representados por uma classe que apresentam alto peso molecular. São estruturas morfológicas de alguns micro-organismos como as vesículas da membrana extracelular de *Acinetobacter sp.* que desempenham uma ótima função na partição dos hidrocarbonetos com a formação de microemulsões, e assim, facilitam a sua entrada nas células microbianas (DESAI e BANAT, 1997).

### 3.7.1 Vantagens do uso dos biossurfactantes

Os biossurfactantes oferecem várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos que, conseqüentemente, determinaram suas aplicações no setor industrial, podendo ser aplicados em condições ambientais desfavoráveis (APARNA et al., 2012). Dentre essas vantagens podemos citar:

- Tolerância a temperatura: as propriedades físico-químicas de alguns biossurfactantes não são afetadas por mudanças extremas de temperatura podendo suportar temperaturas de até 90°C. Apresentam maior estabilidade térmica em condições extremas quando comparados aos sintéticos (MAX et al., 2012).
- Tolerância a mudanças de pH e força iônica: possuem maior funcionalidade em extremos pH, entre 5 e 12 por exemplo, e são potencialmente ativos quando submetidos a concentrações de 10% de NaCl, enquanto que 2-3% de sal são suficientes para inativar surfactantes convencionais (ROCHA, 1999, MAX, et al., 2012)
- Biodegradabilidade: são facilmente biodegradados no solo e na água o que os tornam adequados para aplicação na biorremediação e no tratamento de resíduos (MALDONADE et al., 2012).
- Baixa toxicidade: em comparação com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam baixa toxicidade. Tem recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais, sendo permitido em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002; ANYANWU et al., 2011; TIMMA et al., 2014).
- Síntese a partir de material renovável e de baixo custo: estudos mostram a produção de biossurfactantes produzidos através de uma grande variedade de substratos orgânicos de baixo custo (LIMA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2012; JARA et al., 2013).

### 3.7.2 Aplicação de biossurfactantes

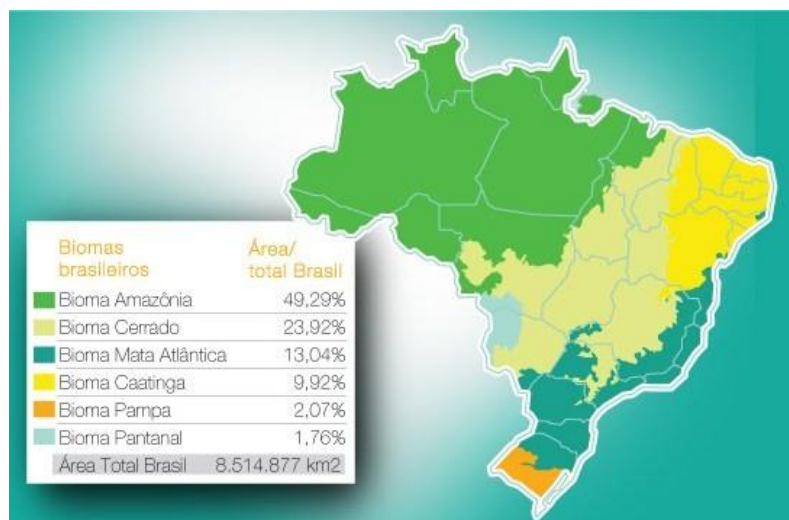
De acordo com Singh (2012) numerosas são as aplicações dos biossurfactantes tais como:

- Indústria alimentícia: usado como aditivos alimentares. Os principais representantes são as lecitinas e seus derivados, ester de ácido graxo contendo glicerol e sorbitol;
- Indústrias de cosméticos: sofrolípidos combinado ao propilenoglicol tem compatibilidade cutânea sendo, portanto, usados comercialmente como hidratantes;
- Indústria médica: biossurfactante e muito útil para o tratamento de várias doenças infecciosas em vegetais, tais como o lipídio succinotrealose de *Rhodococcus erythropolis*. 1% de uma emulsão de ramnolípido foi utilizado para o tratamento de folhas de *Nicotiana* infectada e para controlar a doença do vírus da batata;
- Em controle de poluição ambiental: é eficiente para o tratamento de emulsão industrial, controle de derramamento de óleo, em processos de biorremediação pelo qual os micro-organismos são utilizados para biodegradar ou remover os poluentes de solo e água;
- Produção econômica: dependendo da aplicação, os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de resíduos industriais e subprodutos.

### 3.8 Caatinga

O nome caatinga é originário da língua tupi-guarani, que significa “mata branca”. É um sistema ambiental exclusivamente brasileiro, que ocupa cerca de 11% do território nacional num total de 844.453 quilômetros quadrados. É o principal bioma da Região Nordeste, ocupando totalmente o Ceará e parte do Rio Grande do Norte (95%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%), da Bahia (54%), de Sergipe (49%), do Alagoas (48%) e do Maranhão (1%). A caatinga também cobre 2% de Minas Gerais. (SANTOS, 2010; Ministério do Meio Ambiente, 2012; JÚNIOR et al., 2013). (Figura 1).

**Figura 3.** Mapa do Brasil com os diferentes biomas



Fonte: [www.brasil.gov.br/sobre/meio-ambiente/geografia](http://www.brasil.gov.br/sobre/meio-ambiente/geografia)

A Caatinga situa-se entre o Equador e o Trópico de Capricornio (cerca de 3° a 18° sul). Portanto, dispõe de abundante intensidade luminosa, em todo seu território, durante todo o ano. As altitudes são relativamente baixas; exceto uns poucos pontos que ultrapassam os 2000m, na Bahia, os outros pontos extremos ficam pouco acima dos 1000m. As temperaturas são altas e pouco variáveis, com médias anuais entre 25°C e 30°C e poucos graus de diferença entre as médias dos meses mais frios e mais quentes. Assim, luz e temperatura não são limitantes ao crescimento vegetal e não são causa de maior variabilidade ambiental na área de Caatinga (MOURA et al., 2007; FILHO et al., 2013).

O regime de chuvas tem como características, precipitações intensas, muitas vezes ultrapassando 100mm em um único dia, e sazonalidade irregular, com a época de chuvas podendo iniciar-se em meses distintos, prolongar-se por períodos incertos e encerrar-se, também, em meses diferentes de um ano para outro (GARIGLIO et al., 2010).

As plantas da caatinga são adaptadas ao clima seco e a escassez de água, também chamadas xerófilas. Para sua sobrevivência, algumas plantas armazenam água, outras possuem raízes superficiais que captam a água da chuva e ainda há as que lançam outros recursos para diminuir a perda de água (transpiração), como poucas folhas e espinhos. A vegetação é formada por três estratos: o arbóreo, o arbustivo e o herbáceo, compostos por plantas que produzem frutas, cera, óleo vegetal, fibra (Figura 2). A fauna é muito diversificada composta de répteis, insetos, roedores, aves (SANTOS, 2010).

**Figura 4.** Vegetação da Caatinga



Fonte: <http://www.achetudoeregiao.com.br/animais/caatinga.htm>

A exploração dos recursos naturais da caatinga encontra-se bastante alterada pela perturbação e degradações ambientais causadas pelo uso irracional dos recursos naturais. Isso incluiu atividades agrícolas, queimadas, extrativismo mineral e vegetal e pecuária extensiva, o que tem levado à rápida perda de espécies endêmicas e de processos ecológicos importantes para manutenção dos seus ecossistemas (ARAÚJO et al., 2005).

### 3.9 Solo

O solo é um componente imprescindível para a manutenção da qualidade ambiental, constituindo-se em um dos principais habitats para o desenvolvimento dos micro-organismos (bactérias, fungos, protozoários, algas e vírus) envolvidos na decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, entre outros (ANDERSON e CAIRNEY, 2004; BORGES et al., 2011).

Apesar desta diversidade, os micro-organismos cultiváveis predominantes entre a microbiota do solo são fungos e bactérias heterotróficas do domínio Bactéria. É, contudo, de ter em consideração que a flora microbiana presente numa amostra de solo depende de várias características do solo particular em estudo (a umidade, do pH, da temperatura, do conteúdo em oxigênio gasoso e da composição em material orgânico e inorgânico); e que, alguns destes parâmetros ambientais podem variar, por exemplo, ao longo do ano ou em função do tipo de utilização que é dada ao solo (tipo de cultura agrícola, pastoreio, etc.) (Aburjaile et al., 2011).

O conhecimento da microbiota do solo, além de fundamental para o levantamento taxonômico das populações que ali se encontram, pode levar ao descobrimento de processos metabólicos utilizados por estes organismos que poderão ser importantes para as interações ambientais e em aplicações biotecnológicas (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Os fungos são um grupo de organismos distinto, possuindo uma grande variedade de estruturas e organização vegetativa. Podem ser unicelulares, leveduras, endoparasitas halocárpicas de plantas e animais, ou filamentosos. Os ciclos de reprodução dos fungos são muito variados e podem ser inteiramente sexuados, ou ter fases sexuadas e fases assexuadas. São heterotróficos, alimentando-se por absorção de nutrientes solúveis simples através da parede e membrana celular. Mas degradam polímeros complexos, graças à ação de enzimas que excretam para o exterior das células (MACHADO, 2006).

Esta diversidade torna a sua identificação difícil e restrita a um grupo específico de estudiosos que se dedicam às questões da micologia. Toda a classificação dos fungos se prende essencialmente com as características morfológicas e reprodutoras. Atualmente o conhecimento da sua biologia molecular tem iniciado uma nova era na classificação deste grupo biológico (MACHADO, 2006).



A identificação de fungos filamentosos tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura do fungo. Porém, o mais adequado é a análise a partir da cultura feita no ponto central de uma camada de ágar distribuído em placa de Petri. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias) é fundamental para identificação (LACAZ et al., 2002; MINAMI, 2003).

A observação das estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação de fungos filamentosos. Em alguns grupos, porém, como os fungos hialinos, podem ser necessários também uso de provas bioquímicas. A morfologia microscópica é melhor visualizada com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, por exemplo esporângios que são órgãos de reprodução dos Zigomicetos (LACAZ et al., 2002; MINAMI, 2003).

Para identificação molecular em diferentes amostras de fungos é necessário se ter primers que propiciem a amplificação de um gene ou segmento específico daquela espécie ou daquela função que se deseja identificar. Assim, o desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico baseados em PCR requer o conhecimento de seqüências de nucleotídeos de pelo menos parte da região alvo a fim de que primers específicos possam ser desenhados (FUNGARO 2000).

### 3.10 Zygomycetes

O Filo Zygomycota até 9ª edição do “The Dictionary of the Fungi” (Kirk et al. 2001), formava um grupo único de fungos, apesar de ser polifilético, conclusão baseada em análises dos genes do RNA ribossomal 18s, 5.8s e 28s podendo ser dividido em vários filos no futuro, portanto a classificação do filo esta em fluxo (HIBBET et al. 2007; KIRK et al. 2008). Schüssler et al. (2001) propuseram a separação do Filo Zygomycota em dois, elevando a Ordem Glomales para Filo Glomeromycota, porem mantendo o restante dos zigomicetos em Zygomycota. Posteriormente, Hibbet et al. (2007) dividiram o Filo Zygomycota em quatro Subfilos: Mucoromycotina, Entomophthoromycotina, Kickxellomycotina e Zoopagomycotina, divisão consolidada na 10ª edição do “The Dictionary of the Fungi” (KIRK et al. 2008; SOUZA, 2013).

Os fungos dessa classe apresentam parede celular constituída por quitina e quitosana. O micélio é formado por hifas cenocíticas, apresentando septos somente nos órgãos de reprodução ou quando a colônia envelhece. A reprodução sexuada origina estruturas chamadas de zigosporângios

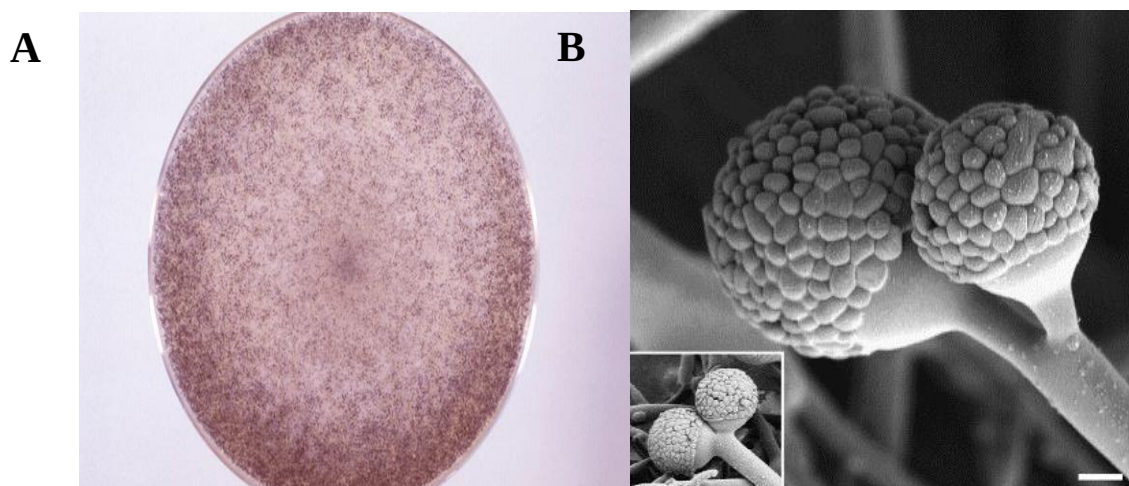
que irão formar os zigospórios. Podem também se reproduzirem assexuadamente por fragmentação, pois os fungos possuem grande capacidade de regeneração, ou ainda pela formação de estruturas de reprodução assexuada como gemas, clamidósporos ou azigoesporângios. As estruturas de reprodução dos fungos dessa classe muitas vezes formam ornamentações e são utilizadas para identificação das espécies (SILVA e COELHO, 2006).

Os Zygomycetes compreendem cerca de 770 espécies de fungos terrestres. Apesar da maioria delas serem saprófitas existem muitas espécies parasitas de plantas superiores, outras que atacam grãos, legumes e frutos estocados e outras ainda são formadoras de micorrizas, representados pela ordem Glomales, simbiotróficos obrigatórios e mutualistas com plantas que o hospedam. Há casos relatados de micoses profundas (sistema nervoso central, pulmões, globo ocular) em pessoas imunodeprimidas por tratamentos quimioterápicos ou em portadores do vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) (TRUFEM, 2000).

### **3.11 Aspectos gerais dos *Rhizopus* spp**

O *Rhizopus* é um dos gêneros da classe Zygomycetes, da ordem Mucorales. As espécies desse gênero são encontrados nos mais variados ambientes, como florestas, solos, frutas e vegetais deteriorados (ALEXOPOULOS, 1996). Morfologicamente são considerados fungos filamentosos, não septados, com micélios cotonosos formando esporângióforos nos nódulos, onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são, usualmente, grandes e negros e suas columelas são esféricas. A base dos esporângios tem a forma de taça. A reprodução sexuada requer dois talos de tipos diferentes que são designados com os sinais positivo (+) e negativo (-), substituindo os adjetivos macho e fêmea. Algumas espécies deste gênero são contaminantes comuns em pacientes que sofrem de zigomicose (CHEN et al., 2009) e determinadas espécies são consideradas fitopatogênicas (TRUFEM, 2000).

**Figura 5.** Cepa de *Rhizopus sp* cultivado em placa de Petri contendo meio de Ágar Batata Dextrose (BDA) (A), Micrografia Eletrônica de Varredura de Esporângio de *Rhizopus sp*. (B).



(FONTE: JENNESSEN et al. (2008).

No gênero *Rhizopus* são descritos várias espécies, sendo as mais comuns: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus azygosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae* e *Rhizopus stolonifer* em que apresentam algumas características morfológicas, como o comprimento dos rizóides e esporangioforos, o diâmetro dos esporângios, a forma da columela, o tamanho, a forma e a textura dos esporangiosporos que auxiliam na diferenciação das espécies do gênero (ALEXOPOULOS, 1996).

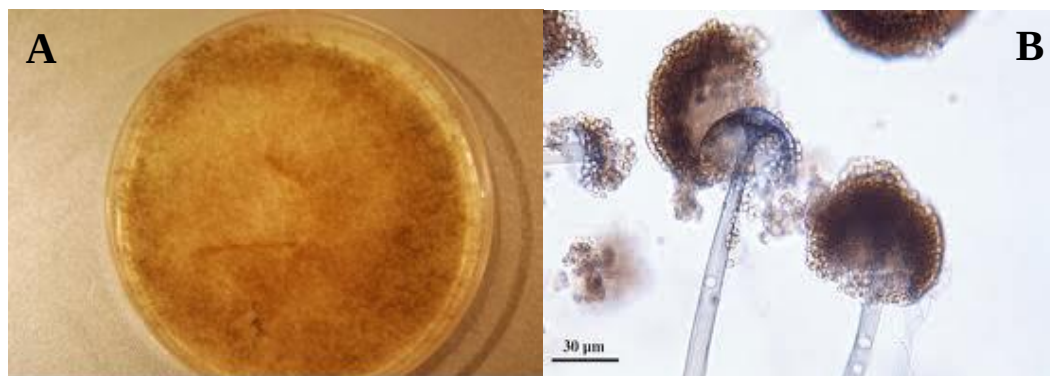
### 3.11.1 *Rhizopus microsporus*

Os fungos do grupo *microsporus* são relativamente raras. Eles têm sido isoladas a partir de solo recolhida em florestas, lixo e a partir de raspas de pele de ave saudável. *Rhizopus microsporus* também foi isolado a partir de madeira mofada em serrarias noruegueses.

Segungo Dolatabadi et al., 2013 caracterizou o *Rhizopus microsporus* em colônias inicialmente brancas, tornando-se cinza escuro, cobrindo a placa de Petri (9 cm diam.) em três a quatro dias, com reverso creme. Sem odor; Esporangióforos 60–450(600) µm de comprimento, lisos e com coloração marrom claro, crescendo em estolões sempre em oposição aos rizóides, solitários ou em grupos de 2 a 3, nunca septados. Rizóides simples pouco ramificado, em formato de dedos, com coloração amarronzada. Esporângios globosos 40–80 µm diâmetro, multiesporados com parede lisa, coloração preto ou marrom escuro, raramente apresentando colar. Columelas em maioria globosas, com algumas subglobosas a cônicas de 25–65µm de diâm, lisas, coloração marrom claro. Esporangiosporos 4–7 × 3–4.5µm, levemente estriados, regular em forma e tamanho, ovóides a

elipsoidal. Clamidosporos raramente observado. Espécie heterotática porém zigosporo não foi observado. Espécie termofílica, com ótimo crescimento de 30 a 36 °C, com máximo crescimento a temperatura de 52 °C.

**Figura 6.** *Rhizopus microsporus* cultivado em placa de Petri contendo meio de Ágar Batata Dextrose (BDA) (A), Micrografia óptica do *Rhizopus microsporus* (B).



(FONTE: <http://www.pelauts.com/rhizopus/rhizopus>).

