



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

NADIELLY REGINA ANDRADE SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Cunninghamella echinulata UCP 1297 NA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Recife

2014

NADIELLY REGINA ANDRADE SILVA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
Cunninghamella echinulata UCP 1297 NA
PRODUÇÃO DE BÍOSSURFACTANTE POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais 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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

Recife

2014

S586p

Silva, Nadielly Regina Andrade

Potencial biotecnológico de *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 na produção de biossurfactante por fermentação submersa / Nadielly Regina Andrade Silva ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Carlos Alberto Alves da Silva, 2014.

86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2014.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos agrícolas. 3. Resíduos industriais. 4. Biotecnologia. 5. *Cunninghamella echinulata*. 6. Fungos. I. Título.

CDU 574.6

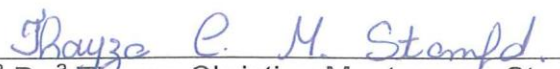
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 NA
PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Nadielly Regina Andrade Silva

Examinadores:



Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco-(UNICAP)
Orientadora



Prof.^a Dr.^a Thayza Christina Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco-(UFPE)



Prof.^a Dr.^a Kaoru Okada
Universidade Católica de Pernambuco-(UNICAP)

Defendida em 17 / 03 / 2014

Coordenadora: Profa. Dra. Clarissa Daisy Costa Albuquerque

*Dedico aos meus pais, José Carlos e Maria
Régia, aos meus irmãos, Antonio e Carlos Vinicius,
pelo amor e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS e a minha família, por todas as oportunidades alcançadas durante minha trajetória.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki, exemplo de sabedoria, pelo incentivo e dedicação à pesquisa, pela confiança em mim depositada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva por transmitir tranquilidade e pela sincera ajuda.

Ao Reitor, Prof.Dr.Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira S.J., pela oportunidade de utilização dos laboratórios do NPCIAMB e pelas facilidades na realização do Mestrado.

A Profa. Dra. Clarissa Daisy Costa Albuquerque, pelo respeito e ensinamentos.

A todos os professores que fazem parte do Mestrado em Desenvolvimento de processos Ambientais, e em especial a Prof.^a Dr.^a Kaoru Okada, pela amizade e estímulo, desde a graduação. Obrigada por tudo.

A secretária Sônia Maria de Souza e aos técnicos de laboratório André Felipe Santos de Lima, e em especial, Severino Humberto de Almeida pela total disponibilidade e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos colegas de turma, em especial, Márcia Muniz, Maria Andreza, Brindize Ferreira pelo companheirismo, troca de amizade, aprendizado e experiência na concretização desta jornada acadêmica.

A todos os colegas que integram o NPCIAMB pela compreensão, paciência e troca de conhecimentos, em particular ao grupo SISBIOTA, Grayce Kelli Barbosa, Adriana Ferreira e Marcos Antônio de Luna, pelo constante incentivo. Muito obrigada, meus amigos.

Ao CNPq, pelo fomento concedido para execução do projeto SISBIOTA.

À FACEPE pelo fomento para a realização da Pesquisa, como também pela bolsa concedida para a realização do Mestrado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1	11
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	15
1.3.1 Surfactantes	15
1.3.2 Biossurfactantes.....	17
1.3.3 O papel e a importância dos biossurfactantes.....	24
1.3.4 Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes	25
1.3.5 Aplicação dos biossurfactantes	26
1.3.6 Resíduos agroindustriais	32
1.3.7 Micro-organismo.....	34
1.3.7.1 O gênero <i>Cunninghamella</i> e aplicações.....	36
1.3.7.2 Caatinga	37
1.4 Referências Bibliográficas	38
CAPÍTULO 2	46
Resumo	47
1 . Introdução	48
2 . Resultados e Discussão	49
2.1 . Descrição da <i>Cunninghamella echinulata</i>	49
2.2 Curva de crescimento, consumo de carboidratos, pH e produção de biossurfactante	49
2.3 Características de emulsificação do biossurfactante.....	51
2.4 Os estudos de estabilidade	52
2.5 Rendimento , CMC, carga iônica e Composição Química Preliminar do biossurfactante.....	54

