



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
MATERIAIS**



**DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus niger* NA PRESENÇA DE GLICERINA EM
ATMOSFERA OXIDANTE**

**ORIENTANDA: JOANA MEDEIROS OLIVEIRA
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RIBEIRO DOS SANTOS JÚNIOR**

**TERESINA – PIAUÍ
2017**

JOANA MEDEIROS OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus niger* NA PRESENÇA DE GLICERINA EM
ATMOSFERA OXIDANTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Piauí– UFPI, como requisito complementar à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ RIBEIRO DOS SANTOS JÚNIOR

TERESINA – PIAUÍ

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí Biblioteca
Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

O48d **Oliveira, Joana Medeiros.**

Desenvolvimento de *Aspergillus niger* na presença de glicerina em atmosfera oxidante / Joana Medeiros Oliveira. – 2017.

100 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

“Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior”.

1. Ciência dos Materiais. 2. *Aspergillus niger*. 3. Glicerina. I. Título.

CDD 620.112

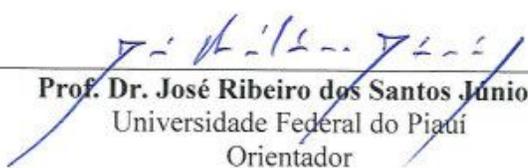
JOANA MEDEIROS OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE ASPERGILLUS NIGER NA PRESENÇA DE
GLICERINA EM ATMOSFERA OXIDANTE**

Dissertação submetida à coordenação do curso de Pós-graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Materiais.

Aprovada em: 29/09/2017

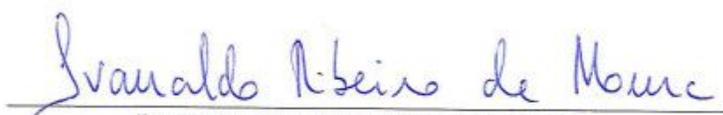
Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior
Universidade Federal do Piauí
Orientador



Prof. Dr. José Milton Elias de Matos
Universidade Federal do Piauí
Examinador Interno



Prof. Dr. Ivanaldo Ribeiro de Moura
Instituto Federal do Piauí
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, a Deus todo poderoso, Criador do Céu e da Terra, por sempre comigo está. À minha família e aos meus amigos, pelo amor, carinho e incentivo, imprescindíveis a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço a DEUS, pelo dom da vida, por me dar inteligência e sabedoria para progredir em minha carreira acadêmica;
- ✓ Aos meus familiares, especialmente à minha mãe Maria Júlia , ao meu pai Félix Rocha (in memória) e aos meus irmãos e as minhas irmãs: Fátima, Charles, Gil, Walfranklins, Zuleide, Humildes, Dionelda, Rosilândia e aos meus sobrinhos e sobrinhas (Ruan Félix, Taciana, Tamires, Lorena, Letícia, Tarsila, Maria Eduarda, Ana Júlia) ,que deram apoio e incentivo durante esta jornada;
- ✓ Ao meu orientador Prof.Dr.José Ribeiro dos Santos Júnior pela amizade, Orientação e apoio em todos os momentos;
- ✓ À Prof. Dr^a.Girlene Soares de Figueirêdo por todo apoio fornecido para o desenvolvimento desse trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. Francisco Cardoso Figueiredo pelo apoio e incentivo durante esta jornada;
- ✓ Ao Prof. Dr. José Milton Elias de Matos, pelas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.
- ✓ Ao Prof.Dr. Ivaldo Ribeiro de Moura, por ter aceitado ser membro externo da banca do mestrado e pelo apoio.
- ✓ À Prof. Dra^a. Maria Rita de Moraes Chaves Santos , pelo apoio e incentivo.
- ✓ Agradeço aos colegas da turma do Mestrado em Engenharia de Materiais do UFPI, e os alunos do laboratório de Química da UFPI pelo incentivo e apoio;
- ✓ Aos amigos e amigas: Bruno, Maria Inês, Natália, Edimília, Lorena, Mirna, Neide, Janete, Avilnete,Carla Adriana pelo incentivo e apoio;
- ✓ Aos funcionários e técnicos do LIMAV: Especialmente ao Kelson, Elton Marks, Maria das Graças da biblioteca da UFPI, pela sua colaboração e amizade.
- ✓ Aos professores da UFPI do Programa de pós- graduação em Ciência dos Materiais.

A todos o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4

CAPITULO 1 REVISÃO DA LITERATURA: APLICAÇÕES DE *Aspergillus niger* EM CONVERSÕES MICROBIOLÓGICAS EM ATMOSFERA OXIDANTE

RESUMO	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 REVISÃO DA LITERATURA.....	9
1.1.1 Microrganismos e Bioprocessos	9
1.1.2 <i>Aspergillus niger</i> e Processos Biotecnológicos	17
1.1.3 A Glicerina	20
1.1.4 O Destino da Glicerina gerada a partir do Biodiesel.	27
2 CONCLUSÃO	30
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

CAPITULO 2: DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus niger* NA PRESENÇA DE GLICERINA EM ATMOSFERA OXIDANTE

RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. Parte Experimental.	46
2.1 Materiais	46
2.2 Procedimentos Experimental	47
2.2.1 <i>Isolamento da espécie microbiana utilizada nesta pesquisa</i>	47
2.2.2 <i>Identificação taxonômica do microrganismo</i>	47
2.2.3 <i>Caracterização do Microrganismo</i>	48
2.2.4 <i>Caracterização dos produtos resultantes do crescimento de <i>Aspergillus niger</i> em substrato contendo glicerina</i>	51
2.2.4.1 <i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	51
2.2.4.2 <i>Análise termogravimétrica (TG)</i>	51
2.2.4.3 <i>Cromatografia gasosa (CG)</i>	51
2.2.4.4 <i>Cromatografia em camada delgada (CCD) da amostra de glicerina/fungo/peptona/ água</i>	52
2.2.4.5 <i>Teste de Viscosidade da amostra de glicerina/ fungo/ peptona/água</i>	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 <i>Isolamentos do microrganismo</i>	53
3.2 <i>Identificação taxonômica do microrganismo</i>	53
3.3 <i>Caracterização do microrganismo</i>	54

3.3.1 Desenvolvimento de <i>A. niger</i> em solução de água e glicerina	54
3.3.2 Desenvolvimento de <i>A. niger</i> em meios de glicerina enriquecidos	56
3.3.3 Influência da temperatura no desenvolvimento de <i>A. niger</i> em meios contendo glicerina	59
3.3.4 Influência do pH no desenvolvimento de <i>A. niger</i> em meios contendo glicerina ...	62
3.3.5 Influência da agitação no desenvolvimento de <i>A. niger</i> em meios contendo Glicerina.....	64
3.4 Caracterização dos produtos resultantes do crescimento de <i>Aspergillus niger</i> em substrato contendo glicerina	65
3.4.1 Espectroscopias de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	65
3.4.2 Análises Termogravimétricas (TG)	67
3.4.3 Cromatografia Gasosa (CG).....	69
3.4.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)	72
3.4.5 Teste de Viscosidade	76
4. CONCLUSÃO	78
5 . REFERÊNCIAS	79
6 . CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7. APENDICE	84

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Aspectos da Microscopia da espécie <i>Aspergillus niger</i>	19
Figura 2 –Fórmula estrutural da glicerina	21
Figura 3 - Glicerina gerada na produção de biodiesel (b100), segundo grandes regiões (200-2015)	23
Figura 4 – Principais Aplicações da Glicerina na indústria.....	23

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Aspectos da macroscopia (A) e microscopia (B) de <i>A. niger</i>	54
Figura 2 - Massa micelial produzida por <i>A.niger</i> em diferentes concentrações de glicerina	55
Figura 3 - Índice médio da velocidade de crescimento micelial de <i>A. niger</i> em meios de glicerina enriquecidos	58
Figura 4 –Produção de conídios em <i>A.niger</i> em meios enriquecidos	58
Figura 5 – Crescimento micelial de <i>A.niger</i> em diferentes temperaturas	61
Figura 6 – Produção conidial de <i>A.niger</i> em diferentes temperatura	62
Figura 7 - Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de <i>A.niger</i> em diferentes pHs.....	63
Figura 8 - Produção conidial de <i>A. niger</i> em diferentes pHs	64
Figura 9 – Peso seco em <i>A. niger</i> sob as condições de agitação e sem agitação.....	65

Figura 10 – Espectros na região de infravermelho com as amostras da glicerina comercial, fungo/glicerina/água, fungo/peptona/água e fungo/glicerina/peptona/água .	66
Figura 11 -Análise térmica do material (TG)da amostra contendo fungo/glicerina/peptona/água.....	68
Figura 12 -Cromatograma em Head space (parte volátil) da glicerina utilizada no trabalho como fonte de carbono para o fungo <i>A. niger</i>	69
Figura13 – Cromatograma da amostra de fungo/peptona/ água	70
Figura 14 – Cromatograma da amostra fungo/peptona//glicerina/água, onde está apresentando a região da voláteis e a presença de glicerina	71
Figura 15 - Cromatografia em camada delgada (CCD) da amostra de glicerina/fungo/água (ponto 1) e da amostra fungo/peptona/água (ponto2).Introdução da amostra via head space (Figura A) e ponto 3 Glicerina/fungo/peptona/água e ponto 4 glicerina comercial). Introdução da amostra via head space (Figura B).....	73
Figura 16 - Cromatografia em camada delgada (CCD) amostra de fungo/glicerina/água (ponto1),no Ponto 2 amostra fungo/peptona/água (congeladas) Figura (A). No ponto 3- Glicerina/peptona/fungo/água (congelada) no ponto 4- Glicerina comercial (congelada) Na figura(B)	75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Mercado da glicerina, volumes e usos industriais26

CAPÍTULO 2

Tabela 1- Valores de Viscosidadedas amostras: glicerina,fungo/glicerina/água, Fungo/peptona/glicerina/água e Fungo/peptona/água76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

TG - Análise termogravimétrica

CG - EM - Cromatografia gasosa

TV - Teste de viscosidade

CCD - cromatografia em camada delgada

RPM - Rotação por minutos

LCC - Líquido da castanha de caju

BDA - Batata, dextrose e ágar

BOD - Demanda bioquímica de oxigênio

min.- minutos

ml - mililitro

LPM - Laboratório de pesquisa de pesquisa em Microbiologia

IVCM - Índice de velocidade de crescimento micelial

°C - graus Celsius

g- grama

UFPI - Universidade Federal do Piauí

PPGCM- Programa de pós-graduação em Ciência dos Materiais

LIMAV- Laboratório Interdisciplinar de Materiais

P – Peso

T- Temperatura

°C – Graus Celsius

eV = elétron-volt

g/cm.s – grama centímetros por segundo

RESUMO

O uso de espécies microbianas empregadas em processos diversos que visam facilitar a vida da humanidade é conhecido desde a antiguidade. Processos como as fermentações de diversos substratos por microrganismos são milenares e acompanham o desenvolvimento das civilizações. A espécie *Aspergillus niger* é um exemplo bastante empregado em bioprocessos. Neste contexto, buscou-se com este trabalho, avaliar o desenvolvimento de *Aspergillus niger* na presença de glicerina em atmosfera oxidante, visto que, esse microrganismo é muito utilizado na biotecnologia para obtenção de diversos produtos industrializados. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos. No capítulo 1, está apresentada uma breve revisão, sobre a utilização do fungo, do gênero *Aspergillus*, em diversas substâncias, tais como glicerina. O produto da conversão biológica está contextualizado, bem como a utilização e as aplicações destas matérias. No Capítulo 2, discute-se a aplicação de *Aspergillus niger* em solução com glicerina. Apresenta-se os resultados e discussões envolvidas na pesquisa, onde se estabeleceu as condições de desenvolvimento do fungo e caracterizou-se os produtos obtidos. São discutidas, neste capítulo as condições: a temperatura, o pH, e a agitação que proporcionam o maior crescimento do fungo na solução. As caracterizações foram feitas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia em camada delgada (CCD) e Teste de viscosidade. Os resultados das amostras com *Aspergillus niger*/glicerina/peptona/água foram analisados e indicaram a presença de compostos voláteis tais como: acetona, propanol, butanol, 3-metil-butanol e 2-metil-butanol.

Palavras-Chaves: *aspergillus niger*, glicerina, atmosfera oxidante

ABSTRACT

The use of microbial species employed in various processes aimed at facilitating the life of mankind is known from this antiquity. Processes such as the fermentations of various substrates by microorganisms are millenarian and accompany the development of civilizations. The species *Aspergillus niger* is an example widely used in bioprocesses. In this context, we aimed to evaluate the development of *Aspergillus niger* in the presence of glycerin in an oxidizing atmosphere, since this microorganism is widely used in biotechnology to obtain various industrialized products. This paper was divided into two chapters. In Chapter 1, a brief review is presented on the use of the fungus, of the genus *Aspergillus*, in various substances, such as glycerin. The product of biological conversion is contextualized, as well as the use and applications of these materials. In Chapter 2, the application of *Aspergillus niger* in solution with glycerin is discussed. It presents the results and discussions involved in the research, where the conditions of development of the fungus were established and the products obtained were characterized. The conditions are discussed in this chapter: temperature, pH, and agitation which provide the greatest growth of the fungus in the solution. The characterizations were made by Fourier Transform Infrared (FTIR), Thermogravimetry (TG), Gas Chromatography (GC), Thin Layer Chromatography (TLC) and Viscosity Testing. The results of the *Aspergillus niger* / glycerin / peptone / water samples were analyzed and indicated the presence of volatile compounds such as: acetone, propanol, butanol, 3-methylbutanol.

Key Words: *aspergillus niger*, glycerin, oxidizing atmosphere

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* é composto por fungos cujos conídios estão presentes no ar, e normalmente não são considerados agentes patogênicos humanos. Membros do gênero *Aspergillus*, incluindo a espécie *A. niger*, estão distribuídos por todo o mundo e estão comumente presentes em restos vegetais e no solo. São caracterizados por conídios escuros, geralmente negros e conidióforos hialinos globosos marrons, medindo 4-5 µm de diâmetro. São considerados saprófitas e degradam moléculas complexas de materiais derivados como os celulósicos vegetais por secretarem uma variedade de enzimas hidrolíticas (De Vries & Visser, 2001).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* são de grande importância econômica graças às suas propriedades enzimáticas, que são utilizadas na indústria de panificação, cervejeira, produção de antibióticos e ácidos orgânicos. O uso diário desses produtos é considerado seguro pela Organização Mundial da Saúde - OMS e outras organizações de referência no controle alimentar como a Food and Drug Administration - FDA e Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias – EMBRAPA (Embrapa,1996).

O fungo *A. niger* cresce em material orgânico em ampla escala de temperatura (6 a 47° C) e pH (1,4-9,8) e o limite de crescimento para atividade de água é de (0,88), que é relativamente alto quando comparado a outras espécies de *Aspergillus* (Frost & Moss, 1987). É considerado também uma fonte segura de celulasas destinadas a indústria alimentícia, em comparação com a espécie *Trichoderma viride*, que é usado para aplicações não alimentícias, embora as enzimas de ambos os fungos possam se assemelhar em muitos aspectos.

Segundo Gokhale (1986), este fungo pode ser considerado superior a outras espécies fúngicas, reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos.

A Glicerina ou glicerol é o nome comum do composto orgânico 1,2,3-propanotriol, descoberto por Carl W. Scheele em 1779 durante a separação de uma mistura aquecida de PbO, preparada com óleo de oliva. São sinônimos de glicerina: trihidroxipropano, glicil álcool, gliceril e 1,2,3-trihidroxipropano (Oecd-sids, 2002). Na natureza, a glicerina existe em óleos vegetais tais como: soja, mamona, babaçu, girassol, palma, algodão, coco e dendê e em gorduras animais nas formas combinadas de glicerina com ácidos graxos (Chavez, 2008 & Thopson, 2006).

A glicerina é um composto fundamental para o sistema metabólico de conversão microbiológica de microrganismos. É considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas (Gancedo, 2000; Dillis, et al, 1980; Tani, Yamada, 1987), sendo um dos poucos substratos capazes de atravessar a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas. Em bactérias como a *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1Pf atua por sensibilidade mecânica sem gasto energético na presença de glicerina, este facilitador permite a assimilação, além de glicerina, de pequenas moléculas de polihidroxicólicas, ureia e glicina, mas exclui moléculas carregadas como o gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (Chavez, 2008 apud Moat, Foster, 2002).

Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerina como fonte de carbono por microrganismos, especialmente por bactérias, muitos destes apontam principalmente o mecanismos de assimilação de glicerina por estes microrganismos para produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e ativos para combustíveis, e a produção de outros produtos industrializados (Papanikolaou, 2002).

Nesta pesquisa apresentamos no Capítulo 1 uma breve revisão sobre os microrganismos e biotecnologia com ênfase na biotransformação, em especial as

espécies *A. niger*, além de subsídios sobre a glicerina, o substrato empregado nesta pesquisa. Em seguida apresentamos no Capítulo 2, todas as etapas da pesquisa sobre o desenvolvimento de *A. niger* no substrato glicerina em atmosfera oxidante incluindo seus resultados com as caracterizações por Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TG), Cromatografia gasosa (CG), Cromatografia em camada delgada (CCD), Teste de viscosidade (TV) e as discussões e conclusão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chavez, J. D. (2008) .Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.

De Vries, R. P.; Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 497- 522.

Dillis S.S. Apperson A, Schmidt MR & Saier MH ,(1980). Carbohydratetransport in bacteria. *Microbiology Reviews*, 44, 385 - 418.

EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, (1996). Conservação pós-colheita. Brasília: Serviço de produção de informação.

Gancedo, C.; Gancedo, J.M; Sols, (2000). A Glycerol Metabolism in Yeasts.*Journal of Biochemistry*, 2, 165-172.

Gokhale, D. U.(1986) .Xylanase and betaxylosidase production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Biotechnology Letters*. 8. 137-138.

Moat, A.G.; Foster, J.W.; Specto, M.P.(2002).Central pathways of carbohydrate metabolism. In: Moat, A.G.; Foster, J.W; Spector, M.P. (Eds). *Microbialphysiology*. New York: Wiley - Liss, 363 .

Oecd.Sids. (2002). Glycerol-CAS. N:56 81-5 Sids. Assessment. Report. UNES. Publicantions. France.

Papanikolaou, S., Aggeli, G. (2002).*Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol.*Journal of applied Microbiology*, 92, 737-744.

Tani,y .; Yamada .H.(1987). Glycerol metabolism in methylotrophic yeasts, *Agriculture and Biological Chemistry*,7.

Thompson, J.C.; He, B.(2006) .Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Engineering and Agriculture*, 22, 261-265.

**CAPÍTULO 1 - APLICAÇÕES DE *Aspergillus niger* EM CONVERSÕES
MICROBIOLÓGICAS EM ATMOSFERA OXIDANTE**

APLICAÇÕES DE *Aspergillus niger* EM CONVERSÕES MICROBIOLÓGICAS EM ATMOSFERA OXIDANTE

Joana Medeiros Oliveira¹, Girlene Soares de Figueirêdo², Francisco Cardoso Figueiredo³
e José Ribeiro dos Santos Júnior¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais – CT/UFPI

²Departamento de Microbiologia – CCS/ UFPI

³Colegio Agrícola de Teresina – CCA/UFPI

RESUMO

A espécie *A. niger* é um microrganismo muito utilizado na biotecnologia devido seu emprego para obtenção de diversos produtos industrializados. A utilização deste fungo para a produção de substâncias derivadas de substratos variados, incluindo a glicerina e sua utilização e aplicações na indústria como produtos de valor agregado consumidos pela sociedade. Neste capítulo, apresentamos uma breve revisão da literatura acerca do microrganismo, sobre as pesquisas com utilização da espécie *A. niger*, a importância econômica da glicerina bem como os problemas advindos do seu descarte no ambiente. O capítulo está estruturado da seguinte forma: Microrganismos e Biotecnologia; O gênero *Aspergillus niger* e processos biotecnológicos; A Glicerina e o Destino da glicerina no meio ambiente.

Palavras-Chaves: aplicações, glicerina, *aspergillus niger*

ABSTRACT

A. niger is a microorganism widely used in biotechnology due to its use in obtaining various industrialized products. The use of this fungus for the production of products derived from various substrates, including glycerin and its use and applications in industry as value-added products consumed by society. In this chapter, we present a brief review of the literature on the microorganism, the research using *A. niger* species, the economic importance of glycerin as well as the problems arising from its disposal in the environment. The chapter is structured as follows: Micro-organisms and biotechnology; The genus *Aspergillus niger* and biotechnological processes; Glycerin and the Fate of Glycerin in the Environment.