### 3.12 Rejeitos agroindustriais

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de substratos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Ao contrário do que acontecia no passado, os resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem tratamento para ração animal ou adubo. Atualmente, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais (LAUFENBERG et al., 2003; LIMA, 2011).

Particularmente, a bioconversão dos resíduos agrícolas das indústrias de alimentos estão recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias residuais representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de diversos produtos biotecnológicos considerados úteis. Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FSS) desempenha um papel de destaque no aproveitamento dos resíduos sólidos, pois, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos, dos quais muitos apresentam grande interesse para segmentos industriais, além de elevado valor agregados (PINTO et al., 2005; LIMA, 2011).

Diferentes tipos de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em diversos substratos agroindustriais. Contudo, são os fungos filamentosos os mais

adaptáveis a esse tipo de meios, pois são capazes de crescerem com pouca água e muitos sólidos presentes, além de sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorecem a colonização do meio. Esse fato se traduz na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses micro-organismos (DURAND, 2003; PANDEY, 2003; LIMA, 2011)).

### 3.12.1 Manipueira

A manipueira, que em tupi-guarani significa “o que brota da mandioca”, água residual do processamento, constitui-se no resíduo líquido mais importante, representando, em média, 30% da matéria-prima processada, no caso de produção de farinha de mandioca. Nesse caso, a manipueira é constituída da água de prensagem da massa ralada e contém todos os componentes solúveis da raiz, inclusive com um teor residual de açúcares da ordem 20 a 40g/L (WOSIACKI e CEREDA, 2002). A composição da manipueira, segundo Cereda (2001) (Tabela 1).

A importância do cultivo da mandioca no Brasil é indiscutível, tanto como fonte de energia na alimentação humana e animal, quanto como geradora de emprego e de renda. Na Industrialização da mandioca a farinha, a fécula e o polvilho azedo são os principais produtos (CEREDA, 2001). A partir da otimização dos processos produtivos e dos avanços tecnológicos propiciados pela pesquisa científica e tecnológica, surgiram novas possibilidades de exploração deste produto. Exemplo de novos produtos é a extração de beta-caroteno da folha (ORTEGA, 2003), a utilização do polvilho em “chips” (GRIZZOTO e MENEZES, 2004).

A água residuária, manipueira, possui a maioria dos compostos solúveis, incluindo a linamarina, que é o  $\beta$ -glicosídeo de acetonacianidrina, responsável pela liberação de cianeto nas águas residuárias. O teor de cianeto total no líquido é muito variável, dependendo da variedade da mandioca, mas fica em torno de 364 mg/L em manipueira de farinha, com 50% de cianeto livre (LAMAISON, 2009).

Segundo Lamaison (2009), a manipueira caracteriza-se por conter elevada carga orgânica solúvel (DQO) e alguns sólidos insolúveis ou em suspensão, além da presença de glicosídeo hidrolisável o cianeto que apesar da pequena quantidade levando-se em consideração a diluição, permanece nesta água na forma de ácido cianídrico aumentando o seu potencial poluidor.

**Tabela 2:** Valores Médios para a caracterização de resíduos líquidos da industrialização da mandioca

| Componentes        | Manipueira de Farinheira | Manipueira de Fecularia |
|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Água (%m/v)        | 92,77                    | 91,53                   |
| Proteína           | 1,22                     | 0,97                    |
| Amido (% m/v)      | 9,42                     | 6,12                    |
| Mat. Graxa (% m/v) | 0,50                     | 0,11                    |
| Cinzas (% m/v)     | 0,54                     | 0,08                    |
| Fibras             | 0,30                     | 0,10                    |
| pH                 | 4,10                     | 4,10                    |
| Acidez*            | 3,27                     | 2,70                    |
| HCN (mg/L)         | 463,76                   | 80.00                   |

\*mL NaOH/100g

Fonte: CEREDA (2001)

Todas as águas geradas durante o processamento da mandioca, nas pequenas indústrias, são normalmente descartadas para o meio ambiente, muitas vezes, sem o devido tratamento. Além do aspecto de agressão ao meio ambiente, deve ser considerado também que o despejo indevido dos sub-produtos de mandioca constitui em perda de rendimentos para o produtor, quando se consideram as quantidades e composição das águas geradas na produção (LAMAISON, 2009).

Desta maneira, atualmente, a manipueira tem sido vista como um subproduto passível de ser reaproveitado em outras atividades. No espectro de opções para o seu aproveitamento encontra-se a produção de biomassa lipídica, ácido cítrico e aromas através da utilização da manipueira como fonte de carbono em processos fermentativos (LAMAISON, 2009).

A respeito dos tratamentos utilizados para esta água residuária, encontram-se trabalhos relatando a produção de biogás pelo seu tratamento anaeróbio (PATINO, 2001) e também a possibilidade de tratamento aeróbio em sistemas de lodos ativados (OLIVEIRA et al., 2001).

Barana e Cereda (2000) utilizaram um biodigestor anaeróbio de duas fases, obtendo-se uma eficiência de 80,9%, com carga orgânica de 0,33g DQO/L.d. Ribas e Barana (2003), também, utilizaram com sucesso para a remoção de 71% de DBO da manipueira, um reator anaeróbio, aplicando-se cargas de 0,86g DQO/L.d.

Em Santa Catarina, conforme Cardoso, (2005), a prática da fertirrigação, colocada como uma alternativa viável para a utilização das águas deste processamento em algumas regiões do país é dificultada na região Sul do Estado, pela textura arenosa do solo e da proximidade do lençol freático sendo este facilmente contaminado.

### 3.12.2 Milhocina

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida a uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é usada principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (DOMINGOS, 2009).

A composição da milhocina é muito variável, dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento. Uma composição típica é mostrada na Tabela 2. Dentre os compostos variados encontram-se íons metálicos, vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades (DOMINGOS, 2009).

**Tabela 3:** Composição típica de milhocina.

| Substâncias            | Porcentagem %    |
|------------------------|------------------|
| Milhocina em Base Seca | 50,7             |
| pH                     | 3,9              |
| Proteína               | 40,8 (Base Seca) |
| Ácido Láctico          | 16,0 (Base Seca) |

|                    |                  |
|--------------------|------------------|
| Açúcares Redutores | 12,8 (Base Seca) |
| Compostos Variadas | 30,4 (Base Seca) |

Fonte: Akhtar *et al.*, 1998.

Inúmeras aplicações medicinais que muitos desconhecem a milhocina ou água de milho, é usado na cultura do material de onde se extraem a “penicilina”, a “estreptomicina” e outras drogas similares. Com alto valor protéico, a milhocina é utilizada na composição de tônicos reconstituintes. A dextrose ou açúcar de milho por ser idêntica ao açúcar que existe no sangue humano é usado nos hospitais em injeções endovenosas para recuperar as forças de pessoas enfermas ou em estado pós-operatório. Até mesmo sangue para transfusões é algumas vezes enriquecido com a adição de dextrose (DOMINGOS, 2009).

### 3.12.3 Farelo de trigo

O trigo foi introduzido no Brasil pelos colonizadores, espalhando-se por diversas áreas, principalmente na região sul e centro-sul. Tradicionalmente, o Rio Grande do Sul detém a maior parte da área cultivada (75%), cabendo o restante aos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e outros. Há um elevado número de cultivares, muitas já conhecidas de longa data, outras resultantes de seleções e hibridações realizadas em estações experimentais (EMBRAPA-SUÍNOS e AVES, 2004).

Como o consumo do trigo não se dá de forma direta, os grãos precisam ser processados através da moagem e refinamento para obtenção da farinha de trigo. É do interior dos grãos que é extraído a farinha. Neste processo, o resíduo gerado é a casca do grão, também conhecido como farelo de trigo. A farinha é comercializada para fins industriais e alimentícios enquanto o farelo é comercializado, sendo incorporado em rações animais, tendo em vista ser um material rico em fibras e proteínas (SILVA, 2006).

Quanto ao beneficiamento do trigo, Lima (2003) através da Embrapa Suínos-Aves cita a farinha como um produto do beneficiamento, e subprodutos, o farelo de trigo, ainda composto de pericarpo, partículas finas de gérmen e das demais camadas internas dos grãos e o triguilho, grãos pouco desenvolvidos que acabam entrando em alguns processos de industrialização e são eliminados diretamente em função do seu peso específico ser menor do que o exigido.

Quanto ao farelo de trigo Zacchi *et al.* (2005) confirmam citação de Lima (2003) ao comentarem que o farelo é produzido em todo mundo em grandes volumes como subproduto da



indústria de moagem do trigo e que este material não deve ser desprezado pois concentra ainda, fonte considerável de açúcares.

No que se refere à utilização destes insumos como incremento em rações animais Souza e Santos (2005), defendem que, esses materiais, quando adequadamente tratados e tecnicamente orientados na alimentação animal, podem representar um enorme benefício econômico, social e ambiental, e continua enfatizando que devido ao incremento na alimentação animal e seu enorme potencial como recurso alimentar para os ruminantes, os resíduos lignocelulósicos têm sido motivo de intensas pesquisas em todo o mundo, com a finalidade de melhorar seu aproveitamento e valor nutritivo através de métodos químicos.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABUL, K. A., ABU, Y., ATIA, F. M. D., MAHBUB, H., REZAUL, K., ASRAFUL, J. Production of Microbial Lipids from Rice Straw Hydrolysates by *Lipomyces starkeyi* for Biodiesel Synthesis. *Journal Microbial Biochem Technol*, 8, 2014.
- ABURJAILE, S. B., SILVA, M. P., BATISTA, E. A. F. S., BARBOSA, L. P. JARDIM, LIMA., BARBOSA, F. H. F. Pesquisa e caracterização da diversidade microbiológica do solo, na região de São José do Buriti – MG, em decorrência da substituição de cobertura florestal nativa (cerrado) por plantações de eucalipto. *Ciência Equatorial*. V. 1, N. 2, p. 69-81, 2º Semestre 2011.
- AKHTAR, M. An overview of biomechanical pulping research. In: RAYMOND, A. YOUNG.; AKHTAR, M. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: John Wiley and Sons, p. 309-339, 1998.
- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p, 1996.
- ALMEIDA, A. F. Cultivo de *Mucor circinelloides* em substratos líquido e sólido para produção de ácidos graxos insaturados. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Paulista, 2007.
- ANDERSON, I. C., CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.
- ANDREW, S. B., AIDYN, M. Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *Research article*. v. 24, 2014.
- ANYANWU, C.U.; OBI, S.K.C.; OKOLO, B.N. Lipopeptide biosurfactant production by APOSTOLIS, A. K., AFRODITI, C., NIKOLAOS, K., SERAPHIM, P., IOANNIS, K. K. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*. v. 116, p. 566–577, 2014.
- ARAÚJO, F.S.; RODAL, M.J.N.; BARBOSA, M.R.V. & MARTINS, F.R. Repartição da flora lenhosa no domínio da Caatinga. In: Araújo, F.S, Rodal, M.J.N., Barbosa, M.R.V. (Orgs.). *Análise das variações da biodiversidade do bioma Caatinga: suporte a estratégias regionais de conservação*. Brasília, Ministério do Meio Ambiente, Pp. 15-33, 2005.
- ARAÚJO, J. M. A. *Química de alimentos: teoria e prática*. 4ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2008, 596 p.
- ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. *Biomacromolecules*, 6, 2106, 2006.
- BAJPAI, P., BAJPAI, P. K., WARD, O. P. Effects of aging *Mortierella* mycelium on production of arachidonic and eicosapentanoic acids. *Journal Am. Oil Chem. Soc.* 68, 775-780, 1991.

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. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 87, p. 427–444, 2010.

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. Appl. Microbiol. Biotechnol. v. 87, p. 427–444, 2010.

BARANA, A. C.; CEREDA, M. P. Cassava wastewater (manipueira) treatment using a twophase anaerobic biodigestor. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 20, n. 2, 2000.

BEOPOULOS, A., CHARDOT, T., NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica*: a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*. Vol. 91,

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

Blog. Estudo em Doenças de Plantas – Dr. Milton Luiz da Paz Lima e Caullius Jordão. *Rhizopus Stolonifer*. Disponível em: <<http://fitopatologia1.blogspot.com/2010/10/aspectos-gerais-e-morfologicos-do-fungo.html>> Acessado em dezembro de 2012.

BORGES, L. R., LAZZARI, S. M. N., PIMENTEL, I. C., NOVA, M. X. V. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. Revista Acadêmica Ciências Agrária. Ambiental. Curitiba, v. 9, n. 2, p. 185-194, abril./junho 2011.

BOURDON J, BAZINET T, ARNASON T, KIMPE L, BLAIS J, WHITE P. Polychlorinated biphenyls (PCBs) contamination and aryl hydrocarbonreceptor (AhR) agonist activity of omega-3 polyunsaturated fatty acidsupplements: implications for daily intake of dioxins and PCBs. FoodChem Toxicol. N. 48: v. 11: p. 3093-3097: 2010.

BRUM, A. A. S., ARRUDA, L. F., REGITANO-D´ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. Química Nova. Vol. 32, No. 4, p. 849-854, 2009.

BRUM, A. A. S., ARRUDA. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2004.

BRUNCKHOST, H. Palma, melhor alternativa agrícola para a Amazônia. Óleos e grãos, São Paulo, n. 52, p.16, 2000.

CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S.; KAUR, J.; MEHTA, S.K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. Adv Exp Med Biol. v. 672, p.261–280, 2010.

*Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. Braz. Arch. Biol. Technol, v. 52, n.4, p. 785-793, 2009.

CARDOSO, G.M. Uso da Manipueira como Biofertilizante no Cultivo do Milho: Avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade do milho. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais, UNESC, 2005.

CEREDA, M.P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo : Fundação Cargill, v.4, cap.1, p. 13-37, 2001.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal Bioscience Bioengineering*, 87 (1), 1-14, 1999.

CERTIK, M.; SLAVIKOVA, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with  $\gamma$ -linolenic acid by fungal solid-state fermentations. *Food Technology Biotechnology*, Zagreb, 44 (1), 75-82, 2006.

CHAUDHURI, S., DE, B. K., BHATTACHARYYA, D. K. Essential fatty acids of lipids produced by soil around oil extraction mill. *Journal Oil Technol. Assocn. of India*, 29, 35-38, 1997.

CHEN, CHUN-CHANG., YEN-CHING CHO, CHIEN-CHEN LAI, AND WEN-HWEI HSU. Purification and characterization of a new *Rhizopus* pepsin from *Rhizopus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Ásia. Vol. 57, p. 6742–6747, 2009.

CHRISTIE, W.W. Analysis of complex lipid. *Lipid Analysis*, 2 ed., New York: Pergamon, p.107-134, 1982.

D' AGOSTINI, D. Obtenção de lipídios estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa. Tese de doutorado do programa de pós-graduação em tecnologia Bioquímica-Farmacêutica área de tecnologia de alimento. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêutica. 2001.

DE, B. B. K., VERMA, S. Characterization of lipids and fatty acids of the soil derived fungus *Cladosporium sp.* *grasas y aceites*, n. 62, v. 2, p. 213-220, 2011.

DE, B. K and KUMAR, T. Production and optimization of polyunsaturated fatty acids in some fungi of *Aspergillus* and *Mucor* Genus. *Journal Oil Technology Assocn. of India*. 37, 8-13, 2005.

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

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial DIGBY WREDE, MOHAMED TAHA, ANA F. MIRANDA, KRISHNA KADALI, TREVOR STEVENSON, DOLATABADI, S., WALTHER, G., VAN DEN ENDE, A. H. G.G., de HOOG, G.S. 2013. Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal diversity* 64 (1): 145-163.

DOMINGOS, M. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. Dissertação de Mestrado - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA. P.23-25, 2009.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. Academic Press, London, UK. V. 1, 1980.

DOMSCH, K.H., W. GAMS., T.H. ANDERSON. 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press, London, UK.

DORADO, M. P., BALLESTEROS, E., ARNAL, J. M., GOMEZ, J., LÓPEZ-GIMÉNEZ, F. J. Testing waste olive oil methyl ester as a fuel in a diesel engine. *Energy Fuels*. v. 17, p.1560–1565, 2003.

ELLIS, D.H. Zygomycetes. Chapter 16 In Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th edition Edward Arnold London. p. 247-277, 1997.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Suínos e Aves, 2004. Endereço eletrônico <http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2003/artigo-2003-019.html;ano=2003>. Acesso em 15/10/2013.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação. Embrapa Solos, p.412, 1999.

EROSHIN, V.K.; SATROUTDINOV, A.D.; DEDYUKHINA, E.G.; CHISTYAKOVA T.I. Arachidonic acid production by *Mortierella alpine* with growth-coupled lipid synthesis. *Process Biochemistry*, London, 35, 1171-1175, 2000.

ESTÉVEZ, C. V., ÁLVAREZ, B. P. Técnicas básicas de microbiología observación de hongos filamentosos. *Reduca (Biología) Serie Microbiología*. N.2, v. 4, p. 1-15, 2009.

FIDLER, N.A., KOLETZKO, B., SAUERWALD, T. U. single cell oils production and application. <http://www.bfro.uni-lj.si/zbornik>. 74, 37-45, 1999.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry*, Maryland, 226, p. 497- 509, 1957.

FONTES, G.C.F., AMARAL, P.F.F., COELHO, M.A.C. Produção de biossurfactante for advanced biofuel production. *Bioresource Technology* 163, 12–17, 2014.

JUNIOR, F. T. A., FERREIRA, R. L. C., SILVA, J. A. A., MARANGON, L. C., CESPEDDES, G. H. G. Natural regeneration of an area of Caatinga vegetation in Pernambuco state, Northeastern Brazil. *Cerne, Lavras*, v. 19, n. 2, p. 229-235, 2013.

FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., SMYTH, T. J. P., BANAT, I. M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European J Lipid Sci*

FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., BANAT, I. M. (Bio)surfactant and bioremediation, successes and failures. In *Trends in Bioremediation and Phytoremediation*; Plaza, G., Ed.; Research Signpost: Kerala, India. pp. 145–156, 2011.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia diagnóstico e análise de variabilidade. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*. P. 12-16, 2000.

GALVÍNCIO, D., MOURA, M.S.B. Aspectos climáticos de água de chuva no estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Geografia* v. 22, n. 2, p. 15-35, 2005.

GARIGLIO, M. A., SAMPAIO, E. V. S. B., CESTARO, L.A., KAGEYAMA, P. Y. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga. *Servico Florestal Brasileiro – Brasília*. CDU (2.ed.). ISBN 978-85-63269-04-1. P. 368. 2010.

GDAFF: Australian government department of agriculture, fisheries and forestry. Fishery status reports 2007.

GOMES, M. A. B. Ácidos Graxos Essenciais -3 - (AAL) Ácido  $\alpha$  Linolênico 18:3( $n-3$ ), (EPA) Ácido Eicosapentaenóico 20:5( $n-3$ ) e (DHA) Ácido Docosaheptaenóico 22:6( $n-3$ ). Universidade Estadual de Maringá - PPZ - Programa de Pós-graduação em Zootecnia. P. 1-10, 2008.

GONÇALVES, G. S. Estratégias de controle de invasão biológica por *Prosorpius juliflora*, na Caatinga e ecossistemas associados. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia.

