



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRITU SENSU*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
AMBIENTAIS - MESTRADO

THAYNÁ RHOMANA DA SILVA CÂNDIDO

**PRODUÇÃO DE BIODISSURFACTANTE POR *Mucor* sp.
E *Rhizopus* sp. E APLICAÇÃO NA
BIORREMEDIAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E
SOLO CONTAMINADOS POR PETRÓLEO**

Recife, 10 de fevereiro de 2022

THAYNÁ RHOMANA DA SILVA CÂNDIDO

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Mucor* sp.
E *Rhizopus* sp. E APLICAÇÃO NA
BIORREMEDIAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E
SOLO CONTAMINADOS POR PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Rosileide Fontenele Andrade Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki

Recife, 10 de fevereiro de 2022

Ficha Catalográfica

C217p Cândido, Thayná Rhomana da Silva
Produção de biossurfactante por *Mucor sp.* e *Rhizopus sp.*
e aplicação na biorremediação de amostras de água e solo
contaminados por petróleo / Thayná Rhomana da Silva
Cândido, 2022.
77 f.: il.

Orientadora: Rosileide Fontenele Andrade Silva
Coorientadora: Galba Maria de Campos Takaki,
Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos
Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos
Ambientais, 2022.

1. Biotecnologia.. 2. Mucorales. 3. Biossurfactantes.
4. Resíduos agroindustriais. I. Título.

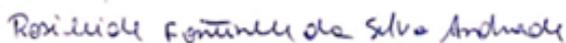
CDU 574.6

Luciana Vidal - CRB4/1338

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Mucor* sp.
E *Rhizopus* sp. E APLICAÇÃO NA
BIORREMEDIÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁGUA E
SOLO CONTAMINADOS POR PETRÓLEO**

THAYNÁ RHOMANA DA SILVA CÂNDIDO

Examinadores:



Profa. Dra. Rosileide Fontenele Andrade Silva (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Prof. Dr. Marcos Antonio Barbosa de Lima
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP



Profa. Dra. Hélvia Waleska Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba - UFPB

Defendida em: 10/02/2022.

Coordenador (a): Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho em honra a Deus que me deu este tão sonhado título, ao meu pai *in memoriam* e namorado que sempre acreditaram em mim e me apoiaram nesta jornada. A minha orientadora pela confiança depositada e colegas de laboratório por toda ajuda despendida.

AGRADECIMENTOS

Colocando Deus acima de tudo, agradeço a Ele primeiro pela força a mim concedida enquanto sonhava e planejava com este título e durante a jornada que culminou com este momento.

Agradeço aos meus pais, que sempre investiram e acreditaram no meu potencial, assim como meu namorado, um grande incentivador dos meus sonhos.

Em especial ao meu querido pai, agora no céu, que mesmo além da vida me deu forças para continuar quando eu quase desisti.

Aos responsáveis pelo laboratório Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB), Adriana e André, por todo suporte e ensinamentos dados a mim.

Aos companheiros pesquisadores da turma 16 que juntos passamos por várias dificuldades, mas que uma a uma foram superadas.

Em especial a minha orientadora Profa. Dra. Rosileide Fontenele de Andrade Silva por ter confiado a mim este projeto e toda a sua ajuda e apoio na condução da pesquisa. À Uíara por toda paciência em me introduzir ao laboratório e dado comigo os meus primeiros passos.

Ao meu amigo Rafael pela parceria diária de trabalho juntos, amizade que foi além da bancada de laboratório.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) pelo ambiente estruturado equipado para todo o projeto.

A Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento e fomento à pesquisa.

A todos que ajudaram positivamente de alguma forma até este momento, muito obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I.....	xiii
3.1 Acidentes ambientais com petróleo e derivados	17
3.2 Biorremediação e as biomoléculas de Superfície Ativa: Biossurfactantes	22
3.3 Fungos Filamentosos Produtores de Biossurfactantes	29
3.3.1 Fungos Filamentosos da Ordem Mucorales	31
3.4 Produção sustentável de biossurfactantes	34
CAPÍTULO II	42
Abstract	43
Resumo	44
Resumen	44
2.1 Microorganisms	45
2.2 Renewable substrates	45
2.3 Inoculum preparation	46
2.4 Biosurfactant production	46
2.5 Factorial design.....	46
2.6 Determination of surface tension	46
2.7 Determination of emulsification index (EI24).....	46
2.8 Microscopic analysis of emulsions	47
2.9 Identification of functional groups of industrial waste	47
3.1 Production of biosurfactant by Mucorales fungi.....	47
3.2 Influence of carbon and nitrogen sources for biosurfactant production by <i>Mucor circinelloides</i> and <i>Rhizopus arrhizus</i>	48
3.3 Chemical characterization of waste used for production of	

biosurfactants by Mucorales fungi.....	49
3.4 Potential of the biosurfactant obtained from Mucorales fungi for formation of stable emulsions	50
CAPÍTULO III.....	54
Produção de biossurfactante por <i>Mucor circinelloides</i> UCP 0042 avaliado pela tensõesuperficial.....	62
Influência dos substratos renováveis na produção de biossurfactante por <i>Mucor circinelloides</i> UCP 0042.....	64
CAPÍTULO IV.....	76
Considerações finais	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figure 1** - Pareto diagrams obtained from the statistical analysis of the 2^3 full-factorial design applied to the production of biosurfactants by *Mucor circinelloides* UCP 0006 (A), *Mucor circinelloides* UCP 0005 (B) and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 (C). The point at which the effect estimates were statistically significant ($p = 0.05$) is indicated by dashed lines..... 49
- Figure 2** - Infrared spectrum (FTIR) of the structure of the INW used in production medium of biosurfactants by Mucorales fungi..... 50
- Figure 3** - Potential of the biosurfactant produced by *Mucor circinelloides* UCP 0006, *Mucor circinelloides* UCP 0005 and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 in formation of emulsions using burnt engine oil..... 50
- Figure 4** - Microscopic observation (40x increase) of the emulsions formed by biosurfactant of *Mucor circinelloides* UCP 0005 (A), *Mucor circinelloides* 0006 (B) and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 (C) 51

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Acidentes envolvendo derramamento de petróleo desde 1967 no mundo, local e quantidade liberada em meio ambiente	20
Tabela 2 - Fatores que influenciam na degradação de hidrocarbonetos e seus efeitos.	23
Tabela 3 - Principais classes de biossurfactantes e sua composição	25
Tabela 4 - Empresas e os biossurfactantes obtidos	28
Tabela 5 - Fungos filamentosos e os tipos de biossurfactantes produzidos	31
Tabela 6 - Principais fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo formulado com resíduo de macarrão instantâneo, milho e óleo pós-fritura para produção dos biossurfactantes pelas espécies de <i>Mucor circinelloides</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i>	36

CAPÍTULO II

Table 1 - Composition of instant noodle waste, corn steep liquor and post-frying soybean oil used as carbon and nitrogen sources in the culture media formulated for production of biosurfactants by species of Mucorales fungi (<i>Mucor circinelloides</i> and <i>Rhizopus arrhizus</i>)	45
Table 2 - Levels and variables of the 2 ³ full-factorial design for biosurfactant production by different Mucorales fungi.....	46
Table 3 - Surface tension results obtained by <i>Mucor circinelloides</i> UCP 0005, <i>Mucor circinelloides</i> UCP 0006 and <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1609 in 2 ³ full-factorial design	47
Table 4 - Surface tension obtained in this study compared with the literature in last five years involving culture of filamentous fungi in media containing substrates of renewable origin.....	48

RESUMO

No decorrer do processo de extração até a comercialização do petróleo, diversas atividades são potencialmente perigosas ao meio ambiente devido o elevado risco de vazamento de petroderivados em ambientes aquáticos e terrestres. Neste contexto, uma solução para remoção do petróleo e derivados é a aplicação de biossurfactantes definidos como compostos naturais e biodegradáveis produzidos por microrganismos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi produzir, extrair e caracterizar o biossurfactante produzido por espécies de *Mucor circinelloides* e *Rhizopus arrhizus* e aplicar na biorremediação de solo e água impactados por petróleo e derivados, desenvolvendo bioprocessos viáveis e ecossustentáveis. Os estudos iniciaram com aplicação de planejamento fatorial 2^3 utilizando os resíduos agroindustriais como milhocina, óleo pós-fritura e resíduo de macarrão instantâneo como nutrientes no meio de produção para quatro isolados da ordem Mucorales (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *Mucor circinelloides* UCP 0006, *Mucor circinelloides* UCP 0042 e *Rhizopus arrhizus* UCP 1609). As condições de cultivo foram pH 5,5 em fermentação submersa, agitação orbital de 150 rpm por 96 h. Os quatro isolados da ordem Mucorales foram capazes de utilizar os substratos como fontes nutricionais para produzir biossurfactantes. No entanto, a cepa que apresentou maior redução na tensão superficial (72 a 27 mN/m) foi *M. circinelloides* UCP 0006 na condição 3 do planejamento (1% resíduo de macarrão instantâneo, 4% de milhocina, na ausência do óleo de soja pós-fritura). A análise estatística realizada através do diagrama de Pareto confirma a importante influência da milhocina e do óleo pós fritura na redução da tensão superficial. O índice de emulsificação apresentado por *M. circinelloides* UCP 0005 foi significativo (70%) quando comparado aos valores obtidos pelas espécies de *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 (60% na condição 8) e *M. circinelloides* UCP 0006 (55,2% na condição 3). Por outro lado, o *M. circinelloides* UCP 0042 foi cultivado em novo meio de produção (contendo diferentes concentrações de milhocina, óleo pós-fritura e resíduo de macarrão instantâneo) de acordo com planejamento fatorial. De acordo com os resultados obtidos, na condição 7 do planejamento (1% resíduo de macarrão instantâneo, 4% milhocina e 1% óleo pós-fritura) ocorreu a máxima redução da tensão superficial (72 a 24 mN/m). Em adição, o potencial do biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042 na remoção de óleo diesel em solo arenoso foi avaliada. O biossurfactante produzido foi capaz de remover 78% de óleo diesel da areia da praia, além de apresentar potencial de dispersar petroderivado em água (33,2 cm² ODA) e degradar 93% do petroderivado, comprovando a capacidade de *Mucor circinelloides* UCP 0042 em produzir biossurfactante de elevado interesse industrial e ambiental.

Palavras-chave: Biotecnologia. Mucorales. Resíduos Agroindustriais.

ABSTRACT

During the process of extraction until commercialization of petroleum, several activities are potentially dangerous to the environment due to the high leak risk of petroderivatives in aquatic and terrestrial environments. In this context, a solution for removing of petroleum and derivatives is the application of biosurfactants defined as natural and biodegradable compounds produced by microorganisms. Thus, the objective of this work was produce, extract and characterize the biosurfactant produced by species of *Mucor circinelloides* and *Rhizopus arrhizus* and apply in bioremediation of soil and water impacted with petroleum and derivatives, developing a viable and eco-sustainable bioprocess. The studies started with the application of a 2³ factorial design using agro-industrial residues such as corn steep liquor, post-frying oil and instant noodle residue as nutrients in production medium for four isolates of the order Mucorales (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *Mucor circinelloides* UCP 0006, *Mucor circinelloides* UCP 0006, *Mucor circinelloides* UCP 0042 and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609). Cultivation conditions were pH 5.5 in submerged fermentation, orbital agitation at 150 rpm for 96 h. The four isolates of the order Mucorales were able of use substrates as nutritional sources to produce biosurfactants. However, the strain that showed the greatest reduction in surface tension (72 to 27 mN/m) was *M. circinelloides* UCP 0006 in condition 3 of the design (1% residue of instant noodles, 4% cornstarch, in the absence of soybean oil post-frying). Statistical analysis carried out using the Pareto diagram confirms the important influence of corn steep liquor and post-frying oil in reducing surface tension. The emulsification index presented by *M. circinelloides* UCP 0005 was significant (70%) when compared to the values obtained by the species of *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 (60% in condition 8) and *M. circinelloides* UCP 0006 (55.2% in condition 3). On the other hand, *M. circinelloides* UCP 0042 was cultivated in a new production medium (containing different concentrations of corn steep liquor, post-frying oil and instant noodle residue) according to factorial design. According to the results obtained, in condition 7 of the planning (1% instant noodle waste, 4% corn steep liquor and 1% post-frying oil) the maximum reduction in surface tension occurred (72 to 24 mN/m). In addition, the potential of the biosurfactant produced by *Mucor circinelloides* UCP 0042 in the removal of diesel oil in sandy soil was evaluated. The biosurfactant produced was able of remove 78% of diesel oil from beach sand, beyond of having the potential of disperse petroderivatives in water (33.2 cm² ODA) and degrade 93% of petroderivatives, confirming the ability of *Mucor circinelloides* UCP 0042 to produce biosurfactant of high industrial and environmental interest.

Keywords: Biotechnology. Mucoralean. Agro-industrial waste.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O processo de exploração do petróleo envolve atividades com grande índice de risco de acidentes ambientais, principalmente no processo de refino em que há liberação de gases e líquidos poluidores, além da formação de resíduos sólidos que têm tratamento muito difícil e causam efeitos nocivos aos ecossistemas e aos seres humanos (EUZEBIO et al, 2019). O maior derramamento de petróleo no Brasil ocorreu no litoral do nordeste brasileiro, com aproximadamente dois mil quilômetros de extensão, cerca de 70% do total da costa litorânea foi atingida pela contaminação de óleo cru (ARAÚJO et al, 2020).

Neste sentido, vários pesquisadores vêm realizando investigações em busca da atenuação dos efeitos tóxicos por meio da biorremediação, que, segundo Vasilyeva e Kondrashina et al. (2020) e Sajna e Gottumukkala (2019) é uma ampla tecnologia que possibilita a biorremediação e/ou biodegradação dos contaminantes, minimizando a poluição causada pelo petróleo. Os autores afirmam que é uma abordagem prática e econômica e com baixos impactos na natureza, quando comparado aos métodos físico-químicos, além de possibilitar a mineralização dos contaminantes hidrofóbicos em compostos com pouca ou ausência de toxicidade.

O processo de biorremediação empregando surfactantes naturais ou biossurfactantes é uma alternativa bastante promissora que age diretamente no contaminante, que sob certas condições termodinâmicas formam micelas e aprisionam os contaminantes hidrofóbicos (SENRA et al, 2018), ou ainda podem ser recuperados na superfície através de emulsão óleo/água (GOSWAMI et al., 2018). Devido à essa característica, as grandes cadeias carbonadas podem ser facilmente carregadas mecanicamente ou disponibilizadas aos microrganismos, tornando-se um bom substrato e fonte de energia (MILAGRE et al., 2018).

Os biossurfactantes são metabólitos secundários produzidos por diversos microrganismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, são classificados de acordo com a origem bacteriana ou o caráter químico que influencia na sua funcionalidade (ARAÚJO et al., 2019). Estruturalmente a biomolécula apresenta características anfipáticas, ou seja, apresentam porção apolar ou hidrofóbica e outra porção polar ou hidrofílica solúvel em água. As propriedades físico-químicas específicas dos biossurfactantes tem um papel importante na eficiência do processo de remoção de poluentes como corantes e hidrocarbonetos (DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Substratos oriundos de processos agroindustriais podem ser utilizados para produção de biossurfactante por micro-organismos, e alguns estão descritos na literatura como novo meio alternativo com composição sustentável para produção de biossurfactantes por micro-organismos (RIVERA et al, 2019). Os substratos renováveis apresentam diversidade na sua composição podendo apresentar estrutura com elevado teor de carboidratos, proteínas e lipídeos (SANCHES et al, 2021).

Dentre os micro-organismos com potencial biotecnológico, os fungos da ordem Mucorales se apresentam na literatura como promissores no processo de biorremediação de petroderivados, em especial, em ambientes tropicais, como descrito por Ramoutar e Mohammed (2019).

Portanto, considerando o potencial dos fungos Mucorales como relatado na literatura (SILVA et al, 2021) associado aos problemas ambientais de contaminação por petróleo, o presente trabalho apresenta o potencial de produção de biossurfactantes por *Mucor circinelloides* e *Rhizopus arrhizus*, assim como, a investigação na remoção de poluentes hidrofóbicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir, extrair e caracterizar o biossurfactante produzido por espécies de *Mucor circinelloides* e *Rhizopus arrhizus* e aplicar na biorremediação de solo e água impactados por petróleo e derivados, desenvolvendo bioprocessos viáveis e ecossustentáveis.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de biossurfactante pelos isolados de *Mucor circinelloides* e *Rhizopus arrhizus* utilizando a tensão superficial como variável resposta;
- Produzir e extrair biossurfactante do fungo selecionado;
- Identificar as principais propriedades físico-químicas do biossurfactante produzido;
- Investigar a composição química do biossurfactante produzido;
- Avaliar a influência dos resíduos agroindustriais na produção de biossurfactante;
- Investigar o potencial do biossurfactante produzido na remoção de petroderivado impregnado em amostra de solo;
- Avaliar a influência do biossurfactante produzido na biodegradação de petroderivado em água;
- Validar os resultados a partir do programa *Statistica 12.0 StarSoft*.

