



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUALIDADE AMBIENTAL



EVELYN SIQUEIRA CAIXETA

**APLICAÇÃO DE FUNGO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COMO
ALTERNATIVA DE BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUO DE ÓLEO DE
COZINHA**

Uberlândia/MG
Fevereiro/2019

EVELYN SIQUEIRA CAIXETA

**APLICAÇÃO DE FUNGO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COMO
ALTERNATIVA DE BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUO DE ÓLEO DE
COZINHA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental – Mestrado, área de concentração em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia/MG
Fevereiro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C138a Caixeta, Evelyn Siqueira, 1990
2019 Aplicação de fungo em fermentação submersa como alternativa de biodegradação de resíduo de óleo de cozinha [recurso eletrônico] / Evelyn Siqueira Caixeta. - 2019.

Orientador: Edgar Silveira Campos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1268>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Qualidade ambiental. 2. Biodegradação. 3. Fungos. 4. Resíduos. I. Campos, Edgar Silveira, 1981, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental. III. Título.

CDU: 574



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUALIDADE AMBIENTAL



EVELYN SIQUEIRA CAIXETA

**APLICAÇÃO DE FUNGO EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA COMO
ALTERNATIVA DE BIODEGRADAÇÃO DE RESÍDUO DE ÓLEO DE
COZINHA.**

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos – Orientador - UFU

Prof. Dr. Diego Freitas Coêlho - UNICAMP

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho - UFU

Prof. Dra. Adriane Andrade Silva - (Suplente) - UFU

Uberlândia/MG
Fevereiro/2019

**“A persistência é o menor caminho do
êxito”.**

(Charles Chaplin)

“Aos meus pais e irmãos por serem fontes de amor,
inspiração e conquistas, dedico não só este trabalho
mas toda a minha vida...”

AGRADECIMENTOS

Sou grata às pessoas que em algum momento deste curso me estenderam a mão e digo que por mais que esta dissertação seja fruto de meu suor e perseverança, não seria possível sem a ajuda daqueles que, sob o olhar divino, me ajudaram a caminhar. Aprendi que boas vibrações e pensamentos positivos nos levam adiante na vida e faz-nos aproximarmos das pessoas certas durante os momentos árduos.

Primeiramente sou grata aos meus pais Edson e Gilma, por me fornecerem todo tipo de suporte, dando-me força espiritual e orientando-me à driblar as dificuldades sem faltar com respeito aos colegas e professores. Aos meus irmãos, Gustavo e Karina por serem divertidos o tempo todo, me ajudando a transformar os objetivos em conquista e me transmitindo paz nos momentos de angústia e ansiedade. À minha sobrinha Júlia, pela sua meiguice, doçura e palavras sinceras ditas quando eu mais precisava. Isto é amor!

À minha querida avó Orlandina, aos meus tios e à minha amada prima e amiga Aline , que em todos os momentos mantiveram suas orações fervorosas e seus olhares de carinho e cuidado sobre mim.

Às amigas de longa data, as quais, propiciaram-me momentos felizes de descontração e descanso quando eu mais necessitei, fazendo com que eu vencesse mais uma semana de cansaço e estudo.

Aos queridos colegas de classe pela companhia rápida, porém, intensa durante os dois anos. Desejo sucesso a todos! Em especial, agradeço ao Gabriel e Juliana, que de algum modo se preocuparam com o meu bem estar e me propuseram soluções para os momentos de conflito acadêmico.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), à Pró-reitora de Pesquisa e Pós Graduação (PROPP-UFU), ao Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) e ao Programa de Pós Graduação em Qualidade Ambiental – UFU pelo incentivo à pesquisa em desenvolvimento sustentável e ambiental.

Por fim, agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro durante os 24 meses de curso e fomento na consolidação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Qualidade Ambiental e demais programas no Brasil.

RESUMO

CAIXETA, EVELYN SIQUEIRA. **Aplicação De Fungo Em Fermentação Submersa Como Alternativa de Biodegradação de Resíduo de Óleo de Cozinha. 2019. 60 p.** Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG

A geração atual tem produzido uma grande quantidade de resíduos de óleo de fritura, exigindo-se que seja feita a reciclagem deste óleo como caminho para a disposição ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar em três etapas o consumo de gordura pelos fungos denominados ESC 01, ESC 02 e ESC 03 em fermentação submersa em fase aeróbia e anaeróbia, bem como analisar variáveis associadas à biodegradação. Os três fungos foram isolados de resíduo de óleo de cozinha usado por meio de esfregaço em meio Czapek. Após esse processo, o melhor fungo degradador de gordura foi selecionado na Etapa 1 por análise de gravimetria e nas Etapas 2 e 3, foi exposto à condição aeróbica e anaeróbica, respectivamente, durante 6 dias cada. Parâmetros como Tensão Superficial (T.S), Índice de Emulsificação (querosene, óleo sintético, óleo usado, óleo novo), pH, Temperatura e Unidades Formadoras de Colônia foram medidos para checar a viabilidade e aplicabilidade deste fungo em biodegradar. Dentre os 3 fungos diferentes, o que melhor consumiu o resíduo de óleo na Etapa 1 foi o ESC 01 (99%), sendo que de modo aeróbio na Etapa 2, conseguiu reduzir em média 76% do percentual inicial de gordura no tempo estudado e sob modo anaeróbio, observou-se que o fungo reduziu cerca de 30% no mesmo tempo. Sobre os parâmetros avaliados, e de modo aeróbio, apenas o pH obteve forte correlação com o tempo, e as demais variáveis não foram explicadas proporcionalmente às horas de análise. Anaerobicamente, os parâmetros de T.S, pH e I.E para querosene mostraram forte correlação com o tempo. Portanto, no tocante à degradação da gordura pelo fungo ESC01, o ideal é que ele seja aplicado em condição aeróbica e para processos de emulsificação o ideal é que ele seja aplicado sob condição anaeróbica. Nas duas etapas o fungo elevou a tensão do meio proporcionalmente à diminuição do pH.

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação. Fungos. Gordura. Resíduo.

ABSTRACT

CAIXETA, EVELYN SIQUEIRA. **Application of Fungus in Submerged Fermentation as an Alternative to Biodegradation of Waste Cooking Oil. 2019. 60 p.** Dissertation (Master Environmental Quality) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia - MG

The current generation has been producing a large amount of frying oil waste, requiring its recycling for better environmental disposal. This study aimed to evaluate in three steps the fungi fat consumption denominated ESC 01, ESC 02, and ESC 03 in submerged fermentation, as well as to analyze variables associated with biodegradation. The three fungi were isolated from cooking oil waste by smearing on Czapek medium. After this process, the best fat-degrading fungus was selected in Step 1 by gravimetric analysis and in Steps 2 and 3, it was exposed to aerobic and anaerobic condition, respectively, for 6 days each. Parameters such as Surface Tension (S.T), Emulsifying Activity (kerosene, synthetic oil, used oil, new soil oil) pH, Temperature and Colony Forming Unit (CFU) were measured to check the feasibility and applicability of this fungus in biodegradation. Among the 3 different fungi, the ESC 01 (99%) was the one that best consumed the oil waste in Step 1, and in aerobic condition in Step 2, the fungus reduced on average 76% of the initial fat percentage during the time evaluated and under anaerobic condition it was observed that the fungus reduced about 30% at the same time. On the evaluated parameters, in the aerobic condition, only the pH showed strong correlation with time, as the other variables were not explained proportionally to the hours analyzed. In the anaerobic condition, the S.T, pH and E.A for kerosene showed a strong correlation with time. Therefore, regarding the degradation of fat by the ESC01 fungus, the ideal is that it is applied in a aerobic condition and for emulsification processes, ideally it should be applied in the anaerobic condition. In two stages the fungus raised the medium tension in proportion to the decrease in pH.

KEY WORDS: Biodegradation. Fungi. Fat. Waste.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de triglicerídeo (R1/R2/R3:cadeias de ácidos graxos).....	4
Figura 2 - Características do óleo antes, durante e após uso excessivo.....	5
Figura 3 - Estrutura química de alguns ácidos graxos de óleo vegetais.....	6
Figura 4 - Borra do óleo de cozinha usado.....	18
Figura 5 - Óleo residual coletado na empresa Seeds Oil.....	19
Figura 6 - Repique em Capela- 02 e 03/2018.....	21
Figura 7 - Culturas iniciais 01/2018.....	22
Figura 8 - Três culturas puras de fungos 03/2018.....	22
Figura 9 - Shaker contendo Erlenmeyers.....	23
Figura 10 - Rotaevaporador.....	24
Figura 11 - Fase de coleta de solvente contendo a gordura após 24h.....	25
Figura 12 - Coleta de amostras para medição de Tensão Superficial.....	26
Figura 13 - Tensiômetro KRUSS® Educacional k6 (a e b).....	26
Figura 14 - Ponteiras.....	27
Figura 15 - Tubos de Ensaio usados na Emulsificação.....	28
Figura 16 - Meio contendo Micélios (48h).....	29
Figura 17 - Diluições Seriadas.....	29
Figura 18 - Distribuição em placas.....	30
Figura 19 - Contabilização de unidades viáveis.....	36
Figura 20 - Selecionado: ESC 01.....	38
Figura 21 - Querosene emulsificado.....	43
Figura 22 - Óleo novo não emulsificado.....	43
Figura 23 - Óleo Sintético emulsificado.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Caracterização de Compostos por Espectroscopia no Infravermelho.	33
Gráfico 2 - Quantidade média de gordura não degradada por cada fungo- Etapa 1	37
Gráfico 3 - Quantidade média de gordura não degradada pelo fungo na Etapa 2-144h	39
Gráfico 4 - Avaliação da Tensão Superficial Tempo/Média-Etapa 2	40
Gráfico 6 - Média de pH / tempo-Etapa 2	41
Gráfico 7 - Média de temperaturas durante os 6 dias-Etapa 2	41
Gráfico 8 - Percentual de Emulsificação por tempo-Etapa 2	42
Gráfico 9 - Representação da variável y2(pH).....	46
Gráfico 10 - Quantidade média de gordura não degradada pelo fungo na Etapa 3-144h	47
Gráfico 11 - Avaliação da Tensão Superficial Tempo/Média -Etapa 3	47
Gráfico 12 - Média de pH/ tempo Etapa 3	48
Gráfico 13 - Média das temperaturas durante os 6 dias- Etapa 3.....	48
Gráfico 14 - Percentual de Emulsificação por tempo-Etapa 3	49
Gráfico 15 - Representação da variável z1 (T.S).	51
Gráfico 16 - Representação da variável z2 (pH).....	52
Gráfico 17 - Representação da variável z3 (Querosene).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio de Cultura Czapek.	20
Tabela 2 - Classificação do percentual de óleos e graxas presentes na amostra.....	32
Tabela 3 - Associação do Comprimento de Onda e Absorbância do Gráfico 1.....	35
Tabela 4 - Redução média por cada fungo em gramas (g) e porcentagem- Etapa 1.....	37
Tabela 5 - Interpretação do Gráfico 8 (Médias em porcentagem).	42
Tabela 6 - Resposta estatística- Etapa 2.	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	PRODUÇÃO E COMÉRCIO DE ÓLEO VEGETAL	3
2.2	CONSUMO , DESCARTE DO ÓLEO DE FRITURA E IMPACTO AMBIENTAL	4
2.3	FERMENTAÇÃO SUBMERSA: O USO DE MICROORGANISMOS COMO ALTERNATIVA PARA DEGRADAR SUBSTÂNCIAS HIDROFÓBICAS.	10
2.4	FUNGOS: CLASSIFICAÇÃO E CONSIDERAÇÕES	11
2.5	O USO DE SURFACTANTES COMO TENSOATIVOS NA INDÚSTRIA	13
2.6	BIOSURFACTANTES	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	LABORATÓRIO DE APLICAÇÃO DA PESQUISA:	17
3.2	ETAPAS DA PESQUISA:.....	17
3.3	SUBSTRATO: BORRA	18
3.4	MICROORGANISMOS.....	19
3.5	FERMENTAÇÃO SUBMERSA	23
3.6	PARÂMETROS DO EXPERIMENTO	24
3.6.1	<i>Gravimetria</i>	24
3.6.2	<i>Determinação da Tensão Superficial</i>	25
3.6.3	<i>pH e Temperatura</i>	27
3.6.4	<i>Índice de emulsificação (I.E.)</i>	27
3.6.5	<i>Unidades Formadoras de Colônia (UFC)</i>	28
3.6.6	<i>Análises Estatísticas</i>	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ANÁLISE COMPOSICIONAL DA PARTE OLEOSA DO SUBSTRATO.	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DO ÓLEO	33
4.3	UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC).....	36
4.4	ETAPA 1: SELEÇÃO DO FUNGO POR ANÁLISE DE GRAVIMETRIA	36
4.5	ETAPA 2: FERMENTAÇÃO SUBMERSA AERÓBICA E ANÁLISE DE GRAVIMETRIA.	38
4.5.1	<i>Determinação da Tensão Superficial (T.S)</i>	39

4.5.2	<i>pH e Temperatura</i>	40
4.5.3	<i>Índice de Emulsificação</i>	42
4.5.4	<i>Análises estatísticas -Etapa 2</i>	44
4.6	ETAPA 3: FERMENTAÇÃO SUBMERSA ANAERÓBICA E ANÁLISE DE GRAVIMETRIA	46
4.6.1	<i>Determinação da Tensão Superficial</i>	47
4.6.2	<i>pH e Temperatura</i>	48
4.6.3	<i>Índice de Emulsificação</i>	49
4.6.4	<i>Análises estatísticas- Etapa 3</i>	50
5	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Grande parte das poluições ambientais são ocasionadas por atividades humanas e ocorrem de forma direta ou indireta, através de processos industriais e comerciais que acontecem com bastante frequência em todas as regiões do mundo. Por informações mostradas pelas mídias, percebe-se que os órgãos ambientais não conseguem lidar com tantas apreensões que devem ser realizadas e além do mais, as punições não são severas o suficiente para mostrar ao homem que a continuidade dos recursos naturais que até o momento suportaram o seu desejo pelo lucro desmedido, já está intensivamente afetada e desgastada.

O desenvolvimento urbano faz com que o consumo de produtos de origem industrial se torne desenfreado, refletindo diretamente no aumento da geração de materiais compostos por substâncias de difícil degradação. Toma-se como exemplo os resíduos agroindustriais de origem oleosa. Sabe-se que esses compostos não degradam rapidamente quando lançados no solo ou na água e que a geração excessiva desses resíduos nas cidades é fruto do pós-consumo, sendo bastante influenciada pelo comércio local e sempre associada às condições sócio culturais (estilo de vida) ou econômicas (modo de consumo).

O óleo de cozinha usado é um resíduo gerado em grandes quantidades durante o processo de preparação de alimentos e se descartado sem reaproveitamento, pode gerar sérios problemas ecológicos (ALBERICI et al., 2012). Para minimizar essa desestabilização ecológica e gerar lucro, um dos caminhos é o reaproveitamento através da conversão deste óleo em biodiesel (D'AGOSTO et al., 2015).

Atualmente, algumas empresas de reaproveitamento de resíduos oleosos vem surgindo nas grandes cidades para que um pré tratamento seja realizado e para que tenham uma destinação final adequada. Em Uberlândia-MG, cidade que abriga cerca de 683 mil habitantes de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), produz cerca de 150 toneladas/mês (informação verbal)¹ de óleo de cozinha usado, principalmente por processos de fritura. A empresa Seeds Oil que trabalha com a coleta e reaproveitamento deste tipo de resíduo, consegue coletar em torno de 30 toneladas/mês de óleo usado e deste montante, em torno de 2 mil kg são de matéria orgânica de restos alimentícios (borra). Atualmente, a única forma destinação encontrada pela Seeds Oil para descarte desta matéria orgânica, é o processo de incineração que tem sido feito pela Central de Tratamento de Resíduos Sólidos Industriais de Uberlândia (CETRIC) que produz biogás.

¹ Informação fornecida por Luciano Teixeira, dono da Seeds Oil, microempresa que recicla óleo de cozinha usado como meio de promover a logística reversa.

Para criar novos meios de destinação e promover qualidade ambiental, os pesquisadores buscam encontrar métodos naturais que revertam ou minimizem contaminações que possam ameaçar drasticamente a vida do ser humano ou do meio ambiente. Para tanto, novas técnicas de biodegradação advindas de processos biotecnológicos têm sido elaboradas devido a grande habilidade e capacidade de adaptação de microrganismos em ambientes contaminados. Tais técnicas buscam através dos estudos, comprovar a aplicabilidade do uso de metabólitos secundários de microrganismos, pois, eles tendem a auxiliar tanto na decomposição de elementos químicos como na solubilização de substâncias imiscíveis entre si. Estes metabólitos, são nomeados biossurfactantes e possuem a capacidade de agir com rapidez na interface entre meios de diferentes estruturas, gerando uma emulsão e facilitando uma decomposição natural. Possivelmente podem diminuir ou até mesmo substituir o uso de surfactantes de origem química quando em contato com substratos que estimulam sua ações metabólicas.

O interesse nesses biossurfactantes produzidos por microrganismos, têm aumentado devido também ao seu potencial como intensificador na recuperação avançada do petróleo. Uma gama de seus subprodutos têm sido avaliadas sobre as propriedades de atividade superficial e assim, vem sendo sugeridos o seu uso em detrimento aos surfactantes sintéticos. No que se refere às questões econômicas, há indícios de que os biossurfactantes possam ser produzidos de forma mais barata, desde que sejam utilizados substratos renováveis, baratos e em técnicas de fermentação (SANTOS et al., 2014). O tratamento biológico por fungos e outros microrganismos pode reduzir compostos orgânicos, inorgânicos e xenobióticos à formas menos tóxicas, podendo até mesmo ser aplicado em descontaminação de águas superficiais.

Aplicou-se neste trabalho primeiramente, um tratamento biológico em duas etapas, pelas quais, de modo aeróbio e anaeróbio um fungo isolado do resíduo coletado foi selecionado e avaliado quanto à sua eficácia na degradação deste mesmo resíduo que é rico em ácidos graxos e carbono e possui alto poder de contaminação, que é intensificado pelo descarte rotineiro em de pias de bares, restaurantes e lares. Este é indubitavelmente muito nocivo aos corpos hídricos, além de, ao chegar nas estações de esgoto dificultar e encarecer os processos de tratamento.