Palavras-Chaves: applications, glycerin, *aspergillus niger*

1 INTRODUÇÃO

Os fungos estão presentes na natureza em todos os locais: nos solos, em águas superficiais e subterrâneas, sendo parte integrante dos processos naturais de destoxificação disponibilizada para crescimento microbiano (Gurgel, 2007 & Soares, *et al.* 2004; Menegol, *et al.* 2003). Estes microrganismos podem ser do tipo unicelular, conhecidos como leveduras ou multicelulares os quais são denominados de fungos filamentosos. Fungos filamentosos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente como fábricas celulares para a produção de enzimas e uma grande variedade de substâncias. São conhecidas diversas fontes de compostos bioativos e a pesquisa para o isolamento de novos metabólitos fúngicos, que teve início há muitos anos atrás, ainda continua muito ativa (Archer, *et al.* 2008; Sun, *et al.* 2010). O *A. niger* é um fungo filamentoso que tem uma longa história de uso como fonte de ácido cítrico e de enzimas (Shuster, *et al.* 2002). Entre as várias enzimas produzidas, estão incluídas diversas proteases, em destaque a grande produção de proteases ácidas (Jarai & Buxton, 1994), que oferecem uma variedade de aplicações na indústria de alimentos, bebidas e farmacêutica (Vishwanatha, *et al.* 2009).

O fungo *A. niger* é onipresente no solo possuindo importante função na decomposição de matéria orgânica no meio ambiente. De fácil manipulação, este fungo é capaz de sintetizar uma ampla faixa de enzimas a partir de uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo (Slivinski, 2010).

No processo de produção de biomassa microbiana, alguns dos aspectos importantes estão ligados: (1) à seleção do microrganismo, o qual pode ser obtido por isolamento ou aquisição junto a Coleções de Cultura; (2) aos substratos importantes do

ponto de vista nutricional para o desenvolvimento desses microrganismos e (3) aos processos que serão utilizados na produção de biomassa (Moraes, 2002). Outro aspecto que se faz importante é a utilização de linhagens que necessitem curtos tempos de cultivo, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, não produzam pigmentos indesejáveis, tenham reduzida exigência de aeração e que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo. No caso do uso da biomassa ou seus produtos metabólicos para fins de alimentação, é também importante adotar microrganismos seguros, certificados com o Generally Recognized as Safe - GRAS (Crueger.W & Crueger. A ,1993).

Com o constante aumento na produção de biodiesel, houve também um excedente na produção de glicerina. De modo geral, 10% em massa do produto da reação de transesterificação é representado pela glicerina bruta que apresenta impurezas como: água, metanol e material orgânico não glicerol, o que lhe confere um baixo valor comercial (Cubas, et al. 2010). Em função do aumento na demanda desse biocombustível, surge a necessidade de estudos para novas aplicações desse subproduto, o qual, se descartado ao meio ambiente, pode ter alto impacto ambiental (Antunes, et al. 2011). Existem algumas alternativas para solucionar esta questão. Dentre estas alternativas, merece destaque o emprego de microrganismos que utilize a glicerina como substrato, podendo converter a mesma em produtos mais rentáveis. As espécies procarióticas merecem destaque como as bactérias: *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Bauer ,et al. 2005; Rehman, et al. 2008 & Xiu, et al. 2007). Embora pouco estudada, a utilização da glicerina como fonte nutricional para espécies eucarióticas como os fungos, tem sido pesquisada.

Neste sentido, apresentamos uma breve revisão sobre o fungo *A. niger* e suas principais aplicações biotecnológicas, da glicerina e os problemas gerados pela super produção da mesma, enfatizando os aspectos que os tornam relevantes para o desenvolvimento científico e tecnológico da atualidade.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 Microrganismos e bioprocessos

Bioprocessos caracterizam a aplicação industrial de reações ou vias biológicas mediadas por células vivas inteiras de animais, plantas, microrganismos ou enzimas sobre condições controladas para a biotransformação de matérias primas em produtos. O Bioprocessos também pode ocorrer sem resultar em um produto direto, como ocorre na biorremediação, desintoxicação de resíduos ou de efluentes com ou sem subproduto ou derivados (Pereira, N.J.; Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A .2008).

Os microrganismos em geral produzem uma diversidade de enzimas intracelulares para a catálise das suas reações metabólicas. As enzimas, também denominadas de biocatalisadores, são compostos proteicos com características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade, sendo inclusive capazes de catalisar reações estereo-específicas. Este potencial catalítico é utilizado industrialmente nos processos fermentativos e de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância na indústria (Madigan, M.T.; Martinko, J. M.; Parker, J, 2000).

Enquanto nas biotransformações os sistemas enzimáticos de interesse são extraídos das células, a catálise enzimática industrial usa enzimas microbianas excretadas ou extraídas de microrganismos e com diferentes graus de purificação. As enzimas microbianas excretadas são produzidas em maiores quantidades do que as intracelulares e têm a função principal de degradar macromoléculas presentes no meio ambiente, como a celulose, o amido, a lignina e proteínas, para que seus componentes possam ser absorvidos como nutrientes pelos microrganismos (Pereira Jr, Bon, 2008 & Ferrari, 2005).

As enzimas são utilizadas em muitos segmentos industriais, como o de alimentos e bebidas, de detergentes, têxtil, couro, celulose e papel, química fina, medicamentos e cosméticos e, ainda, em metodologia analítica e em biologia molecular. Amilases, glicose oxidase, pectinases, invertase, renina, naraginase, lipases, proteases, celulases e peroxidases são os biocatalisadores mais utilizados (Bon & Pereira Jr, 2008).

As bactérias acabam sendo reconhecidas como vilãs devido ao seu potencial patogênico. Entretanto, essas espécies patogênicas representam uma minoria das espécies bacterianas, sendo a grande maioria inofensiva, inclusive benéficas. Como exemplo, pode-se citar a tarefa fundamental da fixação do nitrogênio atmosférico molecular, papel desempenhado por bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Frankia*, que vivem em associações simbióticas com plantas leguminosas, como o feijão e a soja. Este mecanismo natural de infecção tem sido utilizado, há quase um século, para aumentar a fertilidade do solo por meio da sua inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio produzidas industrialmente por processos fermentativos (Glazer & Nikaido, 1995).

Outras bactérias de importância biotecnológica são as cepas selvagens ou modificadas geneticamente de bactérias dos gêneros *Coryne bacterium*, *Bacillus* e *Micobacterium*, que apresentam a capacidade de excretar produtos do seu metabolismo primário, como aminoácidos. Alguns destes aminoácidos de importância como o ácido glutâmico, excretado por *Coryne bacterium* em substrato de glicose, resultou na seleção e desenvolvimento de bactérias para a produção de ácido L-glutâmico, L-arginina, L-isoleucina, L-histidina, L-leucina, L-lisina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-treonina, L-triptofano e L-tirosina, além de vitaminas e nucleotídeos (Piepersberg, 1993).

Para Madigan, et al. (2000) ainda entre as bactérias, encontramos os estreptomicetos, que são aeróbios, vivem no solo e multiplicam-se formando filamentos ramificados e têm grande importância biotecnológica por produzirem compostos com diferentes atividades biológicas. Esses microrganismos sintetizam moléculas que atuam como antibióticos, antitumorais, imunomoduladores, anti-inflamatórios, vasoconstritores e vasodilatadores, além de terem aplicação no tratamento da diabete e como herbicidas. Os antibióticos são os produtos mais importantes da biotecnologia microbiana, depois das bebidas alcoólicas e queijos.

Historicamente, o potencial metabólico dos microrganismos inseriu-se naturalmente em aspectos fundamentais da vida humana, neste aspecto podemos citar as leveduras, e seu uso de forma empírica na produção do pão e do vinho, alimentos sempre presentes na história da humanidade. A contaminação natural, das uvas e grãos de cevada, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a sua subsequente fermentação originaram o vinho e a cerveja que até os dias de hoje fazem parte dos nossos hábitos alimentares (Panek, 1993). Deste modo observa-se que além das bactérias os fungos são outro grupo de microrganismos presentes nos bioprocessos.

Segundo Silva, et al. (2008), a maior parte do conhecimento sobre rotas metabólicas de degradação desses compostos encontra-se fundamentada em bactérias. No entanto, estudos têm mostrado que fungos atuam como decompositores de compostos aromáticos, assim como de compostos fenólicos.

Conforme Desai & Desai (1993), bactérias e fungos são agentes transformadores eficazes, e a habilidade destes microrganismos metabolizarem certas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação de alguns compostos orgânicos que são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes.

Várias vias metabólicas de degradação já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos (Jacques, 2005).

De acordo com Tortora, Funke & Case (2012), a produção em larga escala de microrganismos, células ou componentes celulares e seus produtos são o resultado da biotecnologia. Há centenas de anos, as pessoas têm consumido alimentos que são produzidos pela ação de microrganismos, mas, somente há pouco mais de cem anos, os cientistas demonstraram que os microrganismos são responsáveis pela produção destes produtos. Com esta descoberta, os microrganismos passaram a ser manipulados e atualmente são usados como matéria-prima barata e abundante, a temperaturas e pressões normais, evitando a necessidade de sistemas pressurizados, caros e perigosos e, de modo geral, sem a produção de resíduos tóxicos.

Os autores Araújo, et al. (2002), realizaram o isolamento e identificação de fungos filamentosos com capacidade de degradação do petróleo. A partir de um solo contaminado com petróleo foram obtidas 80 linhagens, das quais 60 apresentaram

capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Dentre estas linhagens, foram identificados quatro gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*.

Castro (2006) , estudou o potencial de oito microrganismos, incluindo duas linhagens de *A. niger* no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), que se apresentavam com potencial para produção de β -glucosidases.

Atagana, et al. (2006) ao avaliaram a capacidade dos gêneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Pleorotus* isolados de solos contaminados com creosoto, constatou que os fungos constituem um grupo de microrganismos atrativo e promissor para a investigação como agentes degradadores, uma vez que avaliações de fungos em escala de laboratório apresentam um potencial adequado para degradação.

Outro importante processo a fermentação industrial com leveduras contribuem atualmente de forma significativa para a economia de vários países produtores além de vinhos e cervejas. Outras leveduras dos gêneros *Torulopsis* e *Candida*, são capazes de crescer em melaço ou em licor sulfítico, subprodutos da fabricação de açúcar e da indústria de papel, respectivamente, são utilizadas para o tratamento destes resíduos industriais. É de particular importância para o Brasil a produção de álcool combustível por fermentação da sacarose do caldo da cana-de-açúcar por *S. cerevisiae*, tendo em vista ser o país, juntamente com os Estados Unidos, os maiores produtores mundiais de etanol combustível. Adicionalmente, o etanol está sendo cada vez mais valorizado internacionalmente como combustível líquido, em comparação à gasolina, derivada do petróleo. Pois como é produzido a partir de recursos renováveis, não contribui para o efeito estufa e suas consequências, como as grandes modificações climáticas que estão afetando negativamente a Terra (Mendes & Serra, 2012).

Os fungos filamentosos também apresentam seu potencial biotecnológico. Um dos principais papéis de destaque neste quesito é a capacidade de atacar tecidos vegetais através da secreção de enzimas que degradam biopolímeros tais como polissacarídeos, lignina e proteínas, de modo que as ligninases, celulasas, proteases e lipases fúngicas são amplamente empregadas na indústria. Muitas espécies fúngicas também produzem, em condições de metabolismo secundário, uma variedade de moléculas orgânicas de pequena massa molecular com diferentes atividades biológicas, como a antibiótica. Em posição de destaque pode-se citar a penicilina produzida por *Penicillium chrysogenum*. O uso de manipulações genéticas, basicamente técnicas de mutação associadas à otimização do processo fermentativo, incluindo o desenvolvimento de meios, permitiram a melhoria do processo de produção do antibiótico, cuja concentração passou de 0,06 para 26 g/L (Buckland & Lilly, 1993).

Inicialmente empregados apenas como agentes antibacterianos, os produtos do metabolismo secundário de fungos apresentam hoje em dia uma gama bastante diversificada de aplicações, incluindo o uso como imunossuppressores em terapias sofisticadas para pacientes transplantados (Pearce, 1997). Para citar algumas destas substâncias de interesse produzidas por fungos temos: a cefalosporina, de ação analgésica produzida pela espécie *Cephalosporium*; A equinocandina, antibacteriano produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans*; a griseofulvina, por *Penicillium griseofurvum*, um antifúngico; Dihidromevilonina, produzido por *Aspergillus terreus* com função de controle da síntese do colesterol; o Taxol, um antitumoral produzido por *Pestalotiopsis microspora*; A ciclosporina A, um imunossupressor produzida por *Tolypocladium inflatum*. (El-Enshasy, 2007).

Todos os microrganismos sintetizam lipídeos para as funções essenciais de suas estruturas membranosas. No entanto, alguns deles podem acumular e armazenar mais de 20% do seu peso seco em lipídeos, sendo chamados de "organismos oleaginosos". Sob determinadas condições de cultivo, este valor pode aumentar até 70% da sua biomassa (Ratledge e Wynn, 2002). Esses microrganismos oleaginosos (leveduras, fungos, e algas) são considerados como potenciais candidatos para a produção de lipídeos que iria resultar na chamada segunda geração de biodiesel. Especificamente as leveduras oleaginosas, com a sua forma unicelular, são considerados como os mais adequados organismos que têm sido utilizados como ferramentas na compreensão de vários fenômenos da bioquímica lipídica (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Uma grande variedade de substratos tem sido utilizada como fonte de carbono para os microrganismos oleaginosos, tais como açúcares ou resíduos enriquecidos em açúcar, polissacarídeos, N-acetilglucosamina, hidrolisados de vários produtos ou subprodutos, óleos vegetais, ácidos graxos livres, subprodutos ou resíduos graxos, n-alcenos, etanol, glicerol e ácidos orgânicos (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Para Rossi, *et al.* (2011), capacidade de acumulação de lipídeos é determinada pela constituição genética, sendo que os teores máximos de lipídeos atingíveis podem variar enormemente entre espécies e até entre cepas individuais. De acordo com diferentes microrganismos e condições de cultura (tais como temperatura, pH, tempo de cultura, etc), o conteúdo e a composição do óleo são variáveis.

Outras substâncias de muito interesse biotecnológico produzidas por microrganismos são as enzimas. Exemplos destas enzimas, são as amilases, que estão entre as mais importantes enzimas industriais, apresentando grande importância biotecnológica, tais como aplicações nas indústrias têxteis, cervejeira, outras bebidas

fermentadas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica. Apesar de se obter estas enzimas de outras fontes (plantas, animais e microrganismos) as de produção microbianas geralmente encontram grande demanda industrial (Tortora, Funke Case & 2012). Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (Gupta ,et al. 2003; Pandey, et al. 2000).

A aplicação de microrganismos como as bactérias, leveduras e principalmente os fungos, dentro da indústria alimentícia, resulta atualmente em uma indústria extremamente diversificada e com rendimentos econômicos consideravelmente altos.

Outros produtos de origem microbiana considerados importantes são alguns polímeros de aplicação industrial, moléculas estéreo-específicas produzidas por meio de biotransformação, aditivos alimentares aminoácidos e vitaminas (Omura, 1992 & Harki, 2003).

Conforme Wainwright (1995), existem cerca de 200 espécies de *Aspergillus*, comumente isolados do solo, de plantas em decomposição e do ar. As espécies de *Aspergillus* produzem um grande número de enzimas extracelulares, muitas das quais são aplicadas na biotecnologia. Dentre as espécies mais conhecidas, encontram-se o *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e o *A. versicolor*, sendo todos estes importantes para a biotecnologia. Outro aspecto que está intimamente ligado aos processos biotecnológicos, é a facilidade de manipular geneticamente estes microrganismos, gerando linhagens voltadas pra uma maior produção de enzimas específicas. Portanto, a Engenharia Genética tem um papel importante na produção de enzimas uma vez que pode ser usada para introduzir

pequenas mudanças na sequência genética de espécies fúngicas e bacterianas, visando produzir enzimas similares às originais, mas com propriedades alteradas. Pode também ser usada para introduzir genes de organismos originais em organismos produtores (hospedeiros), produzir novas linhagens ou ainda produzir “enzimas puras” sem outras atividades que possam interferir de uma maneira indesejável no produto (Archer, Mackenzi & Jeenes, 2001).

1.1.2 *Aspergillus niger* e processos biotecnológicos

O gênero *Aspergillus*, membro da classe dos Deuteromycetos, é largamente encontrado na natureza, presente em frutas, vegetais e outros substratos em decomposição, quando estes são capazes de fornecer o alimento necessário ao seu crescimento (Pelczar, Chan & Krieg, 1997). Também são contaminantes comuns em laboratórios e hospitais (Trabulsi, *et al.* 2004). O nome *Aspergillus* foi dado devido a sua forma quando observado ao microscópio, parecendo-se com um aspergillum (aspersor).

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem à família das Aspergillaceae, à classe Ascomycetos e à subclasse Euscomycetae. Existem mais de 200 espécies dentro deste gênero (Richardson & Warnock, 2003).

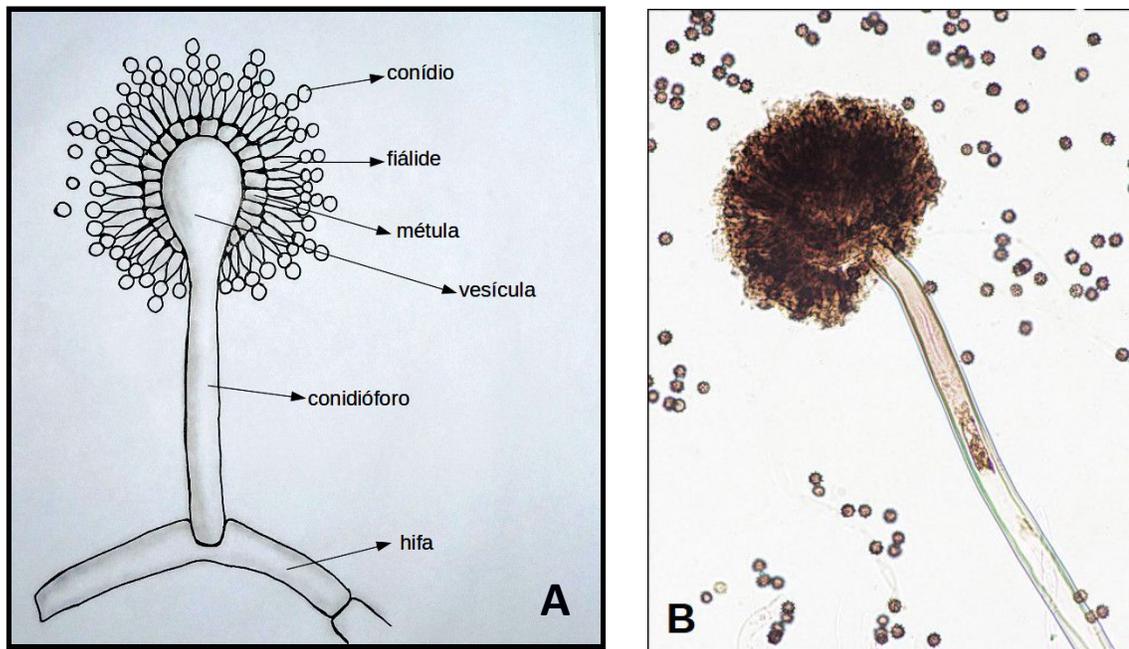
Tieghem (1867) identificou e descreveu pela primeira vez a espécie *Aspergillus niger*, e este epíteto específico conservou-se, devido à sua importância tanto em nível econômico como informativo (Schuster, *et al.* 2002). Metabolicamente são versáteis e têm sido descritos como produtores de metabólitos variados (Yu & Keller, 2005). *A. niger* forma um complexo de espécies (seção nigri) e atualmente encontram-se presentes vinte

e cinco espécies nesta seção. Mundialmente, *A. niger* pode ser um contaminante de alimentos e causadores de infecções em colheita (Leeuwen, *et al.* 2013). Este fungo é considerado geralmente não patogênico, pois os humanos estão em constante contato com esporos de *A. niger*, sem que se verifiquem sinais de doença (Schuster, *et al.* 2002). Apenas em determinados casos, nomeadamente doentes com histórico de doenças graves ou a efetuar tratamentos com imunossuppressores, se observa a colonização de *A. niger* em humanos (Schuster, *et al.* 2002). Existem características específicas que permitem identificar com clareza as espécies. A espécie *A. niger* é facilmente identificável, pois quando observado ao microscópio visualizam-se as vesículas castanho-escuras a pretas, globulosas e radiadas e com fiálides bisseriadas, isto é, métulas e fiálides (Figura 1). Uma das características que o permite distinguir com clareza é que possui conídios castanho ou pretos, sendo globosos com um tamanho de 3.5-5 µm e rugosos (Ellis, *et al.* 2007; Martins., Melo., Heins- Vaccari . 2004; Prakash & Jha, 2014).