GRANGER, L.M., PERLOT, P., GOMA, G., PAREILLEUX, A. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Journal of biochemical and microbiological technology and engineering*. Vol. 42, No. 10, pp. 1151-1156, 1993.

GRIZZOTO, R.K. e MENEZES, H.C. Efeito da fermentação na qualidade de “chips” de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 24, p. 170-177, 2004.

GURR, M. I. Role of fats in food and nutrition. 2 ed. London: Elsevier Applied Science, 1992.

J. Hazard. Mater, v. 151, p. 155–163, 2008.

HALL, M.J.; RATLEDGE, C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture. *Applied Environmental Microbiology*, New York, 33 (3), 577-584, 1977.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, New York, 90 (1), 420-426, 1978.

HAUMANN, B.F., BARRERA-ARELLANO, D., WAGNER, W. Brasil: a giant in the soybean industry. *Inform, Champaig*. v.6, n.8, p. 900-909, 1995.

HIBBETT, D.S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J.F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P.F.; ERIKSSON, O.E.; HUHNDOERF, F.; JAMES, T.; KIRK, P.M.; LÜCKING, R.; LUMBSCH, H.T.; LUTZONI, F.; MATHENY, P.B.; MCLAUGHLIN, D.J.; POWELL, M.J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C.L.; SPATAFORA, J.W.; STALPERS, J.A.; VILGALYS, R.; AIME, M.C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G.L.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; DAI, Y.-C.; GAMS, W.; GEISER, D.M.; GRIFFITH, G.W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D.L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R.A.; HYDE, K.D.; IRONSIDE, J.E.; KOLJALG, U.; KURTZMAN, C.P.; LARSSON, K.-H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWLSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASIO, E.; REEB, V.; ROGERS, J.D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J.P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R.G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W.A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M.M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. vol. 111, part 5, May 2007.

HUANG, Y.S.; PEREIRA, S.L.; LEONARD, A.E. Enzyme for transgenic biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochemical*, London, 86, 793-798, 2004.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 17 jun. 2011.

IMMELMAN, M.; du PREEZ, J.C.; KILIAN, S.G. Effect of C:N ration on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *System. Applied Microbiology*, Washington, 20, 158-164, 1997.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, M. ; J. Biosci. Bioeng. 2005.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiology*, v. 12, n. 24, p. 1-9, 2012.

JANG, H.D.; LIN, Y.Y.; YANG, S.S. Effect of culture media and conditions on polyunsaturated fatty acids production by *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*, Essex, 2005.

JANG, H.D.; LIN, Y.Y.; YANG, S.S. Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by substrate fermentation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, Taipei, 41, 41-48, 2000.

JARA, A.M.A.T.; ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids and Surface: B: Biointerfaces*, v. 101; p.315-318, 2013.

JENNESSEN, J.; SCHNURER, J; OLSSON, J.; SAMSON, R. A.; DIJKSTERHUIS, J. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the R. microsporus group. *Mycological Research*, v.112, p.547–563, 2008.

FILHO, J. M. P., SILVA, A. M. A., CÉZAR, M. F. Management of the Caatinga for the production of goats and sheep. *Rev. bras. saúde prod. anim.* vol.14 no.1 Salvador Jan./Mar. 2013

JUNQUEIRA, O.M.; ANDREOTTI, M.O.; ARAÚJO, L.F.; DUARTE, K.F.; CANCHERINI, L.C.; RODRIGUES, E.A. Valor energético de algumas fontes lipídicas determinado com frangos de corte. *Revista Brasileira Zootecnia*, Viçosa, v.34, n. 6, p. 2335-2339, 2005.

KATCH, F. I.; McARDLE, W. D. Nutrição, exercício e saúde. 4ª.ed. Rio de Janeiro. Medsi, 1996.

KIRK, P.M. ; CANNON, P.F.; DAVID, J.C. ; STALPERS, J.A. (editors). Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi. tenth edition. Wallingford. CABI Publishing. 2008.

KIRK, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. Dictionary of the Fungi. 9 ed. Wallingford: CAB International, 2001.

KOBLITZ, M. G. B., PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. *Ciência Tecnologia. Alimento*, Campinas. Número 24, vol. .2. p. 287-292, abr.-jun. 2004.

KOHLWEIN, S. D. Triacylglycerol homeostasis: insights from yeast. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 285, No. 21, pp. 15663-15667, ISSN 0021-9258. 2010.

KOIKE, Y.; CAI, H. J.; HIGASHIYAMA, K.; FUJIKAWA, S.; PARK, E. Effect of consumed carbon to nitrogen ratio on mycelial morphology and arachidonic acid production in cultures of *Mortierella alpine*, *Journal Bioscience Bioengineering*, New York, 91 (4), 382-389, 2001.

KOUTINAS, A. A., PAPANIKOLAOU, S. Biodiesel production from microbial oil. In: LUQUE, R., CAMPELO, J., CLARK, J. H. editors. *Handbook of biofuels production – processes and technologies*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing. p. 177–98, 2011.

LACAZ C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M. AND MELO, N.T. *Tratado de Micologia Médica*, 9a ed., Sarvier, São Paulo, 2002.

LAMAISON, F. C. Aplicação da água residuária do processamento da mandioca como substrato para a produção de hidrogênio por processo fermentativo. Dissertação de Mestrado - universidade federal de santa catarina centro tecnológico programa de pós-graduação em engenharia de alimentos - Florianópolis – SC. P. 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2a. ed. São Paulo, Sarvier, 2002, 839p.

LIMA, C. R. Avaliação ecofisiológica em sementes de *Caesalpinia Pyramidalis*. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia.

LIMA, G. J. M. M. Trigo na Alimentação Animal. Endereço eletrônico: <http://www.cnpsa.embrapa.br/cgi-bin/notiprn.pl?/home/httpd1/docs/artigos/2003/artigo-2003-n019.html>. Acesso em 15/10/2013.

LIMA, J.M.N. produção do complexo quitosana- polifosfato em *Rhizopus oryzae* ucp 1506 utilizando substratos agroindustriais. Dissertação - Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, 2011.

LIMA, R. A., ANDRADE, R. F. S., SANTOS, L. Q., CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* in pineapple broth (*Ananas comosus*) with burned sunflower oil and application in removal of petrol derivative, *Exacta*, Sao Paulo, v.8, n.2, p.201-210, 2010.

LIMA, R.A., ANDRADE, R.F.S., SANTOS, L.Q., CAMPOS-TAKAKI, G.M., Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* in pineapple broth (*Ananas comosus*) with burned sunflower oil and application in removal of petrol derivative, *Exacta*, Sao Paulo, v.8, n.2, p.201-210, 2010.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; TAKAKI, G. M. C. A New Biosurfactant Produced by  
LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surf B*, v. 102, p. 202–209, 2013.



M.A.A. Schipper and J.A. Stalpers, A revision of the genus *Rhizopus*. 2. The *Rh. Microsporus* group, *Studies in Mycology* 25 (1984), pp. 20–34.

MACHADO, A. P. S. Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água. Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Escola de Engenharia da Universidade do Minho. P. 15- 16, 2006.

Mahan KL, Escott-Stump S. Krause alimentos, nutrição & dietoterapia. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca; p.43-5, 2002.

MAIA, M. R. G. Microorganisms and dietary factors affecting biohydrogenation and conjugated linoleic acid production in the rumen ecosystem. Tese de doutoramento em ciências veterinárias Especialidade de produção animal. Lisboa, 2010.

MARTINS, M. B., SUAIDEN, A. S., PIOTTO, R. F., BARBOSA, M. Properties of Omega-3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. *Rev Inst Ciênc Saúde*, n. 26, v. 2, p. 153-156, 2008.

MARZZOCO, A.; TORRES, G.B. Bioquímica básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2<sup>a</sup>. Ed.; 1999, 360p.

MASUCHI, M. H.; CELEGHINI, M. S.; GONÇAVES, L. A. G.; GRIMALDI, R. Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1053-1057, 2008.

MAYES, P.A; BOTHAN, K.M. Metabolism of Unsaturated Fatty Acid & Eicosanoids. IN: MURRAY, R.K.; DRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. Haper's Illustrated Biochemistry. McGraw-Hill Companies, Inc., 26<sup>ed.</sup>, cap. 23, 190-196, 2003.

MELLO, C. M. A.; SILVA, I. R.; PONTES, J. S.; GOTO, B. T.; SILVA, G. A.; MAIA, L. C. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em área de Caatinga, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 26(4): 938-943, 2012.

MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Ren En*. v. 34, p.1–5, 2009.

MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous micro-organisms. *Renewable Energy*. v. 34, p. 1–5, 2009. *Microbiol*. v. 54, p. 323–326, 1998.

Minami, P.S. Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses, Ed. Manole Ltda, São Paulo, 2003.

Moura, M.S.B; Galvinctio, J.D.; Brito, L.T.L.; Souza, L.S.B.; Sá, I.I.S. & Silva, T.G.F. 2007. Clima e água de chuva no semiárido. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPATSA/36534/1/OPB1515.pdf>.

MUTHUSAMY,K.;GOPALAKRISHNAN,S.;KOCHUPAPPY,T.;SIVACHIDAMBAR AM, P. Biosurfacts: properties, commercial production and application, *Current science*, v. 94, n 6, p. 736-747, 2008.

NAQVI, B. S., HASHMI, K., KHAN, F. A., SHEIKH, D., MEHMOOD, Z. A. Production of lipids by fermentation preliminary report. *J. ISLAMIC ACADEMY OF SCIENCES*. 10, 13-18, 1997.

NAWAWI, W.M.F.W.; JAMAL, P.; ALAM, M.Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 9241-9247, 2010.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger - 5a. ed. São Paulo, Sarvier, 2011.

NELSON, J.G. Isolation and purification of lipids from biological matrices. IN: PERKINS, E.G. (Ed.) Analyses of fats, oils and lipoproteins. Champaign: American Oil Chemists' Society (AOCS), cap. 2, 20-59, 1991.

OLIVEIRA, M. A., REIS, E. M., NOZAKI, J. Biological treatment of wastewater from the cassava meal industry. *Environmental Research*. v. 85, p.177-183, 2001.

ORTEGA, C. I., COSTA, M. A. L., CEREDA, M. P. Biodisponibilidade do B-catoteno da folha desidratada de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 23, p.473-477, 2003.

OYAMA, L.M.; ESTADELLA, D.; SILVA, M.S.; SILVA, M.H.G.G.; NASCIMENTO, C.M.O. Metabolismo lipídico. IN: DÂMASO, A. Nutrição e exercício na prevenção de doenças. Editora Medsi, Rio de Janeiro, RJ, p. 81-88, 2001.

PACHÊCO, A. P.; FREIRE, N. C. F.; BORGES, U. N. A Transdisciplinaridade da desertificação. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. 30 p.

PAPANIKOLAOU, S., GEORGE, A. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. v. 113, p. 1031–1051, 2011.

PATINO, M. T. O. Viabilidade Econômica do aproveitamento de biogás a partir da digestão anaeróbia da manipueira. In: Cereda et al. Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca, Fundação Cargill: São Paulo, cap.14 pp.202-210, 2001.

PELCZAR, M., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. Microbiologia: Conceitos e Aplicações. 4ªed. New York: McGraw-Hill. Vol. 2. P. 315 – 318. 1997.

PINZI, S., DORADO, M. P. Feedstocks for advanced biodiesel production. In: Luque R, Melero JA, editors. Advances in biodiesel production: processes and technologies. Cambridge, UK: Woodhead publishing. p. 69–90, 2012.

RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie, Paris*, 86 (11), 807-815, 2004.

RATLEDGE, C. H. Microbial lipids. UNITED KINGDOM, 1993.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemistry Society Trans.*, London, 30 (6), 1047-1050, 2002.

RATLEDGE, C., COHEN, Z., Microbial and algal lipids: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* v. 20, p. 155–160, 2008.

Ratledge, C., Wynn, J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* v. 51, p.1–51, 2002.

RIBAS, M. M. F., BARANA, A. C. Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (manipueira) treatment. *Scientia agrícola.* v. 60, n 2, p. 223-229, 2003.

RIBEIRO, D.L.R.; ANDRADE, R.F.S.; ANTUNES, A.A. SILVA, A.M.; MAX, Y. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Rhodotorula glutinis* UCP 1555 using industrial wastes. *Microbes In Applied Research: Current Advances and Challenges*, Ed. Mendez-Vilas p. 55-59, 2012.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; MEI, H.C. VAN DER; OLIVEIRA, R. Isolation  
RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology.* v.13, p. 249-252, 2002.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; LEGMANN, R.; RON, E.Z. Purification and  
ROSILLO-CALLE, F., PELKMANS, L., WALTER, A. A. Global overview of vegetable oils, with reference to biodiesel. A report for the IEA bioenergy task 40. Imperial College London (UK), VITO (Belgium) and UNICAMP (Brazil); June 2009.

Rubio-Rodríguez N, Beltrán S, Jaime I, de Diego SM, Sanz MT, Carballido JR: Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovat Food Sci Emerg Tech* 2010, 11 (1):1 12.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DE DIEGO, S. M.; SANZ, M. T.; ROVIRA CARBALLIDO, J. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 11, p. 1–12, 2010.

RUEGGER, M. J. S., TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica.* N. 27, p. 205-211, 2004.

SAMPAIO, E. V. S. B.; COSTA, T. L. Estoques e Fluxos de Carbono no Semi-Árido Nordeste: Estimativas Preliminares. *Revista Brasileira de Geografia Física.* N. 6, p. 1275- 1291, 2011.

Sampaio, E.V.S.B. Características e potencialidades. In: Gariglio, M.A.; Sampaio, E.V.S.B.; Cestaro, L.A.; Kageyama, P. (Eds.) *Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga.* 2ª Ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, pp. 29-48, 2010.

SANTOS, Petrushka Bezerra. Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de angico *Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan. var. *cebil* (gris.) alts e pereiro *Aspidosperma pyrifolium* Mart. Patos, PB. Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido UFCG. P. 45, 2010.

SARAFIN, Y.; DONIO,M.B.S.; VELMURUGAN, S.; MICHAELBABU, M.; CITARAS, T. Kocuria marina BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India, Saudi Journal of Biological Sciences, p. 1-9, 2014.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.01.001>

SATPUTE, S. K., BANPURKAR, A. G., DHAKEPHALKAR, P. K., BANAT, I. M., CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* v. 30, p. 127–144, 2009.

SAXENA, V., SHARMA, C. D., BHAGAT, S. D., SAINI, V. S., ADHIKARI, DK. 1998. Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 501-505.

SCHOLER, 1970 - Mucormykosen bei Mensch und Tier. Taxonomie der Erreger. Chemotherapie im Tierexperiment und in der Klinik. - HabilSchr., Basel.

SCHUSSLER, A., SCHWARZOTT, D., WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105(12): 1413-1421, 2001.

*Serratia marcescens* NSK-1 strain isolated from petroleum contaminated soil. *J.Appl.Sci.Res.*v.7, n.1, p. 79-87, 2011

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3, *International Journal of Microbiology*, p. 1-7, 2014.

SHIMIZU S., KAWASHIMA, H., SHINMEN, Y., AKIMOTO, K., YAMADA, H. Production of eicosapentanoic acid by *Mortierella* fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 1455-1459, 1988.

SILVA, G. Aproveitamento biotecnológico de resíduos agroindustriais na produção de glucoamilase. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências

SILVA, G. K.B. Produção de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) por *Cunninghamella elegans* UCP 542 em substratos alternativos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE, 2011.

SILVA, M. A. Entre o combate a seca e a convivência com o Semi-Árido: transições pragmáticas e sustentabilidade do desenvolvimento. 2006. 298 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável) – Universidade de Brasília, Centro de Desenvolvimento Sustentável, Brasília, DF.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica. Brasil. 2006.

SINGH, V. Biosurfactant – Isolation, Production, Purification and Significance. *International Journal of Scientific and Research Publications*, v.2, n.7, 2012.

SOMASHEKAR, D.; VENMKATESHWARAN, G.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochemistry*, London, 38, 1719-1724, 2002.

SOUZA, A. F. Potencial biotecnológico dos fungos *Lichtheimia hyalospora* e *Cunninghamella echinulata* para produção de lipídeos utilizando resíduos agroindustriais. Monografia (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2013.

SOUZA, O.E.; SANTOS, E.I. Aproveitamento de resíduos e subprodutos agropecuários pelos ruminantes na Embrapa. Disponível em: <[www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=914](http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=914)> 2005. Acesso em 14/10/2013.

SUBRAMANIAM, R., DUFRECHE, S., ZAPPI, M., BAJPAI, R. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *Journal Ind Microbiol Biotechnol.* 37, 1271–1287, 2010.

TAUK-TORNISIELO, S. M.; ARASATO, L. S.; DE ALMEIDA, A. F.; GOVONE, J. S.; MALAGUTTI, E. N. Lipid formation and  $\gamma$ -linolenic acid production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus sp.*, grown on vegetable oil. *Brazilian Journal of Microbiology.* V. 40, p. 342-345, 2009.

TRUFEM, S. F. B. Diversidade no reino fungi: Zygomycota. São Paulo: Universidade de São Paulo. USP. Instituto de Botânica. Brasil. 2000.

TRUFEM, S. F. B. Diversidade no reino fungi: Zygomycota. São Paulo: Universidade de São Paulo. USP. Instituto de Botânica. Brasil. 2000.

VALSTA, L.M.; TAPANAINEN, H.; MÄNNISTÖ, S. Meat fats in nutrition. *Meat Science*, Barking, 70, 525-530, 2005.

WHANG, L.M.; LIU, P.W.G.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water

WHANG, L.M.; LIU, P.W.G.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.*, v. 151, p. 155–163, 2008.

WOSIACKI, G., CEREDA, M. P. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. *Publicatio UEPG – Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias.* V. 8, n. 1, p. 27-43, 2002.

WWW- BRASIL, WORLD WIDE FUND FOR NATURE. Caatinga. Disponível em: [http://www.wwf.org.br/natureza\\_brasileira/biomas/bioma\\_caatinga](http://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/biomas/bioma_caatinga). Acesso em 16 Maio, 2010.

XU, Q.; NAKAJILMA, M.; LIU, Z.; SHINA, T. Biosurfactants for microbubble preparation and application. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, p. 462-475, 2011.

YONG, K.C.; OOI, T.L.; DZULKEFLY, K.; WAN-YUNUS, W.M.Z.; HAZIMAH, A.H. *Oil Palm Res.*13, 2001.

ZACCHI, G., PALMOROLA-ADRADOS, B., CHOTEBORSKA, P., GALBE, M. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology*: 96, 843- 850, 2005.

ZHANG, Q.; LI, M.; MA, H.; SUN, Y.; XING, L. Identification and characterization of a novel  $\Delta 6$  – fatty acid desaturase gene from *Rhizopus arrhizus*. *FEBS LETTERS*, Amsterdam, 556 (1-3), 81-85, 2004.

Zhenhua Ruan, Michael Zanotti, Steven Archer, Wei Liao, Yan Liu. Oleaginous fungal lipid fermentation on combined acid- and alkali-pretreated corn stover hydrolysate. *Technol*, v. 112, p.617-627, 2010.