2.6 Área de deslocamento do óleo (ODA).....	54
2.7 Efeito da viscosidade do biossurfactante.	55
3 . Seção Experimental	55
3.1 Isolamento, Identificação e preservação de micro-organismo.....	55
3.2 Substratos Agroindustriais.....	56
3.3 Condições Culturais e produção de biossurfactante	56
3.4 . Cinética de crescimento e produção de biossurfactante.	56
3.5 Determinação do pH.....	57
3.6 Determinação tensão Superficial.....	57
3.7 Determinação do índice e atividade de emulsificação.....	57
3.8 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)	57
3.9 Determinação da estabilidade do biossurfactante	57
3.10 Isolamento do biossurfactante.....	57
3.11 Carga iônica e viscosidade.....	58
3.12 Teste de propagação do óleo (área de deslocamento óleo - ODA)	58
3.13 Determinação da viscosidade do Óleo.....	58
3.14 A análise estatística.....	58
4 . Conclusões	59
Agradecimentos	59
Referências	59
CAPÍTULO 3	65
CONCLUSÕES GERAIS	66
ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. 1 Representação da estrutura molecular comum dos biossurfactantes	20
Figura 1. 2 Acumulação dos biossurfactantes nas interfaces de líquidos imiscíveis.	21
Figura 1. 3 Representação esquemática da CMC.....	21
Figura 1. 4 Processo estrutural de solubilização de óleo por biossurfactante e adsorção por células microbianas.....	29

Capítulo 2

Figura 1. Características microscópicas e macroscópicas de <i>Cunninghamella echinulata</i> isolada do solo da Caatinga do Nordeste do Brasil.....	49
Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do caldo livre de células de <i>Cunninghamella echinulata</i> após 96 h de cultivo para os experimentos do planejamento fatorial completo de 2 ² . O ponto que estima o efeito estatístico significativo (em p = 0,05). (A) Tensão Superficial.	51
Figura 3. Índice de Emulsificação (E ₂₄) (B) do biossurfactante produzido por <i>Cunninghamella echinulata</i> usando milhocina e óleo de soja pós-fritura.	52
Figura 4. Estabilidade do biossurfactante produzido por <i>Cunninghamella echinulata</i> usando M(milhocina) e (resíduos de óleo de soja) ROS.	53
Figura 5. Área de deslocamento do óleo formado de acordo com substratos: (A) óleo motor queimado + água destilada; (B) óleo de motor queimado + detergente comercial; (C) óleo de motor queimado + Triton X-100 (1%), e (D) óleo de motor queimado + biossurfactante isolado (1%), produzida por <i>Cunninghamella echinulata</i>	55

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. 1 Classificação, exemplos e produção mundial dos surfactantes (%).	15
Tabela 1. 2 Principais classes de surfactantes naturais e os micro-organismos produtores	18

Capítulo 2

Tabela 1. Curva de crescimento, pH, consumo de carboidratos e produção de biossurfactante utilizando resíduos industriais (M e ROS).	50
Tabela 2. Propriedades de redução e aumento dos substratos de viscosidade pelo biossurfactante produzido por <i>Cunninghamella echinulata</i>	55
Tabela 3. Nível e fatores aplicados ao composto planejamento fatorial 2^2	59