Os fungos filamentosos, como o *Aspergillus*, são muito utilizados na indústria, pois possuem características úteis e vantajosas para a produção de uma diversidade de produtos e também conseguem promover a biotransformação de compostos (Meyer, *et al.* 2011). As vantagens do uso desta espécie devem-se à sua fácil manipulação, capacidade de fermentação de várias matérias-primas de baixo custo e a produção de elevadas quantidades de produto (Murphy & Horgan, 2005).

O *A. niger* apresenta-se propício às fermentações em estado sólido por ser considerado um microrganismo GRAS, reconhecido como de uso seguro para a aplicação na área de alimentos e devido à variedade de produtos de seu metabolismo. É capaz de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo do substrato (Schuster & Dunn-Coleman & Frisvad ,*et al.* 2007).

Figura 1- Aspectos microscópicos de *A. niger*. Em **A** observa-se as principais estruturas em desenho esquemático e em **B** a microscopia óptica.



Fonte: Autor (2017)

Rosa, et al. (2011) com o objetivo de incrementar a produção de naringinase por *A. niger* em fermentação submersa, utilizou o substrato melaço de cana-de-açúcar e obteve resultados promissores na produção deste complexo de enzimas de bastante relevância para a indústria de sucos de frutas cítricas, pois é empregado na remoção do sabor amargo característico na produção destas bebidas, e que diminui a qualidade e aceitação de mercado. Além do interesse na indústria cítrica, a naringinase tem potencial de aplicação na indústria farmacêutica, pois é utilizada na produção de anti-inflamatórios

(Ribeiro, et al. 2008), e química na produção de biosurfactantes (Saerens & Bogaert & Soetaert, 2009).

As mananases também apresentam grande interesse comercial, sua produção de acordo com Ademark, et al. (1998), pode ser atribuída a algumas espécies fúngicas inclusive ao *A. niger*. As mananases tem encontrado diversas aplicações industriais, sendo empregadas na preparação de substâncias usadas como aditivos alimentares sem valor nutricional para o crescimento seletivo da microbiota intestinal benéfica em humanos (Puchart ,et al. 2004). Outra aplicação das mananases é o efeito positivo destas enzimas, na liquefação e extração de frutas (Puchart, et al. 2004). A redução da viscosidade das galactomananas de reserva na extração do café, apresentam melhor volatilidade do aroma, propriedades de sabor e aparência da bebida (Nicolas, et al.1998). Mas apesar de muitas possibilidade de uso, Puchart, et al. (2004) relatam que a principal aplicação das mananases ocorre mesmo é na indústria de papel e celulose, para a extração da lignina (Suurnäkki ,et al. 1996).

Zen, et al .(2014) concluiu que a fermentação em estado sólido pode ser uma alternativa para o acúmulo de lipídios e de proteínas em *A. niger*, agregando valor a resíduos agroindustriais e contribuindo para a produção de compostos que podem ser aproveitados para a síntese de biodiesel.

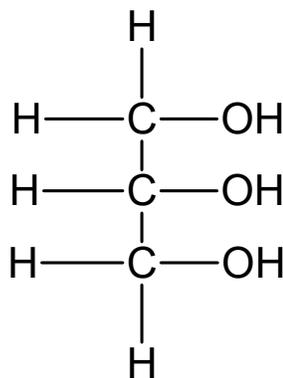
1.1.3 A Glicerina

A busca por combustíveis alternativos que podem ser usados juntamente com o gasóleo do petróleo fortaleceu o crescimento da produção de biodiesel. O biodiesel pode

ser produzido a partir de fontes renováveis como as oleaginosas como: soja, mamona, girassol, dendê, caroço de algodão ou qualquer outra gordura vegetal ou mesmo animal.

De acordo com Mota (2009) no processo de produção do biodiesel um dos principais subprodutos obtidos é a glicerina, uma matéria-prima amplamente utilizada na indústria, e separada da gordura ou do óleo vegetal (Figura 2).

Figura 2- Fórmula estrutural da glicerina



Fonte: Autor (2017)

A glicerina é o nome comercial do glicerol ou 1,2,3 propanotriol que é um composto orgânico pertencente à função química álcool, líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (IUPAC,1993), que pode ser produzido tanto de óleos vegetais como de derivados de petróleo como o próprio propeno (Beatriz ,et al. 2011). Para cada 90 m³ de biodiesel produzidos pela reação de transesterificação de óleos vegetais são gerados 10 m³ de glicerina (Dasari, et al. 2005).

O glicerol bruto é também chamado de glicerina porque a glicerina é constituída de, basicamente, 80% de glicerol (Mota C.J.A & Da Silva & Gonçalves, 2009). A glicerina é

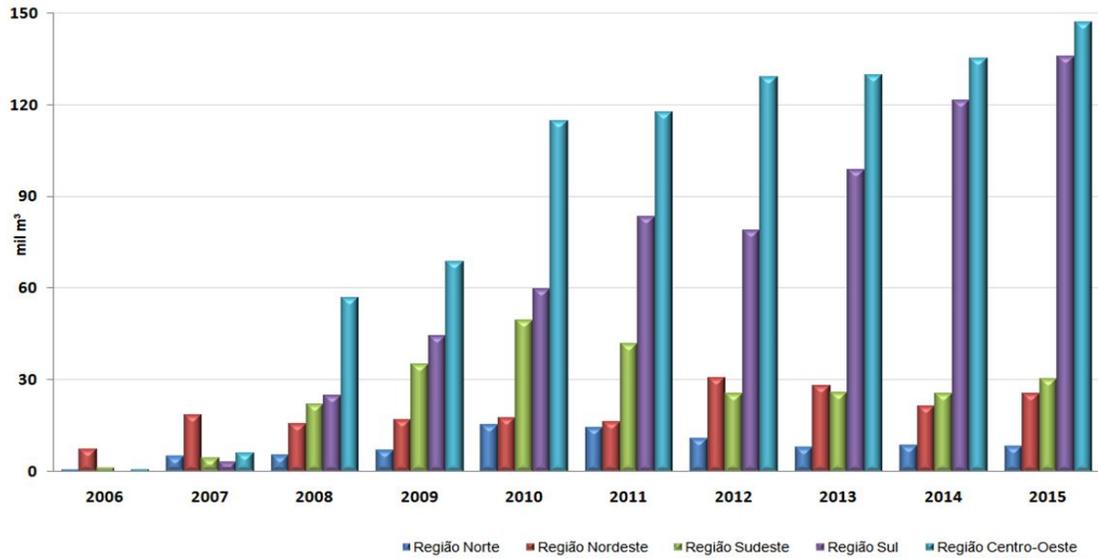
considerada uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbicas e anaeróbicas (Gancedo, C; Gancedo, J.M; Sols, A. 2001 & Dillis, et al. 1980).

A glicerina gerada a partir da produção de biodiesel normalmente está contaminada com água, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, sais, sabões, resíduos de catalisadores e ésteres. Após passar por um processo de purificação (destilação), a glicerina pode ser utilizada em inúmeros produtos, tais como: produção de biogás, indústria médico-farmacêutico, indústria de cosmético (emoliente), indústria química (gliceraldeído), solvente para tintas e vernizes, lubrificante, compósitos (plásticos biodegradáveis) e substrato para processos biotecnológicos (Valliyappan, 2004).

O fornecimento de glicerina, gerada em 2015, foi de 346,8 mil m³ como subproduto da produção de biodiesel (B100), 11,2% a mais que em 2014. A maior geração de glicerina se deu na região Centro-Oeste (42,4% do total), seguida das regiões Sul (39,2%), Sudeste (8,7%), Nordeste (7,4%) e Norte (2,4%) de acordo com a Figura 3. (ANP, 2016).

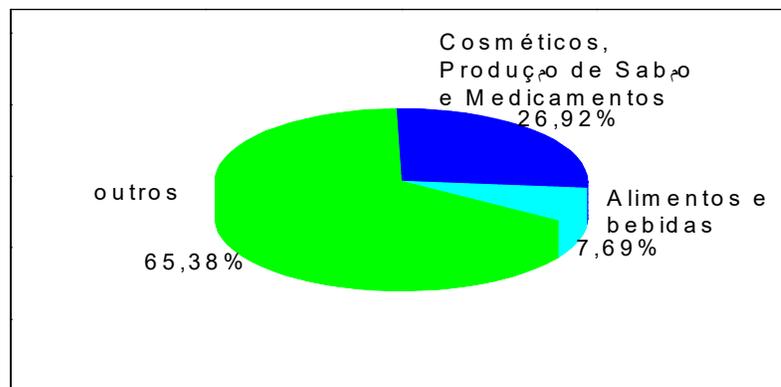
A glicerina como um dos subprodutos do biodiesel tem um custo bastante atraente, (baixo) e é bastante utilizada na indústria química, farmacêutica, de cosméticos, alimentícia e outras (Figura 4). Entretanto, o excesso de produção de glicerina obtida do biodiesel, supera a capacidade de utilização das indústrias químicas e farmacêuticas (Donkin, 2008) e o grande volume de glicerina gerada pode prejudicar o aspecto ecológico do biodiesel, que, quando descartado no meio ambiente, pode prejudicar o mesmo, necessitando de tratamento para alcançar o seu valor no mercado (Antunes ,et al. 2011).

Figura 3- Glicerina gerada na produção de biodiesel (b100), segundo grandes regiões – 2006-2015.



Fonte: ANP/2016 http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/Anuario_Estatistico_ANP_2016.pdf. Acesso em: 14 de set. 2017.

Figura 4 – Principais Aplicações da Glicerina na indústria.



Fonte: (Adaptado de Mota, et al 2009).

De acordo com Lima (2005), a situação se agrava ainda mais, pois a glicerina resultante da produção de biodiesel tem características diferentes da que é utilizada na indústria. No Brasil, apenas uma pequena parte das empresas apresentam as condições exigidas para a extração das impurezas. Só depois de purificada é que a substância pode ser utilizada na área de química fina e no setor alimentício. Torna-se importante desenvolver novas metodologias para a utilização da glicerina gerada em grande quantidade que muitas vezes é incenerada (Pan, et al. 2012).

Os grupos hidroxilas presentes na estrutura da glicerina, proporcionam diversas reações tais como oxidação, desidratação, pirólise e outras o que possibilita a aplicação da glicerina em diversos campo tecnológicos (Oh & Park, 2015). O glicerol bruto apresenta-se na forma de líquido viscoso pardo escuro, que também é chamado de glicerina pois apresenta-se constituído em sua composição 80% de glicerol e está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal, em sua forma combinada (ligado a ácidos graxos, tais como o ácido estereárico, oléico, palmítico e láurico) para formar a molécula de triacilglicerol (Champe & Harvey, 1994.; Mota; Silva & Gonçalves, 2009).

De acordo com Leoneti, *et al.* (2012), dois tipos de conversão do glicerol podem ser realizadas, a química ou bioquímica, em produtos de valor agregado, seja ele bruto ou purificado e a que compõe um cenário de transição a curto prazo, como a alimentação animal, co-digestão e co-gaseificação e tratamento de resíduos, sem qualquer tratamento de purificação do glicerol.

O glicerol, tem sido usado para substituir grãos de cereais ou outros ingredientes de alto teor de amido em dietas de porco, e estudos tem sido intesificados, pois pode reduzir custos da dieta pela oferta do produto no mercado devido à crescente produção

de biodiesel (Berenchtein, *et al.* 2010; Gallego, *et al.* 2014; Gomide, *et al.* 2012). No entanto diversas discussões tem sido realizadas sobre os níveis elevados deste mineral na dieta dos animais, pois podem causar sede, aumento da ingestão de água e uma expansão no volume celular, reduzindo a ingestão alimentar (Brêtas ,*et al.* 2011).

A glicerina é um produto fundamental para o metabolismo de microrganismos como como fonte de carbono, que quando na sua forma bruta contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio assimiláveis por microrganismos para o seu crescimento, atuando como precursor de diversos compostos, e como regulador de vários mecanismos bioquímicos intracelulares (Chavez, 2008 apud Brisson, *et al.* .2001; Moat.; Foster & Spector, 2002). Diversos microorganismos são utilizados na conversão da glicerina, entre eles podemos citar o *Aspergillus niger* já bastante empregado na industria, utilizado por várias décadas para produzir enzimas e ácido cítrico a partir de diferentes matérias-primas, inclusive resíduos (Legisa & Matthey, 1986; Venegas, *et al.* 2013).

Com a crescente demanda por biodiesel no mundo inteiro gera-se mais glicerina, a qual pode provocar sérios problemas econômicos e ambientais. Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se proporcionar a melhor maneira da utilização da glicerina em diversos campos. Como por exemplo, estudos têm sido realizados para a utilização da glicerina. Por exemplo, a sua transformação química para a obtenção de derivados com potencial energético, que possam competir com os tradicionalmente produzidos a partir de petróleo (Zhou, *et al.* 2008). Outra possibilidade é a obtenção de cetais e acetais derivados do glicerol, que possuem aplicações diversas, destacando-se o uso como aditivo para combustíveis, surfactantes, flavorizantes e solventes para uso em medicina (Mota, *et al.* .2009).

Um dos problemas da queima da glicerina e a formação da acroleína ou 2-propenal. Por outro lado a obtenção controlada da acroleína por desidratação da glicerina pode ser empregada na produção do ácido acrílico, que é um monômero de grande importância, pois é utilizado na produção de polímeros super absorventes para uso em fraldas descartáveis, tintas, adesivos, objetos decorativos, entre outros.

Contudo, acredita-se que a produção e a utilização destes novos produtos, além das outras aplicações abordadas, possam diminuir a quantidade de glicerina ofertada no mercado e agregar maior preço para a mesma.

Segundo Pagliaro, *et al.* (2007) Como podemos observar na Tabela 1 o glicerol tem inúmeras aplicações na indústria.,

Tabela 1- Mercado da glicerina, volumes e usos industriais.

Uso na indústria	Volume (%)
Fármacos	18
Cuidados Pessoais	16
Poliéter e polióis	14
Alimentação	12
Triacetina	10
Resinas Auquídicas	8
Tabaco	2
Celofane	2
Explosivos	2
Outros	11

Fonte: Adaptado de Pagliaro, et al. (2007)

1.1.4 Destino da glicerina gerada a partir do biodiesel.

A energia é essencial para o desempenho econômico de uma nação, entretanto, algumas preocupações devem embasar as formas de obtenção de energia, sendo as principais: (1) eficiência; (2) Baixo custo; e (3) a necessidade de proteção ambiental, com reduzida influência sobre o meio ambiente (Da Silva & Da Silva, 2011). Nosso país teve um grande avanço neste setor com a produção de biodiesel, que apresenta como pontos positivos a eficiência e o baixo custo, no entanto, a influência sobre o meio ambiente ainda representa um impasse.

De acordo com Freitas & Penteado (2006), na produção de biodiesel a partir de qualquer triglicerídeo é gerada a glicerina em uma proporção de 100 kg de glicerina para 1 m³ de biodiesel. O crescimento da produção mundial de biodiesel está gerando um excedente da mesma, podendo tornar-se um problema ambiental caso não se encontrem aplicações viáveis.

A glicerina gerada na produção do biodiesel, contém impurezas o que a torna comercialmente desvalorizada, sendo utilizada na área química e no setor alimentício apenas depois de purificada. Porém, a tecnologia exigida para extração das impurezas tem custo elevado e poucas empresas no Brasil podem fazê-lo (Marçon , 2010), relatou as impurezas contidas na glicerina ao término da reação de produção de biodiesel são principalmente: água, álcool, catalisador, sabões, ácidos graxos e resquícios de mistura ésteres.

Diante de tal problema, tornou-se relevante compreender o destino desta glicerina gerada. De acordo com Mota , Silva & Gonçalves (2009) a maior parte da glicerina produzida atualmente é direcionada a produção de condimentos alimentares e produtos

farmacêuticos. Porém, a glicerina destaca-se também no ramo comercial de combustíveis, fármacos, cosméticos, tabacos, defensivos agrícolas, entre outros produtos. Entretanto, existe um percentual aceitável de glicerina nestes produtos, sendo que o excesso deste material acaba desvalorizando e conseqüentemente é descartado de forma incorreta no meio ambiente (Boni, 2008). Portanto, trataremos a partir de agora do destino desta glicerina gerada na produção do biodiesel.

A produção de biogás é uma das alternativas para o aproveitamento desse resíduo, objetivando a geração de energia (térmica ou elétrica). O trabalho desenvolvido por (Azevedo, 2010), avaliou a produção de biogás a partir da glicerina bruta oriunda do biodiesel, utilizando-se dejetos bovinos como inóculo. A conclusão da pesquisa é que a quantidade de inóculo influencia na produção de biogás.

A aplicação na indústria petroquímica se dá na síntese de ésteres, acroleína e ácido acrílico, ácido alílico e gás de síntese do glicerol (Miyazawa, et al. 2007).

A biodigestão anaeróbia é outra forma de empregar a glicerina. Este processo ocorre na ausência de oxigênio molecular, onde os microrganismos presentes promovem a transformação de compostos orgânicos complexos em substâncias mais simples. Diversas pesquisas demonstram que a glicerina se constitui em uma fonte de carbono facilmente degradável para muitos microrganismos, e suas propriedades favoráveis à digestão anaeróbica em biodigestores, quando associada a resíduos orgânicos com alto teor de nitrogênio, considerando que a glicerina por si só apresenta digestão problemática devido a sua alta concentração de matérias graxas (Amon, et al. 2006).

Ribeiro (2009) afirma que uma alternativa é o tratamento da glicerina com ácido fórmico, que a converterá em álcool alílico, sendo que este último muito utilizado na produção de herbicidas, fármacos entre outros produtos químicos.

A pesquisa de Berenchtein, et al. (2010) aponta também como utilização desta glicerina, em adição a dieta de suínos em crescimento, comprovando que quando utilizado como ingrediente energético em rações para suínos em crescimento em níveis de até 9%, não há influência no desempenho, nas características de carcaça e na qualidade da carne desses animais.

Mota ,et al. (2009), discutiram a transformação química da glicerina bruta em éteres, acetatos e ésteres, demonstrando o potencial de utilização da glicerina na produção de plástico, bem como a produção de várias substâncias e carbonato de glicerina.

Laersen (2009), mostra que a adição de glicerina bruta na digestão anaeróbia de efluente de fecularia, também é uma forma de dar destinação correta à glicerina.

A combustão direta da glicerina em equipamentos não convencionais em efeito vórtice e câmara de combustão adiabática foi testada por alguns pesquisadores. Pode-se citar a pesquisa realizada por Metzger (2007), que demonstra haver uma redução dos poluentes como: CO/CO₂, acroleína, formaldeído, acetona e acetaldeído ainda podem ser detectados. Contudo, grande pesquisas estão sendo desenvolvida neste campo, para destino desta glicerina gerada na produção do biodiesel.

2. CONCLUSÃO

Os microrganismos em geral produzem uma diversidade de enzimas intracelulares para atender suas reações metabólicas. Este potencial catalítico é utilizado comercialmente, em especial nas indústrias, em processos fermentativos e de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas variadas.

Historicamente, o potencial metabólico dos microrganismos inseriu-se naturalmente em aspectos fundamentais da vida humana. Assim tanto bactérias, quanto os fungos, como as leveduras, tem sua importância na produção do pão e do vinho, alimentos sempre presentes na história da humanidade. Os fungos filamentosos, como o *Aspergillus niger*, são muito utilizados na indústria, pois possuem características úteis e vantajosas para a produção de uma diversidade de produtos e também conseguem promover a biotransformação de compostos. As vantagens do uso desta espécie devem-se à sua fácil manipulação, capacidade de fermentação de várias matérias-primas de baixo custo e a produção de elevadas quantidades de produto.