## CAPÍTULO 2

**Isolation, Identification and Phenotypic Characterization of *Rhizopus microspores* var. *chinensis*, *Rhizopus microspores* var. *microspores* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soil of the Caatinga in Pernambuco, Brazil**

Manuscrito publicado no livro:

Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends, ISBN Print version: 978-90-8686-243-6; Pages of the chapter: 119-123p, 2014.



Environmental microbiology – biodeterioration &amp; biodegradation – bioremediation

## Isolation, identification and phenotypic characterisation of *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil in Pernambuco, Brazil

J.M. Negreiros Lima<sup>1,4</sup>, G.K. Barbosa Silva<sup>1,4</sup>, C.C. Santos Cordeiro<sup>2,4</sup>, M.C. Mota Lins<sup>1,4</sup>, L. Oliveira Franco<sup>3</sup>, C.A. Alves da Silva<sup>4</sup>, K. Okada<sup>4</sup> and G.M. Campos-Takaki<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Biological Sciences, UFPE, 50670-90 Recife, PE, Brazil; jaceline\_maria@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Environmental Process Development, 50050-900 Recife, PE, Brazil

<sup>3</sup>Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil

<sup>4</sup>Nucleus of Research in Environmental Sciences, UNICAP, Brazil. 50.050-590 Brazil

### Abstract

The name Caatinga originates from the Tupi-Guarani language, meaning 'white forest'. It is an environmental system exclusively found in Brazil, which occupies about 11% of the country (a total of 844,453 km<sup>2</sup>). It is the principal biome in the Northeast. Soil is an essential component for the maintenance of environmental quality, thus becoming one of the main habitats for the development of micro-organisms (bacteria, fungi, protozoa, algae and viruses) involved in the decomposition of organic matter. The filamentous fungi were identified using morphologic and microscopy characteristics. The isolates were evaluated for their ability to grow in adverse conditions (pH, temperature and salinity), assimilation of carbon and nitrogen, detection enzyme (amylase, protease, lipase, tannase and polyphenol) and the study of the potential for the production of lipids. The results provide substantial evidence of the behavior of the cultures of *Rhizopus* for obtaining supplies of high commercial value.

**Keywords:** isolation; *Rhizopus*; Caatinga soil; enzyme detection

### 1. Introduction

Soil is an essential component for the maintenance of environmental quality, and as such is one of the main habitats for the development of micro-organisms (bacteria, fungi, protozoa, algae and viruses) involved in organic matter decomposition and nutrient cycling, amongst other things [1,2]. The identification of filamentous fungi is observed from the macroscopic characteristics of colour, appearance, presence of exudates diffusion pigments, odour, the amount of aerial mycelium and growth on different culture media. The literature describes the use of microscopic features using micro-culture techniques for the visualisation of reproductive structures, which supported the taxonomic differentiation level of genus [3,4,5,6]. The process of molecular identification of fungi demonstrated the use of primer amplification of a specific gene or segment of the species or its function which is important to recognize. The developments of diagnostic procedures are based on PCR and require knowledge of the nucleotide sequence of at least part of the region to target specific primer that can be drawn. Therefore, some regions such as those encoding ribosomal RNA have been quite useful [7]. Fungi demonstrated a quick adaptability to the most varied habitats and nutritional sources. Those characteristics are due to the production of a large amount of enzymes, non-specific, and capable of degrading a variety of compounds, including complexes polymers as effective agents applied to biotechnological processes. The oil produced by microorganisms is considered as an alternate nutritional source.

The aim of this work was to isolate, identify and characterise phenotypically the strains of *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *Rhizopus stolonifer* assessing the growth potential in different conditions of pH, temperature and salinity, assimilation and fermentation of sources of carbon and nitrogen, the detection of enzymes (amylase, protease, lipase, tannase and polyphenol oxidase), and the analysis of lipids.



## Part 1

**2. Materials and methods****2.1 Isolation of microorganisms**

The isolation of soil microorganisms was done by serial dilution and plating on selective media. After growth, the colonies were transferred to test tubes and preserved at 5 °C. All isolates of *R. microsporus* var. *chinensis*, *R. microsporus* var. *stolonifer*, and *R. microsporus* var. *microsporus* were kindly supplied by Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB) of UNICAP/Recife, PE.

**2.2 Identification, morphological and biochemical characterisation of isolated fungi**

- **Microculture:** The morphological and microscopic identification was done using PDA medium. The microorganism was inoculated on the sides of the square of this medium. Then cover the medium inoculated with material that was within the coverslip plates, and distilled water was used for hydration chamber. The micro culture was incubated at 28 °C and the daily crop development was monitored.
- **Nitrogen assimilation:** The test assimilation of nitrogen was carried out using the Yeast Carbon Base medium (YCB) without the presence of nitrogen sources. Then a suspension of  $10^7$  spores/ml was prepared and 1 ml of the suspension was transferred to Petri dishes and YCB medium was added. After solidification of the medium, the plate was marked and filled with the following nitrogen (peptone, nitrate of potassium, ammonium sulphate, urea, ammonium chloride and yeast extract). The growth was observed for 72 h at 28 °C.
- **Assimilation of carbon:** Test assimilation of carbon sources was carried out using the Yeast Nitrogen Base medium (YNB) without the presence of carbon sources. A suspension of  $10^7$  spores/ml was prepared and 1 ml of this suspension was transferred to a Petri dish and YNB medium was added. After solidification of the medium, the plate was marked and filled with the following carbon compounds (dextrose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, fructose, mannitol, mannose and xylose). The growth was observed for 72 h at 28 °C.
- **Fermentation:** As evidence for completion of the fermentation 3 ml of basal medium plus bromothymol blue and 95% ethanol was added. After sterilisation the medium 1.5 ml of 6% sugars was added (glucose, sucrose, trehalose, lactose and maltose). Then, 0.2 ml of the spore suspension  $10^7$  spores/ml was inserted into the test tube and incubated for 72 h at 28 °C. The reading was performed, considering the production of gas inside the Durham tube.

**2.3 Growth at different pH, salinity and temperature**

- **pH:** A calibrated potentiometer was used to measure fungal growth at different pH. Culture mediums were prepared (Sabouraud agar) at pH 4.0-7.0 using 20 g/l Gebrite Gelban Gun (GGG) to solidify the medium. The fungi were inoculated in Petri plates (duplicate) and incubated at 28 °C. Growth was observed daily over a period of 96 h.
- **Salinity:** For the analysis of salinity sodium chloride (NaCl) was added in Sabouraud culture medium, in proportions of 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5 and 15% and incubated at 28 °C for 96 h. The growth analysis was performed by measuring the halo of growth.
- **Temperature:** Fungi were inoculated in Petri dish containing Sabouraud culture medium and incubated at different temperatures (28, 37 and 45 °C) for 96 h. The growth of fungi was observed by measuring the diameter of the colony.

**2.4 Enzyme tests**

- **Amylase and protease:** Detection of proteolytic and amylase activity was according to the methodology of Hankin and Anagnostaki [8]. The specific culture media were distributed in Petri dishes and microorganisms were inoculated in the centre of the dishes and incubated at 28 °C for 72 h. After the incubation period the plates were stained with iodine to a solution of 0.1 N for 5 min. The formation of a transparent halo around the colony shows the presence of enzymatic activity.
- **Lipase:** The lipase activity was performed according to the methodology of Hankin and Anagnostaki [8]. The three inductors 20, 80 and olive oil were used for enzymatic detection. The microorganisms were inoculated and incubated at 28 °C for 72 h and monitored every 24 h. The formation of a clear halo around the colony emphasises the presence of lipase.



## Environmental microbiology – biodeterioration &amp; biodegradation – bioremediation

- *Tanase and polyphenoloxidase*: For the detection of the enzyme tannase and polyphenol nutrient agar and malt agar plus specific enzyme inducers were used. The plates were incubated at 28 °C for 72 h with daily monitoring. Following the period of growth of the colony enzymatic detection was carried out.

### 2.5 Extraction of lipids

The lipids were extracted from 1.0 g of biomass using chloroform:methanol (v/v) [9] three times. The extracts obtained were evaporated until dry using a rotoevaporator.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Isolation and identification of Morphological characterisation

From the soil sample of Caatinga of Pernambuco, 325 were isolated filamentous fungal genera and three genera of *Rhizopus* (Table 1). The macroscopic study of the genus *Rhizopus* was characterised by the appearance of colonies of cotton wool, white and coloured yellowish brown or gray with time, with the reverse side of the plate blank. Upon microscopic observation, stolons are present along the mycelium, linking groups of sporangia usually unbranched (Fig. 1). The sporangiospores are long and at its apex forms a collarette, columella and sporangia containing sporangiospores, as described by Lacas *et al.* [10].

### 3.2 Assimilation and fermentation of carbon and nitrogen sources

In the test brew carbon sources, *R. microsporus* var. *chinensis* was able to ferment mannose, xylose, dextrose and low voltages present in the Durham gas tube by changing the pH; *R. stolonifer* fermented mannose, fructose, xylose, mannitol, trehalose, dextrose, sucrose and maltose resulting in low stresses in the Durham gas pipe observing changing the pH; and *R. microsporus* var. *microsporus* showed no change in any fermentative process of the carbon source (Table 2). In the assimilation of nitrogen sources *R. microsporus* var. *chinensis*, *R. stolonifer* and *R. microsporus* var. *microsporus* degraded ammonium sulphate, urea, ammonium chloride and yeast extract (Table 3). The assimilation of carbon sources from *R. microsporus* var. *chinensis* halo degradation was observed in the mannose, xylose and dextrose sources. *R. stolonifer* presented in the halo of mannose, fructose, xylose, trehalose, mannitol, dextrose, sucrose and maltose, and *R. microsporus* var. *microsporus* halo of assimilation was not observed in the carbon sources (Table 4).

### 3.3 Radial growth of fungal filaments under different conditions

The study of the behaviour of the *Rhizopus* samples in media with different pH, salinity and temperature was observed according to radial growth on solid medium. Colonies of *R. microsporus* var. *chinensis*, *R. stolonifer* and *R. microsporus* var. *microsporus* showed better growth in medium with pH 7, 2.5 salinity and temperature 28 °C taking the whole plate in 96 h cultivation (Fig. 2, 3 and 4).

**Table 1.** Identification of samples of *Rhizopus* isolated from soil of the Caatinga-PE.

| Isolated                    | Amounts |
|-----------------------------|---------|
| <i>Rhizopus microsporus</i> | 2       |
| <i>Rhizopus stolonifer</i>  | 1       |



**Fig. 1.** Macroscopic and microscopic observation of *Rhizopus*.

## Part 1

**Table 2.** Fermentation of carbon by *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *Rhizopus stolonifer* and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* isolated from soil of Caatinga.

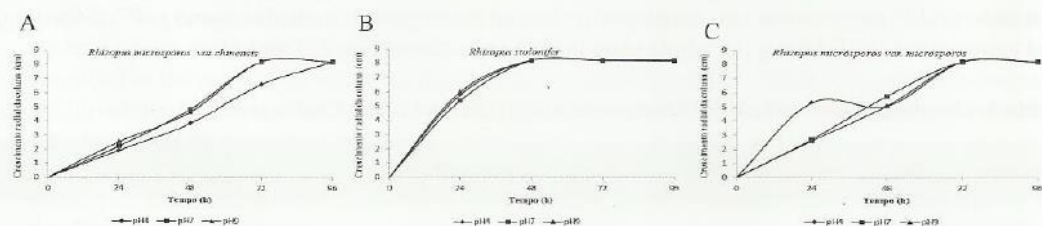
| Fungi                                         | Fermentation of yeast carbon |     |      |      |      |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------|------------------------------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
|                                               | Man                          | Fru | Xilo | Trea | Mani | Dex | Sac | Lac | Mal |
| <i>R. microsporus</i> var. <i>chinensis</i>   | +                            | -   | +    | -    | -    | +   | -   | -   | -   |
| <i>R. stolonifer</i>                          | +                            | +   | +    | +    | +    | +   | +   | -   | +   |
| <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> | -                            | -   | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -   |

**Table 3.** Nitrogen assimilation by *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *Rhizopus stolonifer* and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* isolated from soil of Caatinga.

| Fungi                                         | Nitrogen assimilation |      |                   |               |         |
|-----------------------------------------------|-----------------------|------|-------------------|---------------|---------|
|                                               | Ammonium sulphate     | Urea | Ammonium chloride | Yeast extract | Peptone |
| <i>R. microsporus</i> var. <i>chinensis</i>   | +                     | +    | +                 | +             | -       |
| <i>R. stolonifer</i>                          | +                     | +    | +                 | +             | -       |
| <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> | +                     | +    | +                 | +             | -       |

**Table 4.** Assimilation of carbon by *Rhizopus microsporus* var. *chinensis*, *Rhizopus stolonifer* and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* isolated from soil of Caatinga.

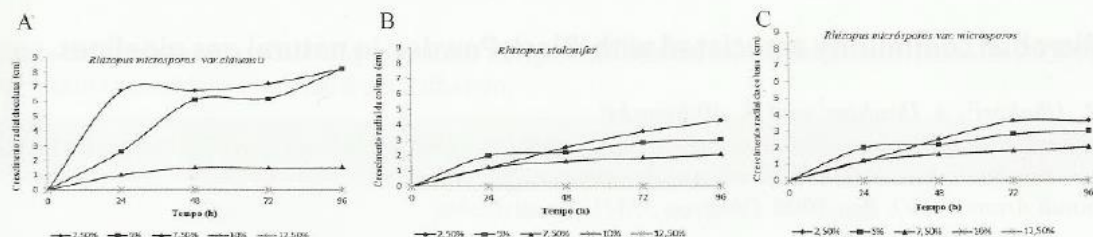
| Fungi                                         | Assimilation of carbon |     |      |      |      |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------|------------------------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
|                                               | Man                    | Fru | Xilo | Trea | Mani | Dex | Sac | Lac | Mal |
| <i>R. microsporus</i> var. <i>chinensis</i>   | +                      | -   | +    | -    | -    | +   | -   | -   | -   |
| <i>R. stolonifer</i>                          | +                      | +   | +    | +    | +    | +   | +   | -   | +   |
| <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> | -                      | -   | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -   |

**Fig. 2.** Colony radial growth (mm) of *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (A) and *Rhizopus stolonifer* (B) and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (C) pH 4, pH 7 and pH 9 at 28 °C for 96 h.

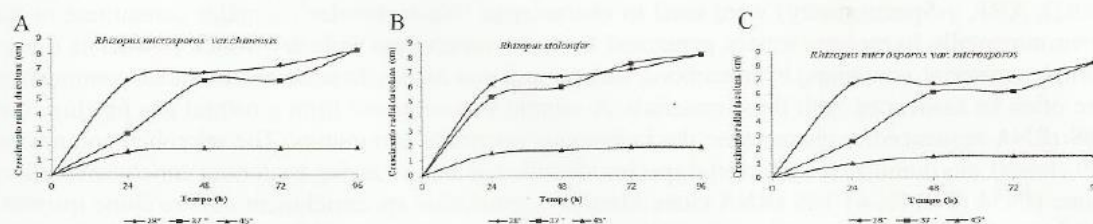
The test for detecting amylase, protease, tannase and polyphenoloxidase in *R. microsporus* var. *chinensis*, *R. stolonifer* and *R. microsporus* var. *microsporus* was not significant for enzyme production. The production of lipids was observed in *R. stolonifer* (35.7%), followed by *R. microsporus* var. *chinensis* (12.3%) and *R. microsporus* var. *microsporus* (10.8%).



## Environmental microbiology – biodeterioration &amp; biodegradation – bioremediation



**Fig. 3.** Colony radial growth (mm) of *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (A) and *Rhizopus stolonifer* (B) and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (C) in salinity 2.5% and 5% at 28 °C for 96 h.



**Fig. 4.** Colony radial growth (mm) of *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* (A) and *Rhizopus stolonifer* (B) and *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (C) in temperatures of 28 °C, 37 °C and 45 °C for 96 h.

#### 4. Conclusion

The *Rhizopus* isolated from the Caatinga soil exhibits the ability to grow in different conditions, pH, salinity and temperature. Tests for assimilation and fermentation of sources of carbon and nitrogen demonstrated the ability of different substrates to consume high nutritional value for fungi. The results provide substantial evidence of the behaviour of *Rhizopus* cultures for obtaining inputs of high commercial value.

#### Acknowledgements

This paper was supported by SISBIOTA-CNPq, CAPES and FACEPE.

#### References

- [1] Anderson IC, Cairney JWG. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* 2004;6:769-779.
- [2] Borges LR, Lazzari SMN, Pimentel IC, Nova MXV. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias. Ambiental*. Curitiba 2011;9:185-194.
- [3] Machado APS. Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água. Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Escola de Engenharia da Universidade do Minho. P. 15- 16, 2006.
- [4] Larone DH. Medically important fungi – a guide to identification. 4 edição. Washington: American Society for Microbiology Press, 2002.
- [5] Watanabe T. Soil and seed fungi – morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press, 2002.
- [6] Anvisa. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. 2004.
- [7] Fungaro MHP. PCR na micologia diagnóstico e análise de variabilidade. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*. P. 12-16, 2000.
- [8] Hankin, L., Anagnostakis, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* v.67, p.597-607, 1975.
- [9] Manocha MS, San-Blas G, Centeno S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol. Sabouraudia* 1980;117:147-154.
- [10] Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. 1991. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*, São Paulo, Savier.

## CAPÍTULO 3

**Produção de lipídios por fungo oleaginoso *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP1304 em condição de crescimento usando substratos agroindustriais**

Manuscrito submetido à revista Applied and Environmental Microbiology



## **Produção de lipídios por fungo oleaginoso *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP1304 em condição de crescimento usando substratos agroindústrias**

Jaceline Maria de Negreiros Lima<sup>1,3</sup>; Grayce Kelli Barbosa da Silva<sup>1,3</sup>; Leonor Alves de Oliveira da Silva<sup>2</sup>; Kaoru Okada<sup>3</sup>; Galba Maria de Campos Takaki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Centro de Ciências Biológica, departamento Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Brasil

Estudos foram realizados com *Rhizopus microsporus* avaliando a detecção da acumulação de lipídeos, produção de biomassa, lipídeos totais, avaliação da composição de ácidos graxos e atividade antioxidante, a partir de substratos alternativos (manipueira, milhocina e farelo trigo), empregando um planejamento fatorial completo de 2<sup>3</sup>, por fermentação submersa. A produção de óleo por *R. microsporus* foi observada pela coloração citoquímica com Sudam Black, ocorrendo maior concentração de lipídeos quando o fungo foi cultivado nos substratos agroindustriais. A fermentação submersa demonstrou que 15% de milhocina, 4% de farelo de trigo e 0% manipueira (ensaio 3) apresentou elevada produção de biomassa (51,00g/L) e apenas lipídios totais de 8%. Contudo, com o aumento de milhocina e 5% de manipueira associado à 3% de farelo de trigo (ensaio 12), observou-se 24,50g/L de biomassa e elevada indução na acumulação de lipídeos (69,0%) por *R. microsporus*, sendo caracterizado como fungo oleaginoso. A composição química dos lipídeos apresentou ácido palmítico (C16:0) 23,528%, ácido esteárico (C18:0) 5,472%, ácido oleico (C18:1) 27,232%, ácido linoleico (C18:2) 37,622% e ácido gama-linolénico (18:3) 6,146%. O ensaio com maior acúmulo de lipídios (69,0%) foi analisado a sua capacidade de sequestrar radicais livres, através da atividade antioxidante que apresentou 96,32% na concentração de 20 µg/mL do extrato do lipídio. O meio formulado demonstrou ser promissor e de relevante composição química, considerando a eficiência na conversão dos substratos agroindustriais na produção de biomassa, lipídeos totais e ácidos graxos, considerando ainda a grande aplicabilidade de óleos.