Portanto, este estudo objetivou propor uma alternativa que acelere a degradação de resíduo oleoso denominado de borra, verificando através de análises físico-químicas a diminuição do percentual de gordura pelo fungo selecionado no período de 6 dias, avaliando-o quanto à modificação dos parâmetros de tensão superficial, ph, temperatura e índice de emulsificação a partir da fermentação submersa, fatores estes que demonstram influencia na viabilidade do fungo em processos de degradação e descontaminação do meio ambiente.

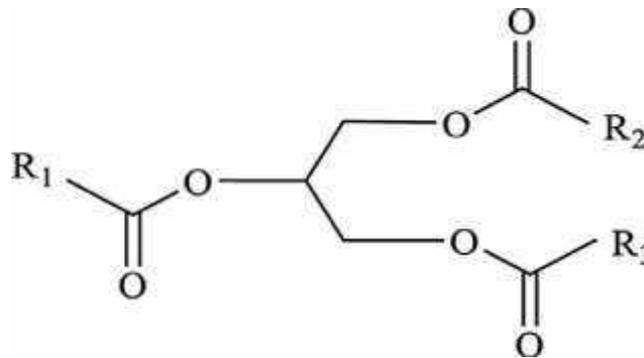
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção e comércio de óleo vegetal

De acordo com Zhang et al., (2017), fontes de óleo vegetal estão disponíveis em todo mundo pois quase todas as plantas produzem óleo, principalmente através de suas sementes. O autor discorre que a soja representa cerca de 60% da produção total de oleaginosas no mundo e que em 2015 a produção global superou a casa dos 317 milhões de toneladas. Isto acontece, pois, a soja está dentre as oleaginosas que possuem os preços mais econômicos para uso em larga escala em produtos comerciais e que 15% da produção deste tipo de óleo é usado especificamente em aplicações industriais. Afirma também que a maior parte do suprimento mundial deste tipo de óleo é produzido na América do Norte (Estados Unidos) e na América do Sul (Brasil e Argentina), países que lideram as exportações. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias produtoras de Óleo Vegetais (ABIOVE) , no ano de 2017 só a produção de óleo de soja no Brasil, foi cerca de 8,10 milhões de toneladas (t) e o consumo no país foi cerca de 6,80 milhões de toneladas. Um pouco a mais do que em 2016, que registrou um consumo de 6,50 milhões t (ABIOVE, 2016). Portanto, percebe-se que nos últimos dois anos tanto a produção quanto o consumo está em crescimento constante.

Os óleos e gorduras podem ser originários de fonte vegetal ou animal, estruturados quimicamente por ésteres de triacilgliceróis sendo insolúveis em água (hidrofóbicos) (ABREU; PEREIRA; RIOS, 2013). Segundo Sharmin et al., (2015), os óleos vegetais são considerados um dos componentes mais importantes da biomassa e são formados por triésteres de ácidos graxos e glicerol (insaturados e saturados). Cerca de 93 a 98% da composição em peso é formada por triglicerídeos e o restante é considerado a parte de menor importância, sendo formada por fosfoglicerídeos, monoglicerídeos e diglicerídeos.

Figura 1 - Estrutura de triglicerídeo (R1/R2/R3:cadeias de ácidos graxos)



Fonte: Zhang et al. (2017)

Percebe-se, portanto, que a produção e o comércio de óleos vegetais está diretamente conectada tanto ao alto consumo de óleos comestíveis quanto também ao interesse aumentado de uso substitutivo relacionado à produtos à base de óleo mineral (SALAM; SUIDAN; VENOSA, 2016). Portanto, preocupações referentes ao modo de descarte devido ao impacto ambiental que óleos podem causar, são fundamentais no processo de tomada decisões sobre a de qualidade ambiental.

2.2 Consumo , descarte do óleo de fritura e impacto ambiental

É notório que no Brasil ainda não há consciência e conhecimento sobre leis e propostas que tratem sobre descarte de óleo. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) possui cerca de dez recomendações sobre o uso e descarte do óleo de cozinha pelos estabelecimentos comerciais. Uma destas recomendações é não descartá-lo na rede pública e com relação aos comerciantes e redes de fast food que necessitam de descartar uma grande quantidade, é indicado que eles entrem em contato com empresas ou entidades licenciadas pelos órgãos competentes da área ambiental . Esta recomendação faz parte do Informe Técnico nº11, de 5 outubro de 2004, que foi criado em resposta à uma documentação recebida na ANVISA pela Associação de Defesa do Consumidor (IDEC) que requereu participação nas ações para a criação de Norma Brasileira que disponha sobre a utilização e descarte de óleos e gorduras utilizados para fritura (ANVISA, 2004).

No Brasil, a população chega a consumir aproximadamente três bilhões de litros de óleo de fritura por ano. Um dos fatores que contribui para este alto consumo, é a cultura culinária

local, como é o caso do estado de Espírito Santo que consome cerca de 150 milhões de litros de óleo vegetal por ano (COSTA; LOPES G.; LOPES J., 2015).

Outro fator que propicia o alto consumo, é a mudança dos hábitos alimentares da população que, devido a modernidade e falta de tempo passaram a valorizar uma alimentação de preparo prático, mais rápido e saborosas, como é o caso das frituras. Ao sofrer intenso aquecimento, os óleos sofrem ação também do oxigênio do ar. Com isto, alterações químicas e oxidativas no óleo ocorrem e peróxidos são formados, sofrendo decomposição e formando produtos secundários (aldeídos, alcoóis, cetonas e hidrocarbonetos) o que colabora para mudanças no sabor, no odor e escurecimento da coloração, típicos de um óleo oxidado. Características como formação de espuma, diminuição da insaturação total, aumento de teor de ácidos graxos livres, também são inerentes à oxidação do óleo de fritura (ABREU; PEREIRA; RIOS, 2013). Estes fatores pós aquecimento estão associadas com a presença de compostos não polares resultantes dos alimentos solubilizados e da oxidação do produto (FREIRE; MANCINI; FERREIRA, 2013).

Figura 2 - Características do óleo antes, durante e após uso excessivo



Fonte: Oliveira , et al. (2008)

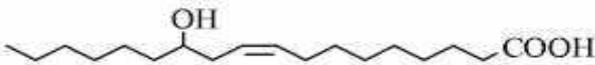
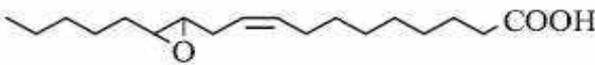
Somente quando o óleo se encontra viscoso, com sabor ruim e coloração escurecida os estabelecimentos passam a descartá-lo, ou seja, há um uso excessivo e continuado deste óleo no preparo dos alimentos, o que pode comprometer a qualidade do produto devido à oxidação (HOCEVAR, 2005).

Devido, portanto, à presença de substâncias não polares oriundas dos processos químicos dos óleos e gorduras submetidos à altas temperaturas, ter a consciência sobre quando e como o descarte deve ser realizado associado ao grau de oxidação destes produtos pode contribuir para que práticas saudáveis ao ambiente sejam estabelecidas. Além do mais, atualmente há uma gama de análises capazes de determinar o grau de oxidação de um óleo, e

partir disto identificar a presença de peróxidos, bem como dos seus produtos secundários como os aldeídos ou também quantificar o número de ácidos graxos livres auxiliando na detecção da oxidação lipídica (ABREU; PEREIRA; RIOS, 2013). Sendo assim, torna-se possível propor práticas e soluções no tocante à preservação do meio ambiente quando se trata do descarte de óleos e gorduras.

Os óleos vegetais, podem constituir cadeias de 8 a 24 carbonos e entre 0 a 7 ligações duplas de carbono-carbono, a depender do tipo de planta e condições climáticas (ZHANG et al., 2017).

Figura 3 - Estrutura química de alguns ácidos graxos de óleo vegetais

Fatty acids	Formula	Structure
Caprylic	$C_8H_{16}O_2$	
Palmitic	$C_{16}H_{32}O_2$	
Stearic	$C_{18}H_{36}O_2$	
Oleic	$C_{18}H_{34}O_2$	
Linoleic	$C_{18}H_{32}O_2$	
Linolenic	$C_{18}H_{30}O_2$	
Ricinoleic	$C_{18}H_{34}O_3$	
α -Eleostearic	$C_{18}H_{30}O_2$	
Vernolic	$C_{18}H_{32}O_2$	

Fonte: Zhang et al. (2017)

A *United States Environmental Protection Agency* (EPA) (2018) explicita que os óleos em geral, quer sejam de origem animal, vegetal ou derivados de petróleo, compartilham de propriedades e constituintes físico químicos que podem produzir no ambiente efeitos deletérios caso haja derramamento. Tais efeitos são citados pela agência: Adesão do óleo ao epitélio dos animais e penas de ave, sufocando-os por depleção de oxigênio; Alta toxicidade; Possui efeito intensivo de combustão; Destrói habitats e produz de odores; Contamina a parte costeira do continente e faz com que as moléculas fiquem aderidas ao meio por muito tempo.

Dessa forma, o amplo uso do óleo de cozinha nos restaurantes, bares e empresas de grandes cidades, evidencia a necessidade de se preocupar com o meio ambiente no que diz respeito ao despejo de resíduos altamente poluidores. Os óleos além de possuir em sua composição química cadeias carbônicas longas (são moléculas de difícil degradação), é

frequentemente descartado de forma inadequada em ralos de pias o que pode provocar entupimentos nas tubulações de esgoto e encarecer os processos de tratamento (RABELO; FERREIRA, 2008). Segundo Klingelfus (2011), é fundamental salientar que o óleo de cozinha usado, caso seja lançado na pia pode causar vários danos à rede de esgoto além de aumentar a necessidade do uso de produtos químicos com conteúdo tóxico para tentar reverter tais danos. Um dos problemas consequentes deste lançamento é citado pela autora: permanência da gordura no encanamento o que pode ocasionar o entupimento das tubulações, principalmente quando não há separação por uma estação de tratamento e saneamento básico.

O Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) detectou no ano de 2013, 1,2 mil entupimentos de rede por causa do descarte do óleo de cozinha incorretamente no sistema de esgoto e com isso, foram gastos mais de R\$ 600 mil para solucionar os problemas causados por esse produto (NOGUEIRA, 2014). A quantidade de óleos e graxas que chegou na estação de tratamento de esgoto de Uberlândia-MG em 2015 foi em média 240 litros por hora, sendo considerado uma quantidade significativa e de grandes alcances para prejudicar o processo, alcançando cerca de 8,5% do percentual total de esgoto coletado (MAGALHÃES et al., 2015).

A partir do que foi supracitado sobre a composição química dos óleos vegetais e mostrado na figura 2 deste trabalho, Costa Filho (2011) diz que os óleos possuem grande potencialidade de contaminar ambientes e estão classificados na Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT) NBR 10004:2004 como resíduos perigosos (Classe I) por apresentarem em sua composição, substâncias com caráter tóxico, corrosivo, inflamável ou patogênico. É sabido que quantidades ínfimas de óleo são suficientes para provocar danos relevantes ao meio ambiente, pois, com apenas um litro de óleo lançado no meio, o oxigênio presente em 1 milhão de litros d'água pode se esgotar rapidamente, dificultando a sobrevivência de seres vivos destes habitats.

Pela Resolução nº 430 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 2011, que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, nas águas doces de classe 4 toleram-se iridescências e nas classes 1, 2 e 3 os óleos e graxas deverão ser virtualmente ausentes, no entanto, caso haja derramamento, os limites para óleos e graxas são:

1. óleos minerais: até 20mg/L;
2. óleos vegetais e gorduras animais: até 50mg/L;
3. ausência de materiais flutuantes;

De acordo com a Ecóleo (2018) os rios e lagos são atingidos todos os meses com o derramamento de mais de 200 milhões de litros de óleo e além de ser um grande poluidor de água doce, também foi considerado o maior poluidor de águas salgadas das regiões brasileiras,

causando um impacto ambiental absurdo. Não obstante, 1 tonelada de óleo liberado no ambiente representa o equivalente à uma carga poluidora de uma população de 40.000 habitantes. Oliveira et al. (2009), discorre sobre vários danos referentes ao lançamento de óleo usado no ambiente:

- a- Nas estações de tratamento de esgoto, o óleo onera cerca de 45% o serviço, pois atrapalha o desempenho dos biodigestores anaeróbios e decantadores que conseqüentemente aumentam a carga orgânica, gerando mais lodo e espuma;

- b- Perda de desempenho dos reatores aeróbio devido a alterações no pH;

- c- Afeta as comunidades aquáticas, pois, o óleo sobrenada devido à diferença de densidade, prejudicando a entrada da luz, reduzindo a interface ar-água, diminuindo as trocas gasosas e, conseqüentemente, a oxigenação do corpo hídrico;

- d- Com relação à questões sociais, o desperdício impede que este óleo produza renda e bens de valor através de processos de reciclagem;

Desse modo, Araújo et al. (2016), explicita que uma das formas corretas para tratamento e reuso do óleo usado é o processamento ou reciclagem, na qual, pode-se obter um subproduto reaplicável na fabricação de tintas, saponáceos, biodiesel além de servir como meio de alimentação para animais. Para que estes subprodutos sejam formados, especialmente o biodiesel, é necessário que o óleo usado passe por várias etapas incluindo a transesterificação (alcoólise, acidólise ou interesterificação). No caso a alcoólise é apropriada pois obtém-se um éster e um álcool a partir da reação de outro éster com um álcool (solvente) em meio ácido. Portanto, os triglicerídeos presentes nos óleos vegetais ou gorduras animais reagem com álcool em presença de catalisador. Atualmente, os catalisadores ácidos (ácidos sulfúrico e clorídrico) são os mais utilizados (FOGAÇA; 2018).. Segundo Oliveira; et al. (2009) as etapas da reciclagem são:

1º: Triagem: a triagem compreende a separação do óleo de boa qualidade do óleo de má qualidade, por meio da verificação da cor;

2º: Peneiramento: o óleo passa por peneiras com redução gradativa de diâmetro, que varia de 0,5 cm a 0,2 cm. Os sólidos retidos podem ser encaminhados para a compostagem ou outra forma de reaproveitamento;

3º: Decantação: repouso por aproximadamente seis horas, tempo necessário para decantar as impurezas existentes e separar a água ainda retida;

4º: Filtração: para a retirada de qualquer resquício de impureza que tenha permanecido;

5º: Transesterificação: para a produção de biodiesel ou outros subprodutos;

No entanto, durante uma das etapas deste processo forma-se a chamada borra oleosa, que é um resíduo altamente gorduroso e rico em matéria orgânica, que pode ser potencialmente

danoso ao ambiente caso seja lançado nos corpos hídricos (ARAÚJO et al., 2016) . Um dos caminhos para se evitar esses percalços é realizar a coleta correta dos óleos e gorduras residuais de fritura e reaproveitá-los para outros propósitos (MONTENEGRO, et al. , 2013).

Portanto, a preocupação ecológica por parte da população em geral, mesmo que ainda escassa, aos poucos muda a visão de empresas de que a economia não pode apoiar-se no que se refere à preceitos sociais ou ambientais. Por esse motivo, as empresas têm procurado por sistemas de proteção ambiental tanto por imposição do mercado como por iniciativa própria, visando retorno financeiro no futuro. O intuito também é evitar sanções por parte das fiscalizações dos Órgãos Ambientais, pois, um estabelecimento que não apresenta preocupação com estes aspectos pode ter seus custos aumentados e, conseqüentemente, diminuir a sua lucratividade, perder a posição no mercado e, em último caso ter a cessação de suas atividades (FRANCISCO; FRANÇA, 2007). Para tanto tem-se a Lei 9.605/98 de crimes ambientais, que dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. Em seu capítulo V , no Art.54 da seção III , caput 2º está explicitado que o lançamento de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos, ou detritos, óleos ou substâncias oleosas, em desacordo com as exigências previstas em leis e regulamentos pode ocasionar pena de 6 meses a 1 ano de detenção e multa (BRASIL, 1998).

O processo de reciclagem do óleo de cozinha teve melhor apoio após a criação da lei do biodiesel 11.097/05 (do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel) que dispõe sobre a obrigação da introdução gradual do biodiesel na matriz energética brasileira para melhorar as estruturas econômicas, ambientais e sociais no âmbito da produção sustentável de biocombustíveis (MAGALHÃES et al, 2015). Estima-se que no Brasil apenas cerca de 2,5% do óleo produzido no país vai para o reuso, enquanto o restante é descartado imprópriamente no solos, corpos hídricos, nos sistemas de tratamento de esgoto ou então, são incinerados, mostrando que iniciativas para o reuso de produtos à base de óleo ainda são escassas pois o espaço no mercado para reintroduzi-los em larga escala ainda é dificultoso devido a falta de organizações competentes. No entanto, a reciclagem de óleo de fritura tem começado a atrair os olhares grandes empresas que tem dado um razoável investimento por interessarem-se em realizar uma disposição adequada deste tipo de resíduos além de enxergarem benefícios em seus lucros a partir disto, pois, os resíduos de óleo de cozinha podem ser usados para a fabricação de vários produtos como tintas, sabão e biodiesel, atingindo vários segmentos da indústria. Além do mais, tais iniciativas incentivam o trabalho de catadores de rua e podem complementar a parte social do Programa Nacional de Produção e Uso de Biocombustíveis (CÉSAR et al., 2017).

Sendo assim, reuniões sobre o tema “óleo de cozinha” bem como seu descarte estavam em processo de discussão e avaliação no Congresso Federal Brasileiro através do projeto de Lei nº 2.074 de 19 de setembro de 2007 (COSTA; LOPES, G.; LOPES, J., 2015), que especifica sobre a participação obrigatória dos postos de gasolina, hipermercados, empresas que vendem ou distribuem óleo de cozinha e estabelecimentos similares em estruturar atividades que mantenham à coleta de óleo de cozinha usado e dá outras providências (BRASIL, 2007). No entanto, este projeto de lei encontra-se arquivado atualmente.