A produção de biodiesel a partir de qualquer triglicerídeo gera a glicerina, em uma proporção de 10%. E com o crescimento da produção mundial de biodiesel uma grande quantidade deste composto é gerada. Este fato, remete a uma preocupação ambiental e portanto, esta revisão faz uma abordagem das aplicações práticas com excelentes perspectivas de estudo neste campo.

3 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ademark, P. et al. (1998). Softwood hemicellulose-degrading enzymes from: Purification and properties of a manase. *Journal of Biotechnology*, 63,199-210.

Agência Nacional Do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP (2016). Disponível em:http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/Anuario_Estatistico_ANP_.pdf. Acesso em: 14 de set. 2017.

Amon, T. et al. (2006). Optimising methane yield from anaerobic digestion of manure: Effects of diary system and glycerine supplementation. *International Congress Series*, 1293, 217-220.

Antunes, F. A. F. *et, al.* (2011). Condições de pré-tratamento do glicerol proveniente da produção de biodiesel utilizando planejamento experimental plackett burman. In: Encontro Latino Americano De Iniciação Científica - INIC, 15., 2011, Lorena. Anais. Lorena, SP: Universidade do Vale do Paraíba, 2011. Disponível em: Acesso em: 14 de set. 2017.

Araújo, F.S. M & Lemos J.L.S. (2002). Isolamento e identificação de Fungo degradadores de petróleo. In: *X Jornada de iniciação Científica. Centro Tecnologia Mineral – CETEM. MCT.*

Archer, D.B.; Connerton, I.F.; Mackenzie, D.A. (2008). Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 99 -147.

Archer, D. B.; Mackenzi, D. A.; Jeenes, D. J. (2001).Genetic engineering: yeasts and filamentous fungi. In: Ratledge, C.; Kristianser, B. *Basic Biotechnology*. Cambridge, United Kingdom: Cambrige University Press, 95-126.

Atagana, H. I. ; Haynes, R. J.; Wallis, F. M. (2006). Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air, and Soil Pollution*, 172, 201-219.

Azevedo, F. G. (2010). Estudos das condições ambientais para a produção de biogás a partir de glicerol co-produto do biodiesel. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Bauer, R et al.. (2005). Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28, 37- 43.

Beatriz, A. et al. (2011). Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Quim. Nova*, 34, n. 2, 306 - 319.

Berenchtein, B. et al. (2010). Utilização de glicerol na dieta de suínos em crescimento e terminação. *R. Bras. Zootec.* 39, 112-119.

Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N. (1999) Tecnologia Enzimática. E.P.S. Bon, Rio de Janeiro.

Boni, L.A.B. (2008). Tratamento da glicerina bruta e subprodutos obtidos da reação de transesterificação de sebo bovino utilizada para a produção de biodiesel. 115 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia: Energia, Ambiente e Materiais - Universidade Luterana do Brasil.

Brêtas, A. A.; Ferreira, R. A.; Amarante Júnior, V. S.; Pereira, W. E.; Fonseca, J. B. and Caldas, F. R. L. (2011). Balanço eletrolítico para suínos machos castrados em crescimento mantidos em ambiente de alta temperatura. *Ciência e Agrotecnologia* 35:186-194.

Brisson, D. et al. (2001). Glycerol: a neglected variable in metabolic processes. *BioEssays*, 534 - 542.

Buckland, B.C. e Lilly, M.D. (1993). Fermentation: An Over View. In: *Biotechnology vol.3 Bioprocessing*, Rhem, H.-J. & Reed.

Castro .O, A. M. (2006). Produção e propriedades de celulasas de fungos filamentosos, obtidos a partir de celulignina de bagaço de cana de açúcar (*Saccharum* spp.).2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Champe, P. C.; Harvey, R. A.(1994). *Biochemistry: Lippincott's illustrated reviews*. 2. ed. New Jersey: J. B. Lippincot Company, 446 .

Chavez,J.D. (2008). Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.

Cubas, J. L. et al (2010). Neutralização da glicerina bruta obtida pela transesterificação dos óleos de crambe, cárcamo e soja. In: Congresso Brasileiro De Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras E Biodiesel. Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: UFLA, EL-Enshasy , H. A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, 225-271.

Crueger, W. Crueger, A. (1993). *Biotecnologia: manual de microbiologia industrial*. Zaragoza: Editorial Acribia, 413.

Da Silva, J. W. P.; Da Silva, A. A. (2011). Etanol – Benefícios, Impactos e Tecnologias. Universidade Federal de Uberlândia.

Dasari, M. (2005). Crude glycerol potential described: while glycerol can be an attractive alternative energy source for animal feed, it has its own limitations in terms of lower energy content than oils and fats, impurities and possible effects on the metabolic activity of the animals. *Feedstuffs, Minnesota*, 79, n. 431- 3.

Desai, J. D.; Desai, A. J. (1993). Biosurfactants: production, properties, applications. Ed. Nainkosaric, University of Western Ontario: London, Canada, cap. 3, 504 .

Dillis, et al. (1980). Carbohydrate Transport in bactéria. *Microbiology Reviews*, 44,385 -418.

El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, cap.9, 225 - 271.

Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R. e Bartley, R. (2007). *Descriptions of Medical Fungi* (2a ed.). Australia: Adelaide Medical Centre for Women and Child.

Ferrari, R. A., V. S. Oliveira, et al. (2005) Biodiesel de soja: taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Quim. Nova.*, 28.10.

Freitas, C.; Penteadó, M. (2006). Biodiesel Energia do Futuro. 1 ed. São Paulo: Letra Boreal, 2006. 146.

Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O. e Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9727– 9732. doi: 10.1021/jf 0718906.

Gallego, A. G.et.al. (2014). Neutral semi-purified glycerin in starting pigs feeding glicerina semipurificada neutralizada na alimentação de leitões. *Semina: Ciências Agrárias* 35:2831-2842.

Gancedo, C; Gancedo, J.M; Sols, A. (2001). Glycerol Metabolism in Yeasts. *Journal of Biochemistry*,.6, n.2,.165 -172.

Glazer, A. N.; Nikaido, H. (1995). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. W. H. Freeman and Company, New York.

Gomide, A. P. C.et.al. (2012). Substituição de milho por glicerina bruta em dietas para suínos em terminação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64:1309-1316.

Gonçalves, B. R. L.; Perez, L.; Ângelo, A. C. D. (2009). Glicerol: Uma Inovadora Fonte de Energia Proveniente da Produção de Biodiesel. 2 nd International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, Disponível em: <http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sexsoes/5a/3/B.%20R.%20L.%20Gon%C3%A7alves%20%20Resumo%20Exp.pdf>> Acesso em: 16 dez. 2010.

Gurgel, B. S. (2007) Avaliação de impactos ambientais por estudo geoquímico na bacia do córrego rico. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília – Instituto de Geociências - Departamento de geoquímica e recursos minerais. Paracatu, 136.

Gupta, R. et al. (2003). Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*, 38, 11,1-18.

Harki, G. D. and Rakshist, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89, 17-34.

Jacques, Rodrigo Josemar Seminoti. (2007). Biorremediação de Antraceno, Fenantreno e Pireno em um argilossolo. 171. Tese (Doutorado de agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Jarai, G., Buxton, F. (1994). Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. *Curr Genet* 26:238-244.

Leeuwen, M. R. van, et al. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus nigeris* accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74, 59–70.

Legisa, M.; Matthey, M. (1986) Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology and Technology*, 8. 258-259.

Leoneti, A. B.; Aragão-Leoneti V.; Oliveira, S. V. W. B. (2012) Glycerol as a byproduct of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. *Renewable Energy*. 45, 138 -145.

Leeuwen, M. R. van, Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., ... Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74(1), 59–70.

Lima, Paulo César Ribeiro. (2005). Biodiesel: um novo combustível para o Brasil. Caderno de Altos Estudos. Câmara dos Deputados. Brasília, 2005. Disponível em: . Acesso em: Março / 2009.

Lima, U. A., Shmidell, W. e Leeuwen, M. R. van, et al. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus nigeris* accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74, 59–70.

Madigan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms*. 9 th ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA.

Marçon, R. O. (2010). Pré-tratamento da glicerina bruta gerada na produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais e gordura animal. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agroenergia -Universidade Federal do Tocantins, Palmas-TO.

Martins, J. E. C., Melo, N. T. e Heins-Vaccari, E. (2004). *Atlas de Micologia Médica* (1a ed.). Barueri: Manole.

Metzger, B. (2007). Glycerol combustion .1-53. Dissertation, master of science north Carolina state University, Raleigh.

Menegol S.; Mucelin C.A.; Juchen C.R. (2003). Avaliação das características físico-químicas do leite do Rio Alegria. In: Congresso Brasileiro De Geoquímica e Contaminação De Águas Subterrâneas, 8. Anais. ABAS/PE, DNMPM, .47- 64.

Melo, E.A.; Guerra, N.B.,(2002) Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Bol.SBCTA. Campinas: 36 (1), n. 1.

Meyer V, Wanka F, van Gent J, Arentshorst M, van den Hondel CA, Ram AF (2011). Fungal gene expression on demand: an inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. *Microbiology*, 44, 1-80.

Mendonça, S. J. (2017). Síntese e caracterização de éteres de glicerina como aditivos oxigenados para o diesel. Disponível em: <http://www.tedebc.ufma.br//tde_busca/arquivo.php?codArquivo=499> Acesso em:17/09/2017.

Menezes, G.D.G.(2006). Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Miyazawa, T. et al. (2007). Glycerol hydrogenolysis to 1,2-propanediol catalyzed by a heat-resistant ion-exchange resin combined with Ru/C. *Applied Catalysis A: General*. 329, 30-35.

Moat, A.G.; Foster, J.W.; Spector, M.P. (2002) Central pathways of carbohydrate metabolism. In: Moat, A.G.; Foster, J.W; Spector, M.P. (Eds). *Microbial physiology*. New York: Wiley-Liss,. 363.

Moraes, I. O. (2002). Produção de Micro-organismos. IN: Lima, U. A.; Aquarone, E.Rueger, W.; Crueger, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. *Biotecnologia Industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos*. v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 199 -217.

Mota, C. J. A., Da Silva, C. X. A., Gonçalves, V. L. C. (2009). Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel, *Química Nova*. 32, 639 - 648.

Murphy, R. A. e Horgan, K. A. (2005). Antibiotics, Enzymes and Chemical Commodities from Fungi. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Applications* (1a ed. 113 – 135).

Nicolas, P. e al. (1998). Hydrolysis of the galactomannans of coffee extract with immobilized β -mannanase. US 5714183.

Oh, S.; Park, C. (2015). Enzymatic production of glycerol acetate from glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, 69, 19 - 23.

Omura, S. (1992) .The expanded horizon for microbial metabolites – a review. *Gene*, v. 115, 1-2, 141-149.

- Pandey, A. et al. (2005). *Enzyme Technology*. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers.
- Pagliari, M. et al. (2007). Ciriminna, R.; Kimura, H.; Rossi, M.; Pina, C. D.; *Angew. Chem., Int. Ed.*, 46, 4434 - 4440.
- Pan, S. et al, (2012). Transesterification of Glycerol with Dimethyl Carbonate to Glycerol Carbonate over Na-based Zeolites. *Chinese Journal of Catalysis*, 33, 1772-1777.
- Pandey, A., Soccol, C. e Mitchell, D. A. (2000). New Developments in Solid State fermentation I. *Bioprocess and Bioproducts. Process Biochemistry*, 35, 1135 -1169.
- Prakash, R. e Jha, S. N. (2014). Basics of the Genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany*, 4(2), 26–30. Disponível em http://urpjournals.com/tocjnls/30_144i_2.
- Panek, A.D. (1993). Yeast – 100 years of contribution to Biochemistry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26, 337- 341.
- Papanikolaou, S., Aggeli, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 113: 1031-1051.
- Pearce, C. (1997). Biologically Active Fungal Metabolites. *Advances in Applied Microbiology* 44, 1-80.
- Pelczar, M. J.; Chan, E. C. S; Krieg, N. R. (1997). *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil.
- Pel, H. J., Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221–231. doi: 10.1038/nbt1282
- Pereira Jr., Nei. (2008); (editor-autor) .*Tecnologia de bioprocessos / Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bon, Maria Antonieta Ferrara*. – Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ,. 62: il. – (Séries em Biotecnologia, 1)
- Pereira, N. J.; Bon, E. P. S.; Ferrara, M. A. (2008). *Tecnologia de bioprocessos. Séries em biotecnologia*.1.
- Piepersberg, W. (1993). *Streptomyces and Corynebacteria*. In: *Biotechnology – Volume1/Biological Fundamentals*. H. J. Rehm and G. Reed, Verlag Chemie, Basel.
- Prakash, R. e Jha, S. N. (2014). Basics of the Genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany*. 4, 26-30.
- Puchart, et al. (2004). Purification and characterization of two forms of endo-β-1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674, 239–250.

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

Rehman, A.; et al (2008). Pre-treatment and utilization of raw glycerol from sunflower oil biodiesel for growth and 1,3- propanediol production by *Clostridium butyricum*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.*

Ribeiro, I. A.; Ribeiro, M. H. L. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control.* 19, 432-438.

Rossi, M., et al. (2011). Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*, Ed. Stoytcheva, M., *InTech*.

Richardson, M. D. e Warnock, D. W. (2003). *Fungal Infection Diagnosis and Management*, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing.

Rosa, C. B. S.; Borsato D.; Buzato J. B.; Celligoi, M. A. P. C. (2011). Naringinase de *Aspergillus niger*: Otimização da produção por metodologia de superfície de resposta e uso do ultrassom para extração. *Semina: Ciências Agrárias.* 32, 1049-1058.

Rossi, M., et al. (2011). Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, *Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies*, Ed. Stoytcheva, M., *InTech*.

Saerens, K.; Bogaert, I. V.; Soetaert, W. (2009). Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase: optimization and kinetics. *Biotechnology Journal.* 4, 517- 524.

Soares, M.C.C. et al. (2004). Análise geoquímica dos sedimentos de fundo do Arroio Salso. Porto Alegre, 2004,. 39-50.

Santos, A. F. (2011). Novas perspectivas da glicerina-Síntese de novos nitratos com propriedades farmacológicas e melhoradores de cetano. Disponível em : <http://btd.biblioteca.ufpb.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=879> Acesso em: 17set. 2017.

Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. e Dijck, P. W. M. van. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4 - 5), 426 – 35.

Suurnäkki, A., e al. (1996). "Location of xylanase and mannanase action in kraft fibers," *J. Pulp Paper Sci.* 22, 78 - 83.

Simões, M.L.G.; Tauk-tornisielo, S.M. (2005). Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. *Holos Environment*, 5, n.2, 94 -103.

Silva, P. Mackon, M. Contiero (2008). O Glycerol: A promising and abundant Carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*..27, - 39Silva, F. A. M.;

Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A.,(1999). Método para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim. Nova*, 22, 94-101.

Shuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C., van Dijck, P.W.M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* , 59:426 – 435.

Slivinskil, C.T. (2010). *Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de Aspergillus niger obtida por fermentação em estado sólido*. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Sun, R. et al. (2010). Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. *Phytochemistry Letters*,. 101-105.

Tani,y; Yamada.k. (1987). Glycerol metabolism in methylotrophic yeasts. *Agriculture and Biological chemistry*,51 ,7 , 1929 -1933.

Trabulsi, L. R. et al. (2004). *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 718. 215 - 228.

Tieghem, V. (1867). *Species Fungorum: Detalhes das espécies: Aspergillus niger*. Disponível em <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/ea00b3b8c44dbcf76443e20f78411>. Acesso em 13 de fevereiro de 2016.

Tortora,G.J.; Funke, B. R.; Case, Christine (2012). *Microbiologia*.: Porto Alegre: Ed.Artmed, 10 edição.

Valliyappan, T.,(2004). Hydrogen or Syn Gás Production from Glycerol Using Pyrolysis and Steam Gasification Processes, Tese de mestrado da Universidade de Saskatchewan, Canadá.

Venegas, I. M. et al. (2013). Characteristics of *Aspergillus niger* xylanases produced on rice husk and wheat bran in submerged culture and solid-state fermentation for an applicability proposal. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1798 - 1807.

Vishwanatha, K.S., Appu Rao, A.G., Singh, S.A. (2009). Characterisation of acid Protease Expressed from *Aspergillus oryzae* mtcc 5341. *Food Chemistry* 114 402– 407.

Wainwright, M. (1995) *Introducción a la Biotecnología de los Hongos*. Edit. Acribia,. Zaragoza, 228, 43.

Xiu, Z-L.; Chen, X.; Sun, Y-Q.; ZHANG, D-J. (2007). Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumonia* under microaerobic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 33,. 42- 45.

Yu JH, Keller N, (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 43, 437– 458.

Zen, S.; Santos, M. C. & Monteiro, C. M. (2014). Evolução da caprino e ovinocultura. Boletim Ativos da Pecuária de Caprino e ovinocultura, Brasília, 9, 1-3.

Zhou, C.H. (Clayton), et al. (2008). Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals *chem.sou.rev*, 37. 527-549 doi 10.1039/b707343G.

**CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus niger* NA PRESENÇA DE
GLICERINA EM ATMOSFERA OXIDANTE**

DESENVOLVIMENTO DE *Aspergillus niger* NA PRESENÇA DE GLICERINA EM ATMOSFERA OXIDANTE

Joana Medeiros Oliveira¹ e Girlene Soares de Figueirêdo² Francisco Cardoso Figueiredo³

José Ribeiro dos Santos Júnior²

¹Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais – CT/UFPI

²Departamento de Química – CCS/ UFPI

RESUMO

O *Aspergillus niger* é um dos microrganismos mais importantes utilizados em biotecnologia devida sua utilização nas indústrias para obtenção de ácido cítrico, lipase e outros. Neste trabalho o fungo foi utilizado em solução aquosa na presença de peptona e de glicerina, como fonte de carbono. O fungo foi isolado de uma ocorrência de fungos do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*) em desenvolvimento sobre uma resina fenólica. Na amostra coletada e cultivada em laboratório se destacou a espécie *Aspergillus niger* com o melhor crescimento. O produto obtido, no cultivo com glicerina como fonte de carbono, filtrado, foi analisado por técnicas: Termogravimétrica, (TG), Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Cromatografia gasosa (CG). As amostras analisadas indicaram a presença de compostos voláteis como: acetona, propanol, butanol, 3-metil-butanol e 2- metil-butanol.

Palavras chave: *aspergillus niger*, glicerina, desenvolvimento

ABSTRACT

Aspergillus niger is one of the most important microorganisms used in biotechnology due to its use in the industries to obtain citric acid, lipase and others. In this work the fungus was used in aqueous solution in the presence of peptone and glycerin, as carbon source. The fungus was isolated from an occurrence of fungi of the genus *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*) under development on a phenolic resin. In the sample collected and cultivated in the laboratory the *Aspergillus niger* species with the best growth was highlighted. The product obtained in the culture with glycerine as a carbon source, filtered, was analyzed by techniques: Thermogravimetric (TG), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Gas Chromatography (GC). The samples analyzed indicate the presence of organic compounds such as acetone, propanol, butanol, 3-methyl-butanol and 2-methyl-butanol.

Key words: *aspergillus niger*, glycerin, development

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos de um modo geral, incluindo os representantes do reino fungi, desempenham papéis essenciais no ambiente e contribuem para a estabilidade dos ecossistemas, participando de processos ecológicos básicos como os ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares (Samson, et al. 2001). A compreensão do papel dos microrganismos nos ecossistemas gerou uma gama de conhecimentos com relação ao seu metabolismo, e conseqüentemente, muito se descobriu a respeito das enzimas microbianas (Sant'ana Júnior, 2001). Deste modo, o isolamento e a identificação de microrganismos, são de grande interesse, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos a partir de plantas ou animais (Alves, et al. 2002).