**Palavras- chaves:** resíduos indústrias, lipídios, ácidos graxos, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*

## 1 Introdução

Os lipídios de micro-organismos servem como base para identificação e exploração de oportunidades biotecnológicas, que incluem o desenvolvimento de produtos economicamente competitivos, processos e aplicações. A produção de lipídios por micro-organismos tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores nestes últimos anos. Os fungos filamentosos, contudo, apresentam produções de lipídios desejáveis devido ao fato de apresentarem altos teores de lipídios contendo composição não usual de ácidos graxos tanto de cadeias curtas, quanto de cadeias longas [1,2].

Nos micro-organismos, os lipídios são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. A composição, qualitativa e quantitativa de lipídios varia de espécie para espécie de acordo com as condições de cultivo, disponibilidade de nutrientes e com o estágio de crescimento [3].

Os lipídios microbianos podem apresentar propriedades antioxidantes, protegendo as células contra danos oxidativos provocados por radicais livres e por espécies reativas de oxigênio [4,5]. Além desta propriedade, desempenham um papel importante na prevenção de doenças associadas ao processo de estresse oxidativo como o câncer, catarata, arteriosclerose e retardo do processo do envelhecimento [6,7].

O fungo *R. microsporus* pertence à ordem Mucorales, classe Zygomycetes, que vivem no solo, ar e matéria em decomposição, crescem bem em substratos como frutas, cereais e pães. Apresenta um elevado potencial biotecnológico na produção de lipídios [8].

Os subprodutos agroindústrias são aqueles provenientes de um processamento industrial, onde se pode produzir um novo produto. Uma maior utilização é limitada pela falta de conhecimento da composição química, viabilidade econômica e garantia de segurança alimentar e ambiental dos subprodutos industriais [9].

Os resíduos agroindustriais são os mais pesquisados como suplementos para constituições de meios de cultura para síntese de produtos desejáveis. São geralmente mais baratos, abundantes e apresentam composição rica em material orgânico [10].

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho, que apresenta grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, utilizada principalmente como suplemento alimentar na fabricação de ração de ruminantes, como também, nutrientes para microrganismos em fermentação industrial, visando a produção de subprodutos de importância comercial. [11, 12, 13].

A manipueira é oriundo do processo da produção de farinha, de mandioca prensada, sendo esse efluente descartado sem nenhum tratamento, causando a poluição dos cursos de água (rios e riachos)

com grandes prejuízos à natureza. A toxicidade desse efluente está relacionada a dois componentes com forte potencial poluidor, destacando-se a matéria orgânica biodegradável e o ácido cianídrico [14]. Esse subproduto é constituído por glicose e outros açúcares, proteínas, células descamadas, laminarina e derivados cianogênicos (ácido cianídrico, cianetos e aldeídos), além de substâncias diversas e diferentes sais minerais, muitos dos quais podem ser fontes de macro e micronutrientes para plantas e micro-organismos [15].

Quanto ao farelo de trigo [16] confirmam citação [17] ao comentarem que o farelo é produzido em todo mundo em grandes volumes como subproduto da indústria de moagem do trigo e que este material não deve ser desprezado pois concentra ainda, fonte considerável de açúcares.

Neste trabalho foi avaliada a influência da utilização de rejeitos agroindustriais manipueira (efluente), milhocina (resíduo industrial do beneficiamento do milho) e farelo de trigo na produção de biomassa, lipídios totais, ácidos graxos e atividade antioxidante por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP1304.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Micro-organismo**

Os estudos foram realizados com a amostra do *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP1304 isolado do solo da caatinga, Brasil-PE, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, (UNICAP), registrada no World Federation Culture for Collection-WFCC, e mantida em meio BDA (Batata Dextrose Agar), a temperatura de 5°C.

### **2.2 Substratos**

Os substratos utilizados foram manipueira da casa de farinha de Pombos/PE. A milhocina, resíduo da indústria de beneficiamento do milho, cedida pela indústria Corn. O farelo de trigo obtido em casa comercial no Recife, Pernambuco- Brasil.

### **2.3 Condições de cultivo e Produção de Biomassa**

O pré-inóculo foi preparado a partir do *R. microsporus* crescido em meio YMA (Yeast Malt Ágar) durante 5 dias, onde os esporos foram coletados com o uso de swabs, transferidos para água destilada estéril e determinado o número de esporos em câmara de Neubauer. Alíquotas de 5mL de suspensão de esporos contendo  $10^7$  esporos/mL foram transferidas para o meio de produção em frascos de Erlenmeyers de 250mL com capacidade 100mL dos meios de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$ , mantidos sob agitação orbital de 150rpm, a temperatura de 28°C, por um período de 96h.

### **2.4 Determinação do pH**

O pH das amostras coletadas foram determinadas por potenciometria a partir do meio livre de células.

## 2.5 Análise citoquímica

Para análise citoquímica de lipídeos, as biomassas foram processadas para visualização em microscópio de fluorescência.

As amostras foram fixadas em paraformaldeído (PFA) e tampão salina fosfato (PBS), pH 7,2. Após a etapa de fixação as amostras foram lavadas em tampão fosfato (PBS). Em seguida foram imersas no corante Sudan Black B por 10 minutos, em condições de escuridão. Em seguida foram lavadas em álcool a 70% para retirar o excesso do corante e submetidas a 37 °C por 1 hora. Posteriormente as amostras foram lavadas com água destilada e contracoradas com safranina por 30 segundos e novamente lavadas com PBS. As lâminas foram montadas utilizando uma gota de glicerina tamponada e visualizadas ao microscópio óptico, as gotículas de óleo neste método são coradas em negro [18].

## 2.6 Extração de lipídios totais

Os lipídeos foram extraídos de acordo com o método descrito por [19]. 1,0 g da biomassa liofilizada foram submetidas a extrações sucessivas de lipídeos por três tempos de clorofórmio: metanol (2:1; 1:1; 1:2 v/v). O material foi agitado por 15 minutos, posteriormente homogeneizado por 24 horas, após cada troca de solvente.

Os extratos foram reunidos e combinados e evaporados até a secar no rotoevaporador. Em seguida 1 a 2 ml de Hexano, foi utilizado para recuperar os lipídeos. As respostas para produção de lipídeos foram calculadas em termo de concentração de lipídeos(g/ L) ou lipídeos totais (%).

$$\text{Rendimento Percentual Lipídeos Totais (\%)} = \frac{\text{massa de lipídeos (g)}}{\text{biomassa seca(g)}} \cdot 100$$

## 2.7 Extração e metilação dos ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram convertidos para ésteres metílicos de acordo com a metodologia de [20]. A biomassa liofilizada (100mg) foi colocada em um tubo de tampa de rosqueada, misturado com 2ml de uma solução de trifluoreto-de-boro 14% em metanol e 2ml de benzeno, encubados “overnight” a 60°C. Após à incubação, 2ml de água destilada foi adicionado a mistura e os tubos foram agitados no vortex a 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 1700 rpm durante 10 minutos a 40°C. Após a centrifugação, o benzeno foi removido e evaporado em atmosfera gasosa. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram resuspendidos em n-hexano e analisados por cromatografia gasosa.

## 2.8 Dosagem da atividade antioxidante

A dosagem de atividade antioxidante foi realizada pelo método fotolorimétrico in vitro do radical livre estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) obtido da SIGMA. Nesse método é preparada uma



solução 0,3 mM de DPPH em etanol. As amostras são preparadas adicionando-se 1mL desta solução de DPPH a 2,5 mL de soluções dos extratos diluídos em etanol a concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL. Nos brancos, ao invés do DPPH, adiciona-se apenas 1 mL de etanol aos extratos diluídos nas mesmas concentrações das amostras. O controle negativo é preparado apenas com 1 mL de DPPH e 2,5 mL de etanol. Como controle positivo foi utilizado o extrato padronizado de Ginkgo biloba, EGb 761®, que possui alta capacidade antioxidante.

A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo de descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada. Trinta minutos após a adição de DPPH às amostras, é feita a leitura em um espectrofotômetro de Ultravioleta UV-vis Shimadzu UV 1601 em 518nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e, com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre a amostra e o branco e as atividades antioxidantes percentuais foram obtidas por regressão linear, logarítmica ou exponencial para cada extrato, chegando-se assim à concentração necessária para se obter 50% do efeito antioxidante máximo estimado de 100% (CE<sub>50</sub>) [21].

## 2.9 Planejamento fatorial completo de 2<sup>3</sup>

Foi utilizado um planejamento experimental, que compreende um fatorial 2<sup>3</sup>, com os níveis + 1 e – 1 e 4 pontos centrais (nível zero). Para analisar os efeitos principais e interações das variáveis concentrações manipueira, milhocina e temperatura foi utilizado o software STATISTICA versão 6.0 da StatSoft®. Ver tabela 1 e 2.

**Tabela 1.** Matriz do Planejamento Fatorial Completo 2<sup>3</sup>

| Fator               | -1 | 0  | +1 |
|---------------------|----|----|----|
| Milhocina (%)       | 15 | 20 | 25 |
| Farelo de Trigo (%) | 2  | 3  | 4  |
| Manipueira (%)      | 0  | 5  | 10 |

**Tabela 2.** Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup>, tendo como variáveis Milhocina (%), Farelo de Trigo (%) e Manipueira (%) variável resposta a produção de Biomassa e Lipídios por estirpes de *Rhizopus* isolados do solo da Caatinga/PE.

| Ensaio | Milhocina (% v/v) | Farelo de trigo (% v/v) | Manipueira (% v/v) |
|--------|-------------------|-------------------------|--------------------|
| 1      | 15                | 2                       | 0                  |
| 2      | 25                | 2                       | 0                  |

|    |    |   |    |
|----|----|---|----|
| 3  | 15 | 4 | 0  |
| 4  | 25 | 4 | 0  |
| 5  | 15 | 2 | 10 |
| 6  | 25 | 2 | 10 |
| 7  | 15 | 4 | 10 |
| 8  | 25 | 4 | 10 |
| 9  | 20 | 3 | 5  |
| 10 | 20 | 3 | 5  |
| 11 | 20 | 3 | 5  |
| 12 | 20 | 3 | 5  |

\* Fixo Temperatura

### 3 Resultados e Discussão

**Avaliação da produção de lipídios por Sudan Black** . A utilização da coloração com Sudan Black em micélio de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 cultivado em meio de composição definida para Mucorales e a melhor condição na produção de lipídios (69%) com meio contendo resíduos agroindustriais (milhocina, manipueira e farelo de trigo 20, 3 e 5%) pode revelar a presença de lipídios sob a forma de corpos de inclusão de cor escura (Figura 1).

Uma análise das micrografias revela que, na condição da composição meio Mucorales apresentou uma baixa inclusão de lipídios homogeneamente distribuídos (Figura 1). Por outro lado, o crescimento em meio residual (milhocina, manipueira e farelo de trigo) resultou em uma maior inclusão de lipídios dispersos no citoplasma celular. A intensidade dessas alterações é relacionada com a concentração de fonte de carbono e é mais elevada em culturas cultivadas em resíduos agroindústrias.

A coloração de corpos lipídicos de fungos usando o Sudan black foi descrito pela primeira vez por [22]. Desde então, o corante tem sido usado para revelar a presença de inclusões de lipídios como uma análise qualitativa para o rastreamento e avaliação da capacidade de células microbianas para acumular lipídios [23].

A fisiologia básica de acumulação de lipídios nos microrganismos tem sido bem estudada. Sabe-se que produção de lipídios requer um meio com um excesso de açúcares ou componentes similares, tais como glicerol e polissacarídeos, mas com pouca outros nutrientes, geralmente nitrogênio [24].



**Figura 1.** Citoquímica do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 cultivada no meio de composição definida para Mucorales (A) e meios agroindustriais (milhocina 20%, manipueira 5% e farelo de trigo 3%) (B) com aumento de 40x.

**Influência de substratos agro-industrial na produção de biomassa e de lipídios.** A produção de biomassa e lipídios totais por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 utilizando manipueira, farelo de trigo e milhocina, através de um planejamento fatorial completo  $2^3$  estão apresentadas na Tabela 3. Observou-se que o ensaio 3 utilizando 15% de milhocina, 4% de farelo de trigo e 0% manipueira apresentou a maior produção de biomassa obtidas nos ensaios correspondendo a um total de 51,00g/L e uma produção de lipídios totais de 8%. A condição 12 do ponto central que utilizou as seguintes concentrações 20% milhocina, 3% de farelo de trigo e 5% de manipueira foi a que melhor produziu lipídios totais, apresentando um total de 69%. O pH dos meios variam de 6,00 a 7,00, destacando-se que a maior produção de biomassa e de lipídios foram obtidas na faixa de 6,30.

Os resultados expressos no Diagrama de Pareto (Figura 2 e 3) contendo os efeitos padronizados para um nível de 95% de confiança, representados pelo valor de p, com as seguintes variáveis independentes: manipueira, milhocina e farelo de trigo, assim como suas associações, influenciaram no rendimento de biomassa e de lipídios totais. Sendo que a manipueira foi a variável independente mais relevante para produção de biomassa, enquanto que, a milhocina foi a variável independente mais relevante para produção de lipídios totais, por ambas estarem acima dos valores de p.

A concentração de 20% de milhocina, 3% de farelo de trigo e 5% de manipueira dos resíduos agroindústrias foram utilizados para o beneficiamento a produção de lipídios em *Rhizopus*

*microsporus*. O *R. microsporus* apresentou uma porcentagem de 69% de lipídeos em sua biomassa seca a 28° C sendo sua maior produção em relação aos ensaios testados. Ver Tabela 3.

A exploração de resíduos agroindústrias como matéria-prima aplicada a conversão de lipídeos por micro-organismos oleaginosos, apresenta ser um destino promissor para a indústria e meio ambiente [25].

O farelo de trigo obtida a partir do processo de separação no beneficiamento do cereal não se caracteriza como fonte de lipídios porque esses se encontram fortemente concentrados no gérmen [26, 27]. Uma alternativa para agregar valor a esses subprodutos seria utilizá-los como substrato em processo fermentativo, empregando espécies fúngicas que poderiam aumentar o nível de proteína digerível, propiciar maior aproveitamento de outros nutrientes por animais monogástricos, ou alterar seu perfil em ácidos graxos essenciais [28,29].

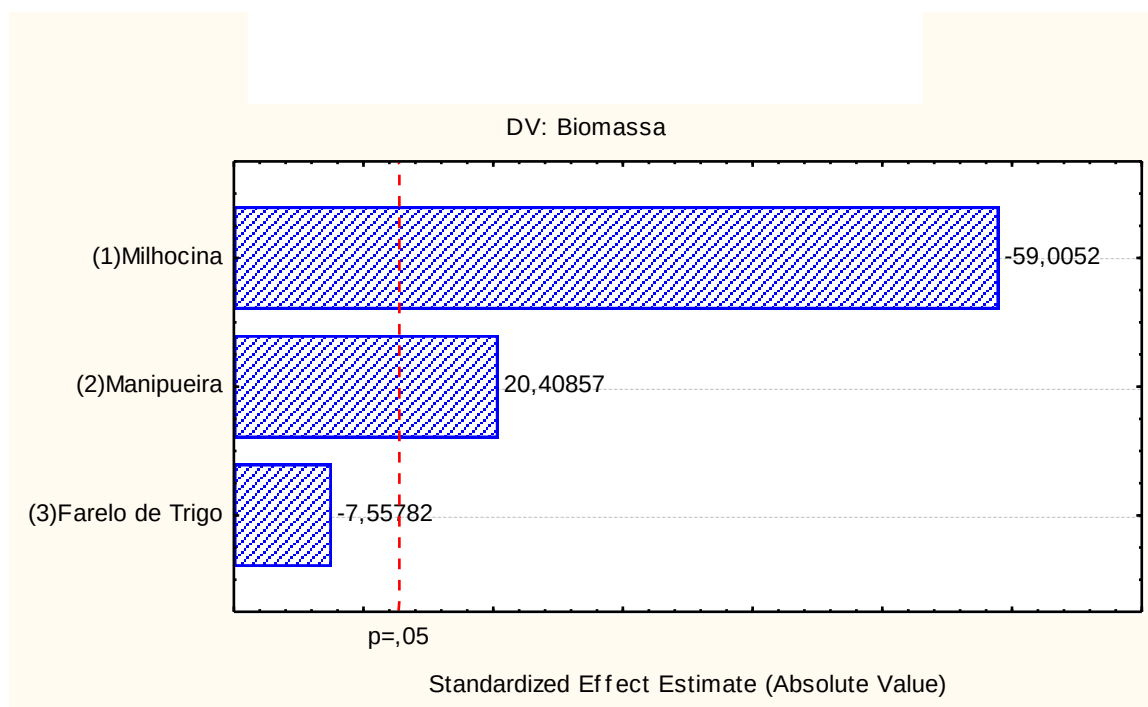
No estudo [30] em que o fungo *Mortierella sp.*, um fungo da ordem Mucorales, apresentou crescimento significativo em concentrações de glicose, observando que o micro-organismo não obteve crescimento significativo em relação às outras fontes de carbono. Contudo essas informações apoiam os resultados obtidos por resíduos agroindustriais (milhocina, manipueira e farelo de trigo) na produção de lipídios e ácidos graxos.

Os valores máximos da biomassa produzida foram superiores ao estudo [31] com o fungo *M. isabelina* cultivada em fonte de lactose, onde neste a mais alta produção foi igual a 11,48g/L para uma concentração de 12% de lactose em relação ao fungo *R. microsporus* que apresentou a maior produção de 51,00g/L na concentração de 15% de milhocina e 4% de farelo de trigo.