RESUMO

Os biossurfactantes constituem uma classe de compostos obtidos por via microbiana com estrutura molecular anfifílica, responsáveis pela redução de tensão superficial e interfacial, com ampla aplicação no setor industrial alimentício, farmacêutico, cosmético, na biorremediação e na recuperação de petróleo. A busca de alternativas para o uso de resíduos torna a produção de biossurfactante mais competitiva e viável, minimizando os custos de produção e conseqüentemente os impactos no ambiente. Nesse contexto, estudos foram realizados com fungo isolado de solo da caatinga (Pernambuco, Brasil). O fungo foi identificado como *Cunninghamella echinulata*, sendo em seguida avaliado seu potencial biotecnológico na produção de biossurfactante. Realizou-se crescimento em meio utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo, milhocina (M) e óleo residual de soja (ORS) como substratos, empregando um planejamento fatorial completo de 2^2 , tendo como variável resposta a produção de biossurfactante, a qual foi avaliada pela redução da tensão superficial e do índice emulsificação. Os resultados indicaram uma redução da tensão da água de 72 para 36mN/m e índice de emulsão de 80% para o óleo queimado de motor. Os testes de estabilidade com o líquido metabólico livre de células frente diferentes temperaturas, concentrações de NaCl e pH tanto para tensão superficial, como para o índice de emulsificação. O biossurfactante apresentou carga iônica, constituição química polimérica com lipídeos (40%), carboidratos (35,2%) e proteínas (20,3%). E ainda apresentou propriedade como agente de dispersão de óleos e no aumento e ou redução da viscosidade. Os resultados promissores com o fungo *C. echinulata* na produção do biossurfactantes/emulsificante sugerem o seu emprego, no futuro, em processos de biorremediação, na redução da concentração dos componentes do petróleo, na limpeza de tanques, no derramamento de petróleo, como também em outras aplicações industriais.

Palavras-Chave: Biossurfactante; Bioprocesso; *Cunninghamella echinulata*; Resíduo agroindustrial; Emulsificante.

ABSTRACT

The biosurfactants are a class of compounds obtained by microbial way with amphiphilic molecular structure, responsible for the reduction of surface and interfacial tension, with wide application in the food industry, pharmaceutical, cosmetic, in bioremediation and oil recovery. The search for alternatives to the use of waste makes the production of more viable and competitive biosurfactant minimizing production costs and hence the impact on the environment. In this context, studies were performed with fungus isolated from Caatinga soil (Pernambuco, Brazil). The fungus was identified as *Cunninghamella echinulata*, being evaluated in a row biotechnological potential biosurfactant production. The growth medium was used agro-industrial residues, corn steep liquor (M) and soybean oil waste (ORS) as substrates, employing a complete planning design of 2^2 with the variable response biosurfactant production which was evaluated by reduction of the surface tension and emulsification index. The results indicated a reduction of water surface tension of 72 to 36mN/m, and emulsification index of 80% for the engine burning oil. Stability tests with cell-free metabolic liquid against different temperatures, pH and NaCl concentrations for surface tension, as well as the emulsification index. The biosurfactant showed ionic charge, polymeric chemical composition constituted by lipids (40%), carbohydrates (35.2%) and proteins (20.3%), and presented property as ability to oil displacement area and increased or decreased the viscosity. The promising results obtained with the fungus *C. echinulata* in the of biosurfactant/emulsifier production suggest in future perspectives to use in bioremediation processes, reducing the concentration of the components of petroleum, cleaning tanks, the oil spill, as well as in other industrial applications.

Keywords: Biosurfactant; Bioprocess; *Cunninghamella echinulata*, Agroindustrial substrates, Emulsifier

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Uma das principais causas globais de poluição é o aumento do consumo de petróleo e seus derivados, além dos efeitos poluentes dos resíduos oleosos emitidos pelas indústrias, cuja remoção no ambiente contaminado é difícil (EPA e Environmental Protection Agency of United States, 2008; LIN et al., 2010; SOUZA et al., 2014). Uma das formas de amenizar tais impactos é através do uso de surfactantes, classe de moléculas tensoativas e emulsificantes, sintetizadas quimicamente com produção mundial acima 7,5 milhões de toneladas, que pode gerar no mercado uma receita superior a US \$41 bilhões (MARTI et al., 2013). São compostos extremamente importantes no setor mundial, com produção total de 54% em detergentes domésticos e lavanderia, e apenas 32% destinado para uso industrial, aplicados na biorremediação, na dispersão de derrames de petróleo, na remoção e mobilização de resíduos oleosos (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; BUENO et al., 2010; BHADORIYA et al., 2013).