Fazendo um contraponto a outros países, o Conselho das Comunidades Europeias-CEE já criou desde 1975, a directiva (75/439) que trata da eliminação de óleos usados, orientando os países Europeus à protegerem o meio ambiente e agirem contra os efeitos prejudiciais causados pela descarga, depósito ou tratamento destes óleos sob a ação de sistemas de regulação além de salientar sobre o reaproveitamento do óleo usado através da promoção de políticas de abastecimento de combustível. Ainda, no artigo 4º desta directiva é dito que os estados membros do CEE devem tomar medidas necessárias para que sejam proibidos qualquer tipo de despejo nas águas interiores de superfície, nas águas subterrâneas, nas águas marítimas territoriais e nas canalizações. Devem também proibir qualquer depósito ou descarte sem controle de resíduos provenientes de óleos usados em solos além de não permitir que tratamentos deste resíduo que possam causar poluição do ar que ultrapasse o nível permitido pela legislação ambiental (EUROPEAN UNION,2010). Portanto, fica claro que o Brasil está totalmente atrasado em comparação à Europa no que se baseia em criação de legislações e aplicabilidade de ações sobre o despejo correto de resíduos oleosos no ambiente, bem como questões referentes à qualidade ambiental, dentre outros aspectos.

2.3 Fermentação Submersa: O uso de microorganismos como alternativa para degradar substâncias hidrofóbicas.

Novas técnicas de degradação de resíduos têm sido aplicadas, como por exemplo o uso de metabólitos de microorganismos (bactérias, fungos e leveduras) que exercem no meio a função de descontaminação, promovendo a chamada biodegradação dos contaminantes presentes através de processos respiratórios, facilitando a manutenção do equilíbrio ecológico (COSTA FILHO, 2011). Além do mais, representa um custo operacional baixo pois consegue avaliar e identificar os microrganismos capazes de sintetizar subprodutos úteis ao ambiente, biodegradáveis e de baixa toxicidade através da fermentação de vários substratos(GUDIÑA et al., 2012).

Um dos caminhos aplicáveis para tal degradação, é a fermentação fúngica submersa, através da qual, microorganismos são colocados em meio líquido contendo nutrientes dissolvidos, tendo como vantagens a manutenção de temperatura e pH, além da homogeneidade do meio de cultura. (COLLA et al., 2010). Esta biodegradação, consiste em decompor compostos químicos por via biológica utilizando-se de microorganismos que são bastante interdependentes dentro de uma comunidade e capazes de realizar detoxificação de ambientes contaminados. Além disso, eles utilizam nutrientes de maneira eficiente pois respondem às condições ambientais muito rapidamente e assim conseguem transformar ou reduzir compostos poluentes em menos poluentes (FRANCISCO; FRANÇA, 2007). Esta técnica é considerada uma alternativa eficiente e ambientalmente econômica que remove a poluição de ambientes por óleo e reduz os danos causados por derramamentos. Além do mais, estudos têm focado sobre o potencial da biodegradação quando melhorada através da bioaugmentação ou bioestimulação com microorganismos pré adaptados (NANA et al., 2013).

A bioaugmentação consiste em adicionar microorganismos no ambiente contaminado para acelerar e completar a degradação. Já a bioestimulação, consiste em estimular o crescimento de microorganismos já presentes no substrato contaminado através da introdução de nutrientes, oxigênio, correção de pH, facilitando assim o processo de degradação do poluente (SOUZA et al., 2014).

No entanto, para que isso ocorra com exatidão, três fatores são fundamentais: contato entre o microrganismo e a substância a ser degradada; condições ambientais favoráveis para a efetividade da degradação e capacidade de transformação da substância (COSTA FILHO, 2011). Portanto, para não haver comprometimento da biodegradação, o ambiente não deve ter pouca umidade, temperaturas e pH desfavoráveis, além de não poder ter escassez de nutrientes minerais (FRANCISCO; FRANÇA, 2007).

Embora a diversidade de microrganismos capazes de biodegradar poluentes como óleos e produzir biossurfactantes ainda seja pouco conhecida, o número de espécies identificadas, com o avanço das pesquisas, tem crescido a cada ano. No entanto, dependendo do habitat em estudo, é estimado que poucas espécies de microorganismos existentes tem sido descoberta como promissoras na produção destes compostos (SOUZA et al., 2014).

2.4 Fungos: classificação e considerações

Todos os fungos são organismos heterotróficos obtendo seu alimento por absorção (secreção de enzimas), são eucariontes e em sua maior parte multicelulares e no caso das

leveduras, são unicelulares . Os multicelulares formados por células alinhadas topo a topo, ramificadas e que formam hifas septadas ou asseptadas, originando um micélio. Isto confere aos fungos uma elevada relação área/volume, facilitando a obtenção de alimentos, pois esta estrutura rapidamente se desenvolve em todas as direções sobre o substrato, podendo crescer mais de um quilômetro por dia, no total, e afastar-se mais de 30 metros do local de início do seu brotamento. De acordo com suas características de absorção de nutrientes, podem ser saprófitos (utilizam matéria orgânica morta), parasitas (adquirem alimentos através de hospedeiros vivos), podem também viver em simbiose ou predação. Percebe-se então, que um fungo pode ter um importante efeito no meio ambiente, principalmente na degradação de substrato. Esta situação permite entender melhor porque motivo os fungos apresentam corpo sob a forma de micélio, pois sem esta estrutura não teriam uma relação área/volume suficientemente elevada para se alimentar com exatidão (BRASIL, 2018).

Segundo Heinzle (2008), os fungos são divididos em dois subgrupos: leveduras e bolores. Leveduras são menores e podem crescer em células individuais ou aglomeradas e podem ser utilizadas para a produção de insulina e vacinas, por exemplo. Já os bolores, desenvolvem-se de forma multicelular por estrutura vegetativa chamada de micélio, com um sistema bem ramificado e normalmente crescem mais sob condições aeróbicas, formando células agregadas. O autor afirma que os fungos filamentosos são usados em larga escala para produzir enzimas como amilases, celulasas and glucoamilases sendo a produção de celulase muito realizada a partir de *Trichoderma reesei*. Os outros tipos de fungos mais comercialmente utilizados são do gênero *Aspergillus s.p*, usados para a produção de ácido cítrico e *Penicillium*, usado para a produção de antibióticos e o fungo filamentoso *Ashbya gossypii* é usado para a produção de Riboflavina. Além dessas aplicações citadas, com o avanço da biotecnologia muitas espécies de fungos estão sendo avaliadas com o intuito de aplicá-las para tratamento de vários resíduos industriais de difícil degradação, devido serem úteis no tratamento de esgotos e descontaminação de ambientes (GIMENES, 2010).

De acordo com Gu et al. (2017), os fungos não somente agem na degradação de materiais repletos de celulose mas também produzem uma variedade de enzimas que degradam matéria orgânica, no entanto, as condições ambientais as propriedades do substrato e os parâmetros do processo interferem na distribuição microbiana, em sua atividade e na mudança populacional. Assim, é difícil dizer com precisão sobre a variação da comunidade de fungos somente por amostragens em diferentes tempos e temperaturas.

Estudos comprovam que estes microrganismos são capazes de crescer sob condições estressantes no ambiente e ainda produzem enzimas extracelulares através do crescimento das

hifas. Outra capacidade, é conseguir agir em substâncias insolúveis, como moléculas oleosas degradando-nas facilmente através da secreção de tensoativos caso o ambiente esteja propício (BYSS et al., 2008). Estes tensoativos são metabólitos secundários produzidos na fase estacionário do crescimento de microorganismos (VARJANI; UPASANI, 2017).

Assim, esta habilidade foi identificada como lucrativa pois além da degradação ágil, pode ocorrer a sucessão de outros microorganismos e, assim, potencializa a biodegradação (BYSS et al., 2008). Portanto, toma-se se como exemplo de grande importância econômica, biotecnológica e comercial, os fungos filamentosos pois possuem alta capacidade de se adaptar em diversos ambientes e produzir compostos degradadores (SPERB et al., 2015). O uso de fontes de carbono em meios de cultura é muito viável na produção de biossurfactantes e tais fontes podem ser caracterizadas por três grupos: Carboidratos, hidrocarbonetos e óleos vegetais e para uma boa biodegradação, é necessário lembrar que fatores ambientais como temperatura, pH, agitação e disponibilidade de oxigenação desempenham um papel fundamental no crescimento microbiano e sua atividade (VARJANI; UPASANI, 2017).

2.5 O uso de surfactantes como tensoativos na indústria

Tensoativos são moléculas que se conectam com partes polares e apolares, possuindo afinidade tanto por óleos e gorduras das soluções, tanto com água, outros líquidos e gases. Dessa forma, atuam como mediador de fases imiscíveis, formando emulsões, ou agindo como detergentes, por exemplo. No entanto, essas duas funções dos tensoativos provocam também a formação de espuma (DALTIM, 2012). Ao diminuírem a tensão superficial dos líquidos, há uma alta probabilidade de que bolhas se formem e se multipliquem principalmente quando há fricção, ocorrendo também a formação de espumas que no caso de serem oriundas do uso de substâncias químicas, não se degradam podendo ficar retidas em rios e lagos, causando um grande impacto visual além de prejudicar a saúde dos animais aquáticos ou até mesmo levá-los a morte (GONÇALVES et al., 2015).

Atualmente, a remoção de componentes poluidores no ambiente tem se tornado o maior problema e desafio, pois, uma das alternativas para melhorar a solubilização destes componentes poluidores tem sido o uso de tensoativos chamados surfactantes (LIU et al, 2017). Estes pertencem à uma das classes mais importantes de produtos químicos, não somente devido ao uso comum diário da vida das pessoas, mas também porque possuem uma grande aplicabilidade nas indústrias, agricultura e na saúde (VARJANI; UPASANI, . , 2017). No entanto, o acúmulo desse tipo de molécula sintetizada no ambiente afeta profundamente o

ecossistema, causando inclusive toxicidade aos mamíferos e microrganismos (GONÇALVES et al., 2015) e por conta de sua estrutura química e características refratárias podem ficar retidos na matriz do solo ou nos corpos hídricos causando outras complicações ambientais (LIU et al., 2017) como por exemplo, prejudica o tratamento da água para o consumo humano tornando-o mais oneroso e complexo (GONÇALVES et al., 2015).

Os surfactantes do tipo alquilfenóis etoxilatos são os mais utilizados em escala industrial para a produção de detergentes e lubrificantes, além de participarem de formulações de tintas e cosméticos. No entanto, este composto é altamente persistente em ambientes aquáticos, já que possui em sua composição o Nonilfenol (NP) e o Octilfenol (OP), que são subprodutos tóxicos aos organismos aquáticos induzindo a uma bioacumulação por serem elementos chamados de Interferentes Endócrinos (IE). Os IE já foram identificados no leite materno humano, na urina e no sistema reprodutivo de roedores (EPA, 2010). Em muitos casos, a contaminação ambiental é causada acidentalmente ou devido ao lançamento deliberado no ambiente de compostos orgânicos e inorgânicos através de atividades industriais (BANAT et al., 2010). Portanto, outras vias de tratamento de resíduos lançados em águas têm sido evidenciadas, como o de microrganismos e seus metabólitos, por exemplo.

2.6 Biosurfactantes

Com o avanço de tecnologias sustentáveis e para modificar o cenário de uso de substâncias químicas, a busca pelo natural e componentes biodegradáveis para tratar sítios contaminados tem aumentado (SOUZA et al., 2014). Descobertas têm mostrado que tensoativos são boa opção e podem ter origem natural, pois são parte de muitas estruturas celulares e membranas biológicas. Compostos com propriedades detergentes produzidos pelos microrganismos, são chamados biosurfactantes e também possuem as mesmas moléculas anfipáticas dos surfactante, ou seja, são hidrofílicas e hidrofóbicas ao mesmo tempo, agindo entre os fluidos de diferentes polaridades e reduzindo a tensão entre água e óleo, aumentando a área de contato dos hidrocarbonetos (componentes insolúveis) causando modificação na sua mobilidade, biodisponibilidade e na sua biodegradação (SOUZA et al., 2014). Estes compostos são classificados de acordo com seu peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação e são caracterizados quimicamente como glicolipídeos, lipopeptídeos, ácidos graxos, fosfolipídios e lipopolisacarídeos, biosurfactantes poliméricos e particulados, possuindo propriedades funcionais e uma diversidade estrutural que fazem deles potenciais componentes atrativos para uso variado em aplicações ambientais e biotecnológicas (VARJANI; UPASANI,

2017). Os glicolipídeos é o grupo de biossurfactantes mais estudado e aplicado. Dentre eles, o mais conhecidos são os ramnolipídeos, trehalolipídeos, soforolipídeos e manosylerythritolipídeos (BANAT et al., 2010). Estes metabólitos são identificados também a partir seu peso molecular, sendo que as moléculas de baixa massa molecular possuem melhor atividade na tensão superficial, enquanto que as de alta massa molecular agem de modo a formar emulsões de sistemas óleo/água mais estáveis (PEREIRA; ALBUQUERQUE, 2017).

Segundo Colla et al. (2010) a partir de resíduos agro-industriais os biossurfactantes são possivelmente produzidos pois aderem facilmente à substratos e moléculas de carbonadas. Gonçalves et al.(2015), também afirma que esses biotensoativos podem ser produzidos a partir de substratos renováveis, como resíduos de processamento vegetal, glicerol, óleos ou até mesmo petróleo. Menezes e Barreto (2015) dizem que este tipo de resíduo, além de fornecer diferentes alternativas de substratos para a fermentação, também ajuda nos problemas de poluição ambiental.

Como forma de captação destes componentes naturais denominados biossurfactante, utiliza-se de resíduos da agroindústria, já que estes possuem grande porcentagem de carboidratos ou lipídeos em sua composição, servindo como fonte de carbono para a alimentação dos microrganismos e conseqüentemente propicia produção desses metabólitos além de favorecer a minimização do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses rejeitos no ambiente. Outros fatores são relevantes quando pensa-se em estimular microrganismos à produzir os biossurfactantes como a concentração de nutrientes presentes no meio (P/Mg/Fe/S/N/Mn) condições como pH, temperatura, agitação e oxigenação e materiais carbonados (SANTOS, 2016).

Várias propriedades funcionais já são conhecidas: emulsificação, formação de espuma, limpeza, atividades de superfície e redução na viscosidade de petróleo. A emulsificação é um processo, pelo qual, forma-se um líquido conhecido como emulsão, que contém gotas de gordura ou óleo suspensos em água. Os melhores emulsificantes são amplamente aplicados como aditivos para estimular a biorremediação e remover substâncias oleosas dos ambientes, ou seja, aqueles com alto equilíbrio hidrofílico-lipofílico pois possuem melhor capacidade de solubilização em meio aquoso e sabe-se que os biossurfactantes de alto peso molecular são altamente eficientes em emulsificar. (VARJANI; UPASANI, 2017). Além do mais, mostram-se também como excelente opção por possuírem menor toxicidade, boa atividade superficial, rápida ação no substrato e alta compatibilidade ambiental (LIU et al., 2017).

Segundo com Nitschke e Pastore (2002), utilizar biossurfactante na limpeza de tanques de estocagem que contém resíduos oleosos que eventualmente sedimentam-se no fundo é uma

boa alternativa, já que estes fragmentos oleosos podem se solidificar e dificultar a limpeza por bombeamento convencional, que utiliza solventes e limpeza manual. Sendo assim, aplicar metabólitos de microorganismos pode diminuir a viscosidade e a formação de emulsões do tipo O/A por conta de sua ação detergente, permitindo assim que o descarte se torne menos dificultoso, além de gerar menos perigo aos técnicos. A partir de estudos, foi possível afirmar que usar o biossurfactante em detrimento aos surfactantes (origem química) , foi possível promover a limpeza e recuperação de 90% das substâncias residuais oleosas.

De acordo com Rodrigues e Teixeira (2010), alguns destes biossurfactantes são descritos também por sua potencialidade como componente ativo biológico e sua aplicabilidade também na área médica, sendo uma alternativa viável como agente antimicrobiano, podendo ser usados com segurança e efetividade também de forma terapêutica.

Portanto, aspectos legais como regulamentos sobre a preocupação da poluição ambiental e saúde advindos de atividades industriais, tem se tornando bastante influentes no tocante ao uso de biossurfactantes em detrimento aos químicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Laboratório de aplicação da pesquisa:

Foi utilizado o laboratório pertencente ao Núcleo de Biotecnologia NUCBIO, situado na UFU Santa Mônica no bloco 1K do Instituto de Engenharia Química, situado na Av. João Naves, 2121. O espaço do laboratório possui aparelhos modernos e é composto por 6 salas sendo cada uma delas destinada ao uso de aplicações específicas para análises microbiológicas, físicas, químicas ou também para técnicas de congelamento e criopreservação de microorganismos com aplicabilidade biotecnológica. Além destas, é equipado com uma sala de informática contendo 5 computadores, a qual, é acessível a todos os alunos que frequentam o laboratório.

O trabalho prático deu-se a partir de janeiro de 2018 após liberação de uso pelos coordenadores e técnicos e conhecimento do espaço de pesquisa em dezembro de 2017, verificando a disponibilidade de materiais-suporte para o isolamento e cultivo de fungos como por exemplo, nutrientes de elaboração de meios de cultura .

Inicialmente, houve uma certa dificuldade de adaptação e entendimento aos modos de uso do laboratório, pois trata-se de um espaço multiuso e que deve ser zelado diariamente para que não ocorra conflitos entre os alunos ou desperdício de materiais de aplicação. Além disto, foi necessário uma busca intensa de artigos científicos que pudessem auxiliar-me com mais precisão sobre metodologias viáveis referentes ao cultivo de fungos e uso de equipamentos pertinentes às análises. Aos poucos fui me adequando às práticas laboratoriais corretas e o crescimento científico acadêmico tornou-se meu aliado, auxiliando-me na busca de resultados e no domínio das técnicas .

3.2 Etapas da pesquisa:

A parte prática consistiu em três etapas subsequentes de fermentação submersa , todas realizadas durante 6 dias, utilizando o mesmo substrato e divididas em:

- **Etapa 1** - Seleção do melhor fungo degradador de gordura em fermentação submersa aeróbica (com agitação), realizada em duplicatas.
- **Etapa 2**- Após o fungo selecionado, foi novamente aplicado na fermentação submersa aeróbica, realizada em triplicatas.

- **Etapa 3-** O fungo selecionado foi colocado nos erlenmeyers dentro de uma caixa de papelão em sistema de fermentação submersa anaeróbico (sem agitação). Etapa realizada em triplicatas.