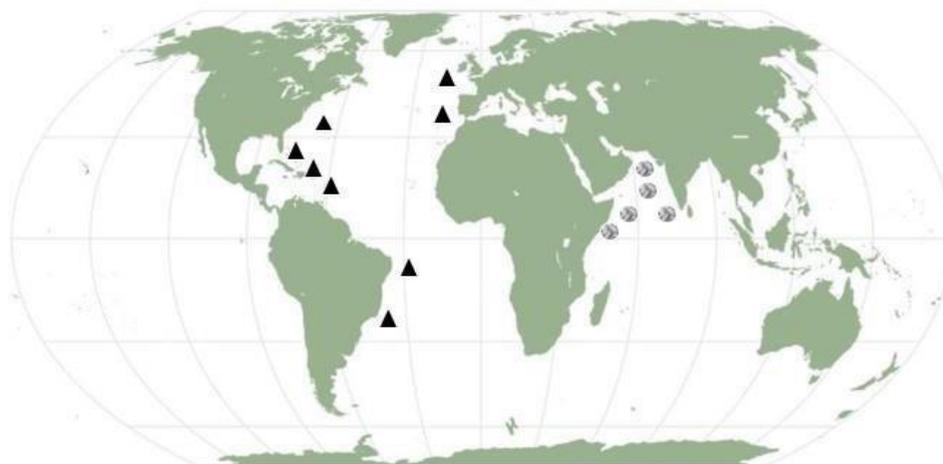
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Acidentes ambientais com petróleo e derivados

A contaminação do meio ambiente com hidrocarbonetos de petróleo tornou-se um sério problema ambiental que aumenta de maneira preocupante há algumas décadas. As principais fontes de contaminação ambiental são provenientes do derramamento de óleo acidental durante extração em plataformas marítimas e seu transporte, de tanques de armazenamento subterrâneos e oleodutos, má conservação de veículos de transporte terrestres e o mau gerenciamento da eliminação dos resíduos do processo de produção. Em levantamento realizado em 2019, estima-se que em escala mundial, o meio ambiente tenha recebido cerca de mil toneladas de petróleo cru, e dentro desta estatística, o acidente com o petroleiro venezuelano que atingiu cerca de 70% da costa litorânea brasileira (ARAÚJO et al 2020; KHALID et al, 2021).

O transporte marítimo intercontinental é o meio mais utilizado para o deslocamento desses produtos, tendo dobrado proporcionalmente entre as décadas de 70 e 80 junto ao crescimento da demanda energética industrial e o crescimento populacional. Nos últimos 50 anos, o comércio marítimo mundial de petróleo cresceu e apesar da flutuação de consumo sofrida pelo setor na década de 1990, o volume médio de petroderivados comercializados foi de 10.000 toneladas/ano. O aumento da exportação originária da Bacia do Atlântico, representado pela figura dos Estados Unidos, e de países da Ásia Ocidental (árabes) para o comércio e refino asiático (notavelmente a China) impulsionaram este aumento (GALIERIKOVA et al, 2020; CAKIR et al, 2021). A figura 1 ilustra o comércio petrolífero entre nações e seu caminho pelos oceanos.

Figura 1 - Distribuição geográfica do comércio de petróleo e demais derivados no mundo (Mercado consumidor (▲) e Mercado exportador)



Fonte: Autoria própria (2022).

Cerca de 90% do transporte mundial de petróleo é feito pelo mar e apesar dos avanços tecnológicos que reduziram consideravelmente os números de acidentes, a atividade petrolífera continua sendo de alto risco não apenas ambiental a diversos ecossistemas, como também a saúde humana e atividades econômicas. Uma vez no mar, o óleo vazado por navios viaja pelos oceanos através das correntes marítimas e ventos chegando a diversas zonas costeiras, afetando os seres vivos aquáticos e terrestres e comprometendo atividades turísticas locais (GALIERIKOVA et al, 2020).

Mundialmente, a grande expansão da atividade petrolífera marítima levou a grandes acidentes com petroleiros. O conhecido navio cargueiro Torrey Canyon (1967), que derramou cerca de 119.328 toneladas de petróleo bruto na costa sudoeste do Reino Unido, na Europa. Na França, o petroleiro Amoco Cadiz (1978) derramou 223.000 toneladas no Mar Celta, formando uma mancha de mais de 30 km de largura por 145 km de extensão que poluíram aproximadamente 375 km da costa da Bretanha. Um único navio despejou 287.000 toneladas de óleo no Mar do Caribe, sendo o maior volume derramado por uma única embarcação já registrada. O acidente de Exxon Valdez (1989) ganhou grande repercussão por despejar cerca de 11 milhões de galões de petróleo bruto na água após colidir com um recife no Alasca. Foi o maior derramamento de óleo nas águas americanas até então, que deixou um saldo de morte de 230.000 aves marinhas, 3.000 lontras, 300 focas, 250 águias e 22

baleias orcas, além de falir a economia local (GALIERIKOVA et al, 2020).

No Brasil, o levantamento de acidentes envolvendo derramamento de petróleo data de 1975, quando um cargueiro fretado pela Petrobrás liberou cerca de 6 mil toneladas na Baía de Guanabara. Vários eventos foram registrados desde então, devido a maior exploração *off-shore* das bacias petrolíferas brasileiras. A maioria dos incidentes registrados se concentrou entre a década de 1990 e 2000, majoritariamente nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, com origem tanto em bacias de exploração petrolífera quanto em vazamento de oleodutos e cargueiros. Em 2016, foi registrado incidente no Rio Amazonas devido a vazamento em oleodutos Peruanos que afetaram o bioma Amazônico (INFOESCOLA, 2020).

O último grande acidente que atingiu a costa derramou um volume entre 5.000 a 12.500 m³ de petróleo que, segundo análises de pesquisadores, tem características químicas similares ao óleo venezuelano, foi despejado a cerca de 700 km do litoral e atingiu 11 estados da região nordeste e sudeste numa extensão de 4.334 km de faixa litorânea. Tendo alcançado áreas de conservação marinha como o Parque Nacional de Abrolhos até regiões costeiras da Floresta Amazônica no Maranhão, este desastre ambiental não teve a responsabilidade apurada e pouco foi feito pelo Governo Brasileiro sentido de contenção e apuração dos fatos. O plano de contingência incluiu voluntários civis que, sem equipamentos de proteção adequados, fizeram a remoção da maior quantidade de óleo (PENA et al, 2020; ZACARIAS et al, 2021). A Tabela 1 mostra os acidentes relatados em ordem crescente desde 1967 a 2019 em várias partes do mundo, bem como a quantidade estimada de petroderivado liberado no meio ambiente.

Tabela 1 - Acidentes envolvendo derramamento de petróleo desde 1967 no mundo, local e quantidade liberada em meio ambiente

EMBARCAÇÃO	ANO	LOCAL	QUANTIDADE DE PETRODERIVADO (EM TONELADAS)
Torrey Canyon	1967	Reino Unido	119.328
Sea Star	1972	Golfo de Omã	115.000
Jakob Maersk	1975	Portugal	88.000
Urquiola	1976	Espanha	100.000
Hawaiian Patriot	1977	Honolulu	95.000
Armoco Cadiz	1978	França	223.000
Atlantic Express	1979	Mar do Caribe	287.000
Independenta	1979	Turquia	95.000
Irenes Senerade	1980	Grécia	100.000
Castillo de Bellver	1983	África do Sul	252.000
Nova	1985	Golfo do Irã	70.000

Odyssey	1988	Canadá	132.000
Khark 5	1989	Marrocos	70.000
Exxon Valdez	1989	Alasca	37.000
ABT Summer	1991	Angola	260.000
Haven	1991	Itália	144.000
Aegean Sea	1992	Espanha	74.000
Katina P	1992	Moçambique	67.000
Braer	1993	Reino Unido	85.000
Sea Express	1996	Reino Unido	72.000
Prestige	2002	Espanha	63.000
Hebei Spirit	2007	Coréia do Sul	11.000
Sanchi	2018	China	113.000
Desconhecido	2019	Brasil	~12.500

Fonte: Galierikova et al (2020) adaptado

Os acidentes com petróleo e seus derivados deixam não só problemas ambientais, como também sequelas sociais e econômicas a comunidade local. Com uma maior regulação e monitoramento, o número de acidentes deste tipo caiu de 24,5/ano registrados entre 1960-1970 a 1,8/ano na primeira década do século 21. (GALIERIKOVA et al, 2020; CAKIR et al, 2021). O emprego de sistemas computacionais para análises de risco busca encontrar pontos suscetíveis a acidentes e minimizá-los, como explosões de gás e a resposta estrutural a elas (CAO et al, 2020). Outros métodos de tendência buscam presumir a extensão dos acidentes e encontrar a melhor forma de gerenciar os danos que podem causar (HELLE et al, 2020). A biorremediação entra em cena quando o dano já aconteceu, buscando remover ou diminuir os contaminantes do meio ambiente.

3.2 Biorremediação e as biomoléculas de Superfície Ativa: Biossurfactantes

A contaminação de ecossistemas por hidrocarbonetos oriundos de petróleo é o tipo de problema mais importante enfrentado em acidentes ambientais. Métodos como extração por solvente, dessorção térmica, incineração e outros tratamentos físico-químicos que possuem desvantagens como o alto custo do processo. A remediação é o termo utilizado para se referir a remoção, degradação ou diminuição desses contaminantes, tornando-os menos ofensivos. Já o termo biorremediação abrange técnicas que utilizam microrganismos ou bioprocessos de origem microbiana para este fim. É considerada uma alternativa barata, eficiente e versátil pois pode utilizar microrganismos aclimatados ao local da contaminação e diferentes fontes de substratos que seriam descartados, sendo ecologicamente mais correta (YUNATI et al, 2018; GAROUSIN et al, 2021).

Utilizada tanto em ambientes aquáticos como terrestres, os microrganismos são capazes de utilizar de seu arsenal metabólico para degradar os poluentes e facilitar a remoção ou transformá-los em substrato para produzir biomoléculas que vão modificar as propriedades físico-químicas e assim facilitar a sua retirada do local. O desafio do tratamento de ambientes contaminados se torna maior pois também é necessário a remoção de poluentes em áreas danificadas a longo prazo, onde se faz necessário uma combinação de técnicas para que o sucesso seja alcançado (YUNATI et al, 2018).

O processo de biorremediação pode ser classificado como *in situ* ou *ex situ*. O processo *ex situ* consiste na retirada do material poluído de seu local de origem para que seja tratado em outro lugar, o que pode levar a um aumento de custos devido a necessidade de escavação do solo, por exemplo, no método *in situ*, o tratamento se dá diretamente no meio ambiente afetado sob condições normais de temperatura, concentração de oxigênio e etc, o que torna o processo mais ecologicamente correto e de baixo impacto ambiental (YUNATI et al, 2018). A Tabela 2 resume os fatores que podem impactar sob as técnicas de biorremediação.

Tabela 2. Fatores que influenciam na degradação de hidrocarbonetos e seus efeitos

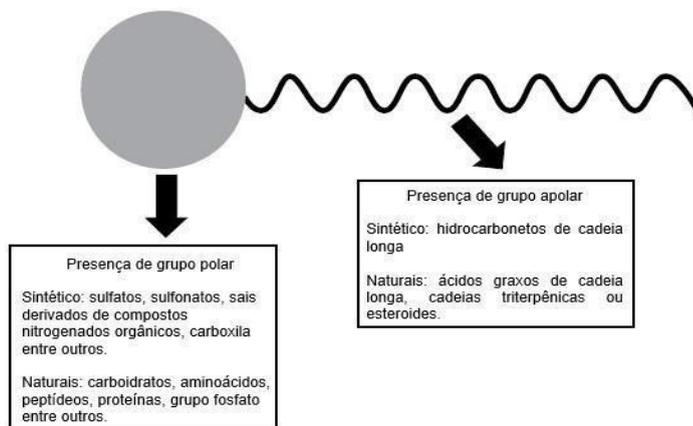
FATORES	EFEITOS
Temperatura	Influência na persistência, viscosidade e solubilidade de hidrocarbonetos
pH	Influência sob as reações enzimáticas dos microrganismos
Oxigênio	Condição metabólica do microrganismo
Água	Presença de outros tipos de poluentes, condições de salinidade, etc.
Fonte nutricional	Carbono e nitrogênio são fontes essenciais para o metabolismo microbiano, além de outros minerais.
Tipo de hidrocarboneto	A depender da complexidade de sua estrutura e peso molecular, a sua disponibilidade como substrato pode ser comprometida
Condição do local	Propriedades do solo afetado podem ou não contribuir para a biorremediação <i>in situ</i>
Comunidades microbianas	Uso de consórcios ou associação microbiana para acelerar ou aumentar os resultados

Matéria orgânica	Condições estruturais e influenciada sorção
Presença de contaminantes inibidores	Define se é apropriado ou não abiorremediação local
Água	Presença de outros tipos de poluentes, condições de salinidade, etc.
Fonte nutricional	Carbono e nitrogênio são fontes essenciais para o metabolismo microbiano, além de outros minerais.
Tipo de hidrocarboneto	A depender da complexidade de sua estrutura e peso molecular, a sua disponibilidade como substrato pode ser comprometida
Condição do local	Propriedades do solo afetado podem ou não contribuir para abiorremediação <i>in situ</i>
Comunidades microbianas	Uso de consórcios ou associação microbiana para acelerar ou aumentar os resultados
Matéria orgânica	Condições estruturais e influenciada sorção
Presença de contaminantes inibidores	Define se é apropriado ou não abiorremediação local

Fonte: YUNATI et al (2018).

Os biossurfactantes são compostos naturais produzidos por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos a partir de diferentes substratos, sendo biomoléculas consideradas alternativas viáveis aos surfactantes sintéticos devido sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta estabilidade. Conforme a Figura 1, estruturalmente apresentam porções hidrofílicas e hidrofóbicas, o que confere a esta molécula a característica anfifílica em reduzir a tensão superficial e interfacial entre materiais de polaridades diferentes (PESSOA et al, 2018; MARCELINO et al, 2020).

Figura 2 - Esquema da estrutura das regiões que compõem os surfactantes químicos e naturais



Fonte: Marcelino et al (2020) Adaptado.

A versatilidade das estruturas químicas presentes nos biossurfactantes está diretamente ligado ao seu peso molecular, propriedades físico-químicas e variedade de substratos a partir dos quais eles podem ser sintetizados pelos microrganismos. Essa diferença estrutural e as propriedades observadas classifica os biossurfactantes em glicolipídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, biossurfactantes poliméricos e particulados, conforme Tabela 2 (MARCELINO et al, 2020; SILVA et al, 2021).

Tabela 3 - Principais classes de biossurfactantes e sua composição

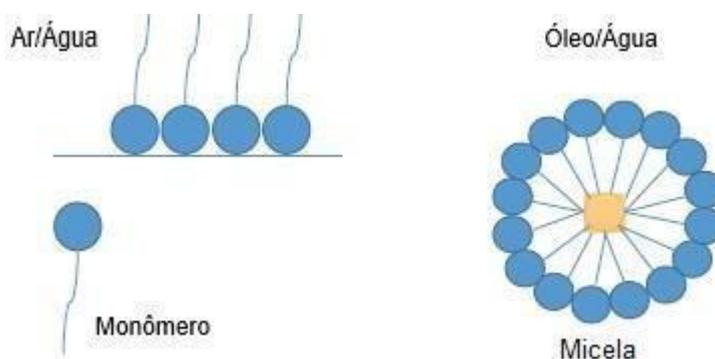
BIOSURFACTANTE	COMPOSIÇÃO E CARACTERÍSTICAS	EXEMPLOS
Glicolipídeos	Composto por carboidratos (mono, oligo e polissacarídeos) e lipídeos (ácidos graxos); Apresenta ligações éster/éter conectando as porções	Ramnolipídeos, e soforolipídeos
Lipopeptídeos	Composto por peptídeos e proteínas; Geralmente apresenta de 7 a 10 aminoácidos residuais ligados a gordura hidrofóbica	Iturin, surfactin e viscosina

Fosfolipídeos	Composto por grupo fosfato ligado a cadeias de ácidos graxos de 5 a 12 átomos de carbono	Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilgliceróis
Poliméricos	Composto por estruturas variadas de heteropolissacarídeos	Alasan, liposan e emulsan
Particulados	Vesículas de proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos com tamanho de 20 a 50 nm	Membrana extracelular de vesículas

Fonte: Marcelino et al (2020)

O caráter anfipático dos biossurfactantes facilita a sua distribuição entre as superfícies imiscíveis como água/óleo e ar/água, levando a diminuição da tensão superficial e interfacial entre esses sistemas. Além disso, outras propriedades como molhabilidade, capacidade de dispersão, solubilizante, emulsificante, detergência e lubrificante são dependentes da distribuição dessas moléculas e da sua estrutura, conforme Figura 2 (SANCHES et al, 2021).

Figura 3 - Tensão superficial e interfacial em sistema ar/água e óleo/água



Fonte: Sanches et al (2021). Adaptado

A versatilidade estrutural e a baixa toxicidade associados as propriedades físico- químicas tornam os surfactantes biológicos candidatos a diversas aplicações possíveis. Atuando como espessantes, emulsionantes e estabilizantes, os biossurfactantes ramnolipídeos tem importante aplicação industrial no ramo alimentício por aumentar a durabilidade e textura dos produtos devido a sua estabilidade frente a diferentes temperaturas e pH's diferentes (RAWAT et al, 2020).

Para indústria cosmética, o uso de produtos naturais é imprescindível para diminuir possíveis efeitos alérgicos ao organismo e para atender à crescente

demanda de consumo sustentável que busca produtos que não agridam o meio ambiente ou os animais usados em testes. Sua ação espumante, umectante e dispersante, os biossurfactantes como surfactina ou soforolipídeos substituem seus análogos sintéticos em formulações como filtros solares, cremes e loções para pele, desodorantes, etc. Como detergentes, lipopeptídeos são capazes de romper os biofilmes bacterianos alterando a hidrofobicidade de uma superfície e facilitar a limpeza tanto do couro cabeludo acometido por fungos como de equipamentos industriais (MARCELINO et al, 2020). Em seu trabalho, Ferreira (2020) comprovou atividade antimicrobiana de surfactante biológico produzido por *F. decemcellulare* FF17 contra patógenos da cavidade oral.

Na área médica e farmacêutica, o potencial antibacteriano, antiviral e fungicida de alguns tipos de biossurfactantes é apreciado na formulação de medicamentos para tratamentos contra infecções sistêmicas ou tópicas de bactérias gram-positivas. Estudos recentes mostram que biossurfactante produzido por *Bacillus* foram capazes de inibir o crescimento e metástase celular em células tumorais, enquanto nanopartículas à base do biossurfactante surfactina têm êxito em sua ação contra a resistência à múltiplas drogas (RAWAT et al, 2020). Tais propriedades tem sido de grande ajuda no tratamento do Sars-Cov 2 (SMITH et al, 2020).