Uma estratégia de produção ecológica é agregada ao alto valor dos biossurfactantes, com base em suas propriedades e funções fisiológicas. Um composto com estrutura molecular anfifílica, de porção hidrofóbica e hidrofílica, com habilidade de reduzir a tensão superficial e interfacial, além de promover a diminuição da viscosidade do óleo. Essas biomoléculas são biodegradáveis, de baixa toxicidade, ecologicamente segura, baixa irritabilidade e compatibilidade com a pele humana com aplicabilidade nos setores farmacêuticos, indústria de cosméticos e de alimentos (BANAT et al., 2000; CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; BANAT et al., 2010). Por razões econômicas sua aplicação é pouco sucedida no mercado mundial, cujo potencial de lucro não é competitivo o suficiente com os homólogos químicos, com base nos rendimentos e na adequação das fontes renováveis ideais para os micro-organismos (APARNA et al., 2012).

A crescente preocupação com a proteção ambiental resultou na utilização de produtos químicos menos agressivos ao meio e suas normas ambientais impulsionaram tais recursos no mercado industrial, voltados ao potencial dos processos biológicos nas diversificadas áreas de atuação. Assim, com o

avanço da biotecnologia associado à aplicação dos produtos naturais a partir de substratos renováveis como matéria prima com o intuito de substituir os compostos derivados do petróleo. A busca por alternativas faz crescer o interesse por subprodutos biológicos através da redução no custo de produção.

Portanto, a utilização de resíduos industriais oleosos na produção de metabólitos secundários é uma abordagem importante que contribui para a redução dos custos, aumentando o valor econômico desses produtos e consequentemente reduzindo os custos de produção. Os óleos vegetais servem como fonte de carbono de alto valor lipídico, rica em ácidos graxos saturados e insaturados, com produção mundial de aproximadamente de 3 milhões de toneladas, considerando o Brasil, um país agrícola (OLIVEIRA et al., 2009; MAKKAR et al., 2011). Com uma produção média de 100 bilhões/L por semana, outro tipo de substrato associado à indústria vegetal é o óleo residual de soja obtido nas cozinhas dos restaurantes, é rico em nutrientes com viável potencial de reutilização e produção em escala mundial (SHAH et al., 2007; ZHU et al., 2007; MAKKAR et al., 2011).

Neste contexto, o trabalho proposto visa à produção de biossurfactante por *Cunninghamella echinulata* empregando resíduos agroindustriais, óleo residual de soja pós-fritura e milhocina, com a finalidade de obter um biotensoativo de baixo custo, estável, com propriedade de redução de tensão superficial e/ou de emulsificação. Desta forma, pretende-se com o uso de resíduos na produção biotecnológica a partir de fungo filamentoso, minimizar os custos de produção do biossurfactante, possibilitando a ampliação do processo no futuro.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial biotecnológico do fungo *Cunninghamella echinulata* UCP 1297, isolado de solo da Caatinga do Estado de Pernambuco, na produção de biossurfactante empregando resíduos agroindustriais de baixo custo, como substratos alternativos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar a produção biossurfactante de *C. echinulata* UCP 1297, empregando resíduos industriais e com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2²;
- ✓ Selecionar a melhor condição de produção do biossurfactante por *C. echinulata*;
- ✓ Avaliar o crescimento *C. echinulata* e a produção do biossurfactante nas condições de cultivo estabelecidos pelo planejamento fatorial composto;
- ✓ Avaliar a estabilidade do biossurfactante frente a condições de temperatura, diferentes concentrações de sal e pH;
- ✓ Realizar a caracterização e composição bioquímica do biossurfactante isolado;
- ✓ Validar os resultados obtidos.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Surfactantes

Os surfactantes constituem uma classe de compostos com estrutura molecular anfifílica, devido a uma porção hidrofóbica, apolar hidrocarbonada, e outra hidrofílica, polar iônica, não-iônica ou anfotérica, responsáveis por reduzirem a tensão superficial e interfacial (BANAT, 1995; SARUBBO et al., 1997; APARNA et al., 2011).). A natureza química dessas moléculas promove sua adsorção nas interfaces de camadas imiscíveis, orientando a porção hidrofóbica no meio apolar, e a hidrofílica no meio polar (ROSSI et al., 2006; SOEMO, 2013).