3.3 Substrato: Borra

Um resíduo de óleo de cozinha utilizado para avaliar a produção e ação de biossurfactante. A borra consiste em uma grande quantidade de matéria orgânica (restos de alimentos semi- carbonizados) com grande quantidade de óleo adsorvido e foi coletada na empresa Seeds Oil situada na rua Guatemala 795, bairro Tibery, cidade de Uberlândia-MG. É uma microempresa administrada por Luciano Teixeira e que recolhe por mês cerca de 30 toneladas de óleo usado nos bares, restaurantes e hospitais da cidade. Este total coletado passa por processos de peneiramento e filtragem para que possa ser revendido para reaproveitamento energético, fabricação de tintas ou sabão. Destas 30 toneladas, cerca de 2 mil toneladas é a borra residual que sobra deste pré-tratamento feito pela Seeds Oil. Atualmente, esta borra é enviada para a CETRIC, que por sua vez faz a incineração para produzir e vender o biogás.

Figura 4 - Borra do óleo de cozinha usado



Fonte: Autora

A análise composicional deste substrato foi feita através do aparelho modelo SHIMADZU SSM-5000A® seguindo o manual de utilização para verificação de carbono total, o qual, orienta-se expor a matéria orgânica à temperatura de 900 C° durante 2 min. O cálculo

pertinente a este resultado é $COT = CO + CIn$. Para a análise dos compostos orgânicos da parte oleosa, foi utilizado o aparelho de Infravermelho modelo Perkin Elmer FT-IR- Spectrum Two® acoplado a um computador, do Instituto de Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia. Este aparelho permite caracterizar os elementos na amostra a partir de dados numéricos contendo a absorvância por comprimento de onda (cm^{-1}). Posteriormente, os gráficos foram plotados no sistema operacional Origin Evaluate 2018. Sobre o percentual de gorduras animal, vegetal e mineral presentes neste óleo, foi realizada uma análise conforme a Standard Methods for Examination of Water and Wastewater -SMWW 5520D- 22th Edition 2012.

Figura 5 - Óleo residual coletado na empresa Seeds Oil



Fonte: Autora

3.4 Microrganismos

Para captação e isolamento de fungos, ocorreu a exposição do substrato ao ar durante 1 semana e então os microrganismos foram isolados a partir da coleta de amostra e cultivados por esfregaço em Placas Petri contendo meio Czapek sólido. Ocorreu a realização de repique a cada 30/40 dias para a obtenção de culturas puras iniciais. Após conseguir separar três amostras de fungos, eles foram mantidos em geladeira à $7^{\circ}C$, seguindo metodologia padrão de repique contínuo em meio de cultura Czapek sólido.

Este meio foi elaborado a partir da junção de vários compostos químicos diluídos em água destilada e esterilizados devidamente em autoclave vertical modelo CS PRISMATEC® à 120°C e pressão de 1atm por 20 minutos (MARTINS, 2018).

Tabela 1 - Meio de Cultura Czapek.

Elementos de Aplicação	Quantidade
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	2,00 g/L
Fosfato de Potássio Dibásico (K ₂ HPO ₄)	1,00 g/L
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄)	0,50 g/L
Cloreto de Potássio (KCL)	0,50 g/L
Sulfato Ferroso (FeSO ₄)	0,01 g/L
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	30 g/L
Ágar (somente para meio sólido)	20 g/L

Para a elaboração deste meio, todos os compostos foram colocados em Becker e pesados em balança de precisão modelo SHIMADZU Ax200®. Após processo de esterilização o meio de cultura foi levado para câmara de fluxo laminar onde a luz UV- Ultra Violeta (germicida) foi ligada por 15 minutos para permitir total esterificação do meio e solidificação em placas Petri. As placas utilizadas também foram todas esterilizadas antes do despejo do meio de cultura.

Após a solidificação em UV, foi necessário mantê-las em geladeira por 24 horas antes do repique, com o intuito de verificar se não houve contaminação. Além do mais, para a segurança do manipulador usou-se luvas e máscara, bem como foi feita a limpeza do local com álcool 70%. A alça de Drigalski ou pinça a ser utilizada também deve ser limpa com álcool 70% e colocada no calor do fogo de uma lamparina.

Figura 6 - Repique em Capela- 02 e 03/2018



Fonte: Autora

Ao passo que o método de repique ia sendo refeito, algumas dificuldades foram encontradas, pois, normalmente o fungo modifica seu comportamento no tocante ao crescimento, alimentação e reprodução à medida que vai sendo mantido em geladeira e realocado em novas placas. Condições como temperatura e luz do dia, também alteram seu comportamento em placas. Isto foi percebido tanto na aplicação em meio sólido quanto em meio líquido, pela forma de crescimento de colônias e colorações. Em algumas oportunidades até a produção de micélios em meio líquido foi modificada. Por estes motivos manter microrganismos durante períodos longos de experimento, foi um dos desafios, porém, com grande aprendizado.

Figura 7 - Culturas iniciais 01/2018



Fonte: Autora

Figura 8 - Três culturas puras de fungos 03/2018



Fonte: Autora

3.5 Fermentação submersa

A fermentação fúngica submersa foi realizada inicialmente a partir da inoculação de 3 fungos em meio nutritivo (Czapek líquido) em erlenmeyers de capacidade 500ml contendo 220 ml de caldo cada. Na primeira etapa, realizada em duplicatas e nomeadas como 1 e 1.1 / 2 e 2.1 para cada fungo, a borra foi pesada (50g/L) e aplicada nos frascos de acordo com o estipulado pela resolução CONAMA 430, portanto, cada frasco continha cerca de 11g de borra colocados em agitação constante à 120 rpm em shaker modelo CERTOMAT MO® durante 6 dias. Então, um fungo foi selecionado como o melhor degradador de gordura após análise de gravimetria em rotaevaporador , que avalia a redução do percentual de gordura na amostra. Na segunda etapa, o fungo selecionado foi colocado em triplicatas nomeadas como 01 e 1.1 e 1.2, na presença de oxigênio à uma agitação constante de 120 rpm em shaker . Também foi colocado em agitação o grupo controle em triplicatas. A partir de então, vários parâmetros pertinentes à pesquisa foram aplicados.

Figura 9 -Shaker contendo Erlenmeyers.



Fonte: Autora

3.6 Parâmetros do Experimento

Parâmetros importantes no tocante à degradação de gordura e comportamento do fungo no meio foram medidos: Gravimetria, Temperatura, pH , Tensão Superficial, Unidades Formadoras de Colônia, Índice de Emulsificação. Os 6 dias de experimento das etapas 2 e 3 foram registrados como: tempo 00h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h.

3.6.1 Gravimetria

Este método é realizado para extrair o óleo da amostra mediante a solubilização em solvente apropriado. Foi feito de acordo com o Standard EPA, method 1664.

Nesta análise, 30 ml do caldo contendo a gordura foi misturado com o solvente n-hexano por 10 min. Após repouso de 24h, o solvente absorve o percentual de gordura contido no meio e se separa da parte aquosa, se estabelecendo na camada superior do meio e então, é retirado com pipeta e colocado em balão volumétrico devidamente seco e pesado antes processo de rotaevaporação e após.

Figura 10 – Rotaevaporador



Fonte: Autora.

Neste equipamento, o balão é anexado à uma estrutura, pela qual, de um lado há a rotatividade em banho maria e de outro, o solvente é recuperado por um sistema condensador. A água do banho maria foi aquecida conforme o ponto de ebulição do N-Hexano (68°C). Um dos benefícios desta análise é o tempo reduzido. Após o banho maria atingir a temperatura, em 5 min o solvente é evaporado e a gordura permanece ao fundo do balão e o cálculo pertinente pode ser feito: peso do balão com amostra – peso do balão sem amostra.

Figura 11 - Fase de coleta de solvente contendo a gordura após 24h



Fonte: Autora

3.6.2 Determinação da Tensão Superficial

Um tensiômetro modelo educacional KRUSS K6® foi utilizado de acordo com o método do anel de Du-Nuoy descrito por Souza et al (2017). Neste método, um anel de platina em um plano paralelo à superfície líquida analisada, é colocado em contato com o líquido, permanecendo até o momento de rompimento com a superfície ou interface. Este rompimento dá-se pela variação de força exercida pelo fluido no anel quando gira-se a régua (Figura 13). A força obtida quando o ângulo de contato se torna 0 é dada em mN/m, caracterizando a tensão superficial do meio em análise. O equipamento foi calibrado com álcool 99,7%. Esta calibração é necessária dado que o anel possui estruturas muito delicadas e qualquer falta de cuidado pode danificá-la, o que altera nos resultados. Sendo assim e se a calibração se mantiver sempre igual,

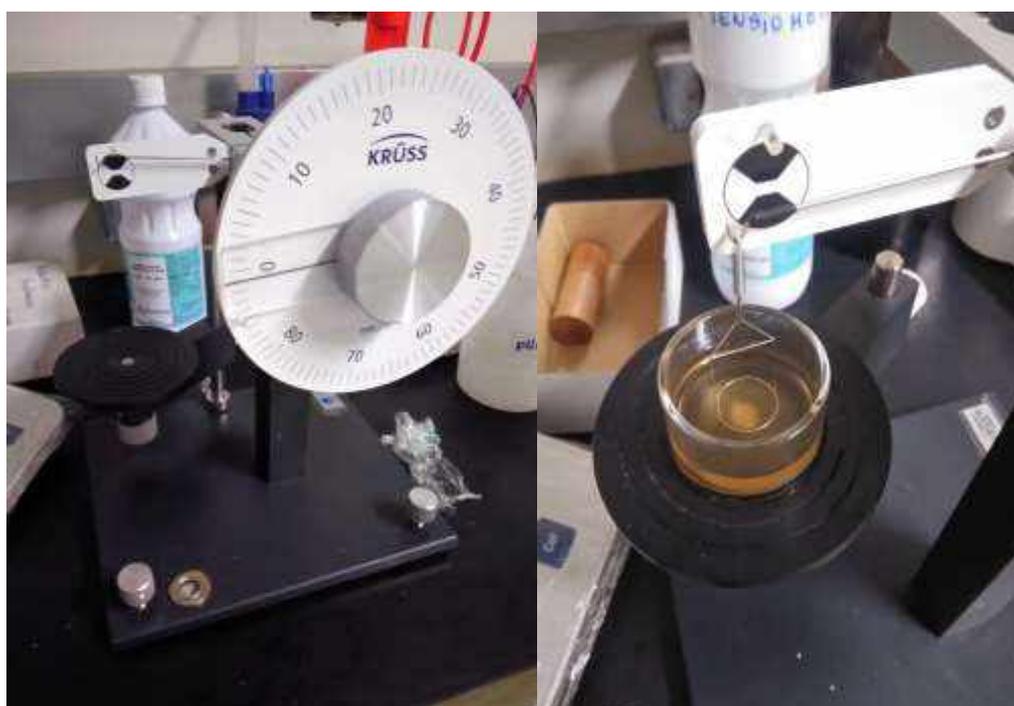
os resultados serão confiáveis. Se a tensão é reduzida ou aumentada ao longo dos dias de análises, percebe-se a eficácia do metabólito produzido pelo fungo a partir dos resultados.

Figura 12 - Coleta de amostras para medição de Tensão Superficial



Fonte: Autora

Figura 13 - Tensiômetro KRÜSS® Educacional k6 (a e b)



Fonte: Autora

3.6.3 pH e Temperatura

O pH foi medidos a cada 24h a partir do uso do pHmetro Digital PG2000 GEHAKA®.

3.6.4 Índice de emulsificação (I.E.)

O índice de emulsificação foi realizado utilizando a metodologia de Martins e Martins (2018). Tubos de ensaio com capacidade de 10 ml foram nomeados e com tampa contendo o caldo fermentativo mais óleo na proporção 2:2 ml aplicados com a ajuda de uma pipeta automática. Esta mistura foi agitada em vórtex modelo AP56 durante 2 minutos cada tubo. Quatro tipos de óleos foram utilizados nesta análise: óleo vegetal de soja novo, óleo usado de fritura, óleo sintético e querosene, todos em triplicatas. Para cada substância uma ponteira nova foi utilizada, conforme a figura 14.

Figura 14 – Ponteiras



Fonte: Autora

Ao preparar uma emulsão, é necessário que se faça agitação da solução para que a solubilização dos tensoativos ocorra e também reduza o tamanho das gotículas de óleo e retire a sujeira para garantir que os processos de detergentes e emulsão sejam eficientes. Essa agitação é a principal causa de formação de espuma que é formada pelas interações intermoleculares entre os componentes da água, do ar e dos tensoativos (GONÇALVES et al, 2015).

Para verificar a formação de emulsões e gerar gráficos, cálculos foram realizados a cada 24h como mostrado abaixo:

Cálculo IE%: medida da camada emulsificada/ medida altura total do tubo x 100.

Figura 15 - Tubos de Ensaio usados na Emulsificação



Fonte: Autora

3.6.5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Esta técnica é importante, pois, permite através de unidade de medida contar as células viáveis que formam colônias sob condições controladas. Para medir as unidades formadoras de colônia, o fungo inicialmente armazenado em placa petri foi transferido para o meio czapek líquido e colocado em constante agitação em shaker (120 rpm) durante 48h. Para que as células fúngicas fossem distribuídas igualmente, foi feita a homogeneização do meio utilizando um agitador elétrico modelo IKA RW 20®, e a análise de contagem das unidades formadoras

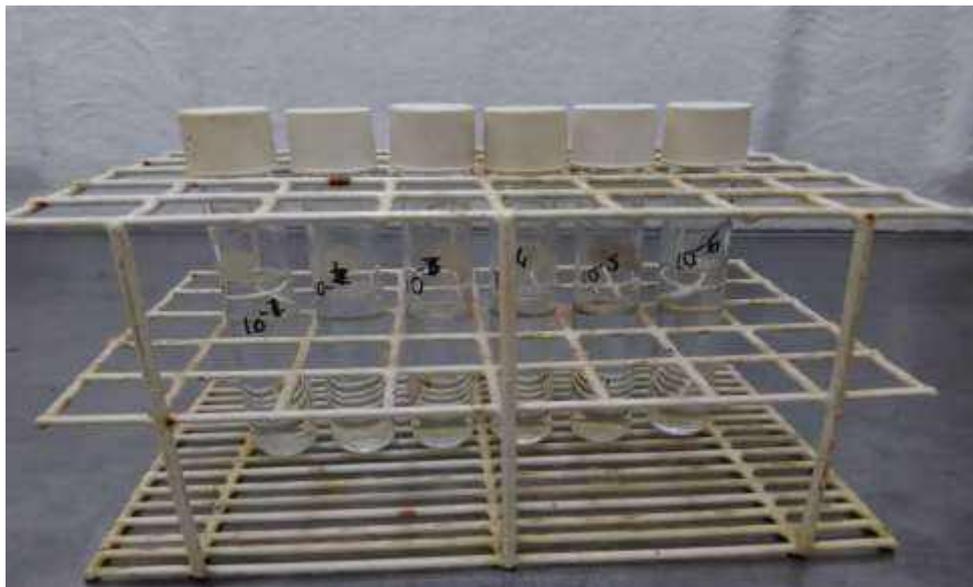
de colônia foi baseada na diluição em série da amostra de 10^{-1} à 10^{-6} em água destilada para posterior plaqueamento e incubação por um período de 48h, utilizando a técnica *spread plate* (BOCZEK; RICE; JOHNSON, 2014).

Figura 16 - Meio contendo Micélios (48h)



Fonte: Autora

Figura 17 – Diluições Seriadas



Fonte: Autora

As diluições deram-se a cada 10 mL com água destilada, retirando-se 1 ml do primeiro tubo e passando para o segundo e assim sucessivamente os tubos foram preenchidos. Feito isto, foi feita aplicação em meio de cultura Czapek sólido em placas Petri devidamente nomeadas conforme as diluições realizadas.

Figura 18 – Distribuição em placas



Fonte: Autora

Após 48h de cultivo, as placas foram colocadas em aparelho refletor modelo UFC BIOMATIC® e as unidades formadoras de colônia foram contadas a partir de marcação com pincel Pilot (preto) na placa (BOCZEK; RICE; JOHNSON, 2014).

3.6.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas objetivaram verificar a relação linear entre o conjunto de variáveis $y_1, y_2, y_3, y_4, y_5, z_1, z_2, z_3, z_4, z_5$ e a variável independente $x = \text{Tempo}(h)$. Foram realizadas através do software estatístico R e identificadas :

Etapa 2 (oxigenação constante):

- $y_1 = \text{Tensão superficial}$
- $y_2 = \text{pH}$

- y_3 = Querosene (I.E)
- y_4 = Óleo Sintético (I.E)
- y_5 = Óleo Usado (I.E)

Etapa 3(ausência de oxigenação):

- z_1 = Tensão superficial
- z_2 =pH
- z_3 = Querosene (I.E)
- z_4 = Óleo Sintético (I.E)
- z_5 = Óleo Usado (I.E)

Inicialmente, com o objetivo de verificar a existência de correlação entre o conjunto de variáveis com a variável tempo, aplicou-se o teste de correlação de Pearson. Nestes testes de correlação foram testadas as seguintes hipóteses:

-Hipótese nula: Coeficiente de Correlação igual a 0, ou seja não há correlação entre as variáveis

-Hipótese alternativa: Coeficiente de correlação diferente de 0, ou seja há correlação entre as variáveis.

Nos testes de hipótese, pode-se rejeitar a hipótese nula, ao nível de confiança 95%, caso o valor-p seja menor que 5%(0,05). Também foram gerados Intervalos de confiança (IC), ao nível de 95% para as correlações. Um intervalo de confiança de 95% significa que se o teste for repetido várias vezes, 95% das vezes a correlação- estará entre os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança. Em seguida, gerou-se o modelo de regressão linear para cada uma das variáveis correlacionadas com a variável independente tempo.

Os modelos dos pressupostos dos resíduos (normalidade, independência e homogeneidade de variâncias) foram validados por meio dos testes de shapiro-wilk, durbin-watson e teste f, respectivamente. Através destes testes, é possível obter confiabilidade na validação dos resultados, já que são análises formais. Existem gráficos que validam modelos dos pressupostos, no entanto, são considerados análises informais e, portanto, não foram colocados neste trabalho.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de matérias-primas de baixo custo pode tornar competitivo os processos de produção de biossurfactantes em detrimento aos produtos químicos. Na maioria dos casos, a fonte de carbono é responsável por 50% do custo final de produção de um bioprocessamento, se tornando economicamente viável (RUFINO et al., 2014). Segundo Martins e Martins (2018), alternativas como as fontes de carbono ajudam o microrganismo a produzir biossurfactante utilizando primeiramente os carboidratos e gorduras, pois provavelmente estas moléculas oleosas auxiliam no crescimento microbiano, tendo como resposta metabólitos que podem ser aplicados em diversas atividades de degradação.