No campo e na cidade, biopesticidas a base de surfactantes naturais são de grande importância no combate a arboviroses e pragas que acometem as cidades e as plantações. Podem atuar removendo compostos indesejados do solo, como os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH's), atuando como biocidas em fungos patogênicos como *Botrytis cinerea* ou aumentando a biodisponibilidade de nutrientes a microrganismos que podem se sobressair e eliminar esses patógenos (MARCELINO et al, 2020).

A biorremediação da água e do solo é um campo de aplicação bastante estudado devido ao grande potencial ambiental dos biossurfactantes. Através do aumento da biodisponibilidade de hidrocarbonetos, os surfactantes naturais facilitam a degradação destes compostos pelos microrganismos que passam a utilizá-los como fonte nutricional. Adicionalmente, podem facilitar a remoção de petroderivados através de suas propriedades emulsificante, dispersante e redutor de tensão

superficial (SILVA et al, 2021).

A contaminação de sedimentos de areia e mangue, além de pedras, por petróleo e outros derivados trazidos pela água de rios e mares tem sido crescente na última década. A remoção de hidrocarbonetos complexos de sedimentos é preocupante, pois a união da areia com esse material orgânico e de alto peso molecular depende da capacidade de difusão e das interações eletrostáticas das longas cadeias de carbono que podem conter outros materiais pesados com a porosidade, permeabilidade e molhabilidade (adesão e coesão) dos grãos derivados de rochas (MAT-SHAYUTI et al, 2020). Quanto a efluentes, o derramamento de óleo ganha contornos problemáticos devido a mudança físico-química que o produto sofre em contato com a água salina de mares e manguezais, além de formar película fina sob a água, o que impede a devida passagem de luz e oxigênio para os seres vivos do ecossistema aquático, causando a morte de diversas espécies (KHALID et al 2021).

O mercado consumidor de biossurfactantes se divide principalmente em Europa e América do Norte (75-80%) e Ásia (20-25%) (MARCELINO et al, 2020). Apesar dos desafios enfrentados na produção de surfactantes biológicos como os custos associados, algumas empresas desenvolveram biossurfactantes com sucesso em escala industrial, conforme tabela 4.

Tabela 4 - Empresas e os biossurfactantes obtidos

EMPRESA	PRODUTO	PAÍS
Lipofabrik	Lipopeptídeos (Surfactin, Iturin, Fengycin, Plipastatin, Lichenysin e Mycosubtilin)	França
AGAE Technologies	Ramnolipídeos	EUA
Urumqi Unite Bio-Technology	Ramnolipídeos	China

Allied Carbon Solutions	Soforolipídeos	Japão
MG Intobio	Soforolipídeo(Sopholine)	Coréia do Sul
Soliance	Soforolipídeo(Solpholiance S)	França
Kaneka Corporation	Surfactina	Japão
Kanebo Cosmetics	Manosilleritrol (MEL-B) e Surfactina (SFNa)	Japão
Saraya	Soforolipídeos	Japão
Ramnolipídeos Company	Ramnolipídeos	EUA
SyntheZyme	Soforolipídeos	EUA
TensionGreen	Ramnolipídeos e Lipopeptídeos	EUA
Logos Technologies	Ramnolipídeo (NatSurFact)	EUA
TeeGene Biotech	Ramnolipídeos e lipopeptídeos	Reino Unido
GlycoSurf	Ramnolipídeos	EUA

Fonte: Geetha et al (2018)

3.3 Fungos Filamentosos Produtores de Biossurfactantes

A capacidade dos fungos em sobreviver em diversos habitats pode influenciar a produção de diferentes metabólitos. A bioprospecção de fungos em ambientes

externos permite a descoberta de novos microrganismos produtores de biossurfactantes, como aqueles isolados em ambientes adaptados ao frio como *Thelebolos* sp. e *Mortierella alpina*, (SILVA et al, 2021) ou ao calor, como *Rhizopus arrhizus* (MILAGRE et al, 2018) e *Mucor hiemalis* (FERREIRA et al, 2020).

As leveduras e fungos são consideradas bons agentes na produção de biomoléculas por apresentarem uma melhor resistência celular e por serem consideradas seguras, com baixo risco de patogenicidade e assim permitem as suas aplicações no ramo alimentício e farmacêutico sem restrições (MARCELINO et al, 2020).

A triagem de fungos filamentosos é feita a partir de testes preliminares como a medição da tensão superficial, índice de emulsificação e hidrofobicidade. A metodologia destes testes é desenvolvida aplicando-se diferentes substratos em diferentes condições de fermentação. A produção de biossurfactantes a partir de fermentação por agitação é a mais comum, porém a fermentação sólida está presente em 39% dos estudos publicados envolvendo fungos. A maior produtividade de fungos filamentosos é observada em pH levemente ácido, entre 5 e 7 (SILVA et al, 2021).

Estudos envolvendo a produção de biossurfactantes por fungos filamentosos tem sido relatados nos últimos 10 anos, conforme expressos na Tabela 5.

Tabela 5 - Fungos filamentosos e os tipos de biossurfactantes produzidos

MICROORGANISMOS	TIPOS DE BIOSURFACTANTES	REFERÊNCIAS
<i>Fusarium</i>	Lipopeptídeo	Qazi et. al., (2014)
<i>Starmerella bombicola</i>	Soforolípídeo	Jiménez-Peñalver et. al., (2016); Jadhav et. al., (2019)
<i>Mucor circinelloides</i>	Glicolípídeo	Zadeh et. al., (2017)
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Glicolípídeo	Souza et. al., (2018)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Glicoproteína	Milagre et. al., (2019)
<i>Mucor hiemalis</i>	Glicolípídeo	Ferreira et. al., (2020)
<i>Aspergillus niger</i>	Glicoproteína	Asgher et. al., (2020)

Fonte: Rivera et al 2019 (adaptado)

3.3.1 Fungos Filamentosos da Ordem Mucorales

Os Mucorales são fungos terrestres morfológicamente simples incluídos inicialmente no filo Mucoromycota, sendo formados de células multicelulares e apresentando hifas cenocíticas sem paredes cruzadas, o que mantém espalhado seu material genético por todo citoplasma e que normalmente, reproduzem-se assexuadamente por zigosporos. São considerados saprófitos por utilizarem como fonte de energia matéria orgânica em decomposição, e também podem ser parasitas oportunistas de animais e plantas (WALTHER; WAGNER; KURZAI, 2019).

De acordo com Lima e Cordeiro et al (2018), os fungos filamentosos mucoraleanos podem degradar carbono a partir de substratos variados como açúcares simples, lipídeos, proteínas ou hemiceluloses e que ao apresentarem termotolerância e alta produção enzimática, demonstram características bioquímicas importantes, bem como a produção de biomassa rica em ácidos graxos, quitina e quitosana, entre outras substâncias.

Apresentando importância biotecnológica, passaram a ser explorados para uso em processos industriais, biocombustíveis e biorremediação (NICOLETTI; ANDOLFI, 2018), como certas espécies que apresentam vantagens com relação a leveduras na produção de etanol e são comparáveis em rendimento a *Saccharomyces cerevisiae*, pois fermentam vários tipos de açúcares (SATARI; KARIMI, 2018). Silva et al. (2018) comprovaram que os fungos filamentosos mostraram em diversos estudos a sua capacidade de produção de bioemulsificantes e biossurfactantes com rendimento mais alto que a de bactérias e leveduras, sendo mais uma alternativa para a biorremediação ambiental.

Apesar de a literatura evidenciar estudos com fungos filamentosos em geral, os estudos publicados com fungos mucoraleanos na produção de biossurfactante com potencial biotecnológico são poucos. Em seus trabalhos, Andrade et al (2018) e Milagre et al (2018) obtiveram sucesso a partir de seu trabalho com *Cunninghamella echinulata* e *Rhizopus arrhizus*, respectivamente, produzindo biossurfactantes glicolipídeos. Em outro trabalho com o gênero *Cunninghamella*, dessa vez a *C. phaeospora*, em que a produção de biossurfactante foi estável em diferentes temperaturas (LINS et al, 2017). Mendonça et al (2020) conduziu estudo com o gênero *Absidia*, no qual obteve biossurfactante com capacidade de reduzir a tensão superficial de 72 mN/m para 30 mN/m.

Quanto ao gênero *Mucor* sp., a produção de surfactante biológico foi verificada a partir da redução da tensão superficial. *Mucor circinelloides* UCP 0005 apresentou capacidade de produzir biossurfactante, apresentando tensão superficial de 34 mN/m em estudo de Santiago et al (2021). Outro estudo com a espécie *Mucor circinelloides* obteve alto rendimento na produção de biossurfactante Glicolipídeo (12,3 g/L) com redução de tensão superficial de 26 mN/m e índice de emulsificação de 65% de petróleo bruto em água do mar (ZADEH et al, 2017). *Mucor hiemalis*

apresentou tensão de 40 mN/m e também índice de Emulsificação de 93% em estudo de Ferreira et al (2020), comprovando a capacidade desta ordem em produzir substâncias de interesse biotecnológico (MILAGRE et al., 2018).

As espécies de *Rhizopus* são especialmente relevantes para os seres humanos, pois podem atuar como patógenos de animais e vegetais. Atacando produtos pós-colheita, e prejudicam o sabor e aparência frutas e vegetais como morango e batata-doce. Podem causar infecções em pacientes imunocomprometidos e são responsáveis por cerca de 60 a 80 % de micomicoses, sendo usados como modelos de estudo de biologia celular e molecular de fungos (GRYGANSKYI et al., 2018).

Quando jovens, as colônias de *Rhizopus* apresentam aspecto esbranquiçado que evolui para acinzentado conforme envelhecem e começam a esporular, enquanto aumentam seu crescimento. Apresenta micélio cenocítico e formam estolões e rizoides que crescem de forma oposta ao esporangióforo, o que o distingue dos demais gêneros Mucorales (ZHENG et al, 2007).

O potencial biotecnológico e a diversidade de aplicações apresentadas por diferentes espécies de *Rhizopus* tem sido pesquisadas devido a facilidade deste gênero em utilizar diversos substratos orgânicos e produzir biomassa com alto teor proteico. Espécies como *R. oryzae*, *R. arrizus*, e *R. stolonifer* apresentam atividade antimicrobiana, hepatoprotetora e na cicatrização de feridas (SRIHERWANTO, et al, 2021). Outros compostos importantes produzidos de interesse industrial produzido por *Rhizopus* são enzimas, ácidos orgânicos, quitina e quitosana e biossurfactantes (MILAGRE et al, 2018).

O gênero *Mucor* apresenta o maior número de espécies descritas dentro dos Mucorales, variando entre 50 a 75 (DOMSCH et al, 1993). Destes, alguns podem apresentar patogenicidade aos seres humanos causando micoses cutâneas (GHERBAWY et al, 2010). Assim como o gênero *Rhizopus* sp., as espécies de *Mucor* sp. são saprófitos e podem ser isoladas em diversos locais como solo, cascas de frutas, grãos, flores, excrementos de animais herbívoros e materiais vegetais em decomposição, o que os torna um grupo fúngico importante ecologicamente por contribuir para diversos ciclos que envolvem o meio ambiente, sendo a maioria de

suas espécies de distribuição cosmopolita (LIMA et al, 2018). Morfologicamente, são caracterizados por produzir esporângios simples ou ramificados e pela formação de zigospóros.

Os estudos sobre este gênero na biotecnologia são baseados na sua capacidade de degradar carbono a partir de açúcares, lipídeos e proteínas de diferentes substratos. São espécies termotolerantes e produtoras de enzimas como amilases e proteases que as tornam interessantes na indústria alimentícia. Sua biomassa apresenta riqueza proteica e lipídica, além de aminoácidos quitina e quitosana (LIMA et al, 2018).

3.4 Produção sustentável de biossurfactantes

Os biossurfactantes de origem bacteriana, principalmente obtidos a partir de espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus*, detêm a maioria dos estudos publicados. Em comparação, os biossurfactantes fúngicos representam cerca de 19% das pesquisas nesta área. Apesar de serem promissores produtores de biomoléculas de interesse industrial, os altos custos de produção são um entrave para sua aplicação. Para minimizar esse problema, o uso de resíduos agroindustriais como substratos não convencionais é uma aposta da biotecnologia industrial para aumentar a viabilidade de produção dessas biomoléculas (SILVA et al, 2021).

Além de reduzir os custos operacionais de produção comercial de biossurfactantes, um aumento de rendimento na produção também pode ser observado, além de não prejudicarem as funcionalidades do produto obtido. A disponibilidade de uma variedade de substratos baratos e renováveis é grande e sua biodegradabilidade não prejudica os microrganismos utilizados (BANAT et al, 2010).

Rivera et al (2019) descreve que resíduos de óleo, de amido, de destilaria, da indústria do açúcar e resíduos sólidos de frutas e vegetais, além de derivados de petróleo são utilizados como substratos na produção de biossurfactantes. Substratos hidrofóbicos, por exemplo, induzem a produção das biomoléculas, regulando as vias metabólicas. Já a fonte de carbono influencia na composição estrutural da molécula e conseqüentemente, as suas propriedades físico-químicas. A seleção da fonte de nitrogênio utilizado como substrato é importante, pois sua concentração pode ser um fator limitante por interferir no pH do meio e alterar o processo fermentativo

(MARCELINO et al, 2020).

Óleo pós fritura é fruto do processamento de óleo no ramo alimentício e constitui uma grande fonte de contaminação do meio ambiente pois apresentam alto teor de gorduras e ácidos graxos, o que diminuem sua degradabilidade (RIVERA et al, 2019). Seu reaproveitamento como uma fonte de carbono é muito utilizada como substrato e bem aceita pelos microrganismos. Ribeiro et al (2020) utilizou este resíduo na suplementação de carbono para *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo biossurfactante glicolípido, mesma classe produzida por *Candida guilhermodii* (LIRA et al, 2020) enquanto *Candida tropicalis* utilizou a fonte de carbono para produzir biossurfactante polimérico (Ribeaux et al, 2017). O óleo pós fritura ainda foi utilizado em estudo com microrganismo *Stenotrophomonas maltophilia*, que foi capaz de apresentar redução de tensão superficial de 27,1 (NOGUEIRA et al, 2020).

Os resíduos ricos em amido são produzidos em grande quantidade pela indústria alimentícia mas também tem grande reaproveitamento para fins como compostagem e se faz presente em estudos com microrganismos produtores de biossurfactantes, como a casca de batata, casca de arroz ou palha de milho. (RIVERA et al, 2019) Como fonte nutricional diversificada, o resíduo de macarrão instantâneo aparece apenas uma vez como meio de crescimento, sendo usado como substrato em estudo de Andrade et al (2018), tendo tido influência positiva e importante para a produção de biossurfactante por *Cunninghamella echinulata* que além de apresentar resultado de tensão superficial de 32,4 mN/m, apresentou dispersão de 32,15 cm² e índice de emulsificação de 81,4%.

A milhocina se apresenta como importante fonte de nitrogênio usada em alguns estudos na literatura, como em estudo de Chandankere et al (2020) em que *Enterobacter* sp. produziu surfactante biológico do tipo ramnolípido e apresentou tensão superficial de 28,1 mN/m. O gênero *Candida* parece aproveitar as propriedades da milhocina e é utilizada como fonte nutricional em estudos a partir de sua espécie *C. glabrata*, que foi capaz de produzir biossurfactante aniônico em larga escala, reduzindo a tensão superficial para 28 mN/m utilizando 20% de milhocina (LIMA et al, 2017). Em seu estudo com *Mucor polymorphosphorus*, Souza et al (2016) utilizou o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) como sistema

estatístico para encontrar a concentração ideal de milhocina utilizando a tensão superficial como variável resposta e a máxima redução de tensão superficial (33,2 mN/m) foi em condição contendo 4,61% da fonte de nitrogênio. A Tabela 6 resume a composição dos resíduos de macarrão instantâneo, milhocina e óleo de soja pós fritura, indicando a sua participação nutricional no processo fermentativo.

Tabela 6- Principais fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo formulado com resíduo de macarrão instantâneo, milhocina e óleo pós-fritura para produção dos biossurfactantes pelas espécies de *Mucor circinelloides* e *Rhizopus arrhizus*

Resíduo de macarrão instantâneo- Componentes	Quantidade (mg)
Carboidratos (Fonte de carbono)	51.000
Proteínas (Fonte de nitrogênio)	9.400
Gorduras totais (Fonte de carbono)	16.000
Sódio	1.357
Tiamina	0.84
Riboflavina	0.91
Niacina	11
Piridoxina	0.91
Milhocina	
Componente principal	Quantidade (%)
Aminoácidos (Fonte de nitrogênio)	62,49
Óleo de soja pós-fritura	
Componentes em ácidos graxos	Quantidade (%)
Saturados (Fonte de carbono)	21,06
Monoinsaturados (Fonte de carbono)	29,78
Poliinsaturados (Fonte de carbono)	55,97

Fonte: Andrade et al (2018) adaptada

REFERÊNCIAS

- Andrade, R. F. S., Silva, T. A. L., Ribeaux, D. R., Rodriguez, D. M., Souza, A. F., Lima, M. A. B., Lima, R. A., Silva, C. A. A., Campos-Takaki, & Galba M. (2018). Promising biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using renewable resources and Its application in cotton fabric cleaning process. **Advances in Materials Science and Engineering**. 1-13, <https://doi.org/10.1155/2018/1624573>
- ARAÚJO, M. E. DE; RAMALHO, C. W. N.; MELO et al. Artisanal fishers, consumers and the environment: immediate consequences of the oil spill in Pernambuco, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. e00230319, 2020.
- ARAÚJO, H. W. C. et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 2, dez. 2019.
- BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 87, n. 2, p. 427-444, 28 abr. 2010.
- CAKIR, E., CEVGILLI, C., FISKIN, R. An analysis of severity of oil spill caused by vessel accidents. **Transportation Research Part D**, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.trd.2020.102662>, 2021.
- CAO, Y., LIU, A., CHEN, M. et al. Safety analysis of an offshore platform for leakage and deflagration accidents from adjacent oil and gas storage and transportation units. **Ships and Offshore Structures**, disponível em <https://doi.org/10.1080/17445302.2020.1786234>. 2020.
- CHANDANKERE, R., RAVIKUMAR, Y., ZABED, H.M. Conversion of Agroindustrial Wastes to Rhamnolipid by *Enterobacter* sp. UJS-RC and Its Role against Biofilm-Forming Foodborne Pathogens. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 68, n. 52, p. 15478- 15489, 2020.
- DE LIMA, C. L. F. et al. Description of *mucor pernambucoensis* (mucorales, mucoromycota), a new species isolated from the brazilian upland rainforest. **Phytotaxa**, v. 350, n. 3, p. 274, 2018.
- DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T.H. 1993. **Compendium of soil fungi**. 1. Academic Press, San Francisco.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77–90, ago. 2020.