Os surfactantes iônicos se classificam negativamente como aniônicos representados pelos sabões, procedidos da saponificação de triglicerídeos de óleos vegetais e animais, ou positivamente como catiônicos, destacados pelos sais de amônio quaternários e aminas de cadeia longa, apresentando utilidade como agente germicida, porém contendo efeitos danosos ao meio ambiente e expressiva toxicidade a animais aquáticos (SOEMO, 2013). Os não-iônicos se solubilizam em água por meio dos grupamentos funcionais (óxido de propileno e etileno e ésteres de sorbitano) e são relativamente não tóxicos, enquanto que, os anfóteros apresentam ambas as cargas, aniônicas e catiônicas, o qual dependem do pH e, capaz de melhorar a formação de espuma em solução (ROSSI et al., 2006; CAMEOTRA, 2010; SOEMO, 2013). Sua classificação e o percentual de produção mundial são representados na tabela 1.1.

A região hidrofílica, contém heteroátomos de nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo e carbono com diversos grupos funcionais, tais como álcoois, éteres, aminas, fosfatos, na qual são constituídas por mono ou polissacarídeos, peptídeos ou proteínas; enquanto que, normalmente o grupamento hidrofóbico contém ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados (GEORGIU et al., 1992; ROSSMANN, 2008; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Mostrando especialidades de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) que afetam suas propriedades físico-químicas.

Tabela 1. 1 Classificação, exemplos e produção mundial dos surfactantes.

Classificação	Exemplos	Produção Mundial (%)
Aniônicos	Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	~50
Catiônicos	Brometo de cetiltrimetilamônio (CTBA)	~5-6
Não-iônicos	Polissorbato (Tween)	~40
Anfóteros	Betaínas (aminoácidos de cadeia longa)	~1

Fonte: SOEMO, 2013.

Essas características peculiares admitem a formação de microemulsões estáveis, em fluidos com grau de polaridades diferentes, os quais são distribuídos nas interfaces dessas fases fluidas, assim, atribuindo à solubilização dos polímeros complexos; e também a formação de agregados moleculares, como micelas, que propiciam a diminuição da viscosidade de compostos no meio (DESAI; BANAT, 1997; NITSCHKE et al., 2002; RON; ROSENBERG, 2002; LIMA, 2007; FELIX, 2012).

São compostos químicos derivados do petróleo, que apresentam propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização, dispersão de fases, capacidade espumante e molhante; com grande aplicabilidade nos setores alimentícios, farmacêuticos, cosméticos, agrícola, de petróleo, entre outros (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; BARROS et al., 2007).

Devido à origem do petróleo, os surfactantes sintéticos vêm sendo substituídos gradativamente por surfactantes naturais, os biossurfactantes. Esses compostos são subprodutos de origem microbiana (bactérias, fungos e leveduras) com propriedades, igual ou superior aos surfactantes sintéticos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998; NITSCHKE et al., 2002). O aumento de efluentes referente às problemáticas ambientais adicionadas às leis de controle do meio ambiente proporcionou tal substituição (BARROS et al., 2007).

Os compostos ativos em superfícies biossintetizados por microorganismos são capazes de aumentar a área de superfície de substâncias insolúveis em água e a biodisponibilidade em substratos hidrofóbicos de tais substâncias, altera as propriedades de superfície bacteriana, proporcionar

redução quanto à toxicidade dos metais pesados, e promover a atividade antimicrobiana como também a formação de biofilme (SINGH; MAKKAR, 2004; BEZERRA et al., 2012). Os biossurfactantes apresentam diversas propriedades e funções fisiológicas que podem ser mais eficazes do que os seus equivalentes químicos, considerando ainda, tolerância à elevada estabilidade térmica e força iônica, fácil biodegradabilidade e baixa toxicidade (MULLIGAN; GIBBS, 1993; URUM et al., 2004). De tal modo, são facilmente afetados por fatores ambientais, tais como temperatura, pH, força iônica e têm a propriedade única de biocompatibilidade e digestibilidade (SEKHON et al., 2012).

A produção microbiana desse metabólito pode ser excretada no meio, ou então, retida na parede celular; facilitando assim, a emulsificação e solubilização dos compostos insolúveis em água, e também no transporte desses substratos através das membranas (NITSCHKE et al., 2002; FELIX, 2012). Sua atuação quanto aos aspectos da biotecnologia ambiental é capaz de produzir efeitos significativos e eficientes em processos de remoção de poluentes, permitindo assim, um aumento quanto ao fluxo de biodegradação natural.