4.1 Análise composicional da parte oleosa do substrato.

Com relação à composição da parte orgânica do substrato, 58% é matéria carbonada conforme dados do aparelho SHIMADZU® para análises de TOC- Total Organic Carbon. Portanto, os 42% restantes é presença de óleo adsorvido e a amostra obteve os resultados descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação do percentual de óleos e graxas presentes na amostra

Column1	Quantidade
Óleos Vegetais e Gorduras Animais	309.461,62 mg/kg
Óleos Minerais	66.560,31 mg/kg
Total	376.021,93 mg/kg

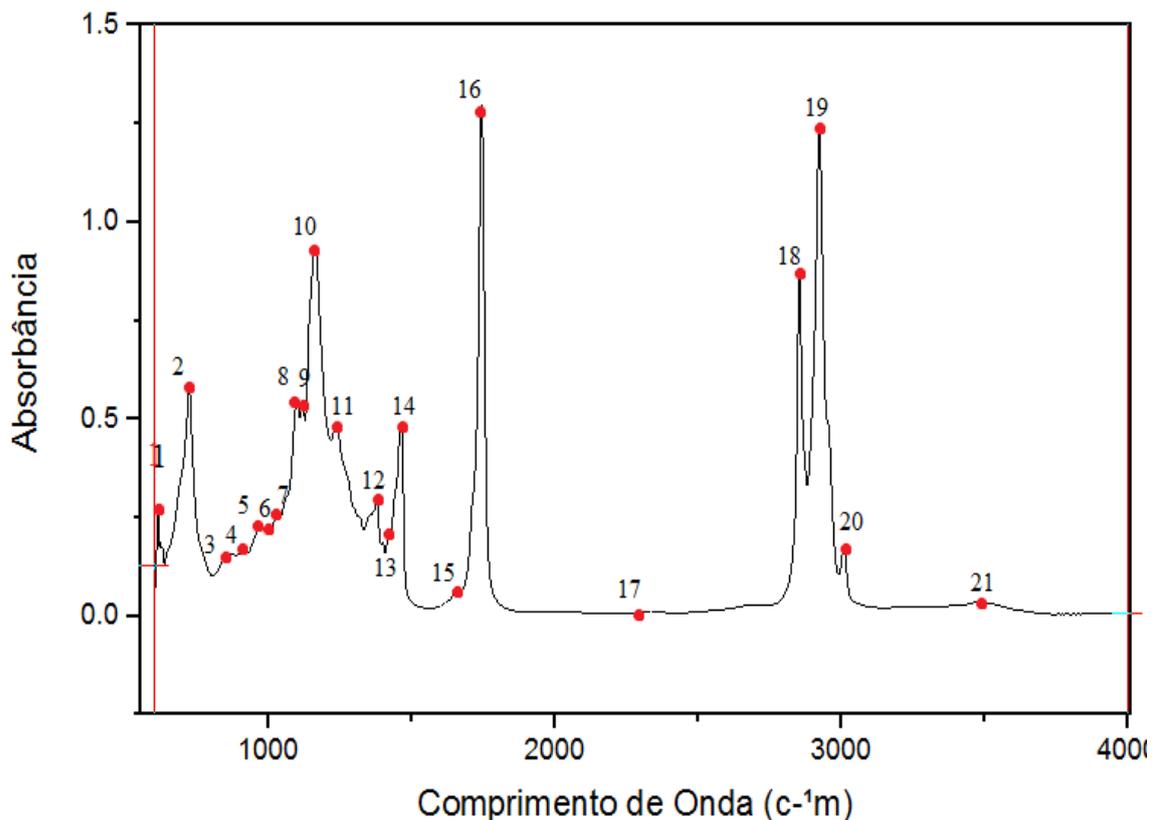
Para chegar a estes resultados, foi necessário analisar pelo menos 1kg do substrato em estudo. No entanto, não foi possível identificar separadamente a quantidade específica de óleo vegetal e animal presente na amostra, mas foi possível isolar o teor de óleos minerais. Com relação às questões de poluição ambiental e considerando o padrão limite supracitado pela resolução CONAMA 430 de lançamento de óleos e graxas em corpos hídricos (50g/L), estima-se que se 1 kg de borra for descartado poderá ultrapassar em mais de 6 vezes o limite estipulado de poluição por óleos do tipo vegetal ou animal e em mais de 3 vezes o limite de poluição por óleos minerais a cada litro de água, após avaliar os resultados dados acima. Além do mais, há

presença de materiais flutuantes, o que não deve existir. Assim, lembrando que a empresa Seeds Oil produz como subproduto de suas atividades 2 mil (t)/mês de borra e tendo-se preocupação sobre o descarte adequado, esta quantidade caso descartada impactaria drasticamente e negativamente qualquer curso d'água.

4.2 Caracterização de compostos orgânicos do óleo

A partir do uso da Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos foi gerado o gráfico , pelo qual, associa-se os comprimentos de onda no eixo X com a respectiva absorbância no eixo Y, e então obteve-se os resultados. Para tanto, utilizou-se de faixas de número de onda pré estabelecidas pelo método de transmissão, pelo qual, a radiação atravessa a amostra, sendo que parte é absorvida e a outra transmitida. (BARBOSA, 2013).

Gráfico 1 - Caracterização de Compostos por Espectroscopia no Infravermelho.



Fonte: Origin Evaluate

Após a análise do gráfico, os resultados mostraram que os compostos presentes estão na região denominada infravermelho médio que vai de $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Onde ocorrem os picos, sendo mais ou menos agudos, estão presentes as regiões de compostos orgânicos, que associando-se o eixo X ao Y têm-se a banda do espectro e conseqüentemente o tipo de composto. Esta análise pode ter como base a divisão já estabelecida de 3 regiões sendo: região 1 de 4000 a 1300 cm^{-1} (estiramento dos principais grupos funcionais OH, NH e C=O). A região 2 de 1300 a 900 cm^{-1} (estiramento de ligação C-O de álcoois, éteres, fenóis e ésteres). E a região 3 que compreende a faixa de 900 a 500 cm^{-1} (compostos aromáticos e alquenos) (BARBOSA, 2013).

Algumas bandas que foram encontradas e seus picos identificados por números, referem-se a presença destes compostos: (1: C-S, CH₂), O-H, (6 ao 7: estiramento de C-O), (12, 13 e 14: -CH₃ simétrico e assimétrico), (15 e 16: estiramentos de C=O e ligações C=C), (17: sais de amônio N-H e água), (18, 19 e 20: estiramento de C-H: alcanos e alquila além de grupo Amina e Hidrocarbonetos, todos de cadeia alifática) (BARBOSA, 2013). Na identificação 21 há a presença de água devido a elevação quase nula da banda e esta água é oriunda possivelmente dos alimentos fritos.

Estes tipos de compostos são originados pelo aumento da temperatura e conseqüente oxidação, o que acontece com os óleos de fritura. Este óleo após aquecido, apresenta estes compostos e caso lançado em um meio aquoso além de dificilmente serem destruídos, dificultam a passagem de luz.

Na tabela 3 é possível a partir dos números estabelecidos, identificar os compostos orgânicos e sua capacidade de absorção de luz. De acordo com Barbosa (2013), quando a radiação eletromagnética associa-se a uma molécula, o efeito causado depende de sua energia. Por vez, essa energia está associada ao comprimento de onda reproduzido. Quanto menor o comprimento de onda de uma radiação, maior será a energia associada a ela e a absorção de luz ocorre de um nível de transição de energia menor (E_1) para um nível de energia maior (E_2).

Tabela 3 - Associação do Comprimento de Onda e Absorbância do Gráfico 1

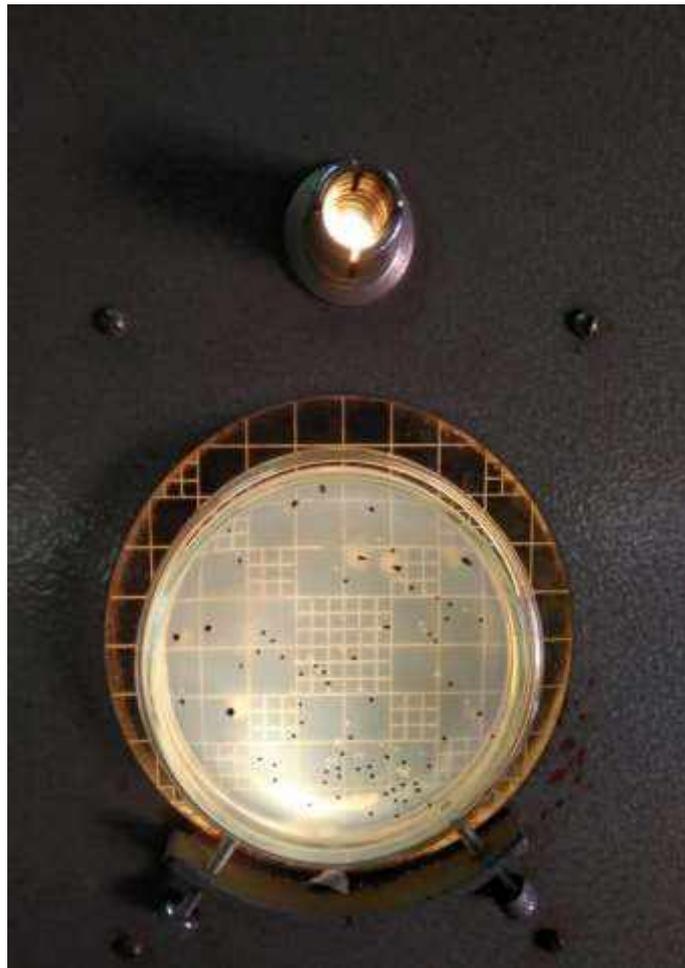
Comprimento de onda (x) cm-1	Absorbância (y)
1- X: 720	0.576919
2- X: 613	0.270266
3- X: 917	0.178203
4- X: 963;	0.23608
5- X: 992	0.22619
6- X: 1095	0.54714
7- X: 1120;	0.54013
8- X:1160	0.93881
9- X:1241	0.48756
10- X:1375	0.30282
11-X:1420	0.21807
12- X:1460	0.48219
13- X:1652	0.06385
14-X:1744	1.29328
15- X:2297	0.01318
16- X:2852	0.86968
17- X:2921	1.22914
18/19 - X:2921	1.22913
20-3011	0.18026
21- 3500	0.03296

Desse modo, se uma amostra orgânica tiver incidência de alguma radiação a depender das regiões do espectro, pode-se identificar se há ou não absorção no comprimento de onda em uma amostra orgânica. Portanto, se a energia de um composto for intensa, poderá causar alterações em suas moléculas como por exemplo, a radiação infravermelha que causa alterações nos modos rotacionais e vibracionais das moléculas e possivelmente, afeta o meio no qual elas estiverem inseridas. Na região do infravermelho médio, como é o caso desta análise, as moléculas possuem maior comprimento de onda, portanto, apresentam menor energia.

4.3 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

As células viáveis foram contabilizadas na placa de maior diluição(10^{-6}) e as unidades formadoras de colônia foram registradas a partir da incidência de luz sobre a placa e marcação com pincel. Foi encontrado um valor de 91×10^8 unidades formadoras de colônia.

Figura 19 - Contabilização de unidades viáveis

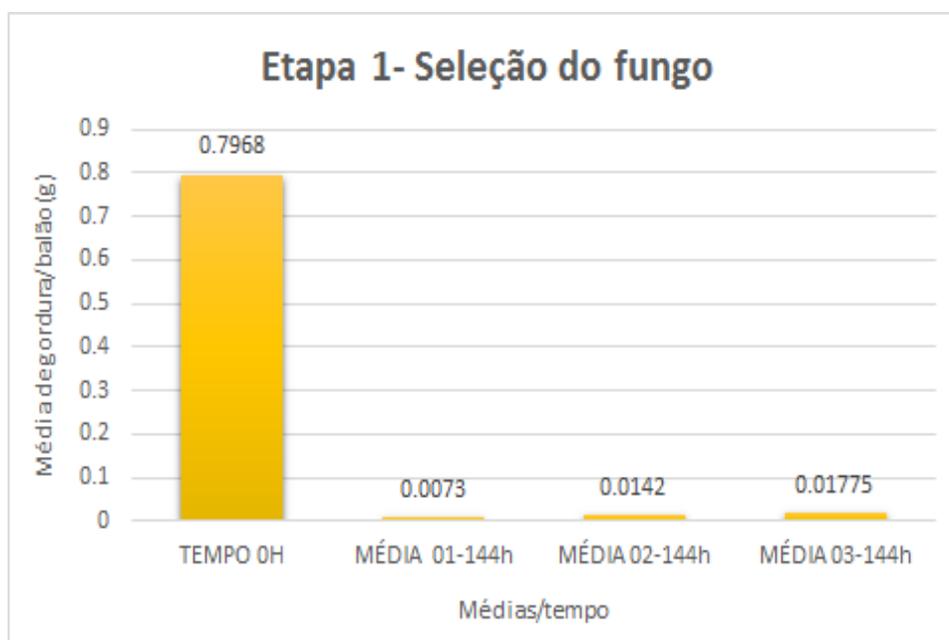


Fonte: Autora

4.4 Etapa 1: Seleção do fungo por análise de gravimetria

Os resultados mostraram que o fungo ESC01 possui o maior potencial de degradação de gordura em comparação com ESC 02 e ESC03. Dado que o percentual médio de gordura presente no fundo do balão em 30 ml de amostra coletada foi de 0,7968 g inicialmente , o restante médio não degradado por cada fungo é expresso no gráfico 2:

Gráfico 2 - Quantidade média de gordura não degradada por cada fungo- Etapa 1



Fonte: Autora

O gráfico 2 mostra as quantidades de gordura restantes em cada balão após a evaporação do solvente n-Hexano no tempo inicial 0h e no tempo final 144h último dia, bem como as médias das duplicatas de cada fungo 01, 02 e 03 expressas em gramas(g). Em porcentagem, a redução é representada na Tabela 4 , a partir da subtração da quantidade de gramas inicial pela quantidade média de gramas do tempo final de cada fungo.

Tabela 4 - Redução média por cada fungo em gramas (g) e porcentagem- Etapa 1

Fungo	Redução de:	Percentual Reduzido
ESC 01:	0,7895 g	99,1%
ESC 02:	0,7826 g	98,22%
ESC 03	0,7793 g	97,81%

Considerando que estes resultados foram obtidos a partir da subtração da massa de gordura do tempo 0h antes da fermentação pelo tempo 144h após fermentação de 6 dias, o fungo nomeado ESC 01 foi selecionado como melhor degradador e foi aplicado nas etapas subsequentes 2 e 3. Em comparação com os outros dois fungos nota-se que todos são boas

opções para aplicação em processos de degradação de gordura , com ínfimas diferenças de redução entre si.

Figura 20 - Selecionado: ESC 01



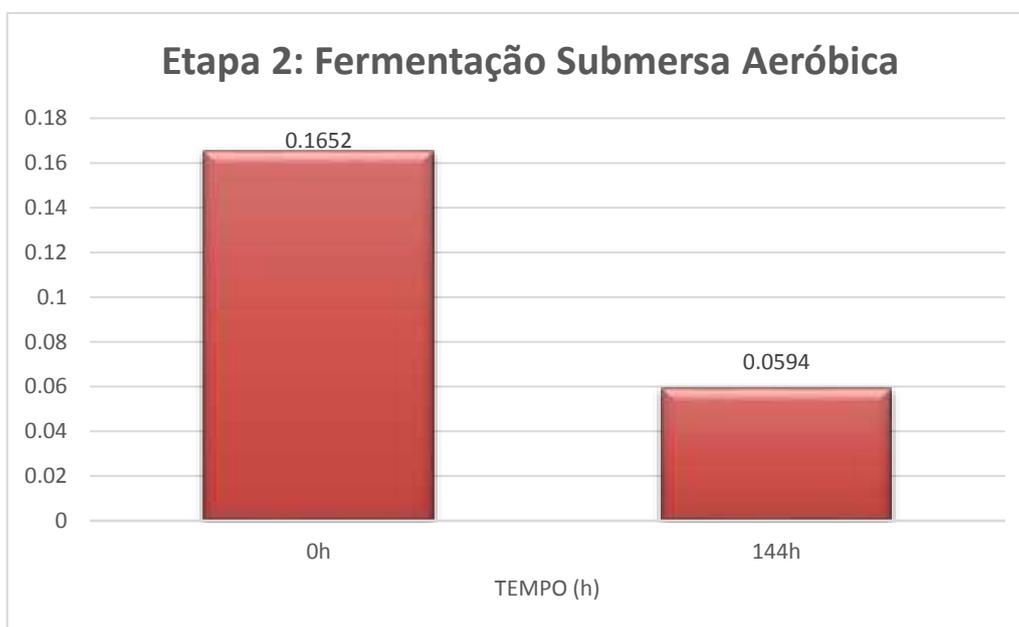
Fonte: Autora

Segundo Nitschke e Pastore (2002) os microrganismos possuem uma alta habilidade em aderir à superfícies nas quais podem liberar células para se multiplicarem e isto pode ser uma das mais importantes estratégias para sobreviver: facilidade em colonizar e escolher meios de acordo com sua necessidade e disponibilidade de nutrientes (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Desse modo, explica-se os processos de degradação de gordura ocorridos neste estudo. Foi fornecido um meio altamente nutritivo para o fungo, no qual, ele pôde se conectar ao substrato e se reproduzir. Como consequência, houve a liberação de surfactantes como metabólito secundário.

4.5 Etapa 2: Fermentação submersa aeróbica e análise de gravimetria.

Os valores expressos em gramas no gráfico, correspondem à média do que restou de gordura nos balões(triplicatas) após 6 dias de experimento.