EUZEBIO, C. S.; RANGEL, G. D. S.; MARQUES, R. C. Derramamento de petróleo e seus impactos no ambiente e na saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 52, p. 79–98, 2 nov. 2019.

FERREIRA, F. S. Biossurfactantes de fungos endofíticos isolados de *Gustavia cf. hexapetala* (Alb.) Sm. (*Lecythydaceae*) na Amazônia, contra patógenos da cavidade oral. 140 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2020.

Ferreira, I. N. S., Montero-Rodríguez, D., Campos-Takaki, G. M., & Andrade, R. F. S. (2020). Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, 47, 51-58, <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.006>

GALIERIKOVÁ, A., MATERNA, M. World Seaborne Trade with Oil: One of Main Cause for Oil Spills?. **Transportation Research**, v. 44, p. 297-304, 2020.

GHERBAWY, Y., KESSELBOTH, C., ELHARIRY, H. et al. Molecular barcoding of microscopic fungi with emphasis on the mucoralean genera *Mucor* and *Rhizopus*. In: Gherbawy Y. and Voigt K. (eds.) **Molecular identification of fungi**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. p. 213–250. 2010.

GOSWAMI, R. et al. Effect of ionic strength on crude emulsification and EOR potential of micellar flood for oil recovery applications in high saline environment. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, p. 49–61, nov. 2018.

GRYGANSKYI, A. P. et al. Phylogenetic and Phylogenomic Definition of *Rhizopus* Species. **Genes & Genomes Genetics**, v. 8, n. 6, p. 2007–2018, jun. 2018.

HELLE, I., MAKINEN, J., NEVALAINEN, M. Impacts of Oil Spills on Arctic Marine Ecosystems: A Quantitative and Probabilistic Risk Assessment Perspective. **Environmental Science & Technology**, v. 54, p. 2112-2121. 2020.

FIGUEIREDO, E.A. Derramamentos de petróleo no Brasil. Disponível em <<https://www.infoescola.com/ecologia/derramamentos-de-petroleo-no-brasil/>>. Acesso em 31/01/2022.

KHALID, F.E., LIM, Z.S., SABRI, S. et al. Bioremediation of Diesel Contaminated Marine Water by Bacteria: A Review and Bibliometric Analysis. **Journal of Marine Science and Engineering**, disponível em <https://doi.org/10.3390/jmse9020155>, 2021

LIMA, R.A., ANDRADE, R.F.S., RODRIGUEZ, D.M., et al. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, v.11(6), p.237-244.

LIMA, D. X. et al. Diversity of basal fungal order Mucorales (Mucoromycota) in a remaining area of the Brazilian Atlantic Rainforest. **Nova Hedwigia**, v. 107, n. 3, p. 459–471, 1 nov. 2018.

LINS, A.B., BIONE, A.P., FONSECA, T.C.S. et al. Biosurfactant Production by *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 Using Controlled Temperature Through of Arduino. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v. 6(12), p. 2708-2715.

LIRA, I.R.A.S., SANTOS, E.M.S., SELVA FILHO, A.A.P. et al. Biosurfactant Production from *Candida Guilliermondii* and Evaluation of its Toxicity. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 457-462, 2020.

MARCELINO, P.R.F., GONÇALVES, F., JIMENEZ, I.M., et al. Sustainable production of biosurfactants and their applications. **Lignocellulosic Biorefining Technologies**, Disponível em doi.org/10.1002/9781119568858.ch8. 2020.

MILAGRE, A. P. et al. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 150–157, 7 fev.2018.

NICOLETTI, R.; ANDOLFI, A. The Marine-Derived Filamentous Fungi in Biotechnology. **Grand Challenges in Marine Biotechnology**, p. 157–189, 2018.

NOGUEIRA, I.B., RODRIGUEZ, D.M., ANDRADE, R.F.S., et al. Bioconversion of Agroindustrial Waste in the Production of Bioemulsifier by *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 and Application in Bioremediation Process. **International Journal of Chemical Engineering**, <https://doi.org/10.1155/2020/9434059>,2020.

PENA, P.G.L., NORTHCROSS, A.L., DE LIMA, M.A.G. The crude oil spill on the Brazilian coast in 2019: the question of public health emergency. **Thematic Section: Public Health Emergencies In Debate, Reports In Public Health**, v.36, disponível em 10.1590/0102-311X00231019, 2020.

PESSOA, M.G., VESPERMANN, K.A.C., PAULINO, B.M. et al. Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 319-339, 2019.

RAMOUTAR, S.; MOHAMMED, A.; RAMSUBHAG, A. Laboratory-scale bioremediation potential of single and consortia fungal isolates from two natural hydrocarbon seepages in Trinidad, West Indies. **Bioremediation Journal**, v. 23,n. 3, p. 131–141, 3 jul. 2019.

RIBEIRO, B.G., MONTEIRO, S.M., AMARO, S.I. et al. Study of the Biosurfactant Production by *Saccharomyces Cerevisiae* Urm 6670 Using Agroindustrial Waste. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 61-66, abr. 2020.

RIBEAUX, D.R., ANDRADE, R.F.S., SILVA, G.S. et al. Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable-resources. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11(23), p.981-991.

RIVERA, A. D.; URBINA, M.A.M.; LÓPEZ, V.E.L. Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2019.

SAJNA, K. V.; GOTTUMUKKALA, L. D. Biosurfactants in Bioremediation and Soil Health. In: KUMAR, A.; SHARMA, S. (Eds.). **Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation**. Microorganisms for Sustainability. Singapore: Springer Singapore, 2019. v. 16p. 353–378.

SANCHES, M.A., LUZEIRO, I.G., CORTEZ, A.C.A. et al. Production of biosurfactants by Ascomycetes. **International Journal of Microbiology**. Disponível em doi.org/10.1155/2021/6669263. 2021

SANTIAGO, M. G., LINS, U. M. B. L., CAMPOS-TAKAKI, G. M., FILHO, L. O. C., & ANDRADE, R. F. S. (2021). Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* UCP 0005 using new culture medium formulated with jatoba (*Hymenaea courbaril* L.) bark and corn steep liquor. **Brazilian Journal of Development**, 7, (05), <https://doi.org/10.34117/bjdv7n5-497>

SATARI, B.; KARIMI, K. Mucoralean fungi for sustainable production of bioethanol and biologically active molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1097–1117, fev. 2018.

SENRA, T. D. A.; CAMPANA-FILHO, S. P.; DESBRIÈRES, J. Surfactant-polysaccharide complexes based on quaternized chitosan. Characterization and application to emulsion stability. **European Polymer Journal**, v. 104, p. 128– 135, jul. 2018.

SRIHERWANTO, C. Recent potencial biotechnological applications of the tempeh mould *Rhizopus*. A short review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, Disponível em doi:10.1088/1755-1315/759/1/012066

SILVA, A. C. S. DA et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

SILVA, A.F., BANAT, I.M., GIACHINI, A.J. et al. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: biosynthesis, production and potential applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. Disponível em doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5

SOUZA, P.M., SILVA, M.F., SILVA, T.A.L. et al. Factorial Design based Medium Optimization for the Improved Production of Biosurfactant by *Mucor*

polymorphosphorus. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5(11), p.898-905.

VASILYEVA, G. et al. Adsorptive bioremediation of soil highly contaminated with crude oil. **Science of The Total Environment**, v. 706, p. 135739, 1 mar. 2020.

WALTHER, G.; WAGNER, L.; KURZAI, O. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 4, p. 106, dez. 2019.

YUNATI, M.D. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**, disponível em doi :10.1088/1755-1315/118/1/012063, 2018.

ZACARIAS, D.C., GAMA, C.M., FORNARO, A. Mysterious oil spill on Brazilian coast: Analysis and estimates. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112125>, 2021.

ZADEH, P.H., MOGHIMI, H., HAMED, J. Produção de biossurfactante por *Mucor circinelloides*: aplicações ambientais e propriedades tensoativas. **Water Sci Technology**. 76:1706–1714, 2017.

ZHANG, H. et al. Optimization of the fermentation conditions of *Rhizopus japonicus* M193 for the production of chitin deacetylase and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 57–67, 2014.

CAPÍTULO II

Artigo I - Publicado em **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e13411225332, 2022, (CC BY 40), ISSN 2525-3409, DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25332>, QUALIS A3

Production of biosurfactants by Mucoralean fungi isolated from Caatinga bioma soil using industrial waste as renewable substrates

Produção de biossurfactantes por fungos Mucorales isolados do solo do bioma

Caatinga usando resíduos industriais como substratos renováveis

Producción de biosurfactantes por hongos Mucorales aislados del suelo del bioma

Caatinga utilizando residuos industriales como sustratos renovables

Received: 01/04/2022 | Reviewed: 01/09/2022 | Accept: 01/18/2022 | Published: 01/21/2022

Thayná Rhomana da Silva Cândido ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-9091-8293> Catholic

University of Pernambuco, Brazil

E-mail: thaylp_1@hotmail.com

Rafael de Souza Mendonça

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9226-1627> Catholic

University of Pernambuco, Brazil

E-mail: rafa.13souza@hotmail.com

Uiara Maria de Barros Lira Lins

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6007-9932>

Catholic University of Pernambuco, Brazil

E-mail: uiaramaria@gmail.com

Adriana Ferreira de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9527-2206> Catholic

University of Pernambuco, Brazil

E-mail: adriane.souza@gmail.com

Dayana Montero-Rodríguez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8954-7309> Catholic

University of Pernambuco, Brazil

E-mail: dayanamontero87@gmail.com

Galba Maria de Campos-Takaki

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0519-0849> Catholic

University of Pernambuco, Brazil

E-mail: galba.takaki@unicap.br

Rosileide Fontenele da Silva Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8526-554X>

Catholic University of Pernambuco, Brazil

E-mail: rosileide.andrade@unicap.br

Abstract

In this work it was investigated the potential of Mucorales fungi isolated from the Caatinga of Pernambuco state for production of biosurfactants using renewable substrates. The strains (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *M. circinelloides* UCP 0006 and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609) were cultivated in alternative culture media consisting of instant noodle waste (INW), corn steep liquor (CSL) and post-frying soybean oil (PFSO), according to conditions established by a 2³ full-factorial design (FFD). The production of biosurfactants was evaluated by determining surface tension and emulsification index (EI₂₄) and statistical analysis was performed using Pareto diagram. The presence of the main sources of carbon and nitrogen in production medium was confirmed by FTIR spectroscopy. According to the results, the three fungi evaluated were able of produce biosurfactant in media containing renewable sources. However, the strain that showed the greatest reduction in surface tension (72 to 27 mN/m) was *M. circinelloides* UCP 0006 in condition 3 of the FFD (1% INW and 4% CSL, in absence of PFSO). The infrared analysis of the INW showed the presence of carbohydrates, fatty acids and proteins, proving that this is a suitable substrate for the cultivation of fungi. The biosurfactants produced by *M. circinelloides* UCP 0005 and *M. circinelloides* UCP 0006 were able to form water-in-oil emulsions and the biosurfactant from *R. arrhizus* UCP 1609 formed oil-in-water emulsions. The present study demonstrated that the three Mucorales fungi tested were able to produce biosurfactants from renewable sources, with emphasis on *M. circinelloides* UCP 0006.

Keywords: Biomolecule; Fungi; Surface tension; Emulsification; Sustainability.

Resumo

Neste trabalho foi investigado o potencial de fungos Mucorales isolados da Caatinga do estado de Pernambuco para produção de biossurfactantes utilizando substratos renováveis. As cepas (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *M. circinelloides* UCP 0006 e *Rhizopus arrhizus* UCP 1609) foram cultivadas em meios de cultivo alternativos constituídos por resíduo de macarrão instantâneo, milhocina e óleo de soja pós-fritura, de acordo com um planejamento fatorial completo 2³. A produção de biossurfactantes foi avaliada pela determinação da tensão superficial e índice de emulsificação (IE₂₄) e a análise estatística foi realizada por meio do diagrama de Pareto. A presença das principais fontes de carbono e nitrogênio no meio de produção foi confirmada por espectroscopia FTIR. De acordo com os resultados, os três fungos avaliados foram capazes de produzir biossurfactante em meios contendo as fontes renováveis. No entanto, a cepa que apresentou maior redução na tensão superficial (72 a 27 mN/m) foi *M. circinelloides* UCP 0006 na condição 3 do planejamento (1% resíduo de macarrão instantâneo, 4% de milhocina, na ausência do óleo de soja pós-fritura). A análise no infravermelho do resíduo de macarrão instantâneo mostrou a presença de carboidratos, ácidos graxos e proteínas, comprovando que este é um substrato adequado para o cultivo de fungos. Os biossurfactantes produzidos por *M. circinelloides* UCP 0005 e *M. circinelloides* UCP 0006 foram capazes de formar emulsões do tipo água em óleo e o biossurfactante de *R. arrhizus* UCP 1609 formou emulsões do tipo óleo em água. O presente estudo demonstrou que os três fungos Mucorales testados foram capazes de produzir biossurfactantes a partir de fontes renováveis, com destaque para *M. circinelloides* UCP 0006.

Palavras-chave: Biomolécula; Fungos; Tensão superficial; Emulsificação; Sustentabilidade.

Resumen

En este trabajo se investigó el potencial de hongos Mucorales aislados de la Caatinga do estado de Pernambuco para la producción de biosurfactantes utilizando sustratos renovables. Las cepas (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *M. circinelloides* UCP 0006 y *Rhizopus arrhizus* UCP 1609) se cultivaron en medios de cultivo compuestos por residuo de fideos instantáneos, agua residual de maíz y aceite de soya post fritura, de acuerdo con un diseño factorial completo 2³. La producción de biosurfactante se evaluó por la determinación de la tensión superficial y el índice de emulsificación (IE₂₄) y el análisis estadístico se realizó mediante el diagrama de Pareto. La presencia de las principales fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de producción fue confirmada por espectroscopía FTIR. De acuerdo con los resultados, los tres hongos evaluados fueron capaces de producir biosurfactantes en medios que contenían fuentes renovables. Sin embargo, la cepa que mostró la mayor reducción de la tensión superficial (72 a 27 mN/m) fue *M. circinelloides* UCP 0006 en la condición 3 del diseño factorial (1% residuo de fideos instantáneos, 4% agua residual de maíz, en ausencia de aceite de soya post fritura). El análisis infrarrojo del residuo de fideos instantáneos mostró la presencia de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas, comprobando que este es un sustrato adecuado para el cultivo de hongos. Los biosurfactantes producidos por *M. circinelloides* UCP 0005 y *M. circinelloides* UCP 0006 formaron emulsiones de tipo agua en aceite y el biosurfactante de *R. arrhizus* UCP 1609 formó emulsiones de tipo aceite en agua. El presente estudio demostró que los tres hongos Mucorales evaluados produjeron biosurfactantes a partir de fuentes renovables, destacándose *M. circinelloides* UCP 0006.

Palabras clave: Biomolécula; Hongos; Tensión superficial; Emulsificación; Sostenibilidad.

1. Introduction

The Caatinga is biome unique of Brazil that has a wide variety of species and is the target of growing interest of industries for therapeutic purposes (Sá filho et al, 2021). Occupies about 10% of the national territory, located between the Atlantic forest and the savannah, it is present in 9 northeastern states. With the characteristic semi-arid climate, it has a highly diverse resident microbiota that presents peculiar characteristics, being able to produce bioproducts with innovative properties of high added value and industrial interest (Santos et al, 2021).

There are few records in literature with microorganisms isolated from the Caatinga bioma for the production of biosurfactants. Among the microorganisms, fungi have biotechnological potential due their extensive reproduction capacity, fast and easy adaptation (Riordon et al, 2019).

Biosurfactants are secondary metabolites produced by several microorganisms such as filamentous fungi, yeasts and bacteria (Araújo et al, 2019). Structurally, the molecule has amphipathic characteristics, that is it non-polar (hydrophobic portion) and polar (hydrophilic portion soluble in water) in same molecule (Uzoigwe, 2015). The main properties of potent biosurfactants are emulsifying and solubilizing capacity, reduction of surface tension and interfacial activity. These properties are already widely applied in industrial area as

wetting, solubilizing and foaming substances, among others (Antunes et al, 2013).

The advantage of using biosurfactants in relation to the chemical surfactants is the low toxicity, biodegradability and synthesis from renewable and low-cost substrates (Pacwa-Plociniczak et al., 2011). In this context, the ability of microorganisms in bioconvert industrial residues for the production of biosurfactants is a sustainable alternative, as it meets the environmental demand by reuse of industrial residues reducing the process costs, making the process attractive and easy to industrial employ (Rivera et al, 2019; Oliveira et al, 2020).

In this context, the present study aims to evaluate the capacity of different isolates of Mucorales fungi to production of biosurfactants of high industrial interest using industrial waste as alternative substrates.

2. Methodology

2.1 Microorganisms

In this study, three isolates of Mucorales fungi (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *Mucor circinelloides* UCP 0006 and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609) were used. The strains are maintained in Culture Bank of the Catholic University of Pernambuco (UNICAP), registered with the World Federation of Culture Collections (WFCC) under the number 927.

2.2 Renewable substrates

The renewable substrates used in this study were previously established by Andrade et al., (2018): instant noodle waste (INW), kindly provided by local industry; corn steep liquor (CSL) obtained of corn processing industry (Corn Products, Brazil) located in the municipality of Cabo de Santo Agostinho-PE, and post-frying soybean oil (PFSO), kindly supplied by a local food trade in the city of Recife-PE, Brazil. INW was macerated, and then the particles were uniformed in a 32 mesh (500 µm) sieve. The composition of the selected substrates is shown in Table 1.