As espécies do gênero *Aspergillus* são fungos filamentosos com ampla distribuição geográfica, encontrado em diversos ambientes desde o ar até ambientes aquáticos, sendo o solo o principal habitat destes microrganismos (Read, 1991). A espécie *A. niger* merece destaque, considerando a grande diversidade e sua versatilidade em sobreviver formando estruturas de resistência em ambientes desfavoráveis por longos períodos e voltando a proliferar-se rapidamente quando o ambiente torna-se novamente favorável (Xavier, et al. 2008). A diversidade metabólica e a inespecificidade e versatilidade de seus sistemas enzimáticos múltiplos, torna-os degradadores de diferentes moléculas orgânicas, incluindo compostos xenobióticos de estruturas químicas relacionados, como os hidrocarbonetos do petróleo (Atlas, 1981, Ghazaly & Sayed, 2000).

Uma área de importante destaque na pesquisa aplicada, a biotecnologia, tem o *A. niger* como uma espécie de destaque, com relevância em processos industriais na

produção de ácido cítrico a partir de diferentes matérias-primas (Legisa & Matthey, 1986 .; Desgranges & Durand, 1990 .; André, et al. 2010.; Liguori, Amore & Faraco 2013.; Venegas, et al. 2013), ou o seu desenvolvimento em resíduos, como a glicerina obtida por transesterificação para a produção de biodiesel (Victorino.; Pereira & Fiaux, 2016).

De acordo com Beatriz , Araújo, et al .(2002) & Lima (2005), quimicamente a glicerina comercial é um tri-álcool com três carbonos, nomeada, segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) 1,2,3-propanotriol, sendo derivado de fontes naturais (óleos graxos vegetais e animais na forma de triglicerídeos) ou petroquímica (particularmente na produção do biodiesel).

A glicerina após passar por um processo de purificação pode ser utilizada em inúmeros produtos, tais como: produção de biogás, indústria farmacêutica, indústria de cosmético (emoliente), solvente para tintas e vernizes, lubrificante, compósitos (plásticos biodegradáveis), substrato para processos biotecnológicos, além de outros (Valliyappan, Bakhshi & Dalai, 2004).

Um estudo realizado por Mota & Silva & Gonçalves (2009) revelou que grandes quantidades de glicerina são formadas na produção de biodiesel (em torno de 10 m³ de glicerina para cada 90 m³ de biodiesel), resultando em impactos econômicos e ambientais que se agravam com a crescente demanda pelo biocombustível. Considerando-se a quantidade de glicerina gerada nestes processos, algumas propostas têm sido desenvolvidas para resolver o problema. Dentre elas estão a utilização de microrganismos por conversão microbiana, em produtos de valor agregado, que se apresentam como sendo viáveis em função dos valores econômicos e das características tecnológicas (Silva, Machon & Contiero, 2002).

Os processos biotecnológicos para utilização microbiana da glicerina em produtos de valor agregado em consórcio com biomassa se tornam possíveis, pois este é considerado como uma fonte de carbono por fungos ou bactérias em condições aeróbicas e anaeróbicas (Ito, et al. 2005.; Yazdani & Gonzalez, 2007). Espécies de leveduras como: *Yarrowia lipolytica*, *Candida tropicalis* e *Rhodotorula* sp, e a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, em meios de cultura com restrição de nitrogênio, são capazes de produzir quantidades significantes de ácido cítrico, utilizando como fontes de carbono: açúcares, alcanos, álcoois, óleos, amido hidrolisado e glicerina (Németh.; Kupcsulik & Sevela, 2003 & Venter, et al. 2004).

Este trabalho propôs-se a realizar avaliação do desenvolvimento do fungo *Aspergillus niger*, iniciando por sua adaptação em meio de diferentes concentrações de glicerina, e estabelecer as condições (temperatura, pH e agitação), para que ele apresente o maior crescimento. Ainda, identificar os produtos gerados durante este processo de conversão.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia- LPM do Departamento de Parasitologia e Microbiologia da UFPI e no Laboratório de Bioeletroquímica da UFPI ambos no campus Ministro Petrônio Portela em Teresina-PI.

2.1 Materiais

A espécie fúngica utilizada neste estudo foi isolada a partir de uma colônia em uma amostra de resina de líquido da casca da castanha de caju – LCC, onde o microrganismo se desenvolveu como um contaminante, colonizando esse material (LCC), objeto de pesquisas em desenvolvimento no laboratório de Bioeletroquímica da UFPI.

Para o crescimento das culturas fúngicas, objetivando sua identificação taxonômica, a caracterização e manutenção da viabilidade para os testes de crescimento em glicerina, utilizaram-se os seguintes materiais:

- Glicerina comercial da marca Tayuyna, 95% de Glicerina
- Meio de cultura: batata, dextrose e ágar – BDA, da marca Synth;
- Meio de cultura: Ágar Sabouraud, da marca Himedia;
- Substâncias para enriquecimento dos meios: extrato de Leveduras, marca Himedia, e Peptona de Caseína, marca Synth;
- Vidrarias em geral;
- Reagentes diversos;
- Água tipo “Mille-Q” (18,2 mega ohms de resistividade)

2.2 Procedimentos Experimentais

2.2.1 *Isolamento da espécie microbiana utilizada nesta pesquisa.*

Para o isolamento do microrganismo procedeu-se da seguinte forma: retirou-se porções das colônias em crescimento com o auxílio de uma alça de cromo níquel previamente flambada na chama do bico de Bunsen, em seguida semeou-se em placas de Petri contendo meio BDA e incubou-se em estufa, demanda bioquímica de oxigênio - BOD a 28 °C por um período de 72 h. Esta etapa de isolamento, consistiu na purificação das colônias crescidas, para assegurar tratar-se de uma espécie proveniente de conídio único. Com este objetivo, preparou-se uma solução de conídios com a adição de água destilada e tween 80, e a partir desta solução, foram feitas diluições sucessivas decimais até obter-se no semeio em placas de petri, colônias fúngicas provenientes de um único conídio.

2.2.2 *Identificação taxonômica do microrganismo*

A identificação da espécie fúngica foi feita por taxonomia clássica, de acordo com o manual de identificação para *Aspergillus* de (Klich , 2001), observando-se o crescimento e formação dos conidióforos e conídios, bem como o desenvolvimento do micélio por meio da técnica de microcultivo em lâmina e lamínula segundo o método descrito por (Koneman, et al. 2001). As principais características microscópicas analisadas foram: o tipo de ramificação, comprimento, largura e textura dos conidióforos; comprimento e textura das métulas e fiálides; diâmetro, forma e textura dos conídios além da forma e cor do cleistotécio/esclerócios.

2.2.3 Caracterização do microrganismo.

Após a identificação do isolado fúngico, realizou-se a caracterização das condições favoráveis ao crescimento do microrganismo. Estas condições envolveram: enriquecimento nutricional do substrato (glicerina); influência da temperatura; pH e agitação sobre o desenvolvimento do isolado fúngico.

Para testar a capacidade de crescimento do microrganismo na glicerina como substrato procedeu-se como segue: erlenmeyers em triplicatas foram esterilizados em autoclave para garantir a presença única do microrganismo testado. A estes erlenmeyers foram adicionados glicerina nas proporções de 5 a 50% e água destilada autoclavada em quantidade suficiente para 200 mL. A seguir, o microrganismo foi adicionado sob a forma de suspensão de 1 mL de conídios numa proporção de 10^8 conídios/mL e acondicionados em estufa incubadora BOD.

A avaliação do crescimento micelial foi feita por meio da determinação da massa micelial seca (peso seco) após um intervalo de 20 dias. Para este fim, as culturas foram autoclavadas a 121 °C por 30 segundos com a finalidade de provocar a inativação dos esporos fúngicos, seguida pela filtração da cultura através de papel de filtro e por lavagem com água destilada estéril. A massa micelial obtida foi desidratada por exposição a 60 °C por 8 horas, seguido por manutenção a 40 °C por 24 horas em estufa, segundo o método descrito por (Rasooli & Abyaneh, 2004).

Com o objetivo de enriquecer o substrato e incrementar a velocidade de crescimento do microrganismo, foram testados alguns enriquecedores do substrato como a glicose, o extrato de levedura e a peptona de caseína. Todas as substâncias foram acrescidas ao meio contendo glicerina numa proporção de 5%. Para análise comparativa também se analisou o crescimento em meio contendo apenas glicerina (25%). O

microrganismo foi semeado em placas de petri contendo estes meios enriquecidos (1 mL da suspensão de conídios na proporção de 10^8 conídios/mL) e incubados em estufa BOD por um período de 7 (sete) dias. Durante este período foi realizada a mensuração do diâmetro das colônias com auxílio de um paquímetro e a esporulação (produção de conídios) foi analisada por meio da contagem de conídios em câmara de Neubauer, observadas ao microscópio óptico em objetiva de 40X.

Na avaliação do crescimento micelial (diâmetro das colônias), fez-se a medição, a cada 24 horas, do diâmetro das colônias, durante sete dias, a partir do momento em que foi colocado o disco de micélio com os isolados no meio de cultura, obtendo-se sete leituras. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial, conforme a fórmula descrita na equação 2.1, por (Oliveira, 1991) :

$$IVMC = \frac{\sum(D - D_a)}{N} \quad \text{Equação (2.1)}$$

Sendo:

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

Analisou-se também a Influência da temperatura no desenvolvimento do microrganismo. As análises foram feitas no meio contendo glicerina e enriquecido com peptona e também no preparado, glicerina / água. O microrganismo foi semeado em placas de petri contendo o meio enriquecido ou ainda o preparado de glicerina / água, e

incubado em estufa BOD nas temperaturas de 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C. Todos os testes foram feitos em triplicata. Em seguida foram feitas as mensurações do diâmetro das colônias crescidas até o período máximo de 7 dias do índice de velocidade de crescimento micelial - (IVCM), bem como a análise da esporulação, pelo mesmo método descrito anteriormente para analisar o enriquecimento nutricional.

O pH também foi analisado como um fator determinante para o desenvolvimento do microrganismo. O pH foi ajustado no meio preparado com nutrientes (peptona) e glicerina, sendo a faixa de pH testada de 3-8, com intervalos de 0,5. De modo semelhante às caracterizações de suplementação com nutrientes e temperatura, as análises dos resultados foram feitas até o período de 7 dias e os critérios analisados foram os mesmos (diâmetro das colônias e esporulação).

A agitação foi empregada como um método para propiciar uma melhor homogeneização e interação ao substrato de crescimento com o microrganismo. Erlenmeyers contendo nutriente (Peptona) com água e glicerina (5-50%) foram semeados com a suspensão de conídios (10^8 conídios/mL). Após o semeio os erlenmeyers foram incubados em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker) por um período de 7 dias com controle de temperatura (28 °C) e a agitação em 120 rpm. Para análise comparativa também foram semeados erlenmeyers e dispostos em estufa incubadora BOD sem agitação pelo mesmo período de tempo e à mesma temperatura.

*2.2.4 Caracterização dos produtos resultantes do crescimento de *Aspergillus niger* em substrato contendo glicerina.*

2.2.4.1 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os produtos foram caracterizados também por espectroscopia vibracional na região do infravermelho em um equipamento Perkin Elmer Spectrum GX FT-IR System, na região de 4000 a 500 cm^{-1} , utilizando o método de reflectância – ATR. A análise foi realizada no Laboratório de Química do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI.

2.2.4.2 Análise termogravimétrica (TG)

As curvas termogravimétricas das amostras de glicerina/fungo/peptona/água mille-Q, foram obtidas por meio do equipamento da Shimadzu TG-2050, utilizando um cadinho de platina e atmosfera de argônio, com fluxo de 50 mL min^{-1} na faixa de temperatura de 25 à 600 $^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As referidas análises foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Materiais- LIMAV na Universidade Federal do Piauí – UFPI.

2.2.4.3 Cromatografia gasosa (CG)

A análise dos constituintes químicos foi realizada em sistema HS-GC-MS (Shimadzu) equipado com coluna capilar SLB-5 ms (Sulpeco, 30 m x 0,25 mm x 0,250 μm). A análise dos constituintes químicos foi realizada em sistema HS-GC-MS (Shimadzu) equipado com coluna capilar SLB-5ms (Sulpeco, 30 m x 0,25 mm x 0,250 μm). A análise foi realizada por introdução da amostra via head space operando com temperatura de incubação de 60 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. A temperatura da seringa foi 60 $^{\circ}\text{C}$, volume de injeção de 1,5 mL no modo split (10:1) e temperatura do injetor de 220 $^{\circ}\text{C}$. A programação do

forno foi 40 °C, com taxa de 4 °C min⁻¹ até 250 °C. O gás hélio com fluxo constante a 1 mL min⁻¹. O tempo total de análise foi 52,50 min e a temperatura da interface foi 280 °C. O espectrômetro de massas operando com ionização por elétrons (EI 70 eV) com faixa de massas m/z de 40 a 250 Da, e temperatura da fonte de 230 °C. A identificação foi realizada por comparação dos espectros de massas com os da biblioteca Wiley 229.

2.2.4.4 Cromatografia em camada delgada (CCD) da amostra de glicerina/fungo/peptona/água.

Análise da placa cromatográfica em camada delgada (CCD), foi utilizada uma lâmina microscópica com espessura: 1,0 a 1.2 mm, utilizou-se sílica gel da marca Fluk , utilizou-se um capilar para colocar os pontos da amostra. Os reagentes foi Metanol, (3 ml), Clorofórmio, (7 ml), para diluir a glicerina, para retirar água da amostra utilizou-se acetato de etila e hexano nas proporções, (9 ml a 1 ml), para revelar a placa cromatográfica utilizou-se a solução Sulfato Cérico.

2.2.4.5 Teste de Viscosidade da amostra de glicerina/ fungo/ peptona/água

O teste de viscosidade foi realizado para avaliar seguintes parâmetros: de textura firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade foi avaliados em texturômetro Marca TA-XT plus Texture Analyser (Stable Micro Systems) a 25 °C (compressão de 30 mm, velocidade de teste de 1,0 mm/s e probe Back Extrusion Cell com disco de 35 mm e extensor).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamentos do microrganismo

A técnica de diluições decimais sucessivas permitiu o crescimento de colônias filamentosas com aspecto sugestivo de microrganismos do reino Fungi. As colônias crescidas revelaram pelos seus aspectos macroscópicos distintos, que se tratava de três microrganismos diferentes. A microscopia também constatou este fato. Entretanto em um teste para crescimento em glicerina apenas um dos isolados foi capaz de crescer no meio contendo glicerina, sendo este o selecionado para as demais etapas desta pesquisa, e os outros dois isolados, considerados contaminantes.

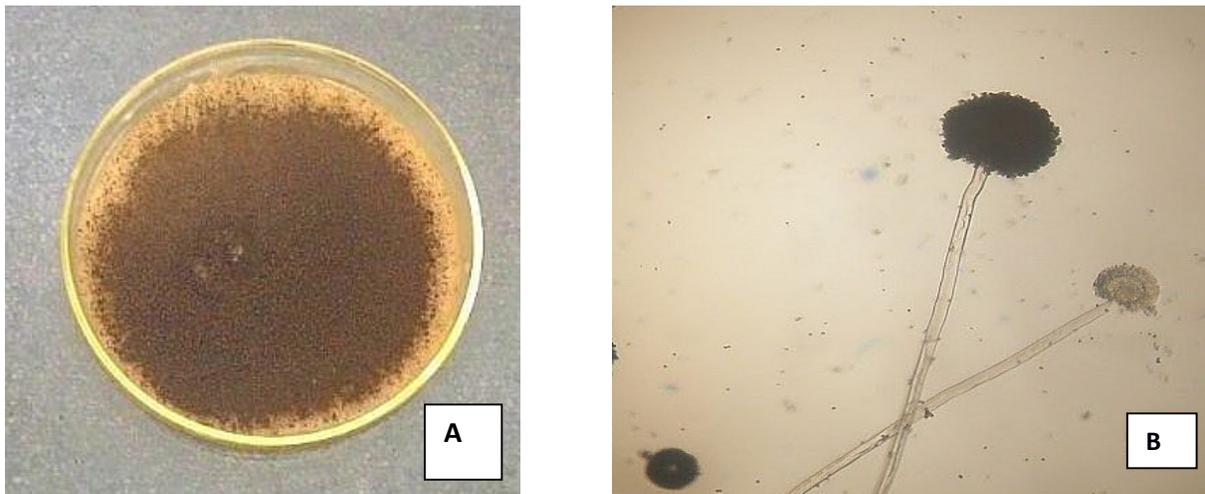
O isolado fúngico selecionado, crescido a partir de uma cultura monospórica, foi posteriormente identificado taxonomicamente, e a partir de então, foi o empregado em todas as análises posteriores desta pesquisa, de modo a garantir a sua pureza.

3.2 Identificação taxonômica do microrganismo

A microscopia da colônia revelou micélio aéreo abundante e após a esporulação, o mesmo apresentou-se de cor marrom escuro (Figura 1 e 2). As observações microscópicas a partir do microcultivo revelaram a presença de micélio hialino e septado nas hifas somáticas e com septação irregular ou ausência de septos na formação do conidióforo. Os conidióforos visualizados eram simples de formato esférico e ameroseptado (sem septo), produzidos em cadeia ao redor de uma célula conidiogênica

(disposição radiada). As métulas são longas e as fiáides curtas, apresentaram aspecto compatível com a espécie *A. niger*.

Figura 1- Aspectos da macroscopia (A) e microscopia (B) de *A. niger*.



Fonte: Autor (2017)

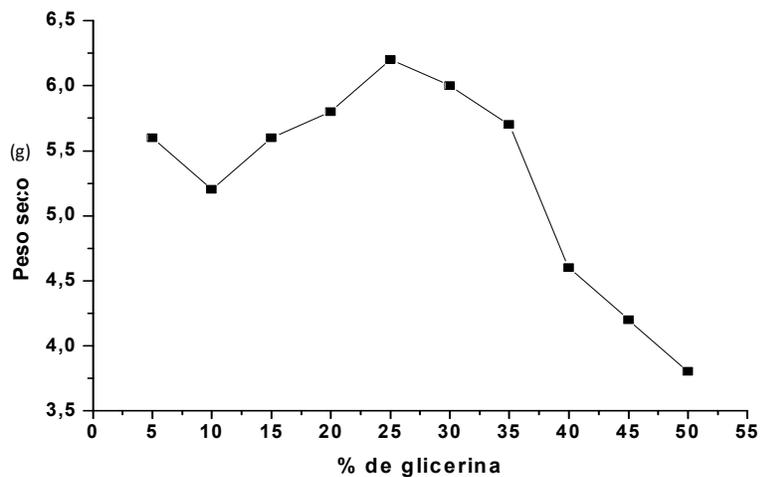
3.3 Caracterização do microrganismo

3.3.1 Desenvolvimento de *A. niger* em solução de água e glicerina

O desenvolvimento de *A. niger* na solução de água e glicerina, nas diferentes proporções (5 a 50% de glicerina) analisadas por meio da determinação da massa seca, revelou a capacidade de *A. niger* em utilizar a glicerina como fonte de carbono. Houve crescimento micelial em todas as amostras testadas, apesar da determinação do peso

seco indicar que na proporção de 25%, a massa seca micelial produzida foi de 6,2 g, contrastando a proporção de 50%, onde a massa seca determinada foi de 3,8 g, como se observa na Figura 2.

Figura 2- Massa micelial produzida por *A. niger* em diferentes concentrações de glicerina.



Fonte: Autor (2017)

Na pesquisa realizada por (Lopes , Messiano & Nardi, 2017), o glicerol foi empregado como fonte de carbono para o fungo *A. niger* a fim de avaliar sua possível biotransformação. Por meio de análises cromatográficas, foi possível observar o consumo do glicerol pelo fungo, já que o mesmo consegue metabolizar o glicerol convertendo-o em compostos de alto valor agregado. De acordo com os mesmos autores, a utilização do glicerol como fonte de carbono para produção de compostos de alto valor agregado, por

meio de biotransformação deve ser considerada na busca de novas alternativas ao excedente da glicerina proveniente da indústria de biocombustíveis.

Victorino , Pereira, & Fiaux, (2016), avaliaram o crescimento de *A. niger* em meio contendo glicerina gerada por transesterificação do óleo de cozinha residual com etanol e compararam com meios a base de glicerol e sacarose. O crescimento microbiano na glicerina foi comparável àquele obtido na sacarose e maior do que o obtido em glicerol. Estes resultados comprovaram que a glicerina provou-se uma matéria-prima apropriada para processos biotecnológicos utilizando *Aspergillus niger*, e que a utilização tecnológica desses dois passivos ambientais: a glicerina e o óleo de cozinha residual, contribuem para a diminuição dos impactos ambientais e econômicos decorrentes de sua geração e descarte.