1.3.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são agentes tensoativos de superfície com aplicabilidade industrial e biotecnológica que apresentam diversidade química estrutural, peso molecular, propriedades físico-químicas, modo de ação e origem microbiana que os caracterizam, como glicolipídeos, lipopeptídeos, poliméricos, particulados, entre outros (NITSCHKE et al., 2002; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Quanto ao peso molecular, essas substâncias se diferem, em os de baixa massa molecular, denominados de biossurfactantes que podem reduzir a tensão superficial e interfacial, de forma eficaz, enquanto que, os de alto peso molecular são mais eficientes na estabilização de emulsão, e assim, chamados de bioemulsificantes (SMYTH et al., 2010; BANAT et al., 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

Os glicolipídeos, fosfolipídeos e os lipopeptídeos representam os biossurfactantes de baixo peso molecular, enquanto que, os de alto peso são

constituídos por polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, misturas complexas desses biopolímeros e lipoproteínas (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). A variedade de células microbianas produtoras de biossurfactantes, podem ser demonstradas na tabela 1.2.

Tabela 1. 2 Principais classes de surfactantes naturais e os micro-organismos produtores.

Tipos de biossurfactantes	Micro-organismos
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Pseudomonas sp.</i>
Sorofolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apicola</i>
Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipoyitica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
células	Várias bactérias

Fonte: MUTHUSAMY et al., 2008.

Diante dos diferentes grupos de biossurfactante faz sentido ocorrer uma variação quanto suas propriedades e funções, onde essas correspondem ao seu tipo de classificação. Entre as variadas classes de biossurfactantes, os lipopeptídeos representam uma das com potencial de aplicação notável em atividades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral, antiviral e antiadesiva (KHIRE; KHAN, 1994; BANAT, 1995; PEYPOUX et al., 1999); outro exemplo dessa mesma classe de biossurfactante é a surfactina, a qual se apresenta como uma molécula biotensoativa versátil com capacidade de inibir a formação de coágulos de fibrina e, também aplicado para a recuperação melhorada de petróleo (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013); esse tipo é produzido pelo *Bacillus subtilis*, comumente localizado no solo. Essas propriedades os tornam moléculas relevantes para aplicações no combate a diversas doenças e como agentes terapêuticos (BHADORIYA et al., 2013). Os glicolipídeos são promissores em atividade anticancerígena, e as substâncias lipopeptídicas encontram-se envolvida na redução da superfície e interfacial tensões dos líquidos, porém não apresentam emulsões estáveis como característica comum (IVSHINA; CHRISTOFI, 2002; BHADORIYA et al., 2013).

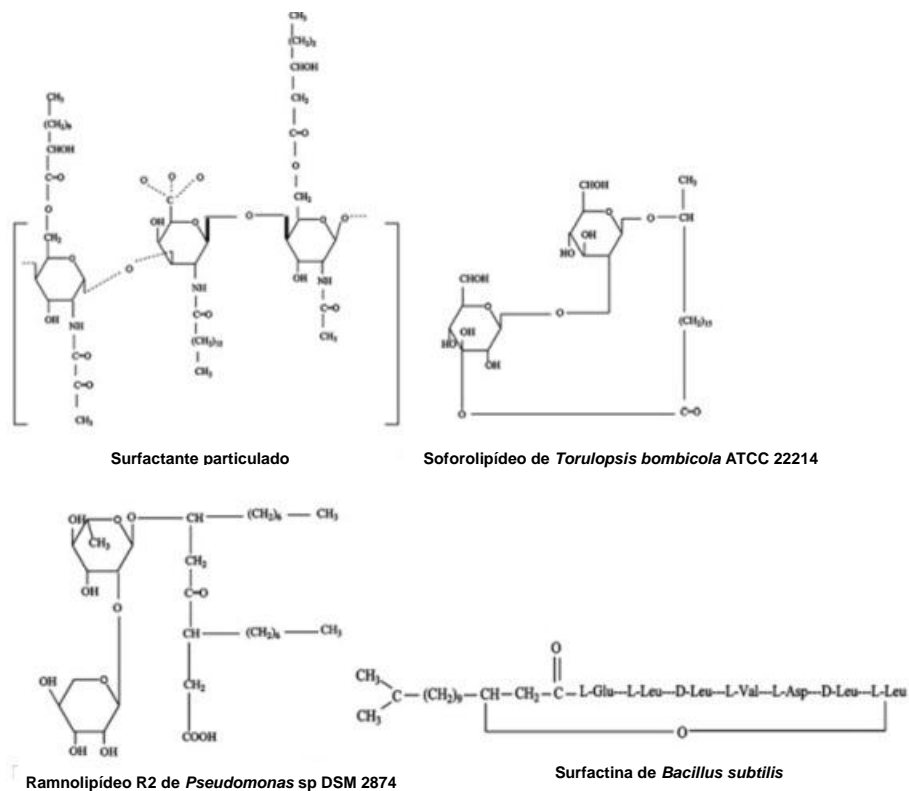
Desta forma, existem alguns exemplos de surfactantes produzidos por micro-organismos como o emulsan por *Acinetobacter*, os soforolipídeos por *Candida bombicola* e os ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa*; cujas estruturas são representadas pela figura 1.1.