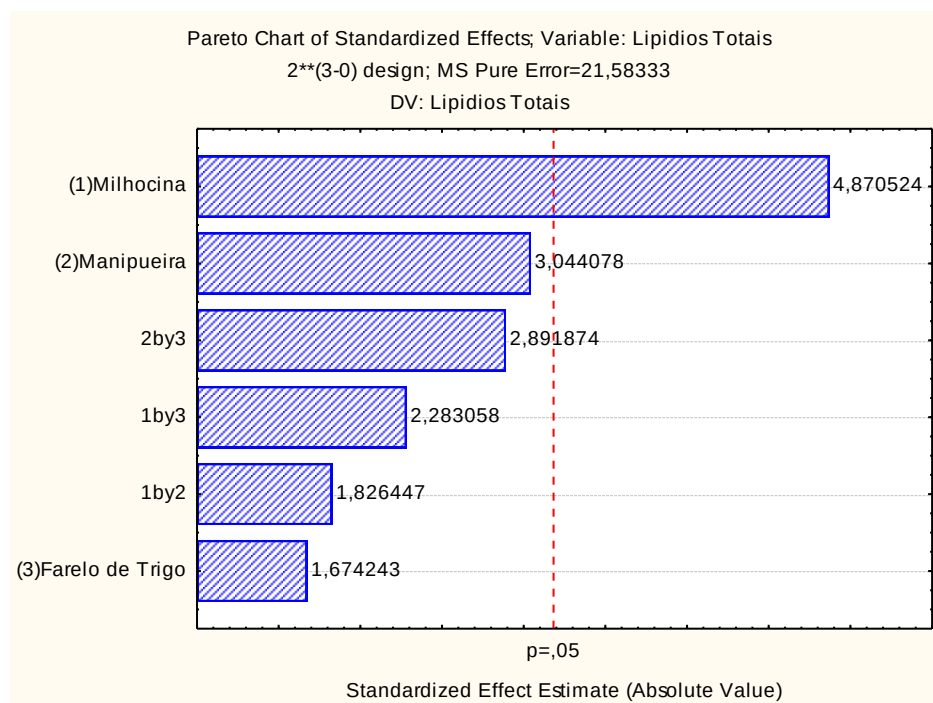
Os resultados [32] com o fungo *M. isabelina* cultivado em glicerina e limitação de nitrogênio produziu quantidades significantes de lipídeos, 4,4g/L, cerca de 50%, um resultado foi considerado importante, dado que o glicerol não é um substrato adequado para produção de lipídeos por vários Zygomycetos oleaginosos em contraste com vários açúcares, polissacarídeos e materiais gordurosos. Já em estudo realizado [33] utilizando a *M. isabelina* cultivado em lactose como fonte de carbono, a concentração máxima de óleo microbiano encontrada foi de 3,65 g/L e o rendimento microbiano de óleo foi de 12,11% obtidos a partir da biomassa cultivada numa concentração de 16,0% de lactose.

**Tabela 3:** Crescimento de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 (biomassa g/L), produção de lipídios totais (%) e pH do meio contendo manipueira, milhocina e farelo de trigo após 96hs de fermentação à 28°C.

| Ensaio | pH   | Biomassa Seca<br>(g/L) | Lipídios totais<br>(%) |
|--------|------|------------------------|------------------------|
| 1      | 6,66 | 33,90                  | 9                      |
| 2      | 6,05 | 27,00                  | 22                     |
| 3      | 6,30 | 51,00                  | 8                      |
| 4      | 6,00 | 17,00                  | 15                     |
| 5      | 7,00 | 40,70                  | 14                     |
| 6      | 6,10 | 36,00                  | 18                     |
| 7      | 6,63 | 43,30                  | 11                     |
| 8      | 6,06 | 30,90                  | 51                     |
| 9      | 6,11 | 29,30                  | 60                     |
| 10     | 6,30 | 27,00                  | 59                     |
| 11     | 6,14 | 25,00                  | 65                     |
| 12     | 6,30 | 24,50                  | 69                     |



**Figura 2:** Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de Biomassa por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 em meio contendo manipueira, milhocina e farelo de trigo após 96hs de fermentação à 28°C por 150rpm



**Figura 3:** Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis utilizadas para a produção de lipídios totais por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 em meio contendo manipueira, milhocina e farelo de

trigo após 96hs de fermentação por 150rpm.

**Caracterização dos ácidos graxos.** Os resultados obtidos com a extração e metilação dos ácidos graxos da biomassa seca do micro-organismo cultivado em meio agroindustriais (milhocina, farelo de trigo e manipueira 20, 3, 3%) podem ser analisados na Tabela 4.

Como observado na Tabela 4 os maiores picos alcançados nas análises cromatográficas dos ácidos graxos dos fungos, foram do ácido linoléico (C18:2) seguido do ácido oléico (C16:0) e do palmítico (C18:2).

Coincidindo com trabalhos anteriores com fungos da ordem Mucorales, como por exemplo *M. circinelloides*, *C. echinulata*, *Z. moelleri*, *R. stolonifer*, apresentando o mesmo perfil de ácidos graxos obtidos neste trabalho, a dominância dos picos alcançados nas análises cromatográficas, do ácido oléico, ácido palmítico e ácido linoléico [34].

O ácido linoléico é um ácido graxo essencial na dieta humana, sendo precursor do ácido araquidônico [35].

O ácido linoléico apresenta o potencial rápido de cicatrização de feridas, por abreviar a fase inflamatória quando ingerido. Ainda o mesmo autor, conclui que a ingestão de ácido oléico modula a fase inflamatória, porém o reparo tecidual não é significativo quanto o uso de ácido oléico. O tratamento tópico está relacionado a hidratação e elasticidade da pele que impede a entrada de microrganismos e a perda de água para o meio externo [36]. Sendo assim, a fonte de ácido linoléico por micro-organismos também parece promissora para área farmacêutica.

Os micro-organismos *Cunninghamella japonica*, *Cunninghamella echinulata*, *Mortierella rammaniana*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, são considerados fontes promissoras na produção de  $\gamma$ -linolênico [37, 38, 39, 40, 41]. Em nosso estudo o *Rhizopus microsporus* produziu uma quantidade significativa deste em meio formulado com milhocina, farelo de trigo e manipueira 20, 3, 3%, respectivamente. Sendo o meio agroindustriais uma condição nutritiva promissora para do ácido  $\gamma$ -linolênico ( $\omega$ -6)

Ao cultivar *C. echinulata* em meio com glicose e cascas de laranjas, verificou que a glicose como fonte de carbono, apresentou maior produção  $\gamma$ -linolênico, do que no resíduo [42].

O ácido  $\gamma$ -linolênico é um importante intermediário na biossíntese de prostaglandina biologicamente ativo a partir de ácido linoleico [43].

**Tabela 4.** Composição em porcentagem dos ácidos graxos de biomassa cultivada em meio agroindustriais (milhocina, farelo de trigo e manipueira 20, 3, 3%), *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 a 28° C, em 96h.

| Ácidos Graxos                 | %      |
|-------------------------------|--------|
| Ácido Palmítico (C16:0)       | 23,528 |
| Ácido Esteárico (C18:0)       | 5,472  |
| Ácido Oléico (C18:1)          | 27,232 |
| Ácido Linoléico (C18:2)       | 37,622 |
| Ácido Gama-linolenico (C18:3) | 6,146  |

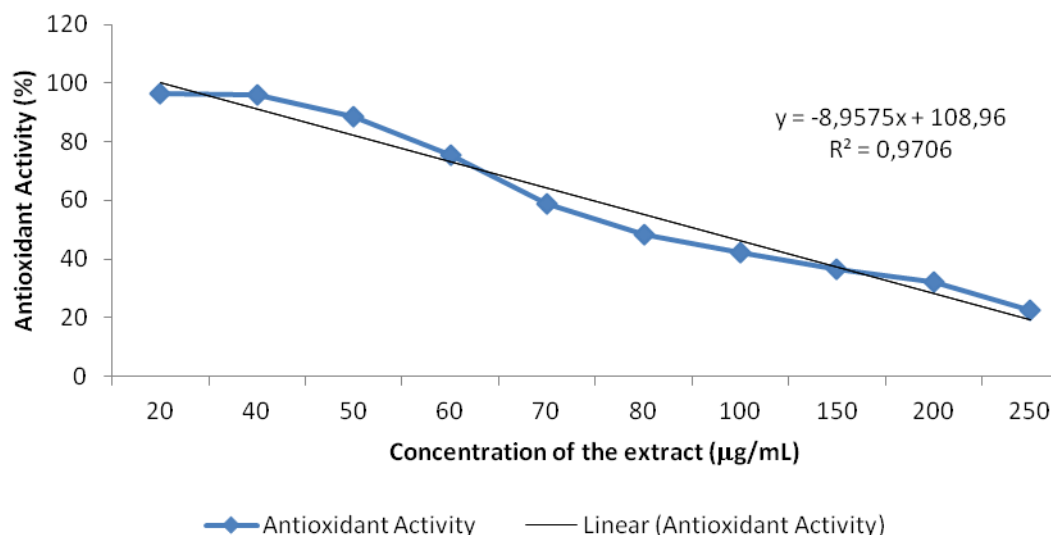
**Análise da atividade antioxidante.** A atividade antioxidante é avaliada a partir da geração de radicais livres que está diretamente relacionada a processos oxidativos, porém, se a produção destes radicais supera a capacidade antioxidante em um sistema vivo, estes podem reagir com lipídios, proteínas e com o DNA conduzindo a danos estruturais/funcionais nas células, enzimas e material genético levando a inúmeras patologias.

Os resultados obtidos foram avaliados a partir da capacidade do DPPH em reagir com os doadores de hidrogênio. As análises foram realizadas em diferentes concentrações do extrato de lipídios (20, 40, 50, 60, 70 80, 100, 150, 200 e 250 µg/mL) demonstrando que na concentração de 20 µg/mL houve um maior valor da atividade antioxidante (96,32%). Quando a um aumento da concentração do extrato de lipídios diminui a ação da capacidade do DPPH em reagir com o hidrogênio. Observado na figura 4.

Alguns autores recomendam a utilização do método DPPH por ser um recurso fácil e preciso para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais [44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52].

O método de DPPH é o mais simples e fácil, tendo em conta a seu baixo custo para a avaliação atividade antioxidante de uma amostra [53].





**Figura 4:** Atividade antioxidante de lipídios totais obtido a partir do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 cultivado em meio agroindústrias (milhocina 20%, farelo de trigo 3% e manipueira 5%).

**Conclusão.** Os meios agroindústrias obtida a partir de insumos indústrias demonstra ser uma excelente fonte de carbono com potencial de aplicação como meio de cultura para o crescimento do *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304. A composição química da milhocina apresenta nutrientes fundamentais para o crescimento e produção de metabólitos do fungo apresentando resultados promissores e inovadores na produção de lipídeos, observado principalmente na estrutura celular através da coloração do Sudan Black e por sua quantidade de armazenamento, no potencial na produção do ácido palmítico, ácido oleico e o ácido linoleico e na atividade antioxidante. A milhocina, o farelo de trigo e manipueira oriunda da produção de insumos agroindústrias apresenta potencial biotecnológico para produção de biomassa e de lipídeos por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304.

### Agradecimentos

Agradecemos aos órgãos de fomentos, CAPES, FACEPE, CNPq pelo apoio financeiro e a Universidade Católica pelo suporte físico.

## Referencias

1. Hansson, L., Dostálek, M. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of gamma-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, 28, 3, 240 – 246.
2. Yang, Y., Mi, Y., Bo, H. Endophytic Fungal Strains of Soybean for Lipid Production. *Bioenerg. Res.* 2014, 7, 353–361.
3. Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy.* 2009, 34, 1, 1-5.
4. Shami, N. J. I. E., Moreira, E. A. M., Lycopene as an antioxidant agent. *Rev. Nutr.* 2004, 17, 2, 227-236.
5. Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M. L. V, X., YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*, 2007, 105, 548-554.
6. Ribeiro, A.B., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S. Flavonóis glicosilados antioxidantes de *Nectandra grandiflora* (Lauraceae). *Eclet. Quím.* 2002, 27,.
7. Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H., Sun, M. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World Journal Microbiology Biotechnology.* 2007, 23, 1253-1263.
8. Ribes, J. A., Vonover-Sams, C. L., Baker, D. J. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000,13, 236–301.
9. Meneguetti C. C., Domingues, J. L., Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. *Revista eletrônica Nutritime.* 2008, 5, 2, 512-536.
10. Santos, S. F. M., Nobrega, J. E., Pinto, G. A. S., Macedo, G. R., SILVA, F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju para obtenção de pectinase por fermentação semi-sólida. In: *Simpósio Nacional de Bioprocessos.* 2005, 15.
11. AMARTEY, S. A., LEUNG, P. C. BAGHAEI-YAZDI, N., LEAK, D. J., HARTLEY, B. S. *Process. Biochemistry.* 2000, 34, 289-294.
12. Fontes, G. C., Amaral, P. F. F., Coelho, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova.* 2008, 31, 8, 2091– 2099.
13. Domingos, M. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. *Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena.* 2009, 23-25.
14. Mesel, M., Pimentel, A. Manipueira se aproveita? *Sociedade Nordestina Ecologia.* 2007, 3.
15. PONTE, J. J. Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante. *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca.* 2000, 4, 5, 81 – 95.
16. ZACCHI, G., PALMOROLA-ADRADOS, B., CHOTEBORSKA, P., GALBE, M. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology.* 2005, 96, 843-850.
17. LIMA, G. J. M. M. Trigo na Alimentação Animal. Endereço eletrônico: <http://www.cnpas.embrapa.br/cgi-bin/notiprn.pl?/home/httpd1/docs/artigos/2003/artigo-2003-n019.html>. Acesso em 15/10/2013.
18. Sheehan, H. L., Storey, G. W. An improved method of staining leucocyte granules with Sudan black B. *The Journal of pathology and bacteriology.* 1947, 59, 1-2, 336-337.
19. MANOCHA, M. S., SAN-BLAS, G., CENENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol.* 1980,117, 147-154.
20. DUNLAP, K. R., PERRY, J. J. Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-utilizing microorganismos. *J. Bacteriol.* 1967, 94, 1919-1923.

21. Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G, Reis, A. S., dos Santos, T. C., Coube, C. S., Leitão, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001, 15, 127-130.
22. BURDON, K. L. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bacteriol.* 1946, 52, 666-78.
23. Neema, P. M., Kumari, A. Isolation of lipid producing yeast and fungi from secondary sewage sludge and soil. *Austral. J. Bas. Appl. Sc.* 2013, 7, 9, 283-288.
24. Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., Zhao, Z. K. (2008) Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol. 110, No. 5, pp. 405–412, ISSN 1438-9312
25. SILVA, C. L M da. Obtenção de ésteres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Departamento de Química Inorgânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005
26. Feddern, V. Badiale-Furlong, E., Souza-Soares, L. A. Efeitos da fermentação nas propriedades físico-químicas e nutricionais do farelo de arroz. *Boletim da SBCTA.* 2007, 27, 800-804.
27. Silveira, C. M., Badiale-Furlong, E. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. *Boletim da SBCTA.* 2007, 27, 805-810.
28. Pitt, J. I., Hocking, A. D. Fungi and food spoilage. Ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.
29. Pandey, A. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 1992, 27, 2, 109- 117.
30. Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 2004; 95: 287–91.
31. DEMIR, M., TURHAN, I., KUCUKCETIN, A., ALPKENT, Z. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase *Bioresource Technology* 128 365–369, 2013.
32. Papanikolaou, S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, Komaitis M, Aggelis G, Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media, *Biores. Technol.*, 99, 2419-2428, 2008.
33. DEMIR, M., TURHAN, I., KUCUKCETIN, A., ALPKENT, Z. Oil production by *Mortierella isabellina* from whey treated with lactase *Bioresource Technology* 128 365–369, 2013.
34. Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 2004; 95: 287–91.
35. PERINI, J.A.L., BRAIDOTTI STEVANATO, F. SARGI, S.C., VISENTAINER, J. E.L, DATALIO, M.M.O., MATSHUSHITA, M., SOUZA, N.E., VISENTAINER, J.V.. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.* vol.23, no.6, Campinas. 2010.
36. RODRIGUES, H.G. Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oléico e linoléico. Tese de Doutorado. Pós-graduação em Fisiologia Humana. Universidade de São Paulo (USP). 2011.
37. GALANINA, L. A.; BEKHTEREVA, M. N.; PAVLOVA, T. A.; TSVETKOVA, E. V. Utilization of individual monosaccharides from their mixtures by the microscopic fungus *Cunninghamella japonica* and its effect on lipid synthesis. *Mikrobiologiya.* 1988 57, 213-217.
38. Hansson, L., Dostálek, M. Effect of culture conditions on mycelial growth and production of gamma-linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1988, 28, 3, 240 – 246.
39. SHIN, Y.C.; SHIN, H.K. Screening of g-linolenic acid-producing fungi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 1988, 20:724-731.
40. Chen, H. C., Chang, C. C., Production of g-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Prog.* 1996, 12, 338–341.

41. KAVADIA A, KOMAITIS M, CHEVALOT I, BLANCHARD F, MARC I, AGGELIS G Lipid and gamma linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. J Am Oil Chem Soc 78:341–346, 2001.
42. GEMMA, H.; KAVADIA, D; DIMOU, V., TSAGOU, M.; KOMAITIS, G.; AGGELIS. Production of gama-linolênico acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and Orange peel. Appl Microbiol Biotechnol. 2002.
43. CARVALHO, P.O., OLEIVEIRA, J.G. PASTORE, G.M. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor* spLB-54 by growth temperature. Rev. Microbiol. vol.30 n.2, São Paulo, 1999.
44. Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papagerogiou, V. P., Assimopoulou, A. N., Boskou, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). Food Chemistry. 2006, 94, 19–25.
45. ATOUI, A.K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry. 2005, 89, 27–36.
46. Ribeiro, E. P., Seravalli, E. A. G. Química de alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blucher, Ltda, 1o Edição, São Paulo. 2004, 155-157.
47. Cardoso, C. L., Silva, D. H. S., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.S. New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis turbinata* and their Antioxidant Activities. J. Braz. Chem. Soc. 2005, 16.
48. Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables Evaluation of Spectrophotometric Methods. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 607-616.
49. Surveswaran, S., Cai, Y. Z., Corke, H., Sun, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. Food Chemistry, 2007, 102, 938–953.
50. Jayaprakasha, G. K., Negi, P. S., Jena, B. S., Rao, J. M. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. J. Food Comp. and Analysis. 2007, 20, 330–336.
51. Termentzi, A., Kefalas, P., Kokkalou, E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. Food Chemistry. 2006, 98, 599–608.
52. Aaby, K., Hvattum, E., Skrede, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 4595-4603.
53. Ammar, Al-Temimi., Ruplal, Choudhary. Determination of Antioxidant Activity in Different Kinds of Plants In Vivo and In Vitro by Using Diverse Technical Methods. J Nutr Food. 2013, 3:1, 1-9.

## CAPITULO 4

### **Produção de Biosurfactante por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP1304 utilizando resíduos agroindustriais**

Manuscrito a ser submetido à revista World Journal Microbiol Biotechnology



### **Produção de Biossurfactante por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP1304 utilizando resíduos agroindustriais**

**Jaceline MNL · Grayce KBS · Thayse ALS · Kaoru Okada · Campos-Takaki GM**

#### **Resumo**

O biossurfactante produzido por linhagem de fungo filamentoso, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil, apresentou resultados significativos para a biomolécula. A produção do biossurfactante foi realizada através de um planejamento fatorial completo  $2^3$  com variáveis dependente milhoccina, manipueira e farelo de trigo. O biotensioativo foi produzido por *R. Microsporus* var. *microsporus* em 96 horas, o ensaio 11 (20% de milhoccina, 3% de farelo de trigo e 5% de manipueira) à pH 6,14 reduziu a tensão superficial da água de 72mN/m para 28,50mN/m e índice de emulsificação ( $E_{24}$ ) de 90%, utilizando óleo de motor queimado. A nova molécula mostrou composição química por 59% de lipídeos, 20,90% de carboidratos e 16% de proteínas. O índice de emulsificação e tensão de superfície do biotensioativo produzido eram estáveis a temperaturas que variam de 0-100 (° C), pH (2-12) e os valores de concentração de NaCl (2-12% w / v). O rendimento do biotensioativo foi estimado em 3,64g / L. Estes estudos indicam que os recursos renováveis, relativamente baratos e facilmente disponíveis podem ser utilizados para importantes processos biotecnológicos.