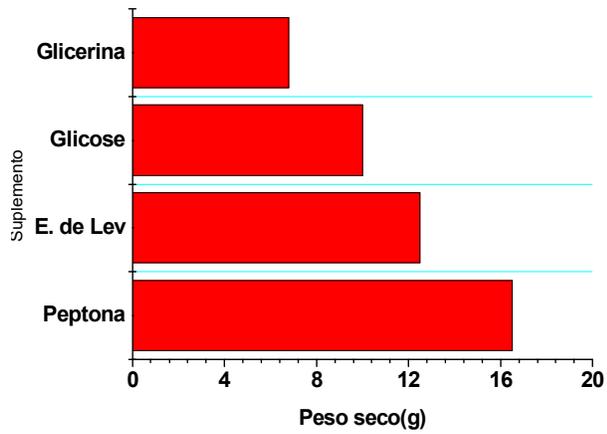
3.3.2 Desenvolvimento de *A. niger* em meios de glicerina enriquecidos

O crescimento de *A. niger* em meio contendo glicerina e enriquecido com peptona foi o que mais favoreceu o desenvolvimento do microrganismo. O IVCM (índice médio de velocidade de crescimento micelial) nos meios enriquecidos com peptona foi de 16,7 mm/dia (média das três repetições), maior do que os índices verificados para os meios enriquecidos com extrato de levedura (12,4 mm/dia) e glicose (10,8 mm/dia). (Figura 3). O meio contendo água, ágar e glicerina, sem as substâncias de enriquecimento, apresentou um índice médio de velocidade de crescimento micelial – IVCM, menor quando comparado aos demais (6,8 mm/dia), o que comprovam diversas pesquisas já

realizadas (Fang & Zhong, 2002), compararam o efeito de fontes inorgânicas de nitrogênio como o sulfato de amônio e cloridrato de amônio, com fontes orgânicas (extrato de levedura, e peptona) sobre a produção de biomassa de *Ganoder malucidum*, constatando maior crescimento micelial nos meios contendo extrato de levedura e peptona. (Kim, et al. 2006), suplementaram com cultivo de *G. resinaceum* com glicose e peptona de soja em biorreator STR de 5 L, obtendo aos 6 dias de cultivo, 42 g/L de biomassa micelial, maior do que os 21,9 g/L de biomassa em 12 dias sem a suplementação. Com o objetivo de otimizar o rendimento e a eficiência da conversão de substrato em biomassa de *Pleurotus tuberregium* em meio líquido, Wu, et al. (2004) utilizaram o extrato de levedura, e consideraram melhor do que a utilização de peptona. Entretanto, a pesquisa conduzida por (Pastore .; Hasan & Zempulski, 2011) verificou que, mediante análise das curvas cinéticas de 22 ensaios, os maiores níveis de produtividade para o ácido cítrico, em isolados de *A. niger*, ocorreram na suplementação com peptona e sulfato de amônio.

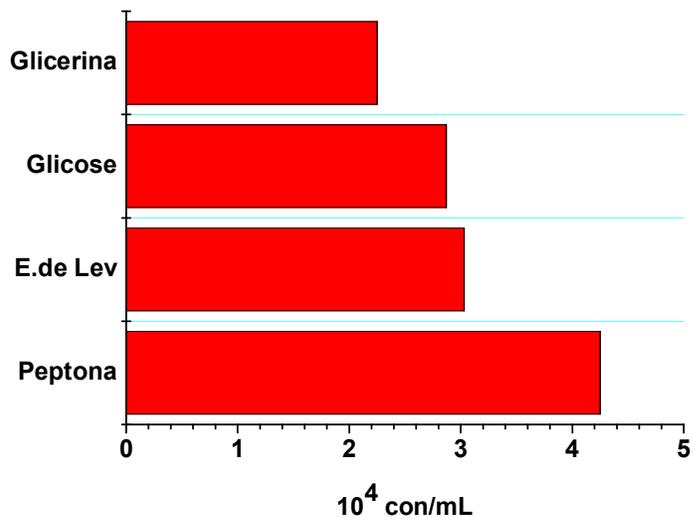
Outro parâmetro avaliado para determinar a melhor substância de enriquecimento ao substrato de glicerina foi a produção de conídios em *A. niger*. De modo semelhante a determinação do índice médio de velocidade de crescimento micelial – IVCM, a peptona também demonstrou ser o melhor suplemento para a produção de conídios em *A. niger* (Figura 4).

Figura 3- Índice médio da velocidade de crescimento micelial de *A. niger* em meios de glicerina enriquecidos



Fonte: Autor (2017)

Figura 4- Produção de conídios em *A. niger* em meios enriquecidos.



Fonte: Autor (2017)

Os conídios constituem uma forma rápida de propagação das espécies fúngicas, de modo que substâncias estimuladoras de sua produção, também influenciam diretamente no desenvolvimento do microrganismo.

A suplementação do meio de cultivo com peptona e extrato de levedura incrementou o crescimento e a esporulação no fungo *Bipolaris euphorbiae* (Penariol, et al. 2008) enquanto que, a adição de vitaminas favoreceu apenas a produção de conídios. (Wenzel, Almeida & Cardoso, 2005) verificaram que houve diferença significativa na produção de conídios em relação às quantidades de dextrose e extrato de levedura. As maiores produções de conídios foram obtidas nos meios com maiores quantidades de dextrose e não com extrato de levedura, de modo que a fonte de carbono não influencia tanto a esporulação quanto a fonte de nitrogênio (peptona ou extrato de levedura). De modo semelhante, em pesquisas anteriores (Wenzel, 2002) observou que a suplementação do meio de cultura com extrato de levedura em baixas concentrações (1%), estimulou a esporulação de *Verticillium lecanii*, o mesmo foi verificado por (Oliveira, 2000).

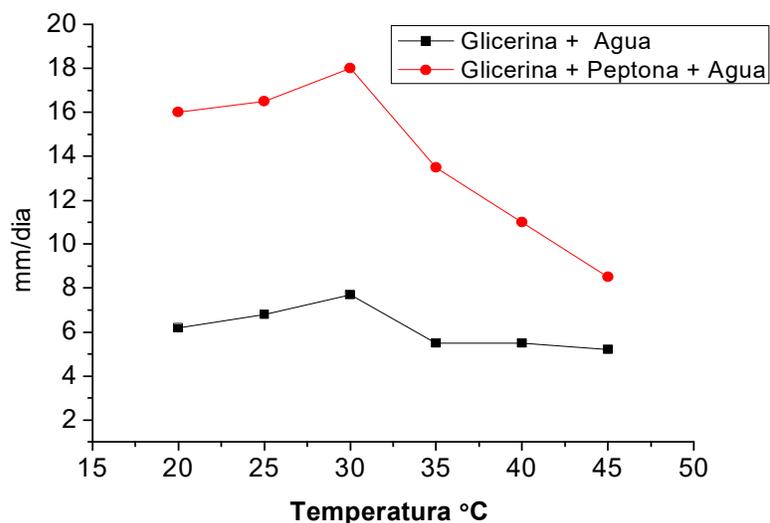
3.3.3 Influência da temperatura no desenvolvimento de *A. niger* em meios contendo glicerina

A temperatura constitui-se em um fator abiótico importante no desenvolvimento dos organismos em geral, de acordo com (Samson, et al. 2001) a temperatura tem um papel importante no crescimento do micélio, na formação e germinação dos esporos dos fungos. A temperatura ótima de crescimento em isolados de fungos xilófagos, analisadas por Castro, et al. (2006) foi na faixa de 35 °C, compatível com as condições dos testes em

temperatura ambiente em que comumente esses organismos são encontrados. No presente estudo, *A. niger* se desenvolveu em todas as temperaturas testadas, entretanto, na temperatura de 30 °C observou-se maior crescimento micelial, alcançando um índice médio de velocidade de crescimento micelial – IVCM de 18 mm/dia em meio enriquecido com peptona e de 7,7 mm/dia aos 30 °C em meio contendo 25% de glicerina+água. Na Figura 5 podemos observar o desenvolvimento de *A. niger* em diferentes temperaturas.

Ferreira, et al. (2012), avaliaram o efeito da temperatura sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani*. Esta pesquisa revelou que a maior média de Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), ocorreu em 25 °C. (Cargnim & Marcuzzo 2014), estudaram a influência da temperatura no desenvolvimento de *A. niger* em cebola, constatando que a melhor temperatura para o desenvolvimento desta espécie é a de 30 °C. Para (Dias, et al. 2005), temperaturas próximas à limítrofe para crescimento de fungos, pode causar redução drástica no crescimento micelial destes microrganismos.

Figura 5- Crescimento micelial de *A. niger* em diferentes temperaturas.

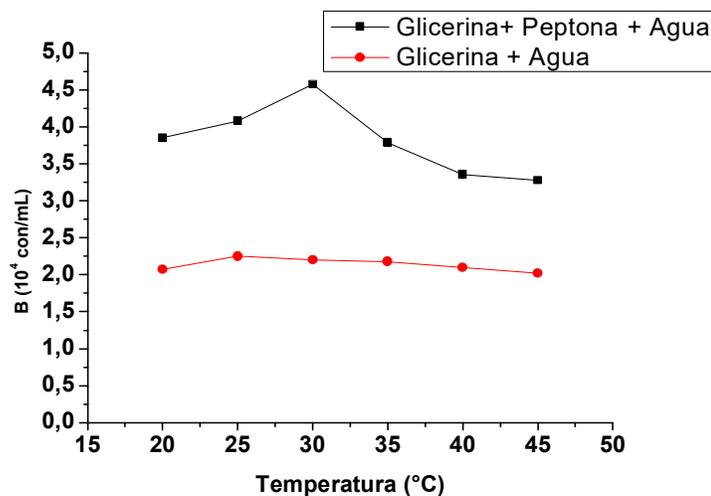


Fonte: Autor (2017)

A temperatura influenciou também na produção de conídios. A contagem de conídios na câmara de Neubauer para todas as amostras (10 – 45 °C) indicou que a temperatura ótima de esporulação em *A. niger* é a de 30 °C (Figura 6).

Um estudo clássico dos pesquisadores Clerk & Madelin, (1965) avaliou a influência da temperatura, umidade, concentração de gás carbônico e luminosidade sobre a estabilidade dos conídios de *Metarhiziu manisopliae*, *Bouveria bassiana* e *Isaria farinosa*, e concluíram que a viabilidade dos conídios foi reduzida pela exposição à luz e elevação de temperatura. Na temperatura de 28 °C o número médio de conídios foi 85,4 enquanto que na temperatura de 23 °C o número médio foi 32,4.

Figura 6 - Produção conidial de *A. niger* em diferentes temperaturas.



Fonte: Autor (2017)

Os conídios adquirem certo grau de resistência térmica, quando expostos a determinadas condições, durante seu processo de formação. Os esporos de *A. flavus* e *A. parasiticus*, quando inoculados em meios com alta concentração de açúcares e baixas

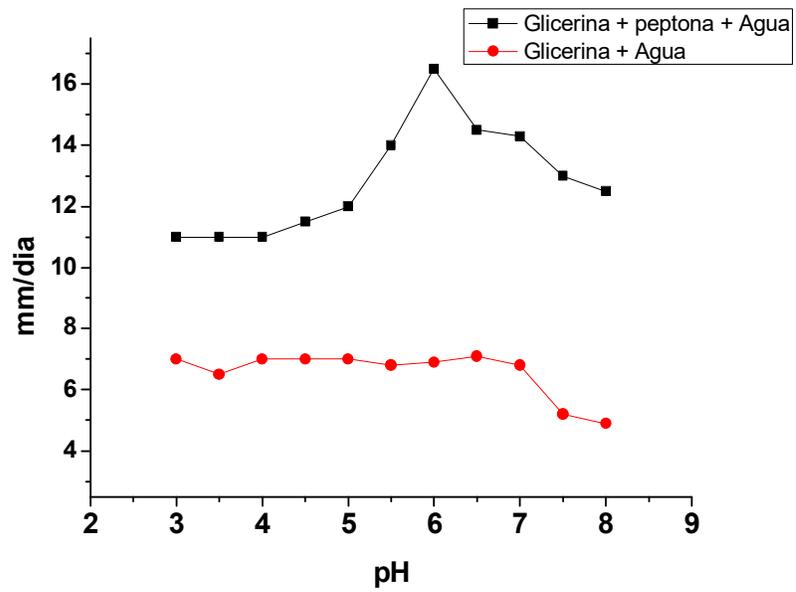
concentrações de proteínas e aminoácidos se apresentam mais resistentes que os produzidos em meios com concentrações normais destes componentes (Blank.; Yang & Scanlon, 1998).

3.3.4 Influência do pH no desenvolvimento de *A.niger* em meios contendo glicerina

Foi observado o crescimento do microrganismo em todos os pHs testados, sendo observado que o pH de 6,0 é o que mais favorece o desenvolvimento de *A. niger*. Em pH 3,0 houve perda do índice médio de velocidade de crescimento micelial – ICVM e esporulação (Figuras 7 e 8).

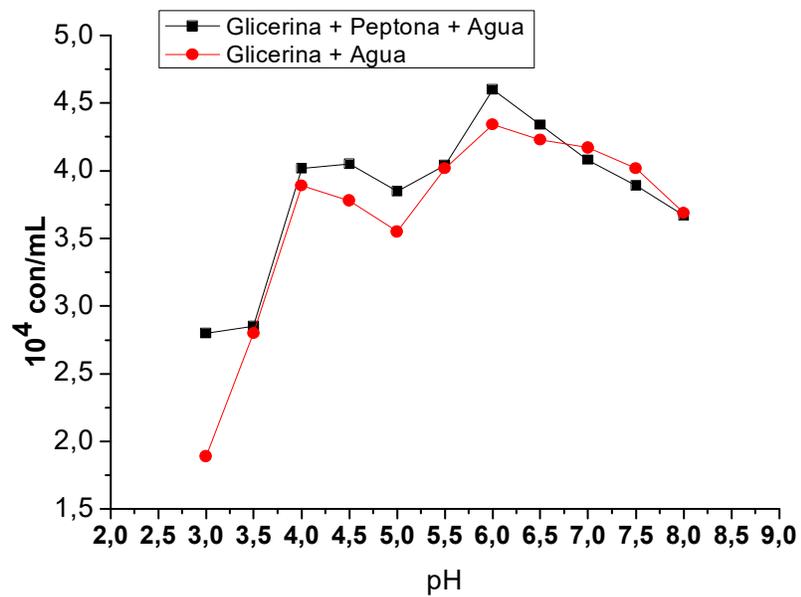
Segundo (Griffin 1994), o pH ótimo para o desenvolvimento de vários fungos encontra-se na faixa entre 4,0 e 6,0, porém, a maioria dos fungos filamentosos tolera variações de pH entre 2,0 e 9,0. No estudo realizado por (Santaella, et al. 2009), com o objetivo de testar a capacidade de *A. niger* no tratamento de efluentes em reatores de uma refinaria de petróleo, observou que os valores de pH de saída dos reatores foram em torno de $3,5 \pm 0,4$, não havendo diferenças significativas, mantendo-se propícios ao desenvolvimento do *A. niger* e inibindo a proliferação de bactérias (a maioria das bactérias não cresce em pH ácido). Entretanto (Mishra & Lata, 2004), que estudaram a influência do pH na remoção de DQO (demanda química de oxigênio) de água residuária de indústria alimentícia, tratadas também com *A. niger* e *A. foetidus*, concluíram que houve maior remoção de DQO em pH 6,0, embora houvesse maior atividade amilolítica em pH 4,0.

Figura 7- Índice médio de velocidade de crescimento micelial IVCMS de *A. niger* em diferentes pHs.



Fonte: Autor (2017)

Figura 8- Produção conidial de *A. niger* em diferentes pHs

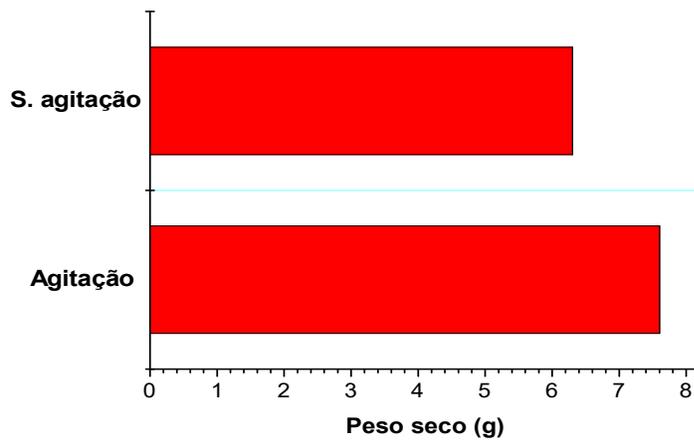


Fonte: Autor (2017)

3.3.5 Influência da agitação no desenvolvimento de *A. niger* em meios contendo glicerina

A influência da agitação sob o desenvolvimento de *A. niger* mostrou a formação de pelets de micélio de proporções consideradas satisfatórias. A biomassa micelial formada foi maior no meio sob as condições de agitação do que em meio sem agitação. (Figura 9).

Figura 9- Peso seco em *A. niger* sob as condições de agitação e sem agitação.



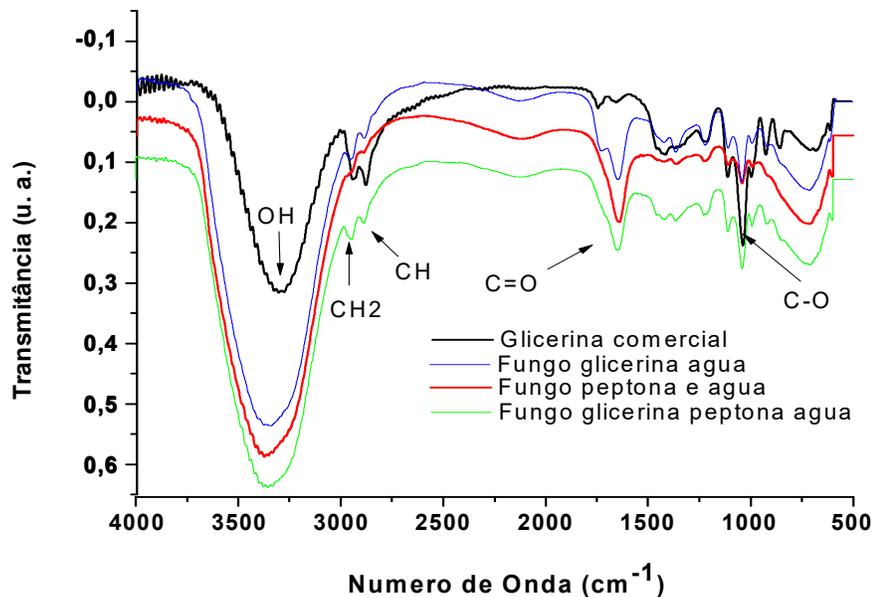
Fonte: Autor (2017)

3.4 Caracterização dos produtos resultantes do crescimento de *Aspergillus niger* em substrato contendo glicerina.

3.4.1 Espectroscopias de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

O gráfico de FTIR apresentou bandas indicativas das funções presentes nos compostos formados, pelo processo de crescimento do fungo, a partir de glicerina comercial com peptona e água Mille-Q. A identificação foi realizada comparando as bandas características dos grupos funcionais encontrados na literatura. Podem-se observar na Figura 10, os espectros de FTIR das amostras.

Figura 10 - Espectros na região de infravermelho com as amostras da glicerina comercial, fungo/glicerina/água, fungo/peptona água e fungo/glicerina/peptona/água.