Table 1 - Composition of instant noodle waste, corn steep liquor and post-frying soybean oil used as carbon and nitrogen sources in the culture media formulated for production of biosurfactants by species of Mucorales fungi (*Mucor circinelloides* and *Rhizopus arrhizus*)

Instant noodle waste Components	Amount (mg)
Carbohydrates (carbon source)	51.000
Proteins (nitrogen source)	9.400
Total fats (carbon source)	16.000
Sodium	1.357
Thiamine	0.84
Riboflavin	0.91
Niacin	11
Pyridoxine	0.91
Corn steep liquor Main component	Amount (%)
Amino Acids (nitrogen source)	62.49
Post-frying soybean oil Components in fatty acids	Amount (%)
Saturated (carbon source)	21.06
Monounsaturated (carbon source)	29.78
Polyunsaturated (carbon source)	55.97

Source: Andrade et al (2018) adapted.

2.3 Inoculum preparation

To prepare the inoculum, 100 mL sterile water were added to the Erlenmeyer flasks and young spores of different fungal isolates were added to the Erlenmeyer flasks. Then, it was performed the count in Neubauer chamber until 10^7 spores/mL. 5% this suspension was used as inoculum in the production media.

2.4 Biosurfactant production

The production was carried out in 250 mL-Erlenmeyers flasks containing 100 mL of the production media, consisting of renewable substrates (INW, CSL and PFSO), at concentrations established by a 2^3 full-factorial design (FFD). The pH of the media was adjusted to 5.5, and then, they were sterilized in autoclave and inoculated with 5% spore solution. Fermentations were carried out under orbital shaking at 150 rpm and 28°C, for 96 h. After this period, the cultures were subjected to filtration and centrifugation, in order to separate the biomass from the metabolic liquids. Cell-free metabolic liquids were used to determination of surface tension and emulsification index.

2.5 Factorial design

A 2^3 FFD was carried out in order to investigate the influence of concentration of each low-cost substrate (INW, CSL and PFSO), as well as the interaction between them, on surface tension as response variable. Table 2 shows the levels studied for each independent variable of FFD. A set of eight assays with four replicates at the central point was performed. The data obtained from the experiments were subjected to statistical analysis by Statistica® software, version 12.0 (StatSoft Inc., USA) and the significance of the results was tested at $p < 0.05$ level.

Table 2 - Levels and variables of the 2^3 full-factorial design for biosurfactant production by different Mucorales fungi.

Variables	Levels		
	-1	0	+1
Instant noodle waste (%)	1	2	3
Corn steep liquor (%)	0	2	4
Post-frying soybean oil (%)	0	0.5	1

Source: Authors.

2.6 Determination of surface tension

Surface tension was measured in triplicate on cell-free metabolic liquids using Du Noüy ring method in an automatic tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Finland), at temperature of 28°C (Kuyukina et al, 2001). The measurement of surface tension on distilled water was used as control (surface tension of water = 72 mN/m).

2.7 Determination of emulsification index (EI₂₄)

The ability of the biosurfactant in form emulsions was verified after 24 h of homogenization, according to Cooper and Goldenberg (1986). The hydrophobic substrate used was burnt engine oil burned in ratio of 1:1 and in triplicate. The emulsification index (EI₂₄) was evaluated according with following equation:

$$EI_{24}(\%) = \text{Emulsion height (EH)} / \text{Total height (TA)} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

2.8 Microscopic analysis of emulsions

The type of emulsion (water in oil/oil in water) was determined after the formation of emulsion by homogenization of the metabolic liquid (containing the biosurfactant) and the hydrophobic substrate (burnt engine oil). Then, a drop of the emulsion was transferred with a Pasteur pipette to slide and visualized in optical microscope with increase of 40x. From the image, the emulsion formed was classified according to the type and formation of bubbles.

2.9 Identification of functional groups of industrial waste

INW used in production medium was subjected to Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, in order to identify the functional groups in its composition. The functional groups of CSL and PFSO were identified according with Naumann et al, (2000) and Forato et al (2013), respectively.

3. Results and Discussion

3.1 Production of biosurfactant by Mucorales fungi

The three Mucorales fungi used in this study were able of metabolize agro-industrial residues for production of biosurfactants, as shown in Table 3. The strain that showed the greatest reduction in surface tension (72 to 27 mN/m) was *M. circinelloides* UCP 0006 in condition 3 of the FFD (1% INW and 4% CSL, in absence of PFSO). Significant values of surface tension were also obtained by *M. circinelloides* UCP 0005 (29 mN/m) and *R. arrhizus* UCP 1609 (31 mN/m) in condition 7 (1% INW, 4% CSL and 1% PFSO).

In this context, *M. circinelloides* UCP 0006 was selected by its promising potential when compared to the biosurfactant-producing bacteria which reduce the surface tension to values between 25-28 mN/m. Previously, several researchers reported similar results to those obtained in the present study, with biosurfactants produced by *Serratia marcescens* (25.92 mN/m) (Araújo et al, 2019), *Bacillus stratosphericus* (28 mN/m) (Hentati et al, 2019), *Streptomyces* sp. (28 mN/m) (Santos et al, 2019) and *Pseudomonas cepacia* (29 mN/m) (Soares et al, 2018).

Table 3 - Surface tension results obtained by *Mucor circinelloides* UCP 0005, *Mucor circinelloides* UCP 0006 and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 in 2³ full-factorial design.

Conditions	Renewable substrates			Surface tension (mN/m)		
	Instant noodle waste (%)	Cornsteep liquor (%)	Post- frying soybeanoil (%)	<i>Mucor circinelloides</i> UCP 0005	<i>Mucor circinelloides</i> UCP 0006	<i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1609
1	1	0	0	40	39	43
2	3	0	0	37	36	38
3	1	4	0	41	27	34
4	3	4	0	34	29	37
5	1	0	1	33	34	40
6	3	0	1	34	32	37
7	1	4	1	29	28	31
8	3	4	1	31	28	32
9	2	2	0.5	31	30	35
10	2	2	0.5	32	29	36
11	2	2	0.5	31	28	36
12	2	2	0.5	30	29	37

Table 4 shows the surface tension results obtained in this study compared to the literature in the last five years. The literature search was carried out from works that also used industrial substrates of renewable origin as raw material in the culture media for the production of biosurfactants by filamentous fungi. It worth highlighting that in the study carried out by Andrade et al. (2018) with *Cunninghamella echinulata* UCP 1299, using the same industrial waste (2% INW, 0.5% PFSO and 2% CSL), the surface tension was 34 mN/m. In addition, the isolate *M. circinelloides* UCP 0006 showed to be a promising microorganism for the production of a biosurfactant capable of competing with the chemical surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS), which reduce the surface tension to 37 mN/m. Oliveira et al (2020) obtained a similar result in their study with *Penicillium sclerotiorum*, also using renewable substrates. It corroborates the ability of filamentous fungi to use different sources of carbon and nitrogen to produce biosurfactants, justifying the importance and necessity of investing in the researches with these microorganisms.

Table 4 - Surface tension obtained in this study compared with the literature in last five years involving culture of filamentous fungi in media containing substrates of renewable origin.

Microorganisms	Substrates	Surface tension (mN/m)	References
<i>Mucor circinelloides</i> UCP 0006	INW and CSL	27	This study
<i>M. circinelloides</i> UCP 0005	INW, CSL and PFSO	29	This study
<i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1609	INW, CSL and PFSO	31	This study
<i>M. circinelloides</i> UCP 0005	Jatobá (<i>Hymenaea stilbocarpa</i>) husks and CSL	34	Santiago et al (2021)
<i>M. hiemalis</i> UCP 0039	PFSO	40	Ferreira et al (2020)
<i>Penicillium sclerotiorum</i> UCP 1361	Whey and barley	27	Oliveira et al (2020)
<i>Absidia cylindrospora</i> UCP 1301	Crude glycerol, CSL and whey	30	Mendonça et al (2020)
<i>Cunninghamella echinulata</i> UCP 1299	INW, CSL and PFSO	32	Andrade et al (2018)

Source: Authors.

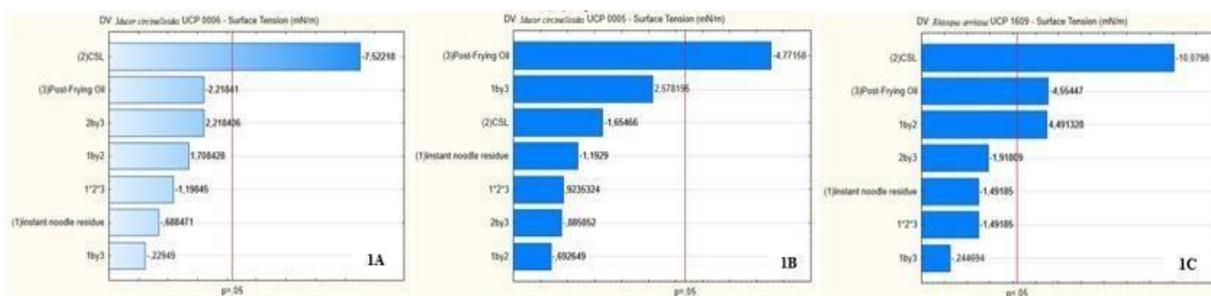
3.2 Influence of carbon and nitrogen sources for biosurfactant production by *Mucor circinelloides* and *Rhizopus arrhizus*

From the results it was possible to identify that the isolates of *M. circinelloides* (UCP 0005 and UCP 0006) and *R. arrhizus* (UCP 1609) used the carbohydrate present in INW (starch) as the first carbon source, as it is a hydrophilic source of easy assimilation. The nitrogen source in the culture medium also plays a fundamental role in the metabolism of microorganisms to obtain biosurfactants, which may have a limiting effect on the

bioprocess by altering the pH of the medium by releasing the chemical amino group, making it acidic (Marcelino et al. al, 2020). Thus, in the present study, the production of the biosurfactant by the Mucorales fungi was favored by the amino acids present in CSL.

The influence of concentrations of carbon sources (INW and PFSO) and nitrogen source (CSL), as well as their interactions in production of biosurfactants by *M. circinelloides* UCP 0005, *M. circinelloides* UCP 0006 and *R. arrhizus* UCP 1609, were statistically evaluated by Pareto diagram (Figure 1).

Figure 1 - Pareto diagrams obtained from the statistical analysis of the 2³ full-factorial design applied to the production of biosurfactants by *Mucor circinelloides* UCP 0006 (A), *Mucor circinelloides* UCP 0005 (B) and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 (C). The point at which the effect estimates were statistically significant ($p = 0.05$) is indicated by dashed lines



Source: Authors.

Figure 1A demonstrates that for production by *M. circinelloides* UCP 0006 only CSL has significant influence on the reduction of surface tension. This isolate showed the greatest reduction in surface tension (72 to 27 mN/m), and it is possible to confirm that this nitrogen source favored the production of the biomolecule. For the isolate *M. circinelloides* UCP 0005 (Figure 1B), PFSO was the most important variable to reduce surface tension in condition 7 (1% INW, 4% CSL and 1% PFSO), being the preferred carbon source used by this isolate. CSL and INW may have greater statistical significance in the results within a new design including other concentrations of these substrates.

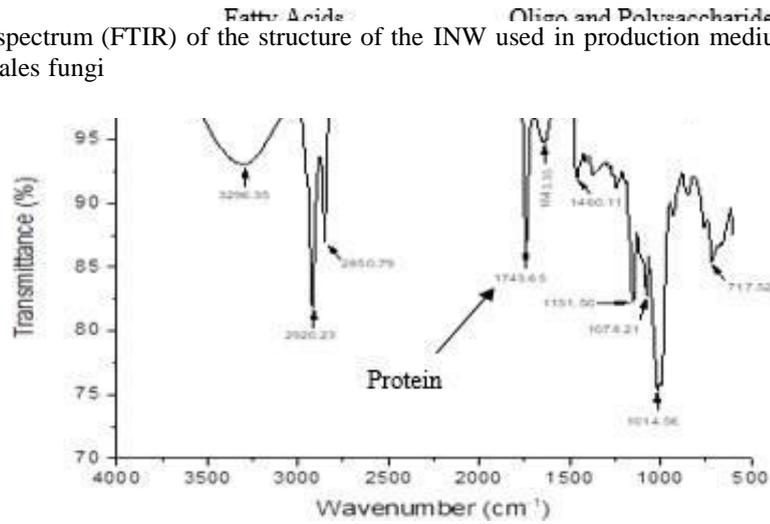
Figure 1C demonstrates that for production of biomolecule by *R. arrhizus* UCP 1609, PFSO and CSL were the components of the production medium that most contributed with the reduction of surface tension. Therefore, INW, in concentration used, did not statistically influence the reduction of surface tension, requiring the increase of this concentration.

3.3 Chemical characterization of waste used for production of biosurfactants by Mucorales fungi.

The chemical composition (functional groups) of the residues used was identified by infrared spectroscopy. According with results obtained by Forato et al (2013), CSL has the presence of different amino acids (protein source) in its composition (peaks between 1700 and 1000 cm^{-1}), confirming its function in production medium as the main nitrogen source. Moreover, CSL also shows the versatility of its composition with the presence of fatty acids (peaks between 3100 and 2800 cm^{-1}) and oligo and polysaccharides (peaks between 1200 and 1000 cm^{-1}) (Naumann et al, 2000, Forato et al 2013), also proving to be an excellent source of carbon for microorganisms. On the other hand, INW (Figure 2) demonstrates a more intense spectral band in 1014 cm^{-1} (Figure 3), evidencing the presence of oligo and polysaccharides (1151 cm^{-1} and 1078 cm^{-1}) confirming the presence of carbohydrates. In addition to the presence of carbohydrates in composition of INW, it was also evidenced the presence of fatty acids (3296 to 2800 cm^{-1}) and proteins (1742 cm^{-1}) in its composition

(Naumann et al, 2000).

Figure 2 - Infrared spectrum (FTIR) of the structure of the INW used in production medium of biosurfactants by Mucorales fungi

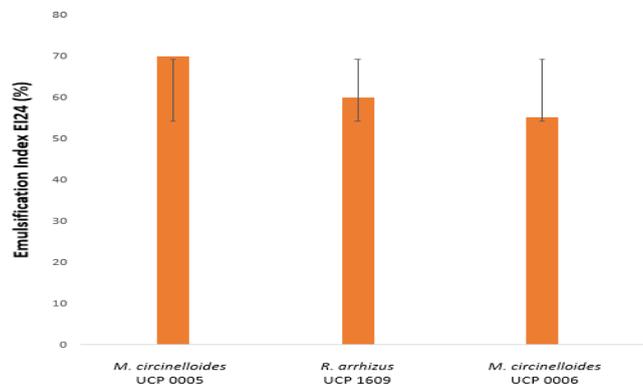


Source: Authors.

3.4 Potential of the biosurfactant obtained from Mucorales fungi for formation of stable emulsions

The emulsifying capacity of a biomolecule is an important parameter that expresses the versatility of its application in different areas (Zargar et al, 2022). The literature indicates that a biosurfactant with the potential to form stable emulsions is one that has an emulsification index (EI₂₄) above 50% (Ferreira et al, 2020). Thus, according to Figure 3, the metabolic liquids obtained from culture of three Mucorales fungi were able to present excellent EI₂₄, showing the bifunctional potential of these filamentous fungi to reduce surface tension and form stable emulsions. However, *M. circinelloides* UCP 0005 showed the best emulsification potential at the central point of FFD (70% in condition 11), followed by *R. arrhizus* UCP 1609 (60% in condition 8) and *M. circinelloides* UCP 0006 (55.2% in condition 3), the latter being the same condition of lower surface tension. A similar emulsification result (EI₂₄ of 79.17%) was obtained by another Mucorales fungus, *Absidia* sp. UCP 1144, after growth in medium containing CSL (3%), glycerol (3%) and whey (4%) (Mendonça et al, 2019).

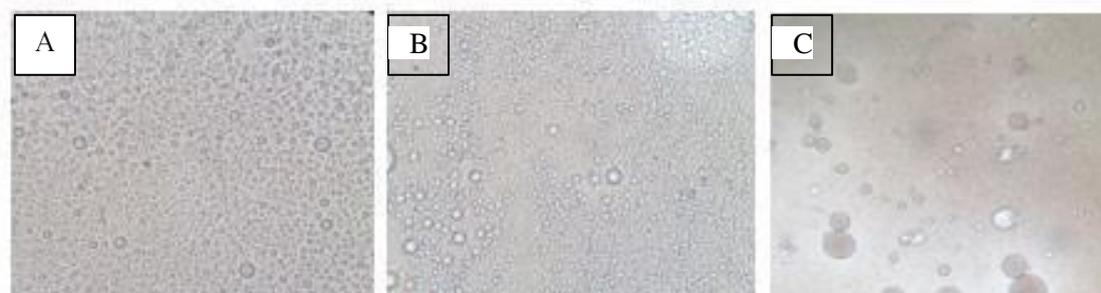
Figure 3 - Potential of the biosurfactant produced by *Mucor circinelloides* UCP 0006, *Mucor circinelloides* UCP 0005 and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 in formation of emulsions using burnt engine oil



Source: Authors.

Figure 4 shows the optical microscopy of emulsions formed by biosurfactant from *M. circinelloides* UCP 0005 (Figure 2A), *M. circinelloides* UCP 0006 (Figure 2B) and *R. arrhizus* UCP 1609 (Figure 2C). Figure 2A and Figure 2B show the formation of oil-in-water emulsions by the biosurfactant of *M. circinelloides* UCP 0005 and *M. circinelloides* UCP 0006, respectively. With a greater number of globular and homogeneous droplets between the phases, there are fewer empty spaces between the bubbles, characteristic of oil drops from a dispersed phase suspended in a continuous or aqueous phase (Souza et al, 2016). On the other hand, Figure 2C shows the formation of water-in-oil emulsions formed by the biosurfactant of *R. arrhizus* UCP 1609.

Figure 4 - Microscopic observation (40x increase) of the emulsions formed by biosurfactant of *Mucor circinelloides* UCP 0005 (A), *Mucor circinelloides* 0006 (B) and *Rhizopus arrhizus* UCP 1609 (C).