Os soforolipídeos são eficientes moduladores de resposta imune (BHADORIYA et al., 2013). Atualmente, a aplicação de surfactantes no ramo farmacêutico e de cosméticos vem adquirindo importância na indústria biomédica já que são utilizados na solubilização e biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis; nesse caso, os fosfolipídeos são empregados no tratamento pulmonar.

A maioria dos biossurfactantes é de natureza aniônica e neutra, com notável predominância bacteriana como micro-organismo produtor, entretanto, a literatura também relata a síntese dessa biomolécula por outros organismos, no caso das leveduras e fungos (NITSCHKE; COSTA, 2007; MULLIGAN, 2009). Outra classe de surfactante com forte potencial em atividade superficial

e emulsificante, denominada de flavolipídeos mostrando fração polar de ácido cítrico.

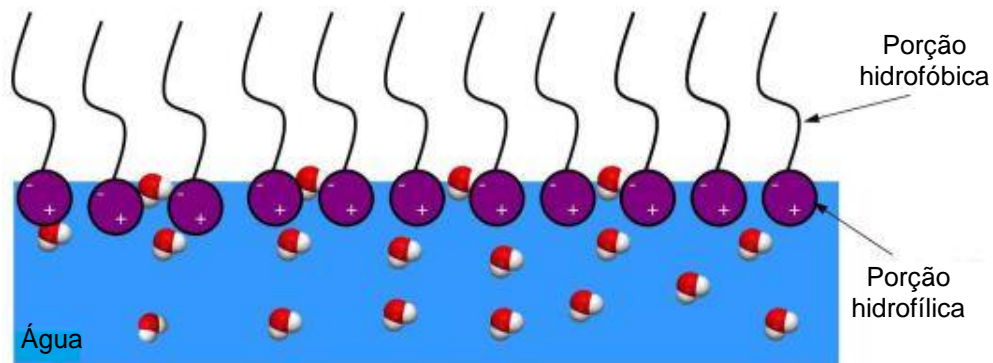
Figura 1. 1 Representação da estrutura molecular comum dos biossurfactantes



Fonte: CAMEOTRA, 2010.

Como os biossurfactantes se acumulam em interface de dois líquidos imiscíveis, ou mesmo entre um líquido e um sólido, ocorre uma redução nas forças de repulsão entre essas duas fases, incidindo uma melhor interação entre as mesmas e, conseqüentemente diminuem a tensão interfacial e superficial. De tal modo, essa mistura e interação é facilmente observada na figura 1.2 (BUENO, 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