Gráfico 3 - Quantidade média de gordura não degradada pelo fungo na Etapa 2-144h



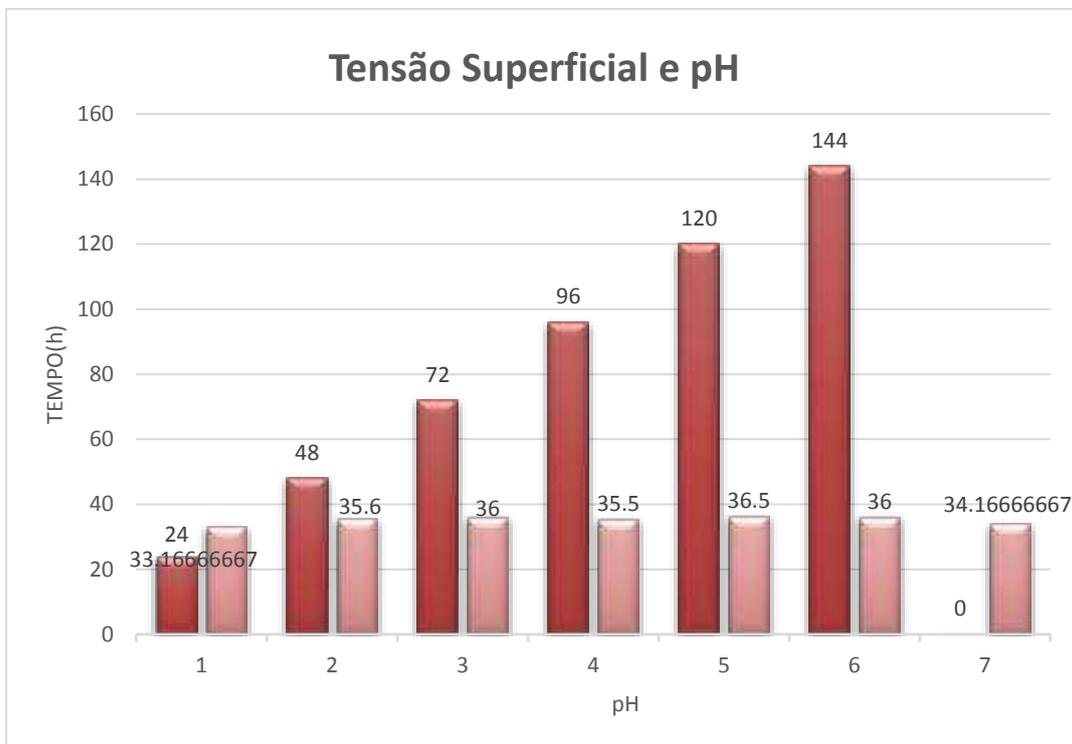
Nota-se que o percentual médio de redução de gordura pelo ESC 01 nesta etapa foi em média 64% (menor do que na etapa 1), no entanto, em uma das triplicatas, o percentual de redução foi igual ao da etapa 1 (cerca de 99%), o que continua a provar a eficiência do fungo. Isto pode ter ocorrido, pois, notou-se visualmente que nesta triplicata o crescimento celular foi mais intenso, o que pode ser devido ao local em que o frasco se encontrava e à exposição à luz. Com relação à quantidade de borra presente no meio, a notou-se grande degradação da matéria orgânica ao longo dos 6 dias de experimento.

4.5.1 Determinação da Tensão Superficial (T.S)

Os gráficos de T.S foram elaborados considerando a média por cada dia do experimento. Considerando o meio puro os resultados sempre foram 23 mN/m. Após a aplicação do substrato a tensão superficial do meio subiu para 32/33 mN/m.

Nota-se que o fungo ESC 01, apesar de ter degradado bastante o percentual de gordura, ele não é um bom redutor da tensão superficial. Pelo contrário, os valores variaram em média de 33 mN/m a 36 mN/m mostrando um aumento irregular. Mais precisamente, as triplicatas 01 e 1.2 chegaram a alcançar uma tensão superficial de 38 mN/m quando o pH obteve sua máxima diminuição.

Gráfico 4 - Avaliação da Tensão Superficial Tempo/Média-Etapa 2



4.5.2 pH e Temperatura

Observou-se que o pH reduziu bastante no tempo 72h em uma das triplicatas, chegando a 3.92. Uma das razões para a diminuição do pH é a produção de ácido pelo fungo podendo-se afirmar, portanto, que o pH mais ácido tende a elevar a tensão do meio, já que nesse mesmo ponto a tensão teve seu maior valor coletado de 38 mn/M. Ou seja, o fungo pode não ser um bom redutor da tensão superficial por produzir um ácido que eleva a tensão do meio.

Gráfico 5 - Média de pH / tempo-Etapa 2

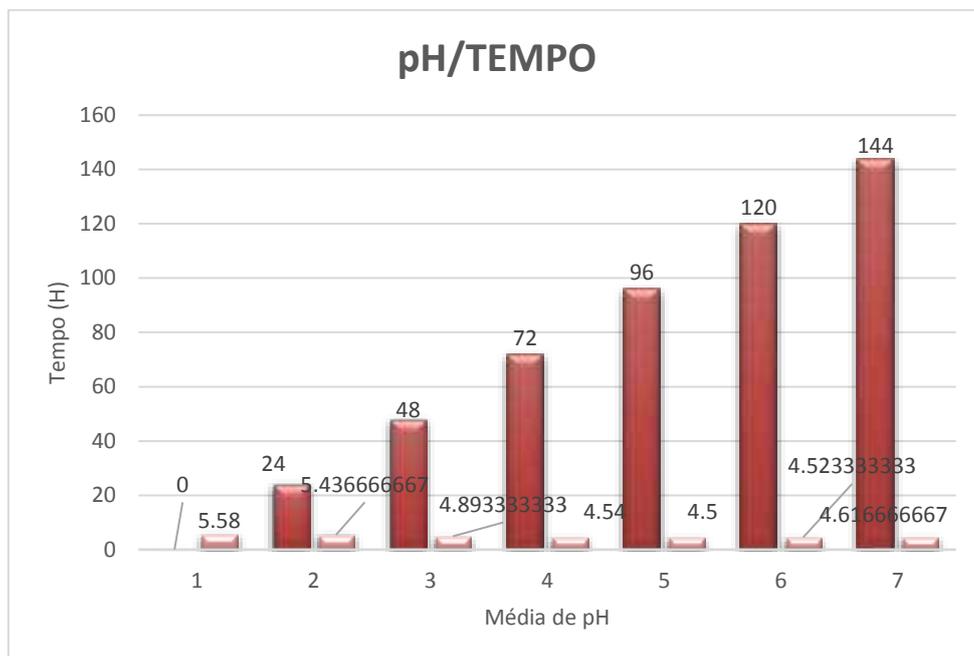
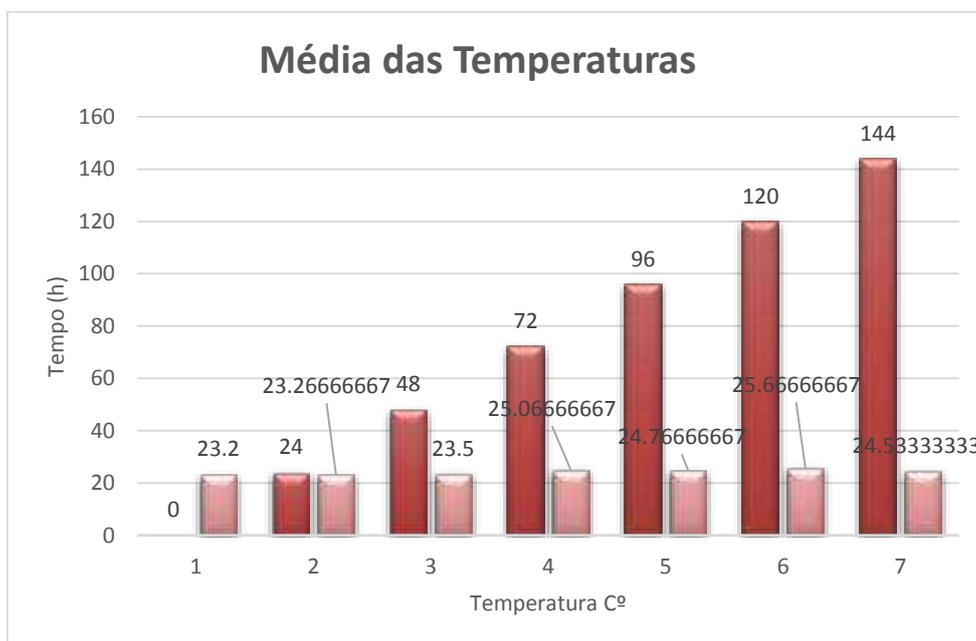


Gráfico 6 - Média de temperaturas durante os 6 dias-Etapa 2



A média de temperaturas se manteve igual no decorrer dos dias, registrando-se cerca de 25°C, com variação baixa de 1° a 2°C para mais ou para menos. O fungo se comporta bem e sem grandes flutuações em temperatura ambiente constante, o que propicia a não interferência nos resultados do experimento.

4.5.3 Índice de Emulsificação

Após cálculos pertinentes à esta análise especificados na metodologia deste estudo e após observação diária, percebeu-se que este fungo pode ser um bom agente emulsificante, o que evidencia possivelmente que ele é um microrganismo viável a ser aplicado em processos de tratamento de poluição ambiental, seja para biorremediação, derramamento de substâncias oleosas em corpos hídricos ou limpeza de tanques e bobinas que recebem aplicação química.

Gráfico 7 - Percentual de Emulsificação por tempo-Etapa 2

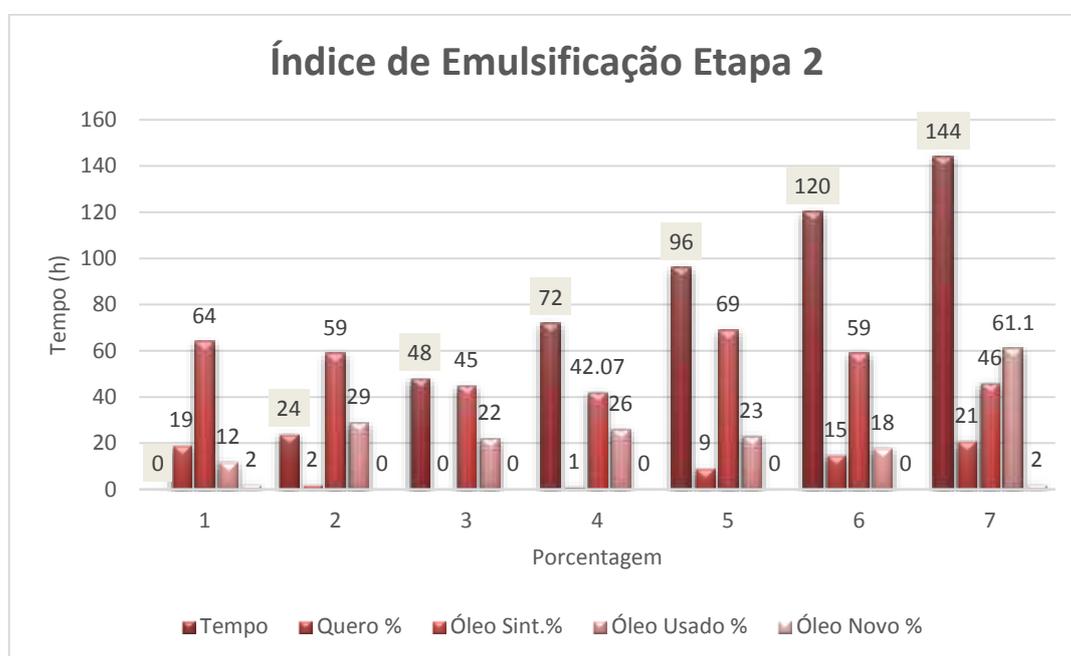


Tabela 5 - Interpretação do Gráfico 8 (Médias em porcentagem)

Tempo	24h	48h	72h	92h	120h	144h
Quero %	2	0	1	9	15	21
Óleo Sint.%	59	45	42	69	59	46
Óleo Usado%	29	22	26	23	18	61
Óleo Novo%	0	0	0	0	0	2

Considerando o resultados obtidos do tempo 0h, no qual, também houve emulsificação, a constituição do meio Czapek pode ter influenciado nos resultados e não pela presença de microorganismos, já que todos os cuidados foram tomados para evitar contaminação. Sendo

assim, pode-se dizer que pelas médias especificadas e pelo cálculo da fórmula, a querosene, o óleo sintético e óleo usado foram emulsificados, o que demonstra a produção de biosurfactante pelo fungo. Sobre a emulsificação em óleo de soja novo, o fungo ESC01 não é viável, pois permaneceu sem emulsificação em todos os tempos. Na tabela 6 é possível verificar estatisticamente quais dados são relevantes considerando o tempo como fator influenciador na emulsificação.

Figura 21 - Querosene emulsificado



Fonte: Autora

Figura 22 –Óleo novo não emulsificado



Fonte: Autora

Figura 23 - Óleo Sintético emulsificado



Fonte: Autora

4.5.4 Análises estatísticas -Etapa 2

Tabela 6 - Resposta estatística - Etapa 2

	Correlação Pearson	Intervalo de confiança		Estatística T	P- valor	R² Ajustado
Tensão S. (y1)	0.2699619	- 0.606369	0.8501808	0,62693	0.5582	0,07288
pH (y2)	-0.8617126	-0.97929	-0.309486	-3,7975	0.01266	0,6911
Querosene (y3)	0.3717477	- 0.529559	0.8787905	0,89542	0.4116	-0.0341
Óleo Sintético (y4)	-0.2117301	- 0.832112	0.6440127	-0,48443	0.6486	-0.1462
Óleo Usado (y5)	0.07203767	- 0.720084	0.7826388	0,1615	0.878	0.005

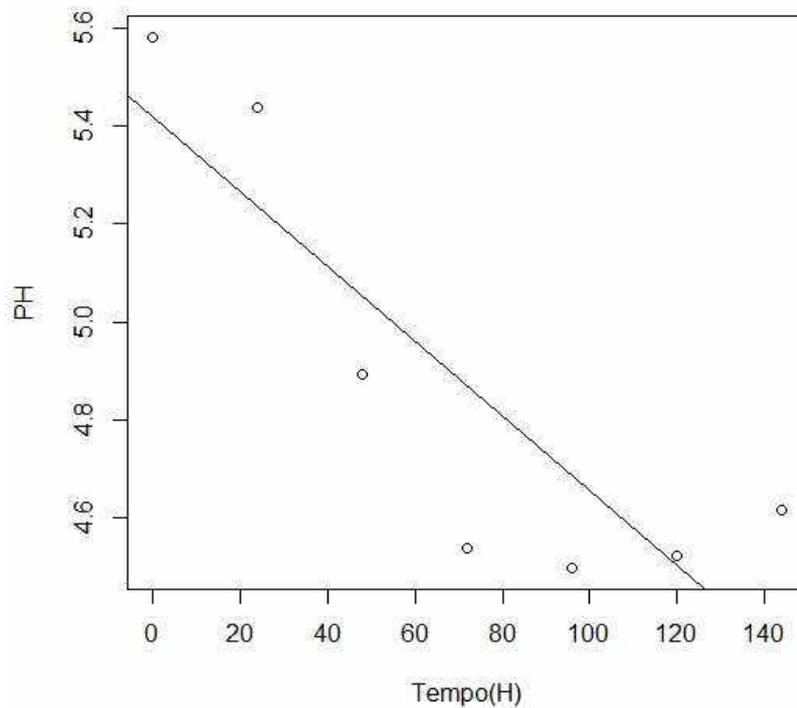
Verificou-se que a variável dependente y2 (pH) foi o único parâmetro que obteve uma relação linear forte com a variável independente x(tempo). Além disso, a hipótese nula (correlação igual a zero) foi rejeitada ao nível de 95% de confiança. Com relação aos outros parâmetros, não rejeitou a hipótese nula , ou seja, não há correlação com o tempo, sendo assim não foi possível gerar um modelo de regressão pois as variáveis obtiveram um comportamento não linear. Porém, isto não quer dizer que o parâmetro de emulsificação é inviável para aplicabilidade em processos ambientais, dado o que foi explicado anteriormente e mostrado pelos gráficos e tabelas pertinente à cada resultado. Pode-se dizer apenas que o tempo não influencia diretamente e linearmente no potencial de emulsificação, sugerindo-se então um tempo mais prolongado de pesquisa para este parâmetro na presença de oxigenação constante. Segundo Rufino et al., alterações que ocorrem na tensão superficial do caldo metabólico são complicadas de serem interpretadas, uma vez que cada resíduo oleoso possui uma específica composição e isso afeta no processo de bioconversão pelos microrganismos, resultando em diferentes respostas.

Tabela 7 - Intercepção do parâmetro y2

$y_2 = 5,4175 - 0,007604x$					
(pH)	Estimativa	Erro Padrão	Estatística T	P valor	R2 ajustado
Intercepto	54,175	0,173275	31,265	<0,001	0,6911
x	-0,007604	0,002002	3,798	0,0127	

Verifica-se que o parâmetro y2 é significativo ao nível de 95% de confiança (P valor<0,05). Conclui-se que a cada aumento na unidade de tempo, há um decréscimo de 0,007 no valor do pH, portanto, aumento na produção de ácido. O presente modelo consegue explicar cerca de 70% da variação total (R2 ajustado =0,69).

Gráfico 8 - Representação da variável $y_2(\text{pH})$.

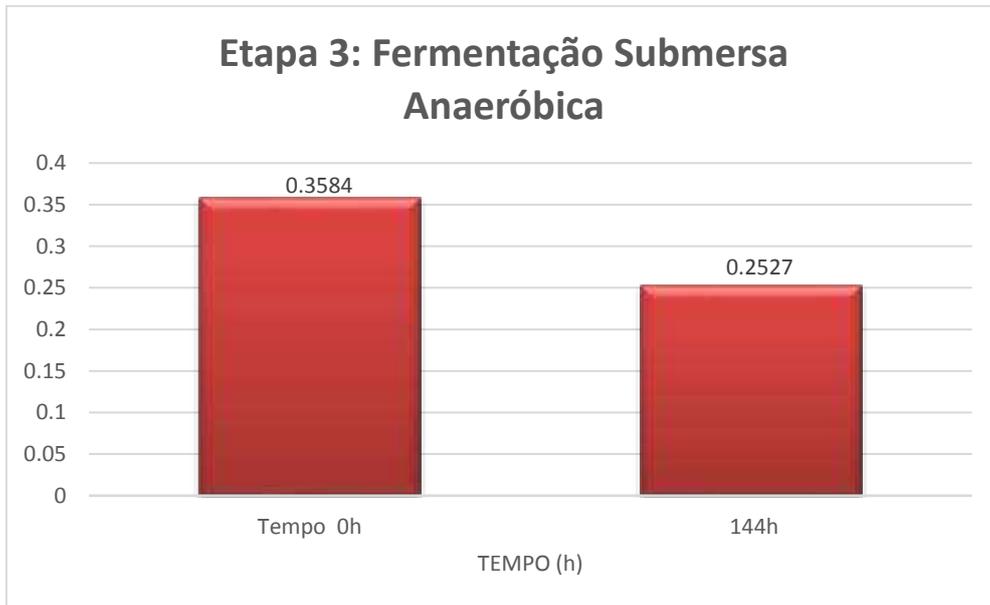


Neste caso, parece que existe uma relação linear negativa, pois quanto mais o tempo passa (eixo x), menor é o valor do pH (eixo y), indicando associação com a produção de ácido conforme o tempo.