Source: Authors.

4. Conclusion

In this study, the maximum efficiency in production of biosurfactant from renewable sources was evidenced by *M. circinelloides* UCP 0006. However, the isolates *M. circinelloides* UCP 0005 and *R. arrhizus* UCP 1609 also showed potential to produce biomolecule with tensioactive and emulsification properties of high industrial interest. The production of biosurfactant by Mucorales fungi was influenced by favorable constitution of alternative production medium rich in hydrophilic carbon source (starch present on INW) and hydrophobic carbon source (PFSO), as well as is rich in source of nitrogen (amino acids present in CSL). Future studies can be carried out using a new factorial design with alteration of the amounts of residues used, considering the possibility of contribution of INW on biosurfactant production by *M. circinelloides* UCP 0005.

Acknowledgments

This work was financially supported by CNPq, FACEPE and CAPES. The authors thank also to the Multiuser Chemical Analysis Laboratory (LABMAQ) of the Department of Chemistry of UFRPE and to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB) of Catholic University of Pernambuco (UNICAP) by the use of the laboratories.

References

- Andrade, R. F. S., Silva, T. A. L., Ribeaux, D. R., Rodriguez, D. M., Souza, A. F., Lima, M. A. B., Lima, R. A., Silva, C. A. A., Campos-Takaki, & Galba M. (2018). Promising biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using renewable resources and Its application in cotton fabric cleaning process. *Advances in Materials Science and Engineering*. 1-13, <https://doi.org/10.1155/2018/1624573>
- Antunes, A. A., Araújo, H. W. C., Silva, C. A. A., Albuquerque, C. D. C., Campos-Takaki, & Galba M (2013). Produção de biossurfactante por

- Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. *Arquivos do Instituto Biológico*, 80 (3), 334-341.
- Araújo, H. W. C., Andrade, R. F. S., Montero-Rodríguez D., Rubio-Ribeaux, D., Silva C. A. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microbial Cell Factories*. 18(1): [https://doi: 10.1186/s12934-018-1046-0](https://doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0).
- Cooper D. G., & Goldenberg, B. G (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (2), 224-229.
- Ferreira, I. N. S., Montero-Rodríguez, D., Campos-Takaki, G. M., & Andrade, R. F. S. (2020). Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. *Electronic Journal of Biotechnology*. 47, 51-58, <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.006>
- Forato, L. A., Britto, D., Scramin, J. A., Colnago, L. A., & Assis, O. B. G. (2013). Propriedades Mecânicas e Molhabilidade de Filmes de Zeínas Extraídas de Glúten de Milho. *Polímeros*, 23 (01), 42-48. <https://10.1590/S0104-14282012005000075>
- Hentati, B., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., & Chamkha, M. (2019). Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 441- 449. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>
- Jadhav, J. V., Pratap, A. P., & Kale, S. B. (2019). Evaluation of sunfloweroil refinery waste as feedstock for production of sophorolipid. *Process Biochemistry*, 78, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.015>
- Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Philp, J. C., Christofi, N., Dunbar, S. A., & Ritchkova, M. A. (2001). Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiology Methods*, 46,109-120. [https://doi: 10.1016 / s0167-7012 \(01\) 00259-7](https://doi: 10.1016 / s0167-7012 (01) 00259-7).
- Lima, C. L. F., Lima, D. X., Souza, C. A. F., Oliveira, R. J. V., Cavalcanti, I. B., Gurgel, L. M. S., & Santiago, A. L. C. M. A. (2018). Description of *Mucor pernambucoensis* (mucorales, mucoromycota), a new species isolated from the brazilian upland rainforest. *Phytotaxa*, 350, (03), 274. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.350.3.6>
- Marcelino, P. R. F., Gonçalves, F., Jimenez, I. M., Carneiro, B. C., Santos, B. B., & Silva, S. S. (2020). Sustainable Production of Biosurfactants and Their Applications. *Lignocellulosic Biorefining Technologies*, 159-183. <https://doi.org/10.1002/9781119568858.ch8>
- Mendonça, R. S., Sá, A. V. P., Rosendo, L. A., Santos, R. A., Marques, N. S. A. A., Souza, A. F., Rodriguez, D. M., & Campos-Takaki, G. M. (2020). Production of biosurfactant and lipids by a novel strain of *Absidia cylindrospora* UCP 1301 isolated from Caatinga soil using low-cost agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Development*, 7, (01), [https://doi 8300-8313. 10.34117/bjdv7n1-564](https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-564)
- Naumann, D. (2000) "Infrared spectroscopy in microbiology", In: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Meyers, R.A. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, U.K., 102. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117>
- Oliveira, L. T., Marques, N. S. A. A., Souza, A. F., Ribeaux, D. R., Cirnea, A. A., Andrade, R. F. S., Silva, T. A. L., Okada, K., & Campos-Takaki, G. M. (2020). Sustainable biotransformation of barley and milk whey for biosurfactant production by *Penicillium sclerotiorum* UCP1361. *Chemical Engineering Transactions*, <https://doi: 79, 259-264. 10.3303/CET2079044>
- Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011) Environmental Applications of Biosurfactantes: Recent Advances. *Molecular Science*, 12, 633-654. <https://doi:10.3390/ijms12010633>
- Ramoutar, S., Mohammed, A., & Ramsubhag, A. (2019). Laboratory-scale bioremediation potential of single and consortia fungal isolates from two natural hydrocarbon seepages in Trinidad, West Indies. *Bioremediation Journal*.1-11. <https://doi.org/10.1080/10889868.2019.1640181>
- Riordon, J., Sovilj, D., Sanner, S., Sinton, D., & Young, E. W. K. (2019). Deep learning with microfluidics for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 37(3), 310-324. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.005>
- Rivera, A. D., Urbina, M. A. M., & López, V. E. L. (2019) Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35 (155). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2729-3>
- Sá-Filho, G. F., Silva, A. I. B., Costa, E. M., Nunes, L. E., Ribeiro, L. H. F., Cavalcanti, J. R. L. P., Guzen, F. P., Oliveira, L. C., & Cavalcante, J. S. (2021). Plantas medicinais utilizadas na Caatinga brasileira e o potencial terapêutico dos metabólitos secundários: uma revisão. *Research, society and development*, 10, (13). <https://doi.10.33448/rsd-v10i13.21096>
- Santiago, M. G., Lins, U. M. B. L., Campos-Takaki, G. M., Filho, L. O. C., & Andrade, R. F. S. (2021). Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* UCP 0005 using new culture medium formulated with jatoba (*Hymenaea courbaril* L.)

bark and corn steep liquor. *Brazilian Journal of Development*, 7, (05), <https://doi.org/10.34117/bjdv7n5-497>

Santos, E. F., Teixeira, M. F. S., Converti, A., & Sarubbo, L. A. (2019). Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 142-150. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.014>

Santos, A. F. A., Andrade, V. D., Cardoso, B. A., Silva, O. S., Oliveira, R. L., Porto, A. L. F., Porto, T. S., & Porto, C. S. (2020). Bioprospecting of enzymes produced by *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolated from Caatinga soil, by solid state fermentation. *Brazilian Journal of Development*, 6, (05), <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-135>

Soares, R. C. S., Almeida, D. G., Brasileiro, P. P. F., Raquel, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2018). Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation*. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9830-4>

Souza, A. F., Rodriguez, D. M., Ribeaux, D. R., Luna, M. A. C., Silva, T. A. L., Andrade, R. F. S., Gusmão, N. B., Campos- & Takaki, G. M. (2016). Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (1608) 1-18. <http://doi.org/10.3390/ijms17101608>

Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., & Rhaman, P. K. S. M. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in microbiology*, 6, 245. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00245>

Zargar, A. F., Lymperatou, A., Skiadas, I., Kumar, N., & Srivastava, P. (2022) Structural and functional characterization of a novel biosurfactant from *Bacillus* sp. IITD106. *Journal of Hazardous Materials*, 423(B). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127201>

CAPÍTULO III

Artigo II a ser submetido para **Petroleum, Science and Technology**, ISSN 1091-6466, QUALIS A4

POTENCIAL BIFUNCIONAL DE *MUCOR CIRCINELLOIDES* UCP 0042 NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE E NA DEGRADAÇÃO DE PETRODERIVADOS EM AMOSTRAS DE SOLO E ÁGUA

Thayná Rhomana Da Silva Cândido^{1,2*}, Dayana Montero Rodríguez², Adriana Ferreira de Souza², Galba Maria de Campos Takaki² and Rosileide Fontenele Andrade Silva²

¹ Doutorado em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

² Núcleo de Pesquisa e Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil

RESUMO

Mucor circinelloides é um fungo filamentosos da ordem Mucorales que tem especial interesse da indústria devido ao seu grande potencial biotecnológico, capaz de bioconverter diversos substratos em nutrientes como lipídeos e carboidratos e formar biomoléculas importantes. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir biossurfactante a partir de *Mucor circinelloides* UCP 0042 e aplicar na degradação de petroderivados no solo e na água. Nos experimentos, foram utilizados os resíduos agroindustriais milhocina, resíduo de macarrão instantâneo e óleo pós fritura em planejamento fatorial 2³ em fermentação submersa e agitação orbital, obedecendo tempo de incubação de 96h a 28°C. Os resultados mostraram que o líquido metabólico produzido pelo microrganismo apresentou excelente tensão superficial (24 mN/m), tendo produzido biossurfactante caracterizado como glicolípido aniônico. Segundo o Diagrama de Pareto, milhocina e o óleo pós fritura, assim como a interação entre os dois, tiveram importância significativa na redução da tensão superficial. Além disso, o líquido metabólico foi capaz de apresentar índice de emulsão de 69% e dispersão de 33,2 cm² em água destilada e 33,16 cm² em água do mar a 80°C, apontando estabilidade do surfactante biológico em altas temperaturas. A capacidade de remoção de petroderivados do biossurfactante produzido foi avaliada na aplicação de teste de biodegradação de óleo queimado em água do mar, que apresentou a taxa de 93%, enquanto o teste de remoção de óleo lubrificante em areia da praia apresentou 78% de remoção, evidenciando o enorme potencial de *Mucor circinelloides* UCP 0042 em diversas aplicações biotecnológicas voltadas a biorremediação do meio ambiente.

Palavras chave: Remoção; Mucorales; Resíduos; Fungos filamentosos

ABSTRACT

Mucor circinelloides is a filamentous fungus of the order Mucorales that is of special interest to the industry due to its great biotechnological potential, capable of bioconverting various substrates into nutrients such as lipids and carbohydrates and forming important biomolecules. In this context, the objective of this work was to produce biosurfactant from *Mucor circinelloides* UCP 0042 and apply it to the degradation of petroderivatives in soil and water. In the experiments, the agro-industrial residues corn step liquor, instant noodles residue and post-frying oil were used in a 2³ factorial design in submerged fermentation and orbital agitation, obeying an incubation time of 96 h at 28°C. The results showed that the metabolic fluid produced by the microorganism showed excellent surface tension (24 mN/m), producing a biosurfactant characterized as an anionic glycolipid. According to the Pareto Diagram, corn step liquor and post-frying oil, as well as the interaction between the two, had a significant importance in the reduction of surface tension. In addition, the metabolic liquid was able to present an emulsion index of 69% and a dispersion of 33.2 cm² in distilled water and 33.16 cm² in seawater at 80°C, indicating stability of the biological surfactant at high temperatures. The ability to remove petroderivatives from the biosurfactant produced was evaluated in the application of the biodegradation test of burnt oil in seawater, which showed a rate of 93%, while the test of removal of lubricating oil in beach sand showed 78% of removal, showing the enormous potential of *Mucor circinelloides* UCP 0042 in several biotechnological applications aimed at bioremediation of the environment.

Palavras chave: Removal; Mucoralean; Residue; Filamentous fungi

INTRODUÇÃO

O potencial dos fungos filamentosos vem crescendo significativamente, em especial os do gênero *Mucor*. Esses fungos possuem potencial na produção de diversas biomoléculas de interesse industrial, ambiental, além de elevado potencial para aplicações na biorremediação e na produção de biomoléculas (DE LIMA et al, 2018; CANDIDO et al, 2022; FAZILI et al, 2022).

Entre as biomoléculas de interesse industrial que podem ser produzidas por fungos filamentosos, estão os biossurfactantes (ARAÚJO et al, 2019; SANCHES et al, 2021). Estruturalmente, os biossurfactantes possuem porção apolar ou hidrofóbica e outra porção polar ou hidrofílica solúvel em água. Estas características estruturais permitem a mistura entre compostos com diferentes polaridades e favorece o aumento da estabilidade (UZOIGWE, 2015). As principais vantagens de utilização dos biossurfactantes frente aos surfactantes químicos é a baixa toxicidade, biodegradabilidade e síntese a partir de material renovável (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Como biomoléculas importantes para a biotecnologia, o mercado global tem uma previsão de crescimento de 8% ou US\$ 2,6 bilhões em 2023, aproximadamente 540 quilos de biossurfactante (GAUR et al, 2022).

Os hidrocarbonetos são compostos por moléculas de carbono e hidrogênio que formam complexas cadeias, podendo também ser constituído por metais pesados. O petróleo bruto é o principal substrato da crescente demanda energética gerada pelo desenvolvimento industrial e populacional acelerado e por isso, derramamentos acidentais causados durante a extração ou transporte do material como o ocorrido na costa brasileira em agosto de 2019, levam a contaminação e exposição prolongada do meio ambiente a toxicidade desses componentes (SHARMA et al, 2019; DURVAL et al, 2021). Apesar de leis mais rigorosas com intenção de prevenir o problema, o transporte de petróleo continuará acontecendo e junto com ele, o risco de derramamentos acontecerem (DA SILVA et al, 2021).

Essa contaminação prolongada e constante derivada do uso contínuo de petroderivados que infiltra o solo é um dos graves problemas que a remediação busca mitigar a partir de técnicas eficazes e de baixo custo para remover contaminantes (GAROUSIN et al, 2021).

Neste sentido, a atenuação dos efeitos tóxicos por meio da biorremediação resolve uma ampla variedade de problemas de contaminação pois é uma tecnologia que promove a remoção e/ou degradação completa dos contaminantes por micro-organismos, minimiza a poluição causada pelo petróleo com uma abordagem prática e econômica e com baixos impactos na natureza com relação aos métodos físico-químicos, transformando os contaminantes em compostos com pouca ou nenhuma toxicidade (GOTTUMUKKALA et al, 2019) e (VASILYEVA et al, 2020). No processo de desintoxicação do meio ambiente destes resíduos perigosos, os agentes tensoativos produzidos pelos microrganismos aumentam a solubilidade dos hidrocarbonetos por meio da emulsificação, formação de micelas e diminuição da tensão superficial, o que facilita a degradação biológica destes contaminantes, intensificando o crescimento microbiano e a taxa de biorremediação (NEJAD et al, 2020).

Assim, considerando a distribuição cosmopolita desta espécie e achados anteriores na literatura sobre o seu potencial biotecnológico, o presente estudo busca avaliar a capacidade de *Mucor circinelloides* em produzir moléculas tensoativas bifuncionais a partir de resíduos industriais, capazes de facilitar a biodegradação e biorremoção de petroderivados em solo arenoso e água do mar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismo

A espécie *Mucor circinelloides* UCP 0042 foi gentilmente cedida pelo Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), registrado sob o número 927 na World Federation of Culture Collections (WFCC), e encontra-se mantido em Ágar Batata-Dextrose.

Inóculo

O inóculo foi preparado a partir da adição de esporos jovens do fungo em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada esterilizada. Posteriormente, alíquota da suspensão esporica foi inserida na câmara de Neubauer para a obtenção de 10^7 esporos/mL.

Meio de produção

Os substratos utilizados para preparo de meio de produção do biossurfactante foram milho-cina (4%), óleo de soja pós fritura (0,5%) e resíduo de macarrão instantâneo (1%) conforme descrito por Andrade et al (2018) e modificado por Candido et al (2022). O meio de produção foi preparado em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250mL e o pH do meio foi ajustado para 5,5.

Produção do biossurfactante

Ao meio de produção foi inoculado 5% da suspensão esporíca contendo 10^7 esporos/mL. Os frascos foram mantidos em agitação orbital de 150 rpm durante 96h a 28°C. Após esse período, foi separado o líquido metabólico da biomassa por filtração e centrifugação. Os ensaios foram realizados em triplicata e o pH final do líquido após o cultivo do *Mucor circinelloides* foi investigado.

Detecção da produção

A detecção da produção do biossurfactante foi avaliada pela tensão superficial. A medição foi realizada em tensiometro automático utilizando anel de Nuoy conforme descrito por Kuyukina et al (2001). Todas amostras foram mantidas em temperatura de 28°C.

Determinação do índice de emulsificação

A capacidade do biossurfactante em formar emulsões estáveis foi avaliada de acordo com a metodologia de Cooper e Goldenberg (1986). Foram inseridos em tubos de ensaio na proporção 1:1, diferentes substratos hidrofóbicos (óleo mineral, óleo de soja, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de motor queimado e óleo diesel) e o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante. Em seguida, os tubos foram agitados em vórtex e após 24h as emulsões formadas foram medidas com auxílio de régua. Todos os ensaios realizados em triplicata. O cálculo do índice de emulsificação foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Altura camada de emulsão (AE) / Altura total (AT) x 100} \quad (\text{Equação 1})$$

Seleção de método de extração

Diferentes métodos de extração do biossurfactante por precipitação foram realizados a partir da precipitação com solventes acetona 1:1 (v/v) e etanol 1:2 (v/v), assim

como pela precipitação ácida (HCl a 2M para pH 2). Em seguida, as amostras foram mantidas em overnight a 5°C. Os precipitados obtidos foram centrifugados a 4.000 rpm por 15 minutos a 5°C e posteriormente liofilizados. Os biossurfactantes isolados foram levados ao dessecador até peso constante e o rendimento foi calculado por gravimetria e expressos em g/L.

Determinação da carga iônica

A carga iônica do biossurfactante foi identificada através de mobilidade eletroforética em potenciômetro modelo ZM3-D-G Zeta Meter System a partir da solução de 100 mg de biossurfactante isolado em 40mL de água destilada.