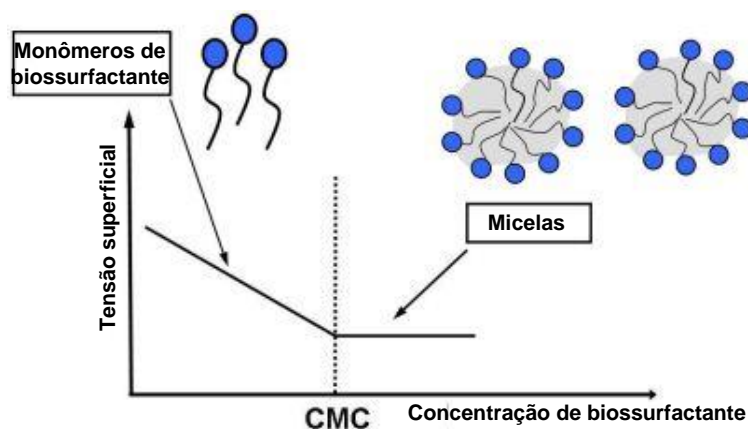
Figura 1. 2. Acumulação dos biossurfactantes nas interfaces de líquidos imiscíveis.



Fonte: SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011.

Quando monômeros de surfactante são adicionados à solução ocorre uma diminuição na tensão interfacial e superficial proporcional ao aumento de sua concentração no meio, até atingir uma determinada concentração, a Concentração Micelar Crítica (CMC), região na qual ocorre redução máxima da tensão e formação de micelas, significando que menos biotenssoativo é necessário para tal diminuição. Assim, quando atingem valores superiores a CMC, não é observada nenhuma redução; os valores abaixo da CMC são representados na forma de monômeros dispersos (IVSHINA; CHRISTOFI, 2002; ROSSI et al., 2006; CORDEIRO SILVA, 2008; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). A relação entre os biossurfactantes, à tensão das superfícies e a formação de micelas é observada na figura 1.3.

Figura 1. 3 Representação esquemática da CMC.



Fonte: WHANG et al., 2008.

Os monômeros se associam de forma espontânea como micelas, vesículas e lamelas; resultado de numerosas interações químicas entre os grupos polares e apolares (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). As micelas são termodinamicamente estáveis e formadas espontaneamente, capazes de aumentam a energia livre do sistema na parte lipofílica; não apresenta papel significativo na formação de microemulsões, que são formadas quando uma fase líquida é dispersa como gota em outra fase líquida. A estrutura hidrofóbica se decompõe em pseudofases através da formação das micelas permitem a solubilização, a qual é influenciada pela redução das forças capilares (IVSHINA; CHRISTOFI, 2002; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

A CMC dependerá da estrutura do surfactante, cuja estrutura agregada é determinada pela polaridade do solvente, no qual o surfactante é dissolvido. Apesar da solubilização em água, os biossurfactantes apresentam valores baixos de CMC quando comparados aos sintéticos, porém o valor da CMC varia com o aumento do pH. Existem parâmetros capazes de determinarem a eficiência e a efetividade de um bom agente tensoativo de superfície, dentre alguns pode se citar o valor mínimo alcançado na tensão superficial e a CMC (BARROS et al., 2007). Como uma característica fundamental e essencial, a eficiência é avaliada pela CMC, a qual pode variar de 1 a 2000mg/L; entretanto, a efetividade é correspondida por valores de tensões interfaciais e superficiais que variam de 31 a 1 mN/m (RON; ROSEMBERG, 2002; CORDEIRO-SILVA, P. A., 2008).

A estabilidade dependerá da natureza dos grupamentos hidrofílicos e lipofílicos, em geral, classificados conforme o equilíbrio hidrofílico-lipofílico, o qual indica se a emulsão do biossurfactante é em água-óleo ou em óleo-água; logo, os emulsificantes com baixo valor (HLB) estabilizam emulsão em água-óleo e são lipofílicos, considerando que os de elevado HLB possuem efeito oposto, com melhor solubilização em água (SABATINI et al., 1995; DESAI; BANAT, 1997; IVSHINA; CHRISTOFI, 2002).

A emulsão é tratada como um sistema heterogêneo de fases contínuas ou dispersas, internas ou externas que contem líquido imiscível disperso em outro

intensamente, sob a forma de gotículas; assim, possui estabilidade mínima que pode ser acentuada pela ação de agentes de superfície ativa. Logo, os biossurfactantes são capazes de estabilizar ou desestabilizar a emulsão (NITSCHKE; COSTA, 2