**Palavras-chaves:** bioemulsificante; fungo filamentoso; *Rhizopus*; resíduos de baixo custo

#### **Introdução**

Atualmente os biossurfactantes apresentam importante papel na área médica como atividade antimicrobianas incluindo antifúngica, antibacteriana, antimicoplasma e antiviral além da aplicação preventiva para retardar o crescimento de biofilmes patogênicos em cateteres e outras matérias médicas insercionais, levando a diminuição de infecções hospitalares sem a necessidade de fármacos ou agentes químicos sintéticos (Singh and Cameotra, 2004). Eles têm sido usados para transfecção gênica (Nakanishi, 2003), adjuvantes para antígenos (Mittenbuhler, 1997), uso como probiótico (Bengmark, 1998), inibidores da formação da rede de fibrina e ativadores da via de fibrinólise (Kikuchi and Hasumi, 2002). Um dos mais benéficos usos dos biossurfactantes é como antiadesivos (Singh e Cameotra, 2004).

Os biossurfactantes são biomoléculas tensoativas produzidos por células vivas, principalmente por microorganismos. Eles são compostos bioquímicos anfifílicos que contêm tanto porções hidrófobas e hidrófilas que permitem a partição na interface entre regiões polares e não polares. Eles são produzidos por uma variedade de microorganismos, principalmente por bactérias, fungos e leveduras (Franzetti et al., 2011).

O fungo *R. microsporus* pertence à ordem Mucorales, classe Zygomycetes, que vivem no solo, ar e matéria em decomposição, crescem bem em substratos como frutas, cereais e pães. Apresenta um elevado potencial biotecnológico na produção de insumos alto valor agregado (Ribes, 2000).

Os resíduos agroindustriais são os mais pesquisados como suplementos para constituições de meios de cultura para síntese de produtos desejáveis. São geralmente mais baratos, abundantes e apresentam composição rica em material orgânico (Santos et al., 2005)

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho, que apresenta grande quantidade de nitrogênio, aminoácidos entre outros nutrientes, utilizada principalmente como suplemento alimentar na fabricação de ração de ruminantes, como também, nutrientes para microrganismos em fermentação industrial, visando a produção de subprodutos de importância comercial. (Amartey et al, 2000., Fontes et al., 2008., Domingos, 2009).

A manipueira é oriundo do processo da produção de farinha, de mandioca prensada, sendo esse efluente descartado sem nenhum tratamento, causando a poluição dos cursos de água (rios e riachos) com grandes prejuízos à natureza. A toxicidade desse efluente está relacionada a dois componentes com forte potencial poluidor, destacando-se a matéria orgânica biodegradável e o ácido cianídrico (Mesel, 2007). Esse subproduto é constituído por glicose e outros açúcares, proteínas, células descamadas, laminarina e derivados cianogênicos (ácido cianídrico, cianetos e aldeídos), além de substâncias diversas e diferentes sais minerais, muitos dos quais podem ser fontes de macro e micronutrientes para plantas e micro-organismos (Ponte, 2000).

Quanto ao farelo de trigo (Zacchi et al, 2005) confirmam citação (Lima, 2003) ao comentarem que o farelo é produzido em todo mundo em grandes volumes como subproduto da indústria de moagem do trigo e que este material não deve ser desprezado pois concentra ainda, fonte considerável de açúcares.

Neste trabalho foi avaliada a influência da utilização de rejeitos agroindustriais manipueira (efluente), milhocina (resíduo industrial do beneficiamento do milho) e farelo de trigo na produção de biossurfactante por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304.

## **Material e Métodos**

### **Micro-organismo**

Os estudos foram realizados com a amostra do *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 isolado do solo da caatinga, Brasil-PE, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, (UNICAP), registrada no World Federation Culture for Collection-WFCC, e mantida em meio BDA (Batata Dextrose

Agar), a temperatura de 5°C.

### **Substratos**

Os substratos utilizados foram manipueira da casa de farinha de Pombos/PE. A milhocina, resíduo da indústria de beneficiamento do milho, cedida pela indústria Corn. O farelo de trigo obtido em casa comercial no Recife, Pernambuco- Brasil.

### **Condições de cultivo e Produção de Biossurfactante**

O pré-inóculo foi preparado a partir do *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 crescido em meio YMA (Yeast Malt Ágar) durante 5 dias, onde os esporos foram coletados com o uso de swabs, transferidos para água destilada estéril e determinado o número de esporos em câmara de Neubauer. Alíquotas de 5mL de suspensão de esporos contendo  $10^7$  esporos/mL foram transferidas para o meio de produção em frascos de Erlenmeyers de 250mL com capacidade 100mL dos meios de acordo com o planejamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1 e 2), mantidos sob agitação orbital de 150rpm, a temperatura de 28°C, por um período de 96h.

### **Cinética de crescimento e produção de biossurfactante.**

O crescimento de estirpes de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 foi acompanhado por biomassa e os resultados foram expressos em (g/L). Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo definidos e submetidos à análise para determinação de biomassa, pH e tensão superficial. Todas as experiências foram realizadas em triplicata .

### **Determinação do pH**

O pH das amostras coletadas foram determinadas por potenciometria a partir do meio livre de células.

### **Determinação da tensão superficial**

Para a determinação da tensão superficial o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante após 96 horas de cultivo, foi medido em um tensiômetro digital tensitech (modelo JZYW\_ 200 A) utilizando-se o anel de DU NUOY, através de sua imersão no líquido, registrando-se a força requerida para retirá-lo através da interface ar-líquido.

### **Índice de emulsificação**

Foi adicionado 1,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo queimado de motor e demais óleos como soja e milho, em tubos graduados, e a mistura foi agitada em vórtex por um minuto. Após 24 horas de repouso, as emulsões foram formadas e calculou-se a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicado por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem.

### **Determinação da estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação**



A estabilidade do biossurfactante foi avaliada a partir da condição selecionada do planejamento fatorial composto, de acordo com a determinação da tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células com diferentes pHs (2,4,6,8,10 e 12), diferentes concentrações de NaCl (2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e diferentes temperaturas (0°C, 5°C, 70°C, 100°C), por 60 minutos.

### Isolamento do biossurfactante

Após 96 horas de cultivo da melhor condição selecionada do planejamento fatorial completo  $2^3$ , devido à menor tensão superficial, o líquido metabólico foi centrifugado 4000 rpm durante 20 minutos para retirada das células e submetido ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com uma solução de HCl 6,0M e precipitado com 2 volumes de Etanol absoluto (2:1 v/v), mantido em repouso por 24 horas a 4°C. Após esse período foi realizada a 4000rpm centrifugação por 30min. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e o biossurfactante extraído foi submetido à diálise com água deionizada por 24h, com trocas a cada 4h para a remoção do sal aderido a amostra. O precipitado foi recolhido e liofilizado, sendo o rendimento do produto isolado, calculado em g. L<sup>-1</sup>.

### Concentração Micelar Crítica (CMC)

O biossurfactante isolado foi solubilizado em água em diferentes concentrações (0.001, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 1, 1.5, 2 e 2.5%) e depois suas tensões superficiais foram medidas. A CMC foi alcançada depois de observar um valor constante da tensão superficial medida em tensiometro automático.

### Caracterização físico-química (proteínas, carboidratos e lipídeos)

As proteínas foram quantificadas pelo kit Labtest (Brasil) utilizando albumina como padrão, os carboidratos pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) utilizando glicose como padrão e os lipídios foram quantificados após extração utilizando clorofórmio e metanol seguindo metodologia de Manocha *et al.*, (1980).

**Tabela 1.** Matriz do Planejamento Fatorial Completo  $2^3$

| Fator               | -1 | 0  | +1 |
|---------------------|----|----|----|
| Milhocina (%)       | 15 | 20 | 25 |
| Farelo de Trigo (%) | 2  | 3  | 4  |
| Manipueira (%)      | 0  | 5  | 10 |

**Tabela 2.** Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup>, tendo como variáveis Milhocina (%), Farelo de Trigo (%) e Manipueira (%) variável resposta a produção de Biossurfactante e pH por *Rhizopus microsporus* isolados do solo da Caatinga/PE.

| Ensaio | Milhocina (% v/v) | Farelo de trigo (% v/v) | Manipueira (% v/v) |
|--------|-------------------|-------------------------|--------------------|
| 1      | 15                | 2                       | 0                  |
| 2      | 25                | 2                       | 0                  |
| 3      | 15                | 4                       | 0                  |
| 4      | 25                | 4                       | 0                  |
| 5      | 15                | 2                       | 10                 |
| 6      | 25                | 2                       | 10                 |
| 7      | 15                | 4                       | 10                 |
| 8      | 25                | 4                       | 10                 |
| 9      | 20                | 3                       | 5                  |
| 10     | 20                | 3                       | 5                  |
| 11     | 20                | 3                       | 5                  |
| 12     | 20                | 3                       | 5                  |

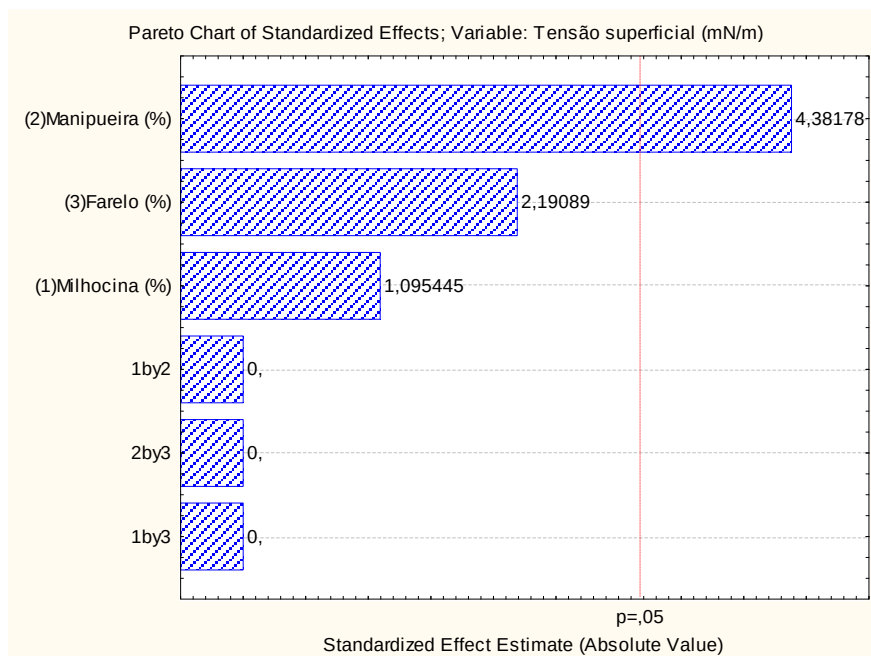
\* Fixo Temperatura

## Resultados

### Produção de Biossurfactante por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas. Neste trabalho foram utilizados milhocina e o farelo de trigo como fonte de carbono e manipueira como fonte de nitrogênio para a produção de biossurfactante por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 crescido por 96 horas, utilizando um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>, com variáveis dependentes e independentes. Os resultados demonstraram que o fungo tem a capacidade de reduzir a tensão de superfície a 28,50mN/m em um pH de 6,30, comparando com a da água (70mN/m). A melhor condição foi confirmada utilizando 20% de milhocina, 5% de manipueira e 3% de farelo de trigo descritos na tabela 3. Todas as análises foram realizadas a partir desta condição selecionada para investigar a produção de biossurfactante. De acordo com o Diagrama de Pareto, ilustrados nas Figuras 1, para um nível de confiança de 95%, representados pelo valor de p, foi observado que o aumento das concentrações de manipueira, de farelo de arroz e de milhocina exerceram efeitos

positivos, estatisticamente significativos, sobre a diminuição da tensão superficial e as interações da milhocina com a manipueira, da manipueira com o farelo de trigo e a milhocina com o farelo de trigo influenciaram na redução da tensão superficial, mas não foram estatisticamente significativas.



**Figura 1:** diagrama de Pareto para a redução da tensão superficial (mN / m), as estimativas de efeitos que foram estatisticamente significativas ( $p = 0,5$ ) são indicados pela linha tracejada.

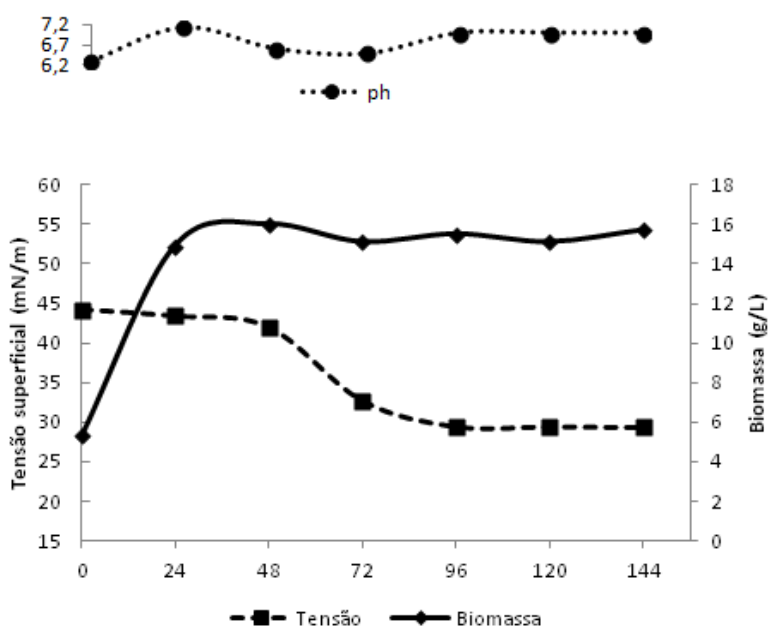
**Tabela 3:** Os resultados de produção de biossurfactante por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304, utilizando planejamento fatorial completo  $2^3$  com repetições do ponto central, às 96 horas de crescimento.

| Ensaio | pH   | Tensão Superficial<br>mN/m |
|--------|------|----------------------------|
| 1      | 6,66 | 50,20                      |
| 2      | 6,05 | 50,70                      |
| 3      | 6,30 | 45,10                      |
| 4      | 6,00 | 51,20                      |
| 5      | 7,00 | 43,10                      |
| 6      | 6,10 | 42,30                      |
| 7      | 6,63 | 35,20                      |

|    |      |       |
|----|------|-------|
| 8  | 6,06 | 43,40 |
| 9  | 6,11 | 28,90 |
| 10 | 6,30 | 29,10 |
| 11 | 6,14 | 28,50 |
| 12 | 6,30 | 29,70 |

### Cinética de Crescimento, pH e produção de Biossurfactante por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304

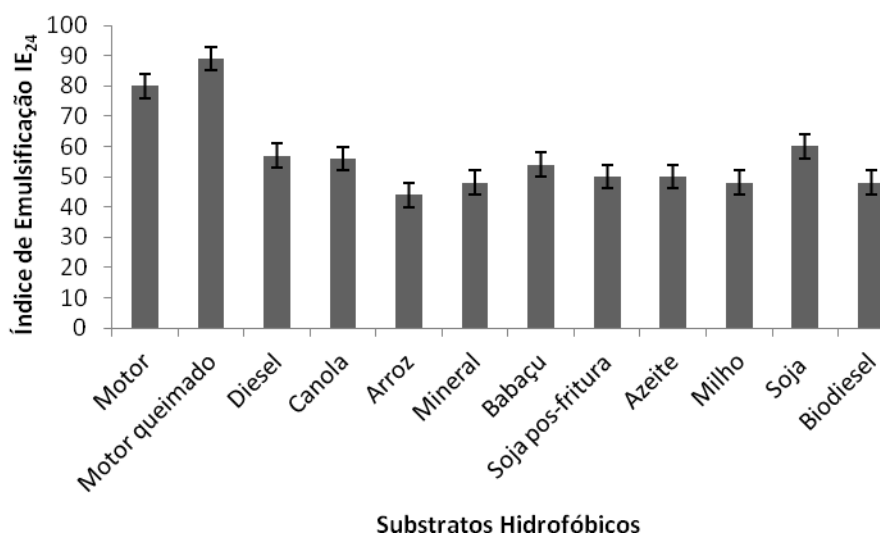
O estudo demonstrou um perfil de crescimento gradual nas primeiras 96 horas, com pequenas modificações, até ao fim do cultivo Figura 2. O crescimento nas primeiras 96 horas de cultivo mostrou atingindo um valor máximo de 18,30 g/L, após a fase exponencial de crescimento. Ao decorrer do tempo de crescimento microbiano (120 a 144 horas) foi observado a fase estacionária. A tensão superficial reduziu até às 120 horas de crescimento, com valores inferiores a 44mN/m, e contínua a reduzir para 29,40mN/m. O pH é um fator que também determina a produção de biomoléculas, a escala variou entre 5,5 a 7,00. As fontes de carbono e nitrogênio influenciaram o tipo e as propriedades do biossurfactante e a produção de biomassa.



**Figura 2:** Cinética do crescimento, tensão superficial e o pH utilizando resíduos agroindustriais (20% de milhocina, 5% de manipueira e 3% de farelo de trigo)

### Características de emulsificação do biossurfactante

Bioemulsificantes são tensoativos que têm a capacidade de formar e estabilizar emulsões. Neste contexto, foi determinado o índice de emulsificação, por meio de um teste quantitativo para avaliar a ocorrência de formação e estabilização de emulsões. Após 24 horas, observou-se a estabilização de emulsões em condições selecionadas, com valores de cerca de 90%, usando o óleo de motor queimado como o substrato hidrofóbico. Estes resultados demonstram que o biotensoativo produzido tem significativas propriedades emulsionantes. Vários autores têm considerado quantidades significativas acima de 50% emulsificação. Além de reduzir a superfície e as tensões interfaciais, biossurfactantes geralmente exibem uma capacidade emulsificante. A Figura 3 mostra o comportamento médio de atividade emulsionante de 96 horas de cultivo. Os melhores resultados relativos à atividade de emulsificação, foram obtidos utilizando óleo de motor queimado.