Determinação da capacidade dispersante de óleo em água

Foi avaliada a capacidade do biossurfactante em dispersar óleo queimado de motor em água. Para tanto, 40mL de água destilada foi adicionada em placas de Petri. Em seguida, 1mL do óleo de motor queimado foi adicionado no centro da placa. O potencial de dispersão do biossurfactante foi avaliado após adicionar 0,5mL do líquido metabólico. A presença da zona clara no centro da placa de Petri indicou área do óleo dispersa. A dispersão foi calculada de acordo com a equação:

$$ODA = \pi \cdot R^2 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $\pi = 3,14$

R^2 = raio da dispersão

Estabilidade da atividade dispersante

A atividade dispersante do biossurfactante foi avaliada pelo teste de dispersão utilizando líquido metabólico submetido a diferentes temperaturas (30, 70 e 80°C), pH (5, 7, 10 e 14). Para tanto, 40mL de água destilada foi adicionada em placas de Petri, seguido da adição de 1mL do óleo de motor queimado no centro da placa e adição do líquido metabólico (0,5mL) contendo biossurfactante após modificações de pH e temperatura. A presença da zona clara no centro da placa de Petri indicou área do óleo dispersa. A dispersão foi calculada de acordo com a equação já descrita no item capacidade dispersante de óleo em água.

Biodegradação utilizando método DCPIP

Para a avaliação do potencial de biodegradação de petroderivado pelo *Mucor circinelloides* foi utilizado o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). Para tanto, foi preparada solução do corante a 1g/L a partir de 0,100 g de DCPIP dissolvido em 100 mL do meio Bushell-Hass (BH). A solução foi homogeneizada em balão volumétrico de igual volume. O armazenamento da solução indicadora foi realizado em frasco âmbar de vidro e mantido a 4 °C. A influencia do surfactante químico (Tween 80) e do biossurfactante (glicolípido de produzido *Cunninghamella echinulatta*) (Andrade et al, 2014) como agente facilitador da biodegradação por *Mucor circinelloides* foi investigado seguindo a metodologia de Hanson et al (1993) com adaptações, como a retirada de ensaios que não continuam o inóculo e o surfactante (sintético ou biológico) numa mesma amostra. Os ensaios estão descritos conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos ensaios para método colorimétrico DCPIP

Condições	Ensaio	Composição	BH (mL)	DCPIP (µL)	ÓL (µL)	IN (µL)	SF (µL)	H ₂ O (µL)
1	Branco	BH	7,5	-	-	-	-	900
2	Controle do meio	BH+DCPIP	7,5	400	-	-	-	500
3	Controle Inóculo	BH+DCPIP+IN	7,5	400	-	200	-	300
4	Inóculo Tween 80	BH+DCPIP+IN+TW	7,5	400	-	200	250	50
5	Inóculo Biossurfactante	BH+DCPIP+IN+BSF	7,5	400	-	200	250	50
6	Óleo e Inóculo	BH+DCPIP+OL+IN	7,5	400	50	200	-	250
7	Óleo, Inóculo Tween 80	BH+DCPIP+IN+TW	7,5	400	50	200	250	-
8	Óleo, Inóculo Biossurfactante	BH+DCPIP+OL+IN+BSF	7,5	400	50	200	250	-

*BH (Meio Bushell-Hass); DCPIP (redox 2,6-diclorofenol-indofenol); OL (óleo); TW (Tween); BSF (biossurfactante)

Fonte: Autoria própria.

Aplicação do biossurfactante na biorremediação em solo

O potencial do biossurfactante obtido de *M. circinelloides* na remoção de petroderivados em amostras de solos foi investigado. O ensaio de biorremediação foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 5 mL do poluente hidrofóbico (óleo diesel e óleo de motor), 10g dos solos (areia de praia e sedimento de mangue) e 75 mL de líquido metabólico contendo o biossurfactante. O surfactante químico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foi utilizado como controle positivo de remoção e a

água destilada utilizada como controle negativo. Os frascos foram mantidos em agitação orbital de 150 rpm por 48 horas a 28° C. Após este período, as amostras foram recolhidas em placas de Petri previamente pesadas e levadas a estufa por 24h a 100° C para peso constante. Os resultados foram calculados conforme a seguinte equação:

$$\begin{aligned} \text{Placa}_{\text{cheia}} - \text{Placa}_{\text{vazia}} = \check{Z}\check{Z} - \text{Peso}_{\text{solo}} = \check{G}\check{D} & \quad (\text{Equação 3}) \\ \check{G}\check{D} - \text{Peso}_{\text{óleo}} = \text{YY} \times 100 / \text{Peso}_{\text{óleo}} & \end{aligned}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de biossurfactante por *Mucor circinelloides* UCP 0042 avaliado pela tensão superficial

Mucor circinelloides UCP 0042 demonstrou ser micro-organismo promissor por conseguir produzir biossurfactante capaz de reduzir a tensão superficial da água (72mN/m) para 24 mN/m na condição 7 do planejamento fatorial (meio constituído por 1% de resíduo de macarrão instantâneo, 4% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura) (Tabela 2). Em adição, valores significativos de tensão superficial (abaixo dos 30 mN/m) foram obtidos na condição 4 e 8 do planejamento fatorial, respectivamente. Bactérias superprodutoras de biossurfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 25-30mN/m (KABIR et al, 2018; HENTATI et al, 2019; KOIM-PUCHOWSKA et al, 2021; REHMAN et al, 2021; WEI XI et al, 2021; ZHANG et al, 2021; CHELLIAH et al, 2022; KACHRIMANIDOU et al, 2022) Portanto, os resultados obtidos neste estudo foram significativos por serem superiores aos registros da literatura para produção de biossurfactantes por fungos filamentosos (SILVA et al, 2021).

Tabela 2: Avaliação da produção de biossurfactante por *Mucor circinelloides* UCP 0042 utilizando a determinação da tensão superficial como variável resposta

Condições	Resíduo de Macarrão			Tensão superficial (mN/m)
	instantâneo (%)	Milhocina (%)	Óleo pós-fritura (%)	
1	1	0	0	33
2	3	0	0	35
3	1	4	0	33
4	3	4	0	27
5	0	0	1	33
6	3	0	1	31
7	1	4	1	24
8	3	4	1	26
9	2	2	0,5	29
10	2	2	0,5	28
11	2	2	0,5	27
12	2	2	0,5	27

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os dados obtidos deste estudo com outras cepas e espécies de fungos, é possível observar o potencial de *Mucor circinelloides*, uma vez que a maioria dos trabalhos com produção de biossurfactantes por fungos é pertencente aos filos Ascomycota e Basidiomycota, e poucos referente ao Mucoromycota (CHOTARD et al, 2022). Em outro recente estudo, Chotard et al., (2022) investigaram a produção de biossurfactantes por espécies de *Mucor* sp., *Absidia* sp. e *Lichtheimia* sp. e obtiveram como melhores resultados tensão superficial de 36, 32 e 31 mN/m, respectivamente.

Portanto, de acordo com o baixo valor de tensão superficial obtido, após produção do biossurfactante por *Mucor circinelloides* UCP 0042, é possível confirmar que esta espécie é promissora para aplicações na biorremediação. Até o momento, não há registros na literatura de valor igual ou menor tensão para biossurfactantes obtidos por fungos filamentosos, o que caracteriza este trabalho como pioneiro.

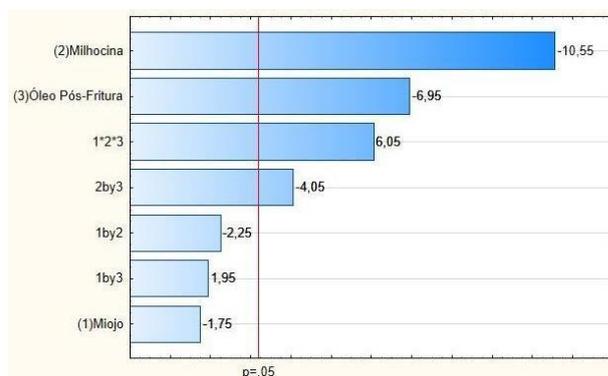
Influência dos substratos renováveis na produção de biossurfactante por *Mucor circinelloides* UCP 0042

A natureza dos substratos no meio de produção em cultivo submerso influencia no metabolismo do micro-organismo durante a síntese de biossurfactantes, assim como o tipo de biossurfactante produzido (SILVA et al 2018; ANDRADE e al, 2018). Neste contexto, a partir dos resultados obtidos, na condição selecionada do planejamento fatorial (meio constituído por 1% de resíduo de macarrão instantâneo, 4% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura) foi possível identificar que provavelmente o *Mucor circinelloides* utilizou como principal fonte de carbono o carboidrato do resíduo de macarrão instantâneo (amido) seguido do óleo pós-fritura. A fonte de nitrogênio utilizada foi a milhocina no meio de produção.

A Figura 1 mostra a análise estatística representada pelo Diagrama de Pareto para avaliação das concentrações do resíduo de macarrão instantâneo, milhocina, óleo pós fritura e as suas interações na redução da tensão superficial obtida após cultivo de *Mucor circinelloides*(Fig 1).

A milhocina foi a variável independente que mais contribuiu com a redução da tensão superficial, seguido do óleo pós-fritura após cultivo de *Mucor circinelloides* (Fig 1). O resíduo de macarrão instantâneo na concentração usada não influenciou estatisticamente na redução da tensão superficial sendo necessário o aumento desta concentração no meio de produção, o que pode ser comprovado pelo resultado se apresentar abaixo da significância. Apesar do resíduo de macarrão instantâneo não ter sido significativo do ponto de vista estatístico, a sua interação com milhocina e óleo pós-fritura contribuíram para que o *Mucor circinelloides* produzisse o biossurfactante.

Figura 1 - Diagrama de Pareto para avaliar a influência dos resíduos industriais na redução da tensão superficial e produção do biossurfactante após cultivo de *Mucor circinelloides*



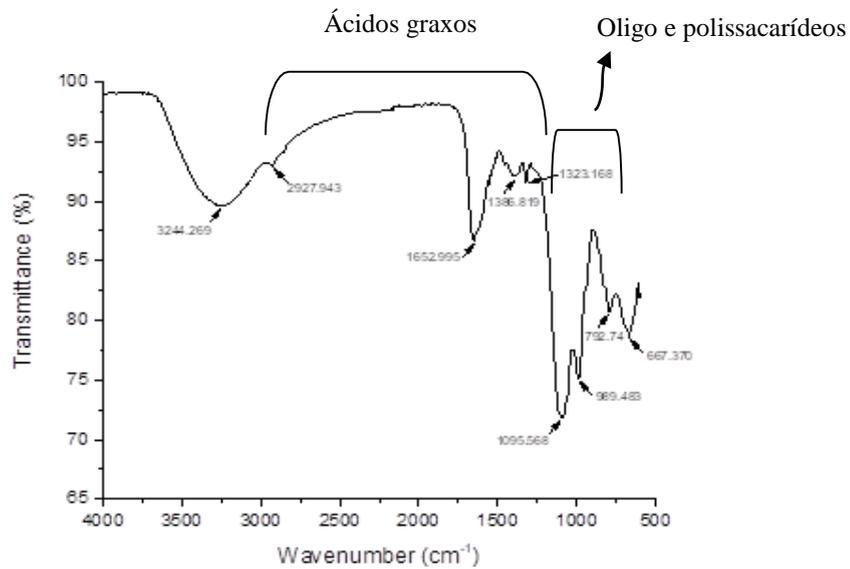
Fonte: Autoria própria.

Caracterização do biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042

O biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042 possui caráter aniônico (-26,6 mV) a 100 volts. Surfactantes aniônicos possuem potencial de aplicação em diversos segmentos industriais (DRAKONTIS et al, 2020; ANDRADE et al, 2018). Por outro lado, a composição do biossurfactante foi avaliada pelo infravermelho FITR (Figura 2) e demonstra presença de grupamento em 2927 cm⁻¹ compatível com ácidos graxos insaturados. Estendendo até aproximadamente 1700cm⁻¹, estas vibrações são compatíveis com estiramento de grupo C=O de grupo funcional éster em lipídeos. Já o pico 1652cm⁻¹ evidencia amida de origem proteica, enquanto os picos 1386cm⁻¹ e 1323cm⁻¹ são compatíveis com estiramento simétrico de grupo COO⁻ de cadeia lateral de aminoácidos e ácidos graxos.

Além disso, entre 1200 e 900cm⁻¹ há a presença de picos de vibrações de estiramento C-O-C e C-O- P de oligo e polissacarídeos e deste até 600cm⁻¹ (NAUMANN et al, 2000). Assim, de acordo com os resultados apresentados pela análise de espectro FITR o biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* possui caráter polimérico.

Figura 2 - Infravermelho (FIR) da estrutura do biossurfactante isolado produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042

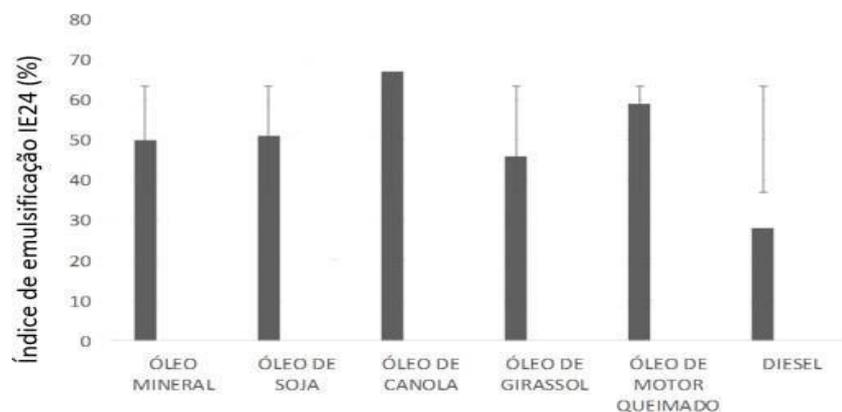


Fonte: Autoria própria.

Capacidade emulsificante do biossurfactante

A capacidade do biossurfactante em formar emulsões estáveis foi avaliada na melhor condição de planejamento fatorial (meio constituído por 1% de resíduo de macarrão instantâneo, 4% de milhocina e 1% de óleo de soja pós-fritura). Emulsão estável foi formada após mistura do biossurfactante e óleo de canola resultando em índice de emulsificação de 69% após 24h, seguido do índice de emulsificação de 60% usando óleo queimado de motor (Figura 3). Adicionalmente, óleo de soja (51%) e óleo mineral (50%) estiveram também dentro e acima da porcentagem considerada satisfatória para agente emulsificante (FERREIRA et al., 2020).

Figura 3 - Índice de emulsificação (IE24%) após 24h utilizando diferentes substratos hidrofóbicos

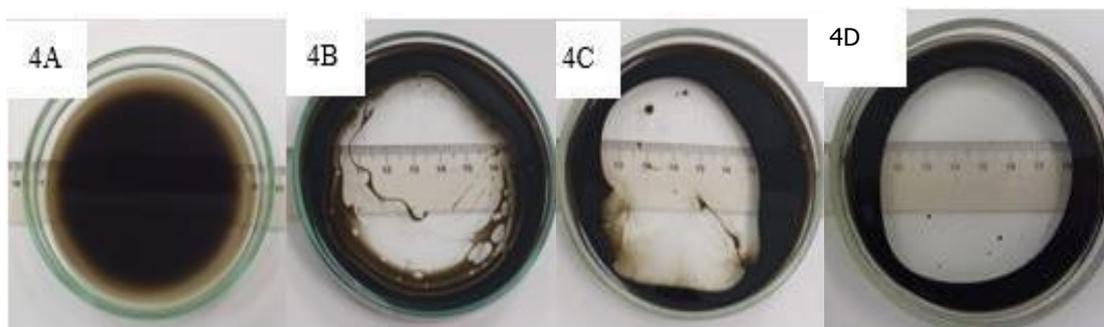


Fonte: Autoria própria.

Potencial do biossurfactante na dispersão de petroderivado em água

A capacidade do biossurfactante em dispersar petroderivados é uma característica importante pois facilita a rápida remoção do poluente (UYAR & SAGLAM, 2021). A Figura 4 ilustra ensaios de dispersão realizados em água após aplicação do biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042. Na Figura 4A temos aplicação da água como controle negativo de dispersão de petroderivados, enquanto na Figura 4B o controle positivo (detergente comercial) resultando em dispersão de 17,27 cm² ODA (Fig. 4B), na Figura 4C o controle positivo de dispersão isolado (Dodecil sulfato de sódio- SDS) resultando em 23,75 cm² ODA e na Figura 4D o potencial de dispersão do biossurfactante de *M. Circinelloides* resultando em dispersão de 33,2 cm² ODA, o que evidencia o elevado potencial de dispersão quando comparado aos comercialmente vendidos. Resultados similares foram obtidos com diferentes cepas de bactérias com potencial de dispersão similar (33,18 cm² ODA) aos obtidos neste trabalho com o biossurfactante da bactéria *Proteus mirabilis* (UYAR & SAGLAM, 2021).

Figura 4 - Potencial do biossurfactante na dispersão de petroderivado em água: controle negativo (4A), detergente comercial (4B), Surfactante químico SDS (4C) e biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042 (4D)



Fonte: Autoria própria.

Estabilidade do biossurfactante avaliado pela dispersão

As Figuras 5 e 6 demonstram o potencial do biossurfactante produzido por *M. Circinelloides* UCP 0042 após ser submetido a modificação térmica e do pH em meio salino (água do mar) com o objetivo de avaliar sua ação dispersante após mudanças extremas. Na Figura 5A, o biossurfactante isolado foi capaz de dispersar composto

hidrofóbico em 28 cm² a 30°C, enquanto na imagem 5B a dispersão foi um pouco menor, apresentando 12,56 cm² a 70°C. Já na figura 5C, uma maior dispersão foi observada, atingindo 33,16 cm² a 80°C.