Fonte: Autor (2017)

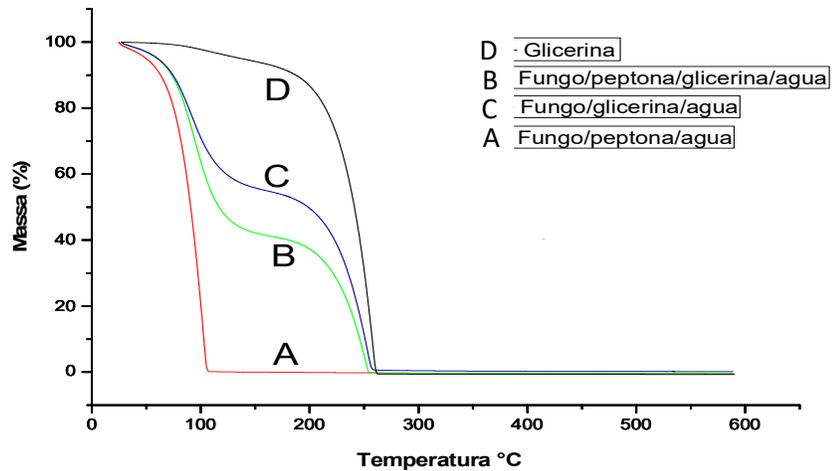
As bandas foram identificadas segundo (Silverstein, Webster & Kiemle, 2005). Para identificar os grupos funcionais presentes nas amostras de glicerina/fungo/peptona/água, realizaram-se as análises por Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (Figura 10). Em relação às bandas observadas na região de 3250 a 3500 cm^{-1} , atribuídas a estiramento OH, observou-se que para a glicerina pura a banda está deslocada, uma vez que o grupo OH refere-se a álcool e que nas outras amostras são indicativos da presença de água. A ligação C-O de álcool secundário simétrico (1162 cm^{-1}) e a ligação C-O de álcool primário (1028 cm^{-1}), representam substâncias que estão na glicina e na peptona das amostras. É possível observar ainda a presença de uma forte banda em 1737-1652 cm^{-1} , C=O (que surge nas amostras glicerina /fungo/água/peptona) atribuída a estiramento da carboxila de éster ou cetona segundo (Silverstein, *et al.* 2007). A presença das bandas 2944 - 2972 cm^{-1} , estiramento assimétrico CH_2 , (Bommannan, *et al.* 1990), e as bandas 2877-2886 cm^{-1} estiramento simétrico CH, (Bommannan, *et al.* 1990). A presença dessas bandas indicam a formação de novos compostos a partir da glicerina e/ou peptona, provavelmente formados pela degradação da glicerina/peptona/fungo/água Mille-Q.

3.4.2 Análises Termogravimétricas (TG)

A Análise Termogravimétrica fornece informações sobre o comportamento de materiais diante de um aumento progressivo de temperatura. As análises termogravimétricas permitiram estabelecer as temperaturas de perda de massa das substâncias presentes nas amostras de glicerina comercial, fungo/glicerina/água, fungo/peptona/água e fungo/peptona/glicerina/água, mostrando que diferentes perdas para cada amostra apresentada na Figura 11. A curva para glicerina, (Figura 11), curva D

apresenta uma perda de voláteis na região de 80 °C a 170 °C, provavelmente correspondente as impurezas da glicerina comercial (água e compostos voláteis). Na região de 171 °C a 275 °C ocorre a degradação da glicerina, resultando em aproximadamente zero de resíduo a partir de 280 °C até 600 °C. Para a amostra de fungo/peptona/glicerina/água, na Figura 11, curva B, para fungo/glicerina/água, pode-se observar a perda de massa na região que vai de 50 °C a 40 °C, que correspondem a perda de voláteis. Esses compostos podem ser provenientes do consumo da matéria disponível ao fungo, isto é, deve ser produto de conversão da peptona e da glicerina em novos compostos. Ainda na Figura 11, curva B, na região de 45 °C a 275 °C, ocorre a perda de massa correspondente a compostos de maior ponto de ebulição, provavelmente a glicerina, e desse ponto em diante apresenta resíduo aproximadamente zero. Na Figura 11, Curva C, fungo/peptona/glicerina/água, pode-se observar a perda de massa na faixa de temperatura entre 40 °C a 140 °C correspondente a formação de produtos voláteis, em função da conversão da peptona e da glicerina promovida pelo fungo. Em temperaturas mais elevadas, mais com um percentual menor em relação a Curva B, na Figura 11, podemos observar a perda de massa entre 145 °C a 275 °C, correspondendo ao aquecimento de compostos pouco voláteis, provavelmente associados a glicerina, e de 280 °C em diante pode pensar em um resíduo aproximadamente zero. Para a última curva Figura 11, Curva A, observa-se que a perda de massa ocorre quase que completamente na faixa de temperatura entre 30 °C a 105 °C, indicando que nessa amostra, fungo/peptona/água ocorre formação de compostos voláteis. Ainda pode-se afirmar que o resíduo é aproximadamente zero (Cavalheiro, et al.1995).

Figura 11- Análise térmica do material (TG) da amostra glicerina/peptona/fungo/água

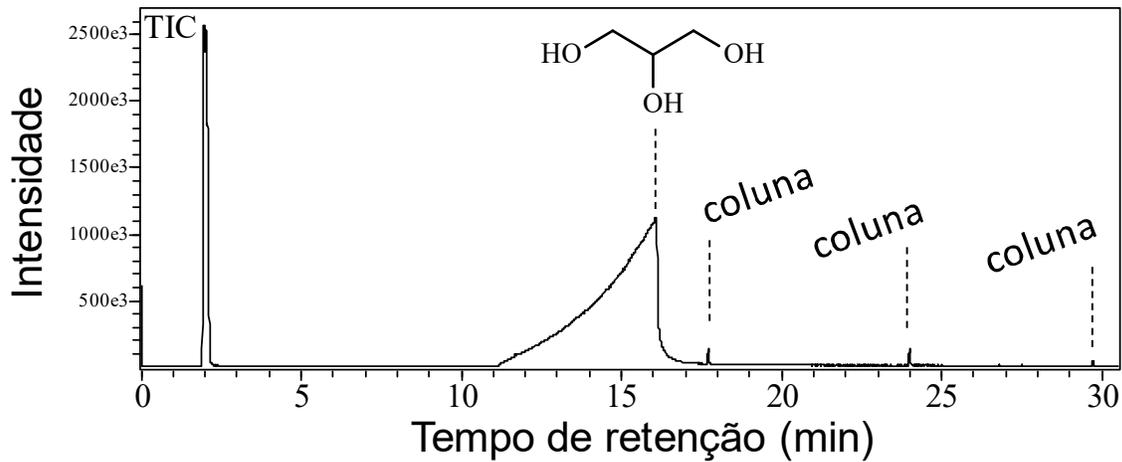


Fonte: Autor (2017)

3.4.3 Cromatografia Gasosa (CG)

Os cromatogramas de íons totais, Figuras 12, 13 e 14 referem-se aos resultados das amostras de glicerina, fungo/peptona/água, fungo/peptona/glicerina/água, fungo/glicerina/água, respectivamente, obtidos por Head space, isto é, somente na parte volátil da amostra. O cromatograma da glicerina, utilizada no trabalho, Figura 12, revela os contaminantes presentes na glicerina e o componente principal, uma vez que ela é 95% pura. Tendo componentes voláteis que podem ser identificados no início do cromatograma e em baixas concentrações, concordando com o apresentado no rótulo. O pico de maior intensidade em aproximadamente 2 min. foi identificado em todas as cromatogramas como CO₂.

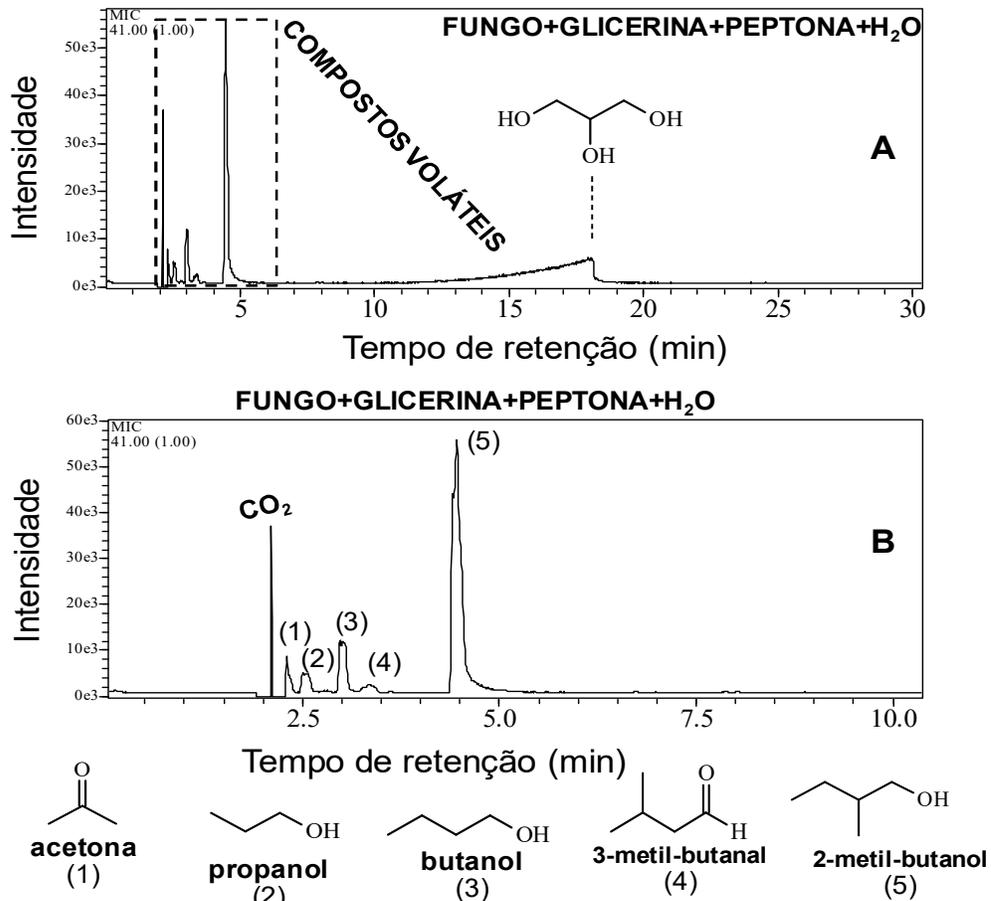
Figura 12- Cromatograma em Head space (parte volátil) da Glicerina utilizada no trabalho como fonte de carbono para o *Aspergillus niger*. Neste gráfico esta identificado dióxido de carbono, voláteis, glicerina e resquícios dos componentes da coluna.



Fonte: Autor (2017)

Na Figura 13 apresentamos o cromatograma da amostra de fungo/peptona/glicerina/água, onde foi identificado um conjunto de produtos voláteis, parte B da Figura 13. Foram identificados cinco compostos, na faixa de 2 a 7 min. Pode-se observar que a intensidade da banda referente a glicerina perde intensidade, e só é maior que a da amostra fungo/peptona/agua, quando se compara os cromatogramas.

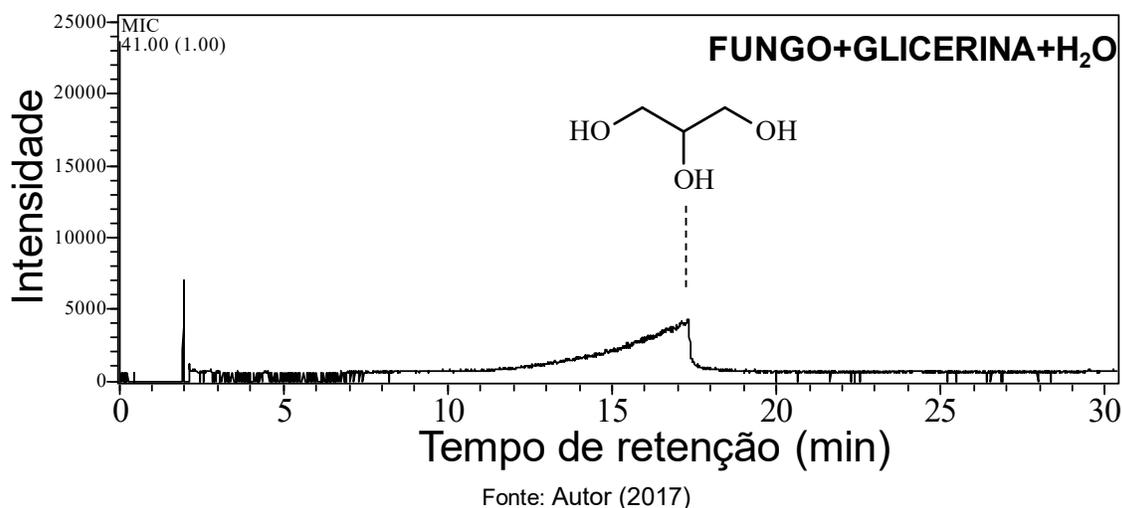
Figura 13 Cromatograma da amostra fungo/peptona/glicerina/água, onde está apresentado a região de voláteis e a presença da glicerina. Os compostos voláteis foram identificados em B.



Fonte: Autor (2017)

Na Figura 14 está apresentado o cromatograma da amostra fungo/glicerina/água, e o pico em 2 min., corresponde a CO₂ e um pico referente a glicerina.

Figura 14- Cromatograma da amostra fungo/glicerina/água.



Na amostra de fungo/ glicerina/água ocorre uma diminuição da banda de glicerina devido o consumo de glicerina por o fungo *Aspergillus niger*, sendo que a glicerina é fonte de carbono para o fungo.

Diversos estudos demonstram a produção de compostos gerados por meio da fermentação da glicerina em escala laboratorial empregando bactérias e leveduras. Na pesquisa desenvolvida por Hong, et al. (2011) a *Klebsiella pneumoniae*, um bacilo gram negativo, produz a partir da glicerina o 1,3-propanodiol sob condições de aerobiose em regime de batelada alimentada com produtividade estimada em $2,13 \text{ g L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. De modo semelhante, a *Escherichia coli* mostrou ser capaz de produzir o mesmo composto, por via fermentativa em condições anaeróbicas (Tang, et al. 2009). Outros produtos de interesse também são gerados a partir da fermentação de glicerina por outras espécies de microrganismos como: a dihidroxiacetona por *Gluconobacter oxydans*, (Hu, et al. 2010); o ácido glicérico por *Acetobacter tropicalis* (Habe, et al. 2010); o etanol por *E. coli*, (Durnin, et al. 2009), butanol por *Clostridium pasteurianum*, (Taconi, et al. 2009), 2,3 butanodiol

por *K. Pneumoniae* (Petrova, 2010); ácido láctico por *E. coli* (Hong, et al. 2009), ácido succínico por *Yarrowia lipolytica*, (Yuzbshev, et al. 2010); poli-hidroxitirato por *Zobellella denitrificans* (Ibrahim Steinbuchel, 2009) e ácido cítrico por *Y. Lipolytica*, (Rymowicz, et al. 2010). Um fato interessante a ser observado é que, a maioria destas substâncias produzidas, possuem um mercado consolidado, sendo empregadas em diversos segmentos industriais.

3.4.4 - Cromatografia em camada delgada (CCD)

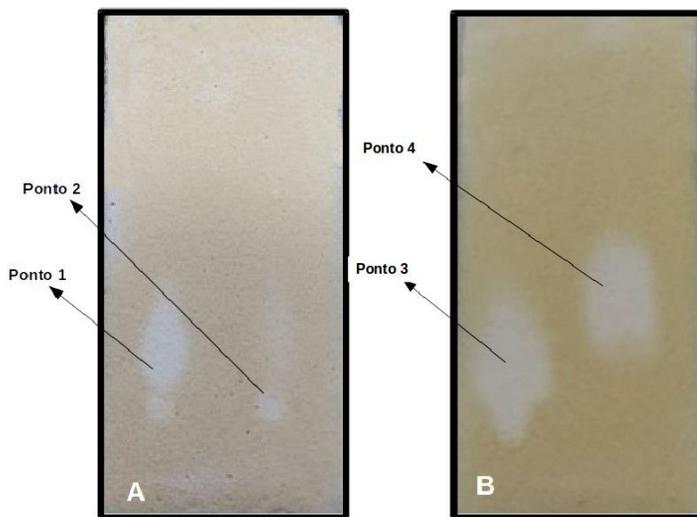
A cromatografia em camada delgada - CCD é uma técnica de adsorção líquido-sólido que ocorre devido à diferença de afinidade, dos componentes de uma mistura, pela fase estacionária. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas, sendo também muito utilizada para a purificação de substâncias e para a identificação de frações coletadas em cromatografia (Collins ,et al. 1995). Na análise cromatográfica por CCD, a placa de sílica (SiO₂), foi utilizada como fase estacionária e as misturas, clorofórmio, metanol, hexano e acetato de etila, que foram utilizadas como eluente, suas aplicações foram feitas com tubos capilares e as revelações feitas com solução Sulfato de Cérico. Sobre as placas montadas foram feitas análises de amostras obtidas em duas condições:

- a) amostras obtidas em ambiente fechado e que foram utilizadas para cromatografia com Head Space;
- b) amostras obtidas em atmosfera oxidante (ar ambiente).

Na condição (a) as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa com Head Space a 60 °C, e o líquido restante foi analisado por CCD. Na condição (b) as amostras

foram analisadas somente por CCD. No ponto 1, Figura 15 A, para amostra fungo/glicerina/água, pode observar que ocorre o arraste das substancias presentes com alargamento significativo da mancha de deslocamento, isto pode ser atribuído a presença de glicerina que tende a se espalhar na placa em função de seu caracter polar, como pode ser visto por comparação ao deslocamento da glicerina pura.

Figura 15- A e B, Cromatografia em camada delgada – CCD, das amostras de obtidas na condição (a): glicerina/fungo/água, apresentada no ponto 1, a amostra fungo/peptona/água, no ponto 2, a amostra fungo/glicerina/peptona/água no ponto 3 e amostra glicerina no ponto 4.



Fonte: Autor (2017)

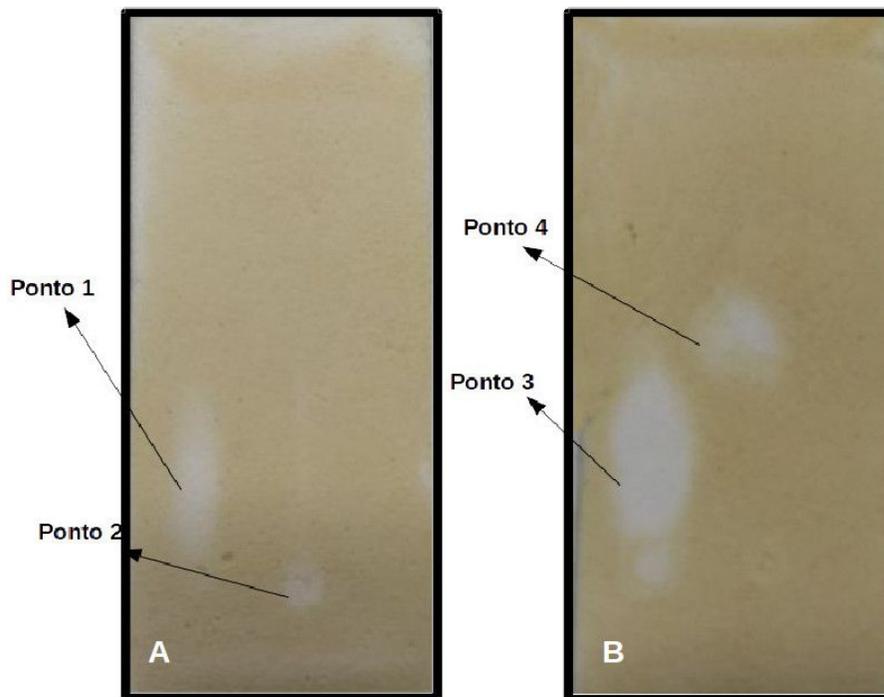
No ponto 2, Figura 15 A, para a amostra fungo/peptona/água, a placa mostra um deslocamento uniforme, indicando a ausência de glicerina e/ou de compostos polares, neste caso confirmando os achados do TG de que a maior parte do material deve ter sido convertido em compostos volateis. Na Figura 15 B, no ponto 3, para a amostra fungo/glicerina/peptona/água o deslocamento indica a presença de compostos com

polaridade, podendo ser a glicerina, ou ácidos carboxílicos como indicado na análise de FTIR. A análise de CCD, no ponto 3, Figura 16 B, se assemelha a do ponto 4, na mesma Figura que é a de glicerina pura.

Para a condição (b) amostras obtidas em atmosfera oxidante, Figura 16 A, ponto 1, amostra fungo/glicerina/água, pode-se observar uma difusão da mostra por uma área considerável, no entanto quando comparada com a de glicerina, pode revelar que o composto tem glicerina mas em muito menor quantidade. No ponto 2, Figura 16 A, para amostra de fungo/peptona/água, apresenta o mesmo comportamento observado para a mesma amostra na condição (a). Para a Figura 16 B, ponto 3, temos a amostra fungo/glicerina/peptona/água, que apresenta uma mancha com um deslocamento considerável em relação as demais e menor que a de glicerina pura Figura 16 B, ponto 4. Nesse caso pode associar a presença de substancias polares além da glicerina, entre estas ácidos carboxílicos, álcoóis outros. A presença de glicerina pode ser inferida em função do alargamento do sinal observado.