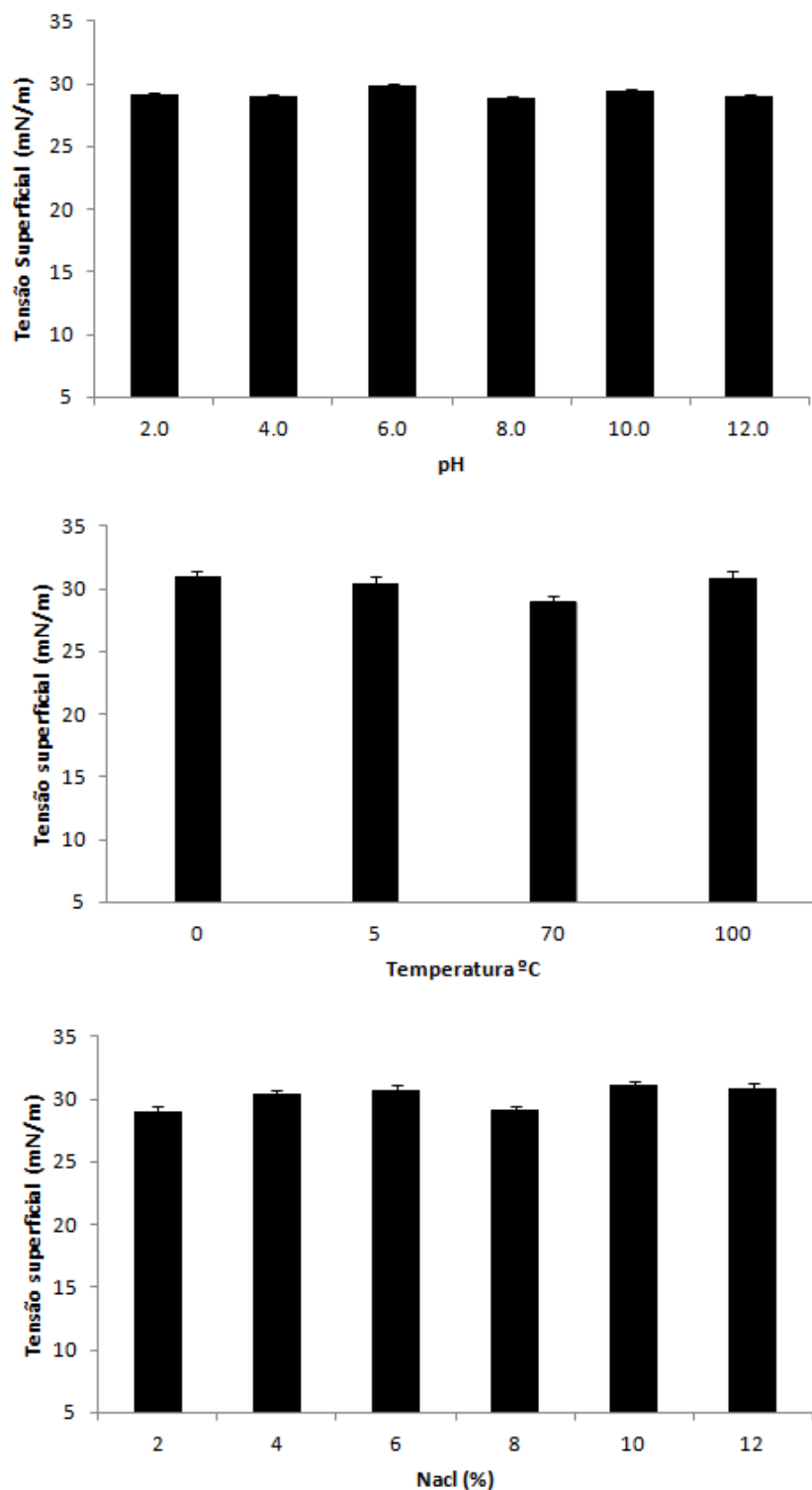


**Figura 3:** Índice de emulsificação (E24) em diferentes substratos hidrofóbicos.

### Estabilidade do Biossurfactante

O biossurfactante selecionado foi testado em diferentes concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10%) apresentando-se estável nas elevadas concentrações, sugerindo a sua possível aplicação em ambiente com elevada concentração de NaCl mantendo-o eficaz a redução da tensão superficial. A estabilidade térmica (0,5,70,100°C) do líquido metabólico livre de células mostrou ser termicamente estável. Com o aumento gradual do pH foi observado uma estabilidade notável no valor da tensão superficial até o pH 12. O caldo isento de células de *R. microsporus* foi ajustado a vários pH na razão de 2-12, a temperatura ambiente, após foram medidas a atividade superficial. As tensões superficiais

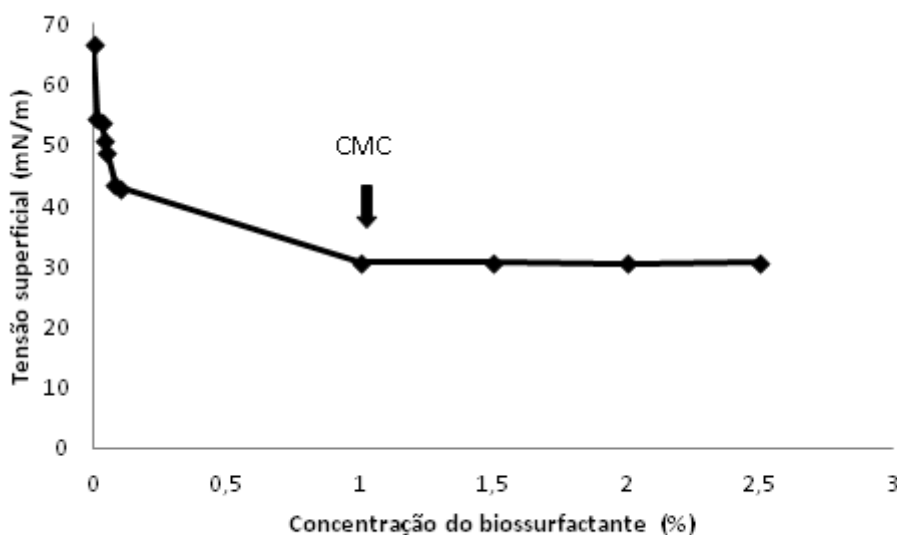
foram mantidas praticamente uniforme em todos os pHs, indicando que a variação do pH não teve efeito significativo sobre a tensão superficial ou índice de emulsificação (Figura 4).



**Figura 4:** Estabilidade do biossurfactante produzido por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 usando (20% de milhocina, 5% de manipueira e 3% de farelo de trigo).

### Rendimento, Composição química e a CMC do Biossurfactante

O rendimento do biossurfactante de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 após a extração com etanol a 70% Foi de 3,64g/L. Estes resultados mostraram que fungo da ordem Mucorales *R. Microsporus* é excelente produtor tensoativo/bioemulsificante. Os resultados da caracterização físico-química do biossurfactante produzido por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 possui 59% de lipídeos, 20,90% de carboidratos e 16% de proteínas. Em nossos estudos, o biossurfactante produzido por *R. microsporus* formou micelas em solução aquosa e alcançou a CMC a uma concentração de 1,0%. A confirmação do alcance da CMC ocorreu após a adição de concentrações elevadas de biossurfactante que não alterou o valor da tensão superficial em solução aquosa permanecendo o valor da tensão superficial semelhante ao do meio de produção (29,40 mN/m) (Figura 5).



**Figura 5** – Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 avaliado pela medição da tensão superficial

### Discussões

Conforme a literatura existe poucos fungos que são capazes de reduzir a tensão superficial em relação às bactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, que possuem resultados mais significativos no que diz respeito à redução da tensão. No entanto, as leveduras apresentaram melhores valores na redução da tensão superficial conforme Bhardwaj et al (2013). A melhor produção de biotensoativo por *Fusarium sp* foi BS-8 fator que ajudou na redução da tensão superficial da água 72-32mN/m sob a condição de pH 7,0, e uma temperatura de 30° C (Silva, 2002). Estirpes de micro-organismos com tensão superficial 35mN/m apresentam ser bons produtores de

biossurfactante, quando os valores são menores que 35mN/m os micro-organismos podem ser considerados um produtor eficiente (Dantigny et al., 2005). Os biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial e tem a capacidade de misturar soluções não miscíveis. Essas propriedades oferecem características importante aos biossurfactantes, como emulsificação, detergência e uma menor viscosidade (Banat et al., 2000).

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido (Banat, 1995).

A produção de biossurfactante 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 (Desai e Banat, 1997).

A produção de biossurfactantes por *resting cells* é uma forma de produção em que não há multiplicação celular. Contudo, as células continuam a utilizar a fonte de carbono para produção do biossurfactante (Desai e Banat, 1997). Na literatura há alguns exemplos de produção de biossurfactantes por *resting cells* de leveduras, como a produção de manosileritritol por *Candida Antarctica* (Kitamoto et al., 1992) e produção de soforolipídeos por *Torulopsis bombicola* (Göbber et al., 1984; Casas e Ochoa, 1999) e *Candida apícola* (Hommel e Huse, 1993), dentre outros.

A maioria dos biossurfactantes é geralmente produzida quando as culturas alcançam a fase estacionária de crescimento (Ron e Rosenberg, 2001). Porém algumas espécies podem apresentar pequena produção durante a fase exponencial de crescimento. Apesar da produção de bioemulsificante por *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 ocorrer durante a fase exponencial de crescimento, a atividade de emulsificação mais significativa ocorreu durante a fase estacionária (Fontes et al., 2008).

O pH do meio é um fator extremamente importante que desempenha um papel importante na produção de biossurfactante. Zinjarde e Pant (2002) relataram o efeito do pH inicial na produção de um biotensioativo por *Y. lipolytica*. A produção máxima de biotensioativo obtida a pH 8.0, que é o pH natural da água do mar. O outro parâmetro importante é a acidez da condição de cultura na produção de biossurfactante por *C. antarctica* e *C. Apicola* (Bednarski et al., 2004).

Bioemulsificantes são tensoativos que têm a capacidade para formar e estabilizar emulsões (Kiran et La., 2009). 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. Os resultados mostraram que sulfato de amônio e cloreto de amônio foram as fontes de nitrogênio que propiciaram maior atividade de emulsificação, enquanto que esta atividade foi reduzida à metade quando se utilizou nitrato de amônio e uréia. Não foi detectada atividade de emulsificação quando o nitrato de sódio foi utilizado ((Kitamoto et al., 1992).

Durante as duas últimas décadas os biossurfactantes têm estado sob investigação contínua, esperando um com potencial para substituir os surfactantes sintéticos. Várias aplicações industriais e ambientais relacionadas, principalmente a propriedades como a detergência, emulsificação, dispersão e a solubilização de compostos hidrofóbicos (Banat et al., 2010). Devido as suas propriedades, como biodegradabilidade, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, alta seletividade e atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade terem conquistado uma maior importância em aplicações industriais e ambientais, tais como biorremediação, lavagem do solo, recuperação avançada de petróleo e outros processamentos de óleo relacionados às indústrias em geral (Banat et al., 2000; Ron e Rosenberg, 2002; Pacwa-Plociniczak et al., 2011; Makkar et al., 2011; Mukherjee et al., 2006).

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é uma propriedade que avalia a eficiência da atividade surfactante (SAHARAN *et al.*, 2011, MAKKAR e CAMEOTRA, 2011). Vários microorganismos possuem capacidade de produzir moléculas com atividade interfacial. Nas últimas décadas tem-se aumentado o interesse em identificar e isolar novos microorganismos produtores de moléculas tensoativas que apresentem boas características surfactantes, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, dentre outras (Rosenberg e Ron, 1999).

A utilização industrial dos biossurfactantes tem sido dificultada devido aos altos custos de produção associados ao uso de substratos dispendiosos. Por outro lado, estes custos podem ser significativamente reduzidos pelo uso de fontes alternativas de nutrientes, com baixo custo, bem como através da obtenção de altos rendimentos em produtos (Thanomsub et al., 2004). Uma possível solução seria o reaproveitamento de subprodutos industriais como, por exemplo, aqueles provenientes da agroindústria.

Essa estratégia diminui os custos da produção do biossurfactante e, conseqüentemente, reduz a poluição causada por esses rejeitos quando lançados no meio ambiente (Maneerat, 2005). A maioria das indústrias alimentícias utiliza gorduras e óleos, gerando grandes quantidades de resíduos graxos. Com o acúmulo desses resíduos, tem aumentado o interesse na utilização desses materiais como fonte de nutrientes para transformação microbiana (Makkar e Cameotra, 2002).

## Conclusão

O novo biossurfactante produzido pelo fungo *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP 1304, além de ser um bom surfactante, tem propriedades atraentes como um tensoativo e composto emulsificante. O biossurfactante tem várias propriedades e não é afetado pela temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio. A composição bioquímica apresenta um novo biotensoativo, constituído por lipídeos (59 %) , carboidratos (20,90 %) e proteínas (16 %). Esta abordagem do biotensoativo produzido por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 representam, uma ferramenta simples e de baixo custo. Considerando as várias propriedades que poderiam ser atraente e potente composto ativo de superfície e emulsificante útil em muitos campos da indústria.

## Agradecimentos

A pesquisa foi apoiada pela CAPES (GKBS de bolsas) e CNPq (308245 / 2010-5 GMCT), e FACEPE (APQ NO.0086.2.12 / 10) a quem os autores agradecem como eles são para a Universidade Católica de Pernambuco para o utilização de laboratórios.

## Referências

- Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Banat, I.M. (Bio)surfactant and bioremediation, successes and failures. In *Trends in Bioremediation and Phytoremediation*; Płaza, G., Ed.; Research Signpost: Kerala, India, 2011; pp. 145–156.
- BENGMARK, S. Immunonutrition: role of biosurfactants, fiber and probiótico bacteria. *Nutrition*, v. 14, p. 585-594, 1998.
- Mittenbuhler, K., Loleit, M., Baier, W., Fischer, B., Seldemeier, E., Jung, G., Winkelmann, G., Jacobl, C., Weckesser, J., Erhard, M. H., Hofmann, A., Bessler, W., Hofmann, P. Drug specific antibodies: T-cell epitope- lipopeptide conjugates are potent adjuvants for small antigens in vivo and in vitro. *International Journal Immunopharmacology*, v.19, p. 277-287, 1997.
- Nakanishi, M. New strategy in gene transfectio by cationic transfection lipids with cationic cholesterol. *Current Medical Chemistry*, v. 10, p. 1289-1296, 2003.
- Kikuchi, T., Hasumi, K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochemistry and Biophysica Acta*, v. 1596, p. 234-245, 2002.
- Singh, P., Cameotra, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, v. 22, p. 142-146, 2004.
- Ribes, J. A., Vonover-Sams, C. L., Baker, D. J. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000,13, 236–301.

Santos, S. F. M., Nobrega, J. E., Pinto, G. A. S., Macedo, G. R., SILVA, F. L. H. Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju para obtenção de pectinase por fermentação semi-sólida. In: **Simpósio Nacional de Bioprocessos**. 2005, 15.

AMARTEY, S. A., LEUNG, P. C. BAGHAEI-YAZDI, N., LEAK, D. J., HARTLEY, B. S. Process. Biochemistry. 2000, 34, 289-294.

Fontes, G. C., Amaral, P. F. F., Coelho, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**. 2008, 31, 8, 2091– 2099.

Domingos, M. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação. **Dissertação de Mestrado** - Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena. 2009, 23-25.

Mesel, M., Pimentel, A. Manipueira se aproveita? Sociedade Nordestina Ecologia. 2007, 3.

PONTE, J. J. Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. 2000, 4, 5, 81 – 95.

ZACCHI, G., PALMOROLA-ADRADOS, B., CHOTEBORSKA, P., GALBE, M. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology**: **96**, 843- 850, 2005.

LIMA, G. J. M. M. Trigo na Alimentação Animal. Endereço eletrônico: <http://www.cnpisa.embrapa.br/cgi-bin/notiprn.pl?/home/httpd1/docs/artigos/2003/artigo-2003-n019.html>. Acesso em 15/10/2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** v.29, p.350–356, 1956.

MANOCHA, M.S.; SAN- BLAS. G.; CENTENO, S. lipid composition of paracciodioids brasilienses: Possible correlation witer virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v.177, p.147-154, 1980

26. Dantigny P, Guilmart A, Bensoussan M (2005) Basis of predictive mycology. *Inter. J. Food Microbiol.* 100, 187-196.

Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, 58, 428. Maneerat, S.; *J. Sci. Technol.* **2005**, 27, 675.

Thanomsub, B.; Watcharachaipong, T.; Chotelersak, K.; Arunrattiyakorn, P.; Nitoda, T.; Kanzaki, H.; *J. Appl. Microbiol.* **2004**, 96, 588.

Rosenberg, E.; Ron, E. Z.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 52, 154.

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

SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal** 2011; GEBJ-29

Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* **2011**,1,5-24.

Mukherjee, S.; Das, P.; Sen, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* **2006**, 24, 509–515.

Ron, E.Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* **2002**, 13, 249–52.

Pacwa-Plociniczak, M; Plaza, G. A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S. S. Review Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, 12, 633-654.

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. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2010**, 87, 427–444.

Bednarski, W., M. Adamczak and J. Tomasik, 2004. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. *Bioresource Technol.*, 95: 15-18.

Kiran GS, Hema TA, Gandhimathi R, Selvin J, Thomas TA (2009) Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 73, 250-256.

Ron, E.; Rosenberg, E.; *Environ. Microbiol.* **2001**, 3, 229.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., COELHO, M. A. Z., Produção de biossurfactante por levedura. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 8, 2091-2099, 2008

Bhardwaj, G.; Cameotra, S.S.; Chopra, H.K. Biosurfactants from Fungi: A Review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **2013**, 4, 160-166.

Silva WO, Tapia, YIP (2002) Produção de biossurfactantes, Desenvolvimento de bioprocessos, DEB, EQ, UFRJ.

Banat I, Makkar R, Cameotra S (2000) Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 5: 495-508.

Dantigny P, Guilmart A, Bensoussan M (2005) Basis of predictive mycology. *Inter. J. Food Microbiol.* 100, 187-196.

Banat, I. M.; *Bioresour. Technol.* **1995**, 51, 1.

Desai, J. D.; Banat, I. N.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, 61, 47.

Kitamoto, D.; Fuzishiro, T.; Yanagishita, H.; Nakane, T.; Nakahara, T.; *Biotechnol. Lett.* **1992**, *14*, 305.

Casas, J.; Ochoa, F. G.; *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 488.

Göbbert, U.; Lang, S.; Wagner, F.; *Biotechnol. Lett.* 1984, *6*, 225.

Hommel, R. K.; Huse, K.; *Biotechnol. Lett.* **1993**, *15*, 853.

---

## CONCLUSÕES GERAIS

- O *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 isolado do solo da Caatinga, Pernambuco, Brasil, apresentou potencial biotecnológico para produzir simultaneamente lipídios e biossurfactante em meio contendo resíduos agro-industriais (milhocina, manipueira e farelo de trigo);
- A estirpe de *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 é considerado um micro-organismo oleaginoso por produzir mais de 20% de lipídios totais;
- Os lipídios totais produzido por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 apresentou excelente atividade antioxidante;
- A linhagem do *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 produziu ácidos graxos de grande relevância para a área médica e farmacêutica;
- O biossurfactante produzido por *R. microsporus* var. *microsporus* UCP 1304 possui baixa tensão superficial, interfacial e CMC;