Em estudo semelhante, Ferreira et al (2020) obteve resultado semelhante (30 cm² a 80°C) utilizando *M. Hiemalis*, microrganismo pertencente ao mesmo Filo Mucoromycota. Demonstrando que em temperaturas extremas (30°C e 80°C) a estabilidade pode ser confirmada a partir da consistência dos resultados, podendo o biossurfactante fúngico ser utilizado no ambiente marinho em diferentes locais do globo atingidos por manchas de óleo, dentro da faixa de temperatura testada.

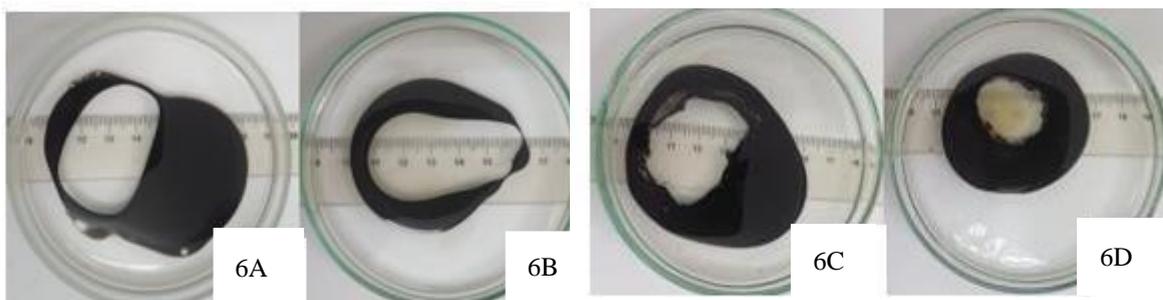
Na Figura 6, a dispersão é avaliada de acordo com diferentes pH's aos quais o biossurfactante isolado foi submetido. Na Figura 6A o biossurfactante foi capaz de dispersar 21,64 cm² em pH ácido (5,0) estando mais compatível ao detergente comercial sintético, enquanto que em pH neutro (7,0), a dispersão atingiu 19,63 cm². Já em pH básico conforme mostrado nas Figuras 6C (9,61 cm²/ pH 10) e 6D (4,9 cm²/ pH 14) as dispersões se mostraram menores.

Figura 5 - Estabilidade do biossurfactante após modificação térmica avaliada pelo teste de deslocamento de óleo: 5A (28 cm²/30°C); 5B (12,56 cm²/70°C); 5C (33,16 cm²/80°C)



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Estabilidade do biossurfactante após modificação do pH avaliada pelo teste de deslocamento de óleo: 6A(21,64 cm²/ pH 5,0); 6B(19,63 cm²/ pH 7,0); 6C(9,61 cm²/ pH 10,0); 6D(4,9 cm²/ pH 14,0)



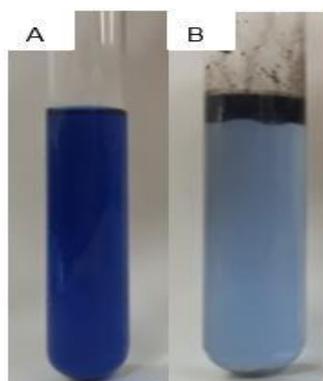
Fonte: Autoria própria.

Potencial de biodegradação do *Mucor circinelloides*

O potencial de biodegradação do *Mucor circinelloides* UCP 0042 foi avaliado pelo método colorimétrico DCPIP. De acordo com a Figura 7, após 24 h foi possível observar a máxima redução da cor de azul escuro para azul claro, o que indica pelo método DCPIP que ocorreu biodegradação na amostra contendo óleo queimado de motor + inóculo de *M. circinelloides*+ biossurfactante. Considerada uma técnica rápida e simples de triagem a ser aplicada na seleção de potenciais microrganismos degradadores de petróleo bruto, este método consiste na aplicação do indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol em meio contendo petroderivado como única fonte de carbono. Ao degradar a fonte de carbono, o indicador DCPIP sai de seu estado oxidado (azul escuro) para o estado reduzido (azul claro) após reagir quimicamente recebendo os elétrons oriundos como produtos da degradação do petroderivado (PEIXOTO et al, 2018).

Esta etapa é qualitativa. Após análise quantitativa avaliada por espectrofotometria a biodegradação foi 93%. Baixos valores de tensão superficial, alto índice de emulsificação e de dispersão de óleo (ODA) são indicativos de um surfactante capaz de facilitar ativamente a degradação dos hidrocarbonetos (LEE et al, 2018).

Figura 7 - Degradação de petroderivado por *M. Circinelloides* avaliado pelo método colorimétrico DCPIP: (A) tempo 0 e (B) após 24 h.



Fonte: Autoria própria.

A presença do biossurfactante nos ensaios de biodegradação demonstrou aumentar a disponibilidade do óleo queimado de motor para *Mucor circinelloides* UCP 0042 contribuindo com rápida biodegradação.

Similares resultados foram observados em estudos utilizando o método DCPIP para detectar potencial de espécies bacterianas em associação com surfactantes sintéticos e biológicos. Porém, não há relatos na literatura de biossurfactantes de fungos filamentosos associado a biodegradação, conforme demonstra Tabela 3.

Tabela 3 - Avaliação do efeito do biossurfactante na biodegradação de petroderivados por bactérias

Hidrocarboneto	Tipo de Surfactante	Microrganismo	Espécie	Referência
Hidrocarboneto aromático policíclico (PAH)	Biossurfactante	<i>Stenotrophomonas</i> sp. N5	Bactéria	Zang et al, (2021)
Diesel	Biossurfactante	<i>Paracoccus</i> sp. MJ9	Bactéria	Xu Meng et al, (2020)
Petróleo bruto	Biossurfactante	<i>Bacillus subtilis</i> RSL-2	Bactéria	Sharma & Pandey, (2020)
Petróleo bruto	Biossurfactante	<i>Agrobacterium fabrum</i> SLAJ731	Bactéria	Sharma et al, (2019)
Petróleo bruto	Biossurfactante	<i>Bacillus algicola</i> 003-Phe1, <i>Rhodococcus soli</i> 102-Na5, <i>Isoptericola chiayiensis</i> 103-Na4 e <i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> SDRB-Py1	Bactéria	Wan Lee et al,(2018)
Diesel	Biossurfactante	<i>Pseudomonas poae</i> BA1, <i>Acinetobacter bouvetii</i> BP18, <i>Bacillus thuringiensis</i> BG3 e <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> BG32	Bactéria	Ali Khan et al,(2017)

Fonte: Autoria própria.

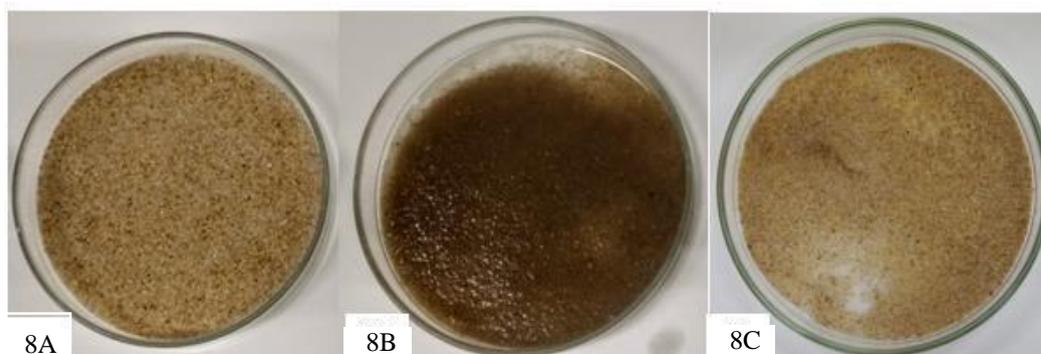
Aplicação de biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042 na remediação de solos impactados com petroderivados

O potencial do biossurfactante produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042 na remoção de óleo diesel em solo arenoso foi avaliada. O biossurfactante produzido foi capaz de remover 78% de óleo diesel da areia da praia (Figura 8). Os resultados obtidos neste estudo foram superiores aos obtidos por Othman et al (2022) com o fungo *Aspergillus fumigatus* que foram capaz de remover 57% de hidrocarbonetos de lodo contaminado. Em estudo utilizando a levedura

Saccharomyces cerevisiae, Kreling e seus colaboradores (2019) conseguiram em 90 dias a remoção de 56,71% de óleo diesel impregnado no solo.

A literatura referente a aplicação de biossurfactantes de fungos filamentosos em solos encontra-se bastante escassa, tornando este trabalho de extrema relevância. Quando então comparado a biotensoativos de origem bacteriana o resultado apresentado por *Mucor circinelloides* torna-se ainda mais importante. Estudos recentes demonstraram que a capacidade de biossurfactantes em remover hidrocarbonetos de solo contaminado com eficiência é entre 43% e 81% (DHIMAN et al 2022), sendo assim, muito próximos deste inédito resultado.

Figura 8 - Potencial do biossurfactante de *M. circinelloides* na remoção de óleo diesel em solo arenoso após 24 h: 8A (areia limpa); 8B (areia + diesel) e 8C (areia pós ação do biossurfactante).



Fonte: Autoria própria.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mucor circinelloides UCP 0042 foi capaz de bioconverter resíduos industriais produzindo potente biossurfactante que apresentou excelente tensão superficial com resultados superiores aos de muitas bactérias já conhecidas como produtoras de biossurfactantes, além de apresentar ótimo potencial de dispersão de petroderivado e possuir estabilidade em diferentes temperaturas e pH em água do mar. O biossurfactante de composição glicolípica foi capaz de apresentar excelente biodegradação de petroderivado, além de ótima capacidade de remoção de óleo de sedimentos da praia e capacidade emulsificante satisfatória. Reunindo características importantes, o bioproduto obtido por este estudo apresenta versatilidade para ser empregada não apenas na biorremediação ambiental em ambientes impactados com petroderivados.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. F. S., SILVA, T. A. L., RIBEAUX, D. R. et al. Promising biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using renewable resources and Its application in cotton fabric cleaning process. **Advances in Materials Science and Engineering**, p.1-13, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1624573>
- ARAÚJO, H. W. C. et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 2, dez. 2019.
- ATAKPA, O.E., ZHOU, H., JIANG, L. et al. Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 290, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133337>. 2022.
- CANDIDO, T.R.S., MENDONÇA, R.S., LINS, U.M.B. L., et al. Production of biosurfactants by Mucoralean fungi isolated from Caatinga bioma soil using industrial waste as renewable substrates. **Research, Society and Development**, v.11, n.02, <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25332>. 2022.
- CHELLIAH, R., BANAN-MWINE DALIRI, E., OH, D.H. Triagem de Actinobactérias para Produção de Biossurfactante. In: Dharumadurai, D. (eds) Métodos em Actinobacteriologia. Manuais de Protocolos Springer. Humana, Nova York, NY. 2022. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_95.
- CHOTARD, M., MOUNIER, J., MEYE, R. et al. Biosurfactant-producing *Mucor* strains: selection, screening and chemical characterization. **Applied Microbiology**, v.2, n.1, p. 248-259. 2022.
- DA SILVA, R.C.F.S., LUNA, F.M., RUFINO, R.D. et al. Ecotoxicity of the formulated biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* CCT 6659 and application in the bioremediation of terrestrial and aquatic environments impacted by oil spills. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 154, p. 338-347. 2021.
- DE LIMA, C. L. F. et al. Description of *mucor pernambucoensis* (mucorales, mucoromycota), a new species isolated from the brazilian upland rainforest. **Phytotaxa**, v. 350, n. 3, p. 274, 2018.
- DHIMAN, V., GIRI, A., DEEPAK, C. Pollutants Bioremediation Using Biosurfactants: A Novel Approach for Improving Soil Health. Soil Health and Environmental Sustainability, p.489-502. https://doi.org/10.1007/978-3-031-09270-1_21
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77–90, ago. 2020.
- FAZILI, A.B.A., SHAH, A.M., ZAN, X. et al. *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. **Microbial Cell Factories**, p.21-29, 2022.
- FERREIRA, I. N. S., MONTERO-RODRÍGUEZ, D., CAMPOS-TAKAKI, G. M., et

al. Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electronic Journal of Biotechnology**. 47, 51-58. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.06.006>

GAUR, V.K., SHARMA, P., GUPTA, S. et al. Opportunities and challenges in omics approaches for biosurfactant production and feasibility of site remediation: strategies and advancements. **Environmental Technology & Innovation**, v.25, <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102132>. 2022.

HENTATI, D.; CHEBBI, A.; HADRICH, et al. Produção, caracterização e potencial biotecnológico de biossurfactantes lipopeptídicos de uma nova cepa de *Bacillus stratosphericus* marinho FLU5. **Ecotoxicol. Ambiente. Saf.** 2019 , v. 167, p. 441-449. 2019.

KACHRIMANIDOU, V., PAPADAKI, A., LAPPA, I. et al. Produção de biossurfactante a partir de lactobacilos: uma visão sobre a interpretação dos métodos de avaliação predominantes. **Applied Biochemistry Biotechnologies**, v. 194 , p. 882-900. 2022. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03686-7>

KAMALUDEEN K., YUSUF Y. D., SIMONA M. H., et al. Descobrimos a diversidade comportamental entre *Pseudomonas spp* de alta resistência . surfactantes no limite da redução da tensão superficial líquida. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 4. 2018. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny008>

KHAN, A.H.A., TANVEER, S., ALIA, S. et al. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, v. 104, p. 158-164. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.04.023>

KOIM-PUCHOWSKA B, KŁOSOWSKI G, DRÓZDŹ-AFELT, J.M. et al. Influência da composição do meio e das condições de cultura na biossíntese de surfactina por uma cepa nativa de *Bacillus subtilis natto* BS19. **Moléculas**, v. 26(10) 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules26102985>.

LEE, D.W., LEE, H., KWON, B., et al. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. **Environmental Pollution**, v. 241, p.254-264. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>

KRELING, N.E., ZAPAROLI, M., MARGARITAS, A.C. et al. Extracellular biosurfactants from yeast and soil–biodiesel interactions during bioremediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, p. 395-408. 2019.

LIMA,R.A., ANDRADE, R.F.S., RODRIGUEZ, D.M., et al. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, v.11(6), p.237-244. 2018.

MULLIGAN, C.N. Sustainable remediation of contaminated soil using biosurfactants. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.635196>. 2021.

NAUMANN, D. Infrared spectroscopy in microbiology, In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Meyers, R.A. (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, U.K., p.102. 2000.

NEJAD, Y.S., JAAFARZADEH, N., AHMADI, N. et al. Remediation of oily sludge wastes using biosurfactant produced by bacterial isolate *Pseudomonas balearica* strain Z8. **Journal of Environment Health Science and Engineering**, v.18, p. 531-539. 2020.

OTHMAN, A.R., ISMAIL, N.S., ABDULLAH, S.R.S. et al. Potential of indigenous biosurfactant producing fungi from real crude oil sludge in total petroleum hydrocarbon degradation and its future research prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.10, n.3. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107621>. 2022.

PEIXOTO, F.B.S., PEIXOTO, J.C.C., MOTTA, D.C.L. et al. Assessment of petroleum biodegradation for *Bacillus toyonensis* by the using redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol. **Biological Sciences**, v. 40. 2018. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v40i1.35640>

RAMLA R., MUHAMMAD I. A., NAEEM A., et al. Crude oil biodegradation potential of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Meyerozyma* sp. **Journal of Hazardous Materials**, v 18, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126276>

RODRIGUES, C.E., BENTO, H.B.S., CARVALHO, A.K.F. et al. Critical applications of *Mucor circinelloides* within a biorefinery context. **Critical Reviews in Biotechnology**, doi <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1592104>. 2019.

SANCHES, M.A., LUZEIRO, I.G., CORTEZ, A.C.A. et al. Production of biosurfactants by Ascomycetes. **International Journal of Microbiology**. Disponível em doi.org/10.1155/2021/6669263. 2021.

SHARMA, S. & PANDEY, L.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. **Bioresource Technology**, v. 307. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123261>

SHARMA, S., VERMA, R., PANDEY, L.M. Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated *Agrobacterium fabrum* SLAJ731. **Biorcatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101322>.

SILVA, A. C. S. DA et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018.

SILVA, A.F., BANAT, I.M., GIACHINI, A.J. et al. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: biosorption, production and potential applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. Disponível em doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5. 2021.

UYAR, E. & SAGLAM, O. Isolation, screening and characterization of biosurfactant producing bacteria oil samples of auto repair shops. **Archives of Microbiology**, v.

CANDIDO, T.R.S. Produção de biossurfactante por *Mucor* sp. e *Rhizopus* sp. e aplicação... 75

203, p. 4929-4939. 2021.

WEI XI, YUANYE P., MASOOME A. A. A Review on Biosurfactant Applications in the Petroleum Industry. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2021, Article ID 5477185, 10 pages, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5477185>

XU, M., FU, X., GAO, Y., et al. Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 5. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104277>

ZANG,T., WU, H., YAN, B., et al. Enhancement of PAHs degradation in biosurfactant/phenol system by increasing the bioavailability of PAHs. **Chemosphere**, v.266. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128941>

KUNCHENG Z. ,WEIYI T. ,JUNZHANG L., et al. Produção do biossurfactante serrawettin W1 por *Serratia marcescens* S-1 melhora a degradação de hidrocarbonetos. **Engenharia de Bioprocessos e Biosistemas**, v. 44, p. 2541–2552. 2021.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os isolados da ordem Mucorales (*Mucor circinelloides* UCP 0005, *Mucor circinelloides* UCP 0006, *Mucor circinelloides* UCP 0042 e *Rhizopus arrhizus* UCP 1609) foram capazes de produzir biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais;
- *Mucor circinelloides* UCP 0042 apresentou máximo potencial de produção de biossurfactante evidenciado pela mínima tensão superficial obtida;
- O índice de emulsificação apresentado pelos quatro isolados estudados foi satisfatório, especialmente pelo *Mucor circinelloides* UCP 0005, possibilitando novas pesquisas para otimização das condições;
- O biossurfactante de composição glicolípica produzido por *Mucor circinelloides* UCP 0042 possui potencial de aplicação na remoção e na biodegradação de ambientes aquáticos e terrestres impactados com petroderivados.