Para os dois conjuntos de medidas (a) e (b) pode afirmar que para as amostras de fungo/peptona/água o predomínio de compostos voláteis observados na cromatografia com Head Space e na TG, para amostra de fungo/glicerina/peptona/água, existe um indicativo de ocorrer processos de formação de produtos diferentes, uma vez que os achados de Head Space, TG e CCD apresentam diferenças significativas. Para amostra fungo/glicerina/água as amostras indicam não apresentar diferenças entre independente do sistema em que foram obtidas.

Figura 16- A e B - Cromatografia em camada delgada CCD das amostras obtidas na condição (b): fungo/glicerina/água, apresentada no ponto 1, e a amostra fungo/peptona/água, no ponto 2, a amostra fungo/glicerina/peptona/água no ponto 3 e glicerina no ponto 4.



Fonte: Autor (2017)

3.4.5 Teste de Viscosidade

A viscosidade de um fluido mede a resistência interna oferecida ao movimento relativo das diferentes partes desse fluido (resistência ao fluxo), (Shames, 1999). A viscosidade está relacionada com a força que tende a se opor a esse movimento, sendo uma medida de fricção interna do fluido. Dessa maneira, quanto maior a barreira potencial

que uma molécula terá que vencer a fim de “saltar” para a vacância adjacente, maior é a viscosidade. Essa barreira potencial é conhecida como Energia de Ativação Viscosa (Ribeiro; Da Cruz; Reis, 2005). Temperatura é um parâmetro relacionado com a energia interna de uma substância, vários estudos têm demonstrado que a viscosidade de um líquido é altamente influenciada por mudanças na temperatura (Oliveira; Barros; Rossi, 2009). O aumento das distâncias intermoleculares reduz as forças atrativas entre as moléculas, diminuindo a viscosidade (Granjeiro, et al. 2007). A Figura 17, (no apêndice) e Tabela 1, mostra o teste de viscosidade das amostras glicerina comercial, fungo/glicerina/água, fungo/peptona/água e fungo/peptona/glicerina/água.

Tabela 1- Valores de Viscosidade das amostras: glicerina comercial, fungo/glicerina/água, Fungo/peptona/glicerina/água e Fungo/peptona/água.

Amostra	(g/cm.s)	Firmeza	Consistência	Índ. Viscos.	Coesividade
Glicerina		12,23	164,22	8,12	7,77
Glicerina/água		9,08	143,43	4,36	5,44
Fungo/glicerina/água		9,36	140,13	4,25	5,56
Fungo/peptona/glicerina/água		9,60	141,63	4,78	5,94
Peptona/água		8,69	137,77	3,80	5,36
Fungo/peptona/água		8,93	135,88	4,16	5,48

Fonte: Autor (2017)

Na amostra de fungo/peptona/água apresenta um valor em gramas por centímetro segundo (135,88 g/cm.s), sendo o menor valor de viscosidade, devido amostra não ter glicerina. Na amostra que contém somente glicerina ocorre um aumento da viscosidade

(164,22 g/cm.s), quando se adiciona a glicerina a viscosidade aumenta devido a glicerina ser muito viscosa. Na amostra fungo/glicerina/peptona/agua, apresentou um considerado aumento da viscosidade (141,63 g/cm.s) devido a presença da glicerina e consumo da glicerina pelo fungo. Na amostra glicerina/fungo /água apresentou a viscosidade (140,13 g/cm.s), devido a presença da glicerina.

4. CONCLUSÕES

- O fungo recolhido na amostra de resina do líquido da castanha de caju (LCC) polimerizada com formol é do gênero *Aspergillus*, espécie *A.niger*, conforme o manual de identificação de *Aspergillus* descrito por KLICH, (2002) e (PITT & HOCHING, 1997).
- As condições necessárias estudadas para melhor atuação do fungo foram: Temperatura de 30° C; pH 6,0 e Agitação e foi avaliado por sete dias para determinar o crescimento do fungo *Aspergillus niger*.
- O fungo apresentou uma degradação e desenvolvimento em meio de glicerina que foi confirmada através de análises das técnicas feitas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia em camada delgada (CCD) e Teste de viscosidade onde foi observado o consumo de glicerina pelo fungo, já que o mesmo consegue metabolizar a glicerina e converter em compostos de alto valor agregado e foi confirmada a biodegradação , corroborando a literatura.
- Conforme a espécie avaliada, foi confirmado que o fungo *Aspergillus niger* é indicado para o processo de conversão microbiológica de glicerina em meio de diferentes concentrações, devido a capacidade de degradação ou conversão microbiológica apresentada.
- Conclui-se, que o melhor meio de cultura do crescimento do fungo *Aspergillus niger* foi de 25% de glicerina apresentando também um crescimento nos outros meios de cultura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M. H.; Campos-Takaki, G. M.; Porto, A. L. F. & Milanez, A. I. (2002). Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal Microbiology*, 33, 225-230.

André, A.; Diamantopouloub, P.; Philippoussisb, A.; Sarrisa, D.; Komaitisa, M. & Papanikolaoua, S (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31, 407-416.

Atlas, R.M. (1981). Petroleum biodegradation and oil. *Spelbioremedition. MarisePollumtion Bulletin* 31(s): 178.182

Beatriz, A.; Araújo, F. & Lima. (2011). Glicerol: Um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. *Quim. Nova*, v. 34, n. 2, p. 306-319.

Blank, G., Yang, R. & Scanlon, G. (1998). Influence of sporulation aw on heat resistance and germination of *Penicillium roqufort* spores. *Food Microbiology*, 15, 151-156.

Cargnim, J. M. & Marcuzzo, L. L. (2014). Efeito da temperatura e do fotoperíodo no desenvolvimento in vitro e in vivo de *Aspergillus niger* em cebola. VII MICTI, Anais, 7, 1-5.

Castro, N.F.; Araújo, J.N.; Cordeiro, M.S.C. & Souza, W.S.B. (2006). Estudo da temperatura ótima para crescimento de fungos xilófagos em meio de cultura. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC, 58.

Cavalheiro, E. T. G.; Ionashiro, M. J.; Breviglier, S. T; Mariano, G. J. & Chaierice, J. O. (1995). A influência de Fatores experimentais em resultados de experimentos termogravimétricos. *Química Nova*. 18, 305-308.

Clerk, T.C. & Madelin, M.F. (1965). The longevity of three insect-parasiting Hyphomycetes. *Transactions British Mycological Society*. Cambridge, 48, 193-209.

Collins, Carol IH. H. et al (1995), *Introdução aos métodos cromatográficos*, 6ªed, Unicamp, Campinas.

Desgranges, C. & Durand, A. (1990). Effect of pCO₂ on growth, conidiation, and enzyme production medium solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. *enzyme microb technology*. 12, 546-555.

Dias, M.B, Pozza, E.A., Abreu, M.S. & Miranda, E.O. (2005). Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. *Ciência e Agrotecnologia*, 29, 545-552.

Durnin, et al. (2009). Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 103, 148-161.

Fang, Q. H. & Zhong, J. J. (2002). Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Progress*.18, 51-54.

Ferreira, J. B., Nascimento, G. O, Bessa, Y. Y., Neves, F. B. G. & Nascimento, L. O. (2012). Efeito da temperatura e óleos essenciais sobre o crescimento micelial de *Fusarium solani* isolado de mudas de *Euterpe oleracea* mart (açai). *Enciclopédia biosfera*, 8, 453-466.

Ghazaly, O. M. & E. Sayed. (2000). Oil spill. SPE International Conference on Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production. 26-28.

Granjeiro, et al (2005) Viscosidades de polpas concentradas de figo-da-Índia. *Revista Brasileira de Agrociência*. Pelotas, 2007. 6 p. ais. Unicamp, 2005.

Griffin, D.H. (1994). *Fungal physiology*. (1ª ed.) New York: Wiley-Liss, (Cap. 12).

Habe, H. et al. 2010). Use of a *Gluconobacter frateurii* Mutant to Prevent Dihydroxyacetone Accumulation during Glyceric Acid Production from Glycerol. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 74, p. 2330-2332.

Hong, W. K. et al. (2011). 1,3-Propanediol production by engineered *Hansenula polymorpha* expressing dha genes *Klebsiella pneumoniae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34, 231-236.

Hu, Z et al. (2010). Production of 1,3-dihydroxyacetone from Glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 340-345.

Ibrahim, M. H. A. & Steinbuchel, A. (2009). Poly(3-Hydroxybutyrate) Production from glycerol by *Zobellia denitrificans* MW1 via High-Cell-Density Fed-Batch Fermentation and Simplified Solvent Extraction. *Applied and environmental Microbiology*, 75, 6222-6231.

Ito, T. et al. (2005). Hydrogen and Ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 260-265.

Kim, G.Y., et al. (2006). Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide protein complex extracted from *Phellinus linteus*. *Biosciences, Biotechnology, Biochemistry*, 70, 1218–1226.

Klich, M.A. (2001). Identification on common *Aspergillus* Species. (1ª ed.). Amsterdam: Centraalbureauvoor Schimmelaucture, 4.

Koneman, et al. (2001). *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. (5ª ed.) Rio de Janeiro: MEDSI, (Cap. 21).

- Legisa, M. & Matthey, M. (1986). Glycerol as an initiator of citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 8, p. 258-259.
- Liguori, R.; Amore, A. & Faraco, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Appl Microbiol Biotechnology*, 97, 6129 –6147.
- Lopes, M. F., Messiano, G. B. & Nardi, C. P. (2017). Biotransformação do glicerol por espécies de *Aspergillus*. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 6, 08-14.
- Misha, B.K. & Lata, A.A. (2004). Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 94, 9-12.
- Mota, C. J. A.; Silva, C. X. A. & Gonçalves, V. L. C. (2009). Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Química Nova*, 32, 639-648.
- Németh, A.; Kupcsulik B. & Sevelle B. (2003). 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 659–663.
- Oliveira, S.M.C.(2000). Exigências físicas e nutricionais para produção de *Sporothrix insectorum* em meios de cultura líquidos. Jaboticabal: 45. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Univ. Estadual Paulista].
- Oliveira, R. C.; Barros, S. T. D. & Rossi, R. M. (2009). Aplicação da metodologia Bayesiana para o estudo reológico da polpa de uva. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande, 8 p.
- Oliveira, J. A. (1991). Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.). Dissertação de Mestrado em Fitossanidade. Escola Superior de Agricultura de Lavras.
- Pastore, N. S., Hasan, S. M. ,& Zempulski, D. A. (2011). Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. *Engevista*, 13, 149-159.
- Penariol, M. C. et al. (2008). Produção de *Bipolariseuorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grãos e resíduos agroindustriais. *Bragantia*, v.67, 805-814.
- Petrov, K. & Petrova, P. (2010). Enhanced production of 2,3-butanediol from glycerol by forced pH fluctuations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, 943-949.
- Rasooli, I. & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15, 479-483.

Read, N. D. (1991). Low-temperature scanning electron microscopy of fungi and fungus-plant interactions. In: *Electron Microscopy of Plant Pathogens* (ed. by K. Mendgen & D.-E. Lesemann), 17-29.

Ribeiro, L. D.; Da Cruz, S. R. A. & Reis, R. A. (2008). Cálculo de viscosidade de misturas não eletrolíticas. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 6º, Campinas.

Rymowicz, W. et al. (2010). Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowialipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 971-979.

Samson, R. A et al. (2001). Common and important species of fungi and actinomycetes. In: B. Flannigan, R. Z. & A. Samson (Eds.), *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments* (pp. 287-292). New York: Taylor & Francis.

Sant'ana Júnior, G. L. (2001). Produção de enzimas microbianas. In: U. A., LIMA, E. Aauarone, W. Borzani & W. Schmidell, W. (Eds.). *Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos* (pp. 351-362). São Paulo: Edgard Blücher.

Santaella, S. T. et al. (2009). Tratamento de efluentes de refinaria de petróleo em reatores com *Aspergillus niger*. *Engenharia Ambiental e Sanitária*, 14, 139-148.

Shames, I. H. (1999) *Mecânica dos Fluidos – volume 1*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 192 p. ISBN: 852-120-170

Silva, G. P.; Matthias M. & Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30–39.

Silverstein M.R., Webster X. F, Kiemle J.D. (2005), "Spectrometric identifications of organic compounds". Seventh Edition. New York

Silverstein, R.M; Webster, F.X. & Kiemle, D.J., (2007). *Identificação espectrométrica de composto Orgânicos*. 7ª Ed, Rio de Janeiro: LTC.

Taconi, K. A.; Venkataramanan, K. P. & Johnson, D. T. (2009). Growth and Solvent Production by *Clostridium pasteurianum* ATCC (R) 6013 (TM) Utilizing Biodiesel-Derived crude Glycerol as the Sole Carbon Source. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 28, 100-110.

Tang, X. M. et al. (2009). Microbial Conversion of Glycerol to 1,3-Propanediol by an Engineered strain of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1628-1634.

Valliyappan, T.; Bakhshi, N. N. & Dalai, A. K. (2008). Pyrolysis of glycerol for the production of hydrogen or syn gas. *Bioresource Technology*, 99, 4476-4483.

Venegas, I. M. et al.(2013). Characteristics of *Aspergillusniger*xylanases produced on rice husk and wheat bran in submerged culture and solid-state fermentation for na applicability proposal. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1798-1807.

Venter, T et al. (2004). Acetate enhances citric acid production by *Yarrowialipolytica* when grown on sunflower oil. *System Applied Microbiology*, 27, 135–138.

Victorino, T. R.; Pereira, R. G. & Fiaux, S. B. (2016). Aproveitamento da glicerina de biodiesel obtida a partir de óleo de fritura para o cultivo do fungo *aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*,42, 56-66.

Watanabe, et al. (2007) *Bioresour. Technol.* 2007, 98, 1285.

Wenzel, I.M.; Almeida, J.E.M. & Cardoso, E.R. (2005). Efeito de diferentes concentrações de dextrose e extrato de levedura no desenvolvimento do fungo entomopatogênico *Lecanicilliumlecanii* em fermentação líquida. *Arquivos do Instituto Biológico*, 72, 127-131.

Wenzel, I.M. (2002). Fatores nutricionais e produção em massa de *Verticilliumlecanii* em meios naturais líquidos e sólidos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista.

Wu, J. Z., et al. (2004). Studies on the submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer: 1. Physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry*, 81, 389-393.

Xavier, O. M. et al. (2008). Contaminação do ar por *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. *Brazilian Journal Veterinary Reseach*, 45, 174-179.

Yazdani, S. S & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 213-219.

Yuzbashev, T. V. et al. (2010). Production of Succinic Acid at Low pH by a Recombinant Strain of the Aerobic Yeast *Yarrowialipolytica*. *Biotechnology and Bioengineering*, 107, 673-682.

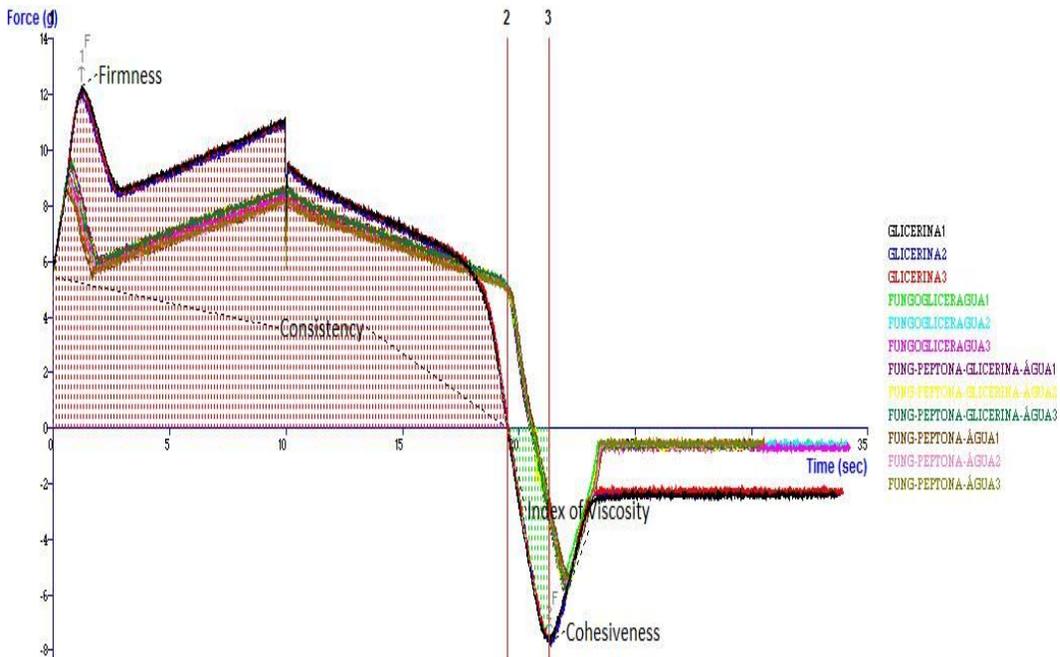
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados, discussões e conclusões abordadas nesta pesquisa, algumas sugestões e perspectivas para trabalhos futuros devem ser destacadas, incluindo:

- Analisar os produtos fixos das amostras glicerina/fungo/peptona/água milique-Q. Utilizando a técnica cromatografia gasosa - (CG).
- Investigar se estes materiais apresentam potencial biodegração em meio de glicerina, através ressonância magnética nuclear- (RMN).
- Verificar a influência de diferentes concentrações de glicerina utilizando outros microrganismos para observar o comportamento deste em meio glicerina.
- Estender as pesquisas para produzir um novo produto polímero a partir dos compostos voláteis (acetona, propanol, butanol, 3- metil-butanal e 2- metil- butanol) da amostra fungo/glicerina/peptona/água que foi obtido na cromatografia gasosa (CG).
- Estender a pesquisa a outros microrganismos com utilização da glicerina comercial e outras substâncias químicas (quitosana e celulose) com o fungo *Aspergillus niger*.

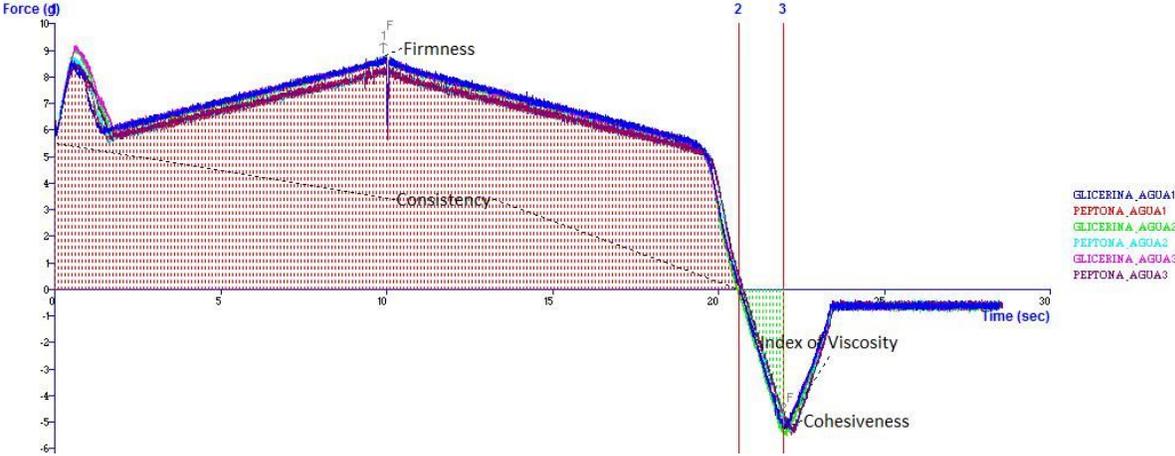
7 – APENDICE

APENDICE 1- Teste de Viscosidade das amostras glicerina comercial, fungo/glicerina/água, fungo/peptona/água e fungo/peptona/glicerina/água.



Fonte: Autor (2017)

APENDICE 2- Teste de Viscosidade das amostras: glicerina/água e peptona/água



Fonte: Autor (2017)