4.6 Etapa 3: Fermentação submersa anaeróbica e análise de gravimetria

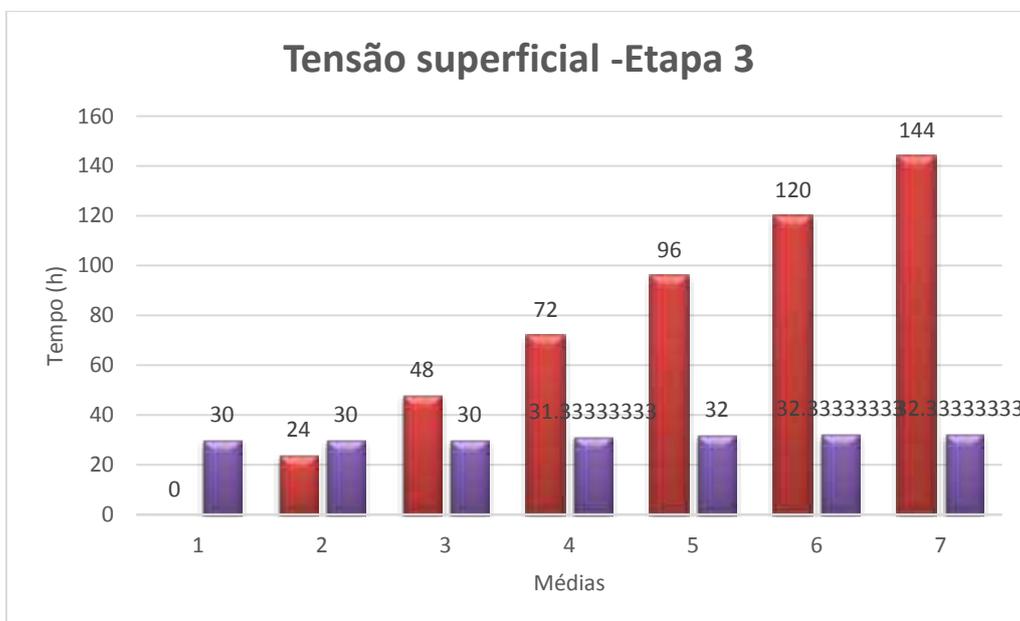
Nota-se que o percentual médio de redução de gordura pelo ESC 01 nesta etapa 3 foi de apenas 30% sendo menor do que na Etapa 2 que obteve o dobro de degradação. Pode-se afirmar então, que de modo anaeróbico o fungo reduz sua eficácia na degradação da gordura, conforme mostrado no gráfico 10.

Gráfico 9 - Quantidade média de gordura não degradada pelo fungo na Etapa 3-144h



4.6.1 Determinação da Tensão Superficial

Gráfico 10 - Avaliação da Tensão Superficial Tempo/Média -Etapa 3



Nesta etapa 3, a variação da tensão superficial foi menor do que na etapa 2, como pôde ser percebido pelo gráfico 11.

4.6.2 pH e Temperatura

Observa-se que as médias de pH encontram-se similares à etapa 2, no entanto, na etapa 3 não houve nenhuma uma triplicata com valores menores do que 4, o que ocorreu na etapa 2 quando o fungo foi exposto à oxigenação constante, conforme o gráfico 12.

Gráfico 11 - Média de pH/ tempo Etapa 3

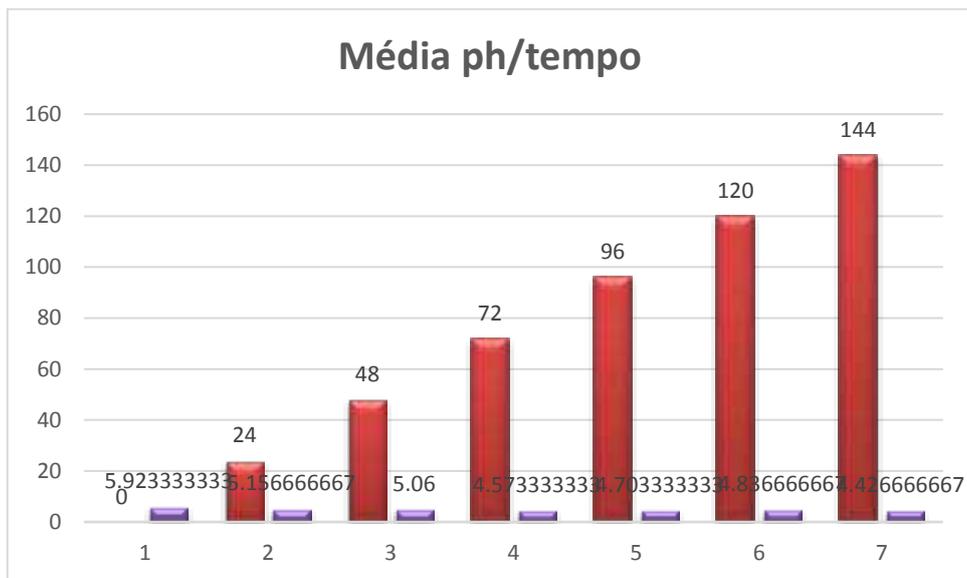
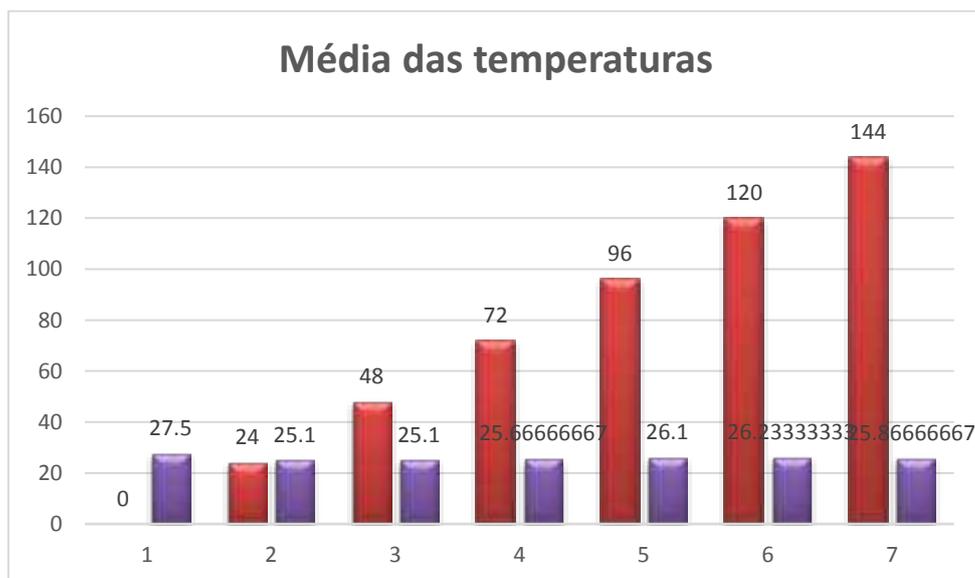


Gráfico 12 - Média das temperaturas durante os 6 dias- Etapa 3



A média de temperaturas se manteve igual no decorrer dos dias, como na etapa 2, já que as duas etapas foram realizadas em período próximo.

4.6.3 Índice de Emulsificação

Gráfico 13 - Percentual de Emulsificação por tempo-Etapa 3

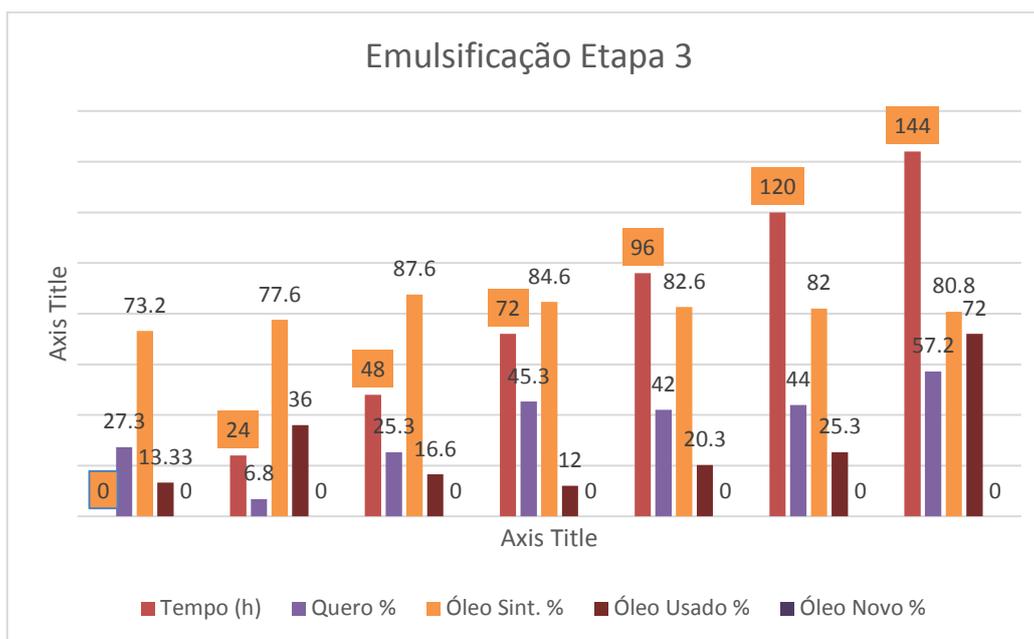


Tabela 8 - Interpretação do Gráfico 14

Tempo	24h	48h	72h	92h	120h	144h
Quero %	7	25	45	42	44	57
Óleo Sint.%	78	87	85	83.5	82	81
Óleo Usado%	36	17	12	20	25	72
Óleo Novo%	0	0	0	0	0	0

Considerando o resultados obtidos do tempo 0h , no qual, também houve emulsificação da querosene, do óleo sintético e do óleo usado como na etapa 2, pode ter ocorrido somente pela constituição do meio Czapek. Nos demais tempos, observa-se alterações pequenas se comparadas com a etapa 2, na qual, houve maiores discrepância dos dados. Sobre a emulsificação em óleo novo, o biossurfactante produzido pelo fungo ESC01 não conseguiu emulsificá-lo.

4.6.4 Análises estatísticas- Etapa 3

Tabela 8 - Respostas estatísticas- Etapa 3

	Correlação de Pearson	Intervalo de Confiança		Estatística T	P valor	R ² Ajustado
Tensão S.(z1)	0.9415962	0.6480679	0.9915613	6,2524	0.001534	0.8639
pH (z2)	-0.8490187	-0.9772572	-0.2660844	-3,5931	0.01566	0.665
Querosene (z3)	0.8343778	0.2187982	0.9748829	3,3849	0.01957	0.6354
Óleo Sintético (z4)	0.4334304	-0.4745054	0.894519	1,0754	0.3313	0.0254
Óleo Usado (z5)	0.5796908	-0.3076839	0.9277487	1,5908	0.1725	0.2032

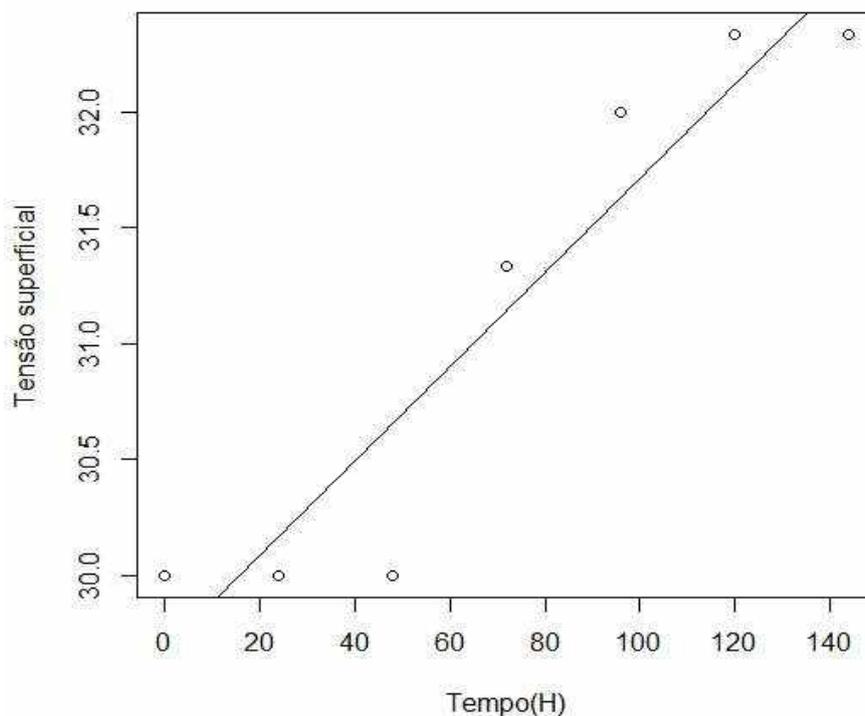
As variáveis dependentes z1 (Tensão Superficial), z2 (pH) e z3 (Querosene) possuíram uma relação linear forte com a variável independente x(tempo). Com relação aos outros parâmetros, não rejeitou a hipótese nula, ou seja, não há correlação com o tempo, sendo assim não foi possível gerar um modelo de regressão pois as variáveis não obtiveram um comportamento linear. No entanto, como na Etapa 2 o óleo sintético e o óleo usado foram emulsificados pelo biossurfactante, porém, de modo irregular sem associação direta com o tempo de análise.

Tabela 9 - Interceptação parâmetro z1

T.S. $z1=29,678571+0,020337x$					
	Estimativa	Erro Padrão	Estatística T	P valor	R2 ajustado
Intercepto	29,678,571	0,281466	105,443	<,001	0,8639
X	0,020337	0,003253	6,252	0,00153	

Com relação ao z1, observa-se que as estimativas dos parâmetros foram altamente significativos (P valor<0,01). Além disso, verifica-se que 86% da variável dependente consegue ser explicada pelo regressor (R2 ajustado=0,86). Pode se afirmar que cada aumento na unidade de tempo representa um aumento de 0,02 na unidade da tensão superficial considerando a associação com a diminuição do pH. Apesar de ter sido uma relação altamente significativa, para processos de redução de tensão superficial, o biossurfactante produzido não é ideal.

Gráfico 14 - Representação da variável z1 (T.S).



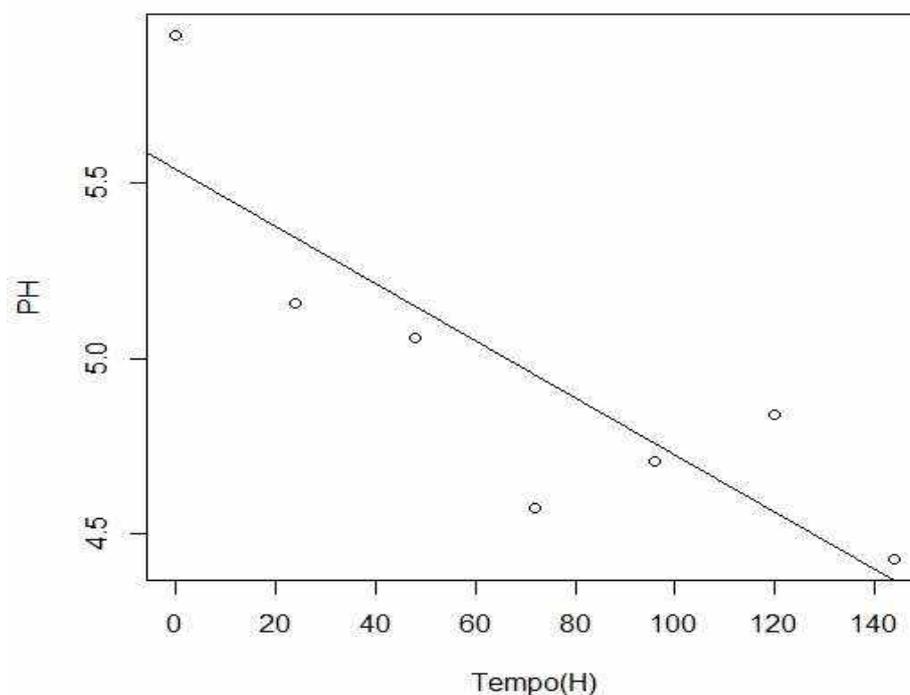
Neste caso observou-se que existe uma relação positiva caracterizando-se por uma reta ascendente, pois quanto mais o tempo (eixo x) aumentava, maior era a tensão superficial do meio (eixo y).

Tabela 10 - Intercepção parâmetro z2

pH $z2=5,542143-0,008165x$					
	Estimativa	Erro Padrão	Estatística T	P valor	R2 ajustado
Intercepto	5,542,143	0,196631	28,185	<0,001	0,665
x	-0,008165	0,002272	-3,593	0,0157	

Observa-se no parâmetro z2 que as estimativas são significativas ao nível de 95% de confiança (P valor <0,05). Verifica-se que a cada aumento na unidade de tempo, há um decréscimo de 0,008 na unidade do pH , anaerobicamente. O modelo conseguiu explicar cerca de 66% da variação total (R2 ajustado= 0,665).

Gráfico 15 - Representação da variável z2 (pH)



Conforme na etapa 2, existe uma relação linear negativa, pois quanto mais o tempo passa (eixo x), menor é o valor do pH (eixo y), saindo de um meio básico e indicando a produção de ácido conforme o tempo.

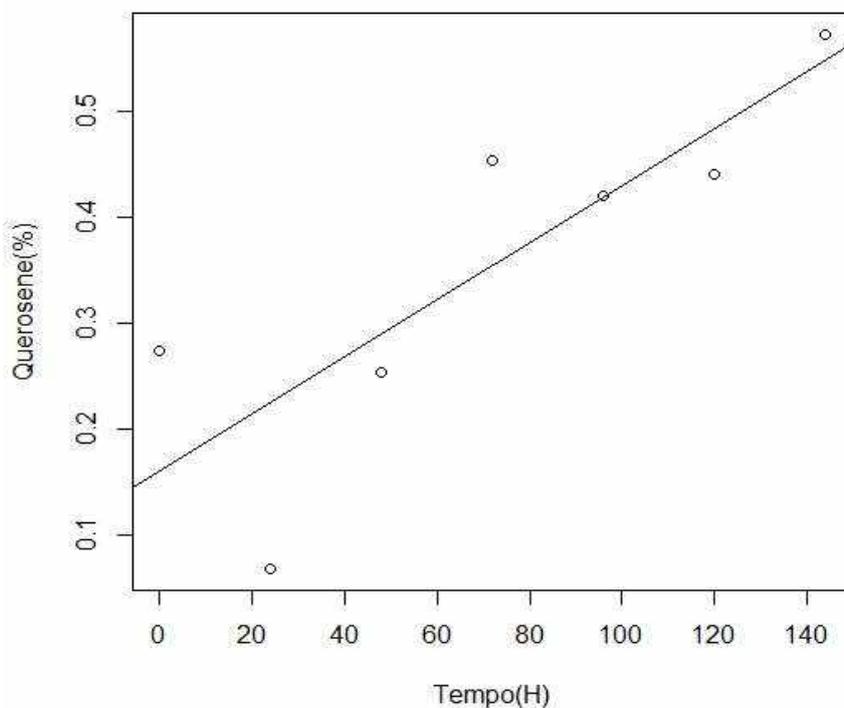
Tabela 11 - Interceptação parâmetro z3

Querosene $z3=0,1609524+0,0026865x$					
	Estimativa	Erro Padrão	Estatística T	P valor	R2 ajustado
Intercepto	0,1609524	0,0686795	2,344	0,0661	0,6354
x	0,0026865	0,0007937	3,385	0,0196	

Observa-se no parâmetro z3 que a estimativa do intercepto não foi significativa ao nível de 95% de confiança. No entanto, optou-se por não retirar este parâmetro, uma vez que é de interesse estimar a média no tempo igual a zero. Conclui-se que a cada aumento na unidade de

tempo, há um aumento de 0,002 na porcentagem de emulsificação da querosene. O presente modelo explica cerca de 63% da variação total (r^2 ajustado= 0,63).

Gráfico 16 - Representação da variável z3 (Querosene)



Observou-se neste caso uma relação positiva, com reta ascendente. À medida que o eixo x aumenta, o eixo y também aumenta na mesma proporção.

5 CONCLUSÃO

O fungo ESC01 é um ótimo degradador de gordura quando exposto ao oxigênio, tendo capacidade de reduzir o percentual de gordura em 99%. Além disso, seus metabólitos podem ser utilizados como agentes emulsificantes em processos de limpeza de tanques e reatores de indústrias utilizam substâncias à base de óleo em seus processos, dado que demonstrou um bom potencial em emulsificar os compostos estudados, ou seja, há a possibilidade de substituir ou pelo menos diminuir o uso de produtos químicos para remover gorduras. O fungo ESC 01 produz ácido tanto em modo aeróbico quanto anaeróbico, o que pode ser viável para vários processos industriais, seja para fabricação de novos produtos seja para processos de limpeza. Entretanto, não é eficaz em reduzir a tensão superficial do meio, já que este parâmetro em alguns tempos se manteve estável no dias iniciais e aumentou levemente em outros tempos inverso e proporcionalmente aos índices de pH. Outro fator associado a não redução da tensão superficial é o peso molecular do biossurfactante produzido, pois, biossurfactantes de baixo peso molecular são bons emulsificadores e os de alto peso molecular são bons redutores de tensão, o que nos indica claramente o tipo de biossurfactante produzido por este fungo. Tais resultados afirmam de forma prática o que é dito na literatura, mostrando que os fungos possuem grande capacidade de adaptação em ambientes contendo resíduos oleosos, o que para processos de biorremediação e limpeza de ambientes contaminados, podem ser uma boa opção de tratamento, caso sejam manipulados corretamente. Sendo assim, essa pesquisa contribui imensamente tanto para melhoria da ciência quanto para questões comerciais e econômicas, sem deixar de lado a educação ambiental, pela qual, pode proporcionar à sociedade novas visões sobre a importância do descarte correto de resíduos, bem como ter noção que é possível utilizar mais substâncias naturais em detrimento das químicas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.; PEREIRA I.; RIOS H. Avaliação da oxidação de óleos, gorduras e azeites comestíveis em processo de fritura. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 118-126, maio/ago. 2013. Acesso em: 20 Julho 2018. <http://dx.doi.org/10.15448/1983-652X.2013.2.13143>
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Informe Técnico nº 11, de 5 de outubro de 2004**. Brasília, DF, out. 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimento/informes>>. Acesso em: 2 ago. 2018.
- ALBERICI, R. M. et al. Used frying oil: a proper feedstock for biodiesel production. **Bioenergy Research**, New York, v. 5, n. 4, p. 1002–1008, 2012. Acesso em : 10 jun. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9216-0>
- ENGENHARIA bioquímica, de bioprocessos e biotecnologia. In: GRUPO ABRIL. **Guia do Estudante**. [São Paulo]. 2018. Disponível em : <<https://guiadoestudante.abril.com.br/profissoes/engenharia-bioquimica-de-bioprocessos-e-biotecnologia/>>. Acesso em: 30 abr. 2018.
- ARAÚJO, A. M. et al. Energias renováveis: borra ácida do processamento do óleo de soja: processos reacionais e caracterizações. In: ENCONTRO NACIONAL DOS ESTUDANTES DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 14., 2016, Brasília; FÓRUM LATINO DE ENGENHARIA E SUSTENTABILIDADE, 2., 2016, Brasília; SIMPOSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL: Centro Oeste, 1., 2016, Brasília. **Anais...** Brasília, DF: UnB, 2016. P. 1-7. Disponível em: <<http://conferencias.unb.br/index.php/ENEEAmb/ENEEAmb2016/paper/viewFile/4991/1240>>. Acesso em: 12 nov. 2018. <https://doi.org/10.5151/engpro-eneeamb2016-er-008-4991>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. **ABIOVE**: boas notícias para 2017 são a safra de mais de 101 milhões de t e o preço em patamar... São Paulo, 2016. Nota à imprensa. Disponível em: <http://abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/13012017-172559-14_12_2016_-_press_release_almoço_com_jornalistas__final.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2018.
- BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 87, p. 427-444, 2010. Acesso em: 8 ago. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
- BARBOSA, L.C. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007.
- BRASIL. **Projeto de Lei nº 2.074 de 19 de setembro de 2007**. Dispõe sobre a obrigação dos postos de gasolina, hipermercados, empresas vendedoras ou distribuidoras de óleo de cozinha e estabelecimentos similares de manter estruturas destinadas à coleta de óleo de cozinha usado e dá outras providências. 2007. Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=1256BF81C681B546AE882AC6D27E7FA2.node2?codteor=509100&filename=A+vulso+-PL+2074/2007>. Acesso em: 12 nov. 2018.

BRASIL. Decreto n.º6.514, de 22 julho de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 fev. 1998. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Decreto/D6514.htm>. Acesso em 12 nov. 2018.

BOCZEK; RICE; JOHNSON. Spread Plate Technique. Spread Plate Technique. **Encyclopedia of Food Microbiology**. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA, 636–637, 2014. Acesso em: 9 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00331-1>

BYSS, M. et al. Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. **Chemosphere**, República Tcheca, v.3, p.1518-1523, July, 2008. Acesso em: 16 sep. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.030>

CÉSAR, A. et al. The potential of waste cooking oil as supply for the Brazilian biodiesel chain. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Volta Redonda-RJ. v.72.2017. Acesso em: 21 mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.240>

COLLA, L.M. et al. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**. Rio Grande do Sul, v. 101, n. 21 p. 8308–8314, July. 2010. Acesso em: 3 abril 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução no 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005.

COSTA FILHO, Gerson Felipe da. **Biodegradação de óleo derivados de petróleo e de origem vegetal estimulada por biossurfactantes em meio aquoso e monitoramento de sua toxicidade**. 2011. 68 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

COSTA, D.; LOPES, G.; LOPES, J. Reutilização do óleo de fritura como uma alternativa de amenizar a poluição do solo. **Revista Monografias Ambientais. REMOA. Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**. UFSM, Santa Maria. v. 14, p.243-253. 2015. Acesso em: 10 nov. 2017.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: E. Blücher, 2011.

D'AGOSTO, M. et al. Evaluating the potential of the use of biodiesel for power generation in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Rio de Janeiro, v. 43, p.807-813 mar. 2015. Acesso em 02 set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.055>

DEMIRBAS. Waste management, waste resource facilities and waste conversion processes. **Energy Conversion and Management**, Sirkak-Turkey v. 52, p. 1280–1287. ed. Elsevier, 2011. Acesso em: 12 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.09.025>

ECÓLEO. Associação Brasileira para Sensibilização. **Coleta e reciclagem de resíduos de óleo comestível**. São Paulo: Secretaria de Meio Ambiente, 2017.

EUROPEAN UNION . **Directiva do Conselho, 16 de Junho de 1975, Eliminação de Óleo Usado.** dez. 2010. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex%3A31975L0439>>. Acesso em: 07 ago. 2018.

FOGAÇA, Jennifer. Reações de transesterificação. In: BRASIL Escola. Disponível em <<http://brasilescola.uol.com.br/quimica/reacoes-transesterificacao.htm>> Acesso em: 06 fev. 2018.

FRANCISCO, Jéferson L.; FRANÇA Karime C. Métodos de tratamento de resíduos de petróleo. In: SERVIÇO BRASILEIRO DE RESPOSTAS TÉCNICAS. **Dossiê Técnico.** Rio de Janeiro: REDETEC, 2007. p.2-13.

FREIRE, Poliana C.; MANCINI Jorge F.; FERREIRA Tânia A. Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. **Revista de Nutrição.** Campinas, v. 26, n. 3 p. 353-368, maio/jun. 2013. Acesso em: 17 nov. 2018. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732013000300010>

GIMENES, Luciana J. **Fungos basidiomicetos:** técnicas de coleta, isolamento e subsídios para processos biotecnológicos. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 2010. Material didático ou instrucional do Curso de Capacitação de Monitores e Educadores. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Fungos_Basidiomicetos_Luciana_J_Gimenes.pdf>. Acesso em: 13 set. 2018

GONÇALVES, E. et al. Tensoativos biodegradáveis. **Gestão em Foco,** Amparo, n. 7, p.252-262, 2015. Disponível em: <http://www.unifia.edu.br/revista_eletronica/revistas/gestao_foco/artigos/ano2015/tensoativos_biodegradaveis.pdf> Acesso em: 12 ago.2018.

GUDIÑA, E et al. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation,** Braga. v. 69, p. 56-64, jun. 2012. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830512000030>> Acesso em 01 out.2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001>

GU, W. et al. Fungi diversity from different depths and times in chicken manure waste static aerobic composting. **Bioresource Technology.** China, p.447-453. April.2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28538200>> Acesso em: jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.047>

HOCEVAR, L. Biocombustível De Óleos E Gorduras Residuais. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL.2005, Lavras. 953–957. Acesso em: 03 dez.2018.

IBGE. Uberlândia. In: IBGE. **IBGE cidades.** 2017. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/uberlandia/panorama>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

KLINGELFUS, Vera. **Reaproveitamento do óleo de cozinha:** possibilidades de projetos nas escolas do campo. Paranaguá: Universidade Federal do Paraná, 2011. Curso de Especialização em Educação do Campo EAD.

LIU, Z. et al. Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, China v.5 n.6, p. 6030-6038, Agosto 2017. Acesso em 10 set.2018. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.021>

MAGALHÃES, A. et al. Proc – Projeto de Reciclagem de Óleo de Cozinha Usado: um desafio para a educação ambiental. In: EXPOSIÇÃO DE EXPERIÊNCIAS MUNICIPAIS EM SANEAMENTO, 19., 2015, Poços de Caldas; Assembleia Nacional da ASSEMAE, 45., 2015, Poços de Caldas. [Trabalhos apresentados]. Poços de Caldas: ASSEMAE, 2015. Disponível em: <<http://www.trabalhosassemiae.com.br/sistema/repositorio/2015/1/trabalhos/124/190/t190t8e1a2015.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

MARTINS, Paola; MARTINS, Vilásia. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 127. p. 10-16, 2018. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0964830516304711?token=98D11D8CC2714DB68402BAC7C3B53456CBDCAC80F3482096C5398443B14FBF24607C6A30354E5460965CEA3E0F9B9675>>. Acesso em: 28 nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.005>

MENEZES, Cristiano R.; BARRETO, Andressa R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas**, Santa Maria.v.19, n.2, p.1365-1391 ago. 2015. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/16853/pdf>> Acesso em: 13 mar.2018. DOI: 105902/2236117016853

MONTENEGRO, M. et al. Aproveitamento de óleos e gorduras residuais para obtenção de produtos de alto valor agregado: formulação de tinta de impressão a partir de óleo residual de fritura. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 1, p. 26–37, 2013. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v5n1a04.pdf>. Acesso em 10 ago.2017. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130004>

NANA , X. et al. Study of bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. **Bioresource Technology**, China, v. 149,p. 22-30, jul. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413014478?via%3Dihub>> Acesso em 20 Jun.2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.024>

NITSCHKE, Márcia.; PASTORE, Gláucia M. Biossurfactantes: Propriedades E Aplicações. **Revista Química Nova**,v.25, n.5, p.772-776 2002. Disponível em :<<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n5/11408.pdf>> Acesso em: 15 março. 2018. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

NOGUEIRA,Daniela. Dmae lança Programa de Reciclagem de Óleo de Cozinha em Uberlândia. **Correio de Uberlândia**, Uberlândia, 2014. Disponível em:<<http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/dmae-lanca-programa-de-reciclagem-de-oleo-de-cozinha-em-uberlandia/>>. Acesso em: 07 maio 2018.

OLIVEIRA, B. et al. **Plano de gerenciamento integrado do resíduo óleo de cozinha-PGIROC**. Belo Horizonte: FEAM, 2009. Disponível em:

<http://www.projetoreciclar.ufv.br/docs/cartilha/pgi_oleo_cozinha.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2018.

PEREIRA, Daniel D.; ALBUQUERQUE Sérgio D. O estudo da produção de biossurfactantes por fungos amazônicos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC**. Viçosa, MG, v. 3, n. 4, p. 0688-0695. 2017. Disponível em: <<https://periodicos.ufv.br/ojs/jcec/article/view/2273>>. Acesso em: 18 Jun.2018. DOI:10.18540/jcecvl3iss4pp0688-0695

RABELO, Renata A.; FERREIRA, Osmar M. **Coleta seletiva de óleo residual de fritura para aproveitamento industrial**. Universidade Católica de Goiás – Departamento de Engenharia – Engenharia Ambiental, Goiânia, Junho, 2008

REDE SIMBIÓTICA DE BIOLOGIA E CONSERVAÇÃO. **Reino Fungi**. [2018]. Disponível em : <<http://www.simbiotica.org/fungi.htm>> Acesso em: 02 ago. 2018.

RODRIGUES, Lígia R.; TEIXEIRA, José A. Biomedical and therapeutic applications of biosurfactants. In: **Landes Bioscience and Springer Science+Business Media**, Braga: Centre of Biological Engineering da Universidade do Minho, 2010. Chapter 6, p.75-76.

RUFINO, R. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Pernambuco. **Electronic Journal of Biotechnology**. Disponível em: <<https://scielo.conicyt.cl/pdf/ejb/v17n1/a06.pdf>> v.17.,n.1, p. 35-38. 2014. Acesso em : 10 ago.2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006>

SALAM, D.; SUIDAN, M.; VENOSA A. Biodegradation and toxicity of vegetable oils in contaminated aquatic environments: Effect of antioxidants and oil composition. **Science of Total Environment**. Cincinnati, v. 547. p. 95-103. Jan.2016. Acesso em: 14 set 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.138>

SANTOS, D. et al. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Recife., v.3, n. 3, Feb.2014 . Acesso em: 13 out.2018 DOI: 10.1016/j.bcab.2014.02.004

SANTOS, F. et al. Utilização de Resíduos como Substrato para a Produção de Biossurfactante por *Yarrowia Lipolytica*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.FAURGS, 25., 2016, Gramado, 2016. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/712.pdf>>. Acesso em: 15 ago.2018.

SOUZA, E. et al. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 89 p. 88- 94, Jun.2014. Acesso em: 30 ago.2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>

SOUZA, K. et al. New glycolipid biosurfactants produced by the yeaststrain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 154, n 1. p.373-382. Jun. 2017. Acesso em: 16 ago 2018. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.041>

SHARMIN, E. et al. Recent advances in vegetable oils based environment friendly coatings: A review. **Industrial Crops and Products**. v.76,n.15., p 215-229 July 2015. Disponível em:

< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015301953> > Acesso em 8 set.2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.022>

SPERB, J. et al. Avaliação qualitativa da produção de lipases e biossurfactante por fungos isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, Niterói, v.17, n. 3, p.385-397. 2015. Acesso em: 5 dez.2017. <https://doi.org/10.22409/engevista.v17i3.690>

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECT AGENCY. **Nonylphenol (NP) and Nonylphenol Ethoxylates (NPEs)**. 2010. Disponível em : < https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rin2070-za09_np-npes_action_plan_final_2010-08-09.pdf >. Acesso em: 08 jun.2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Vegetable Oil and Animal Fats**. Abril 2018. Disponível em: < <https://www.epa.gov/emergency-response/vegetable-oils-and-animal-fats> > Acesso em: 08 jun.2018.

VARJANI, Sunita ; UPASANI, Vivek. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, Essex, v. 232, p.389-397Feb.2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417301645?via%3Dihub>> Acesso em : 5 set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

ZHANG, C., et al. Recent advances in vegetable oil-based polymers and their composites. **Progress in Polymer Science**, lmsford, v.71.Jan.2017. Acesso em: 12 nov.2017. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2016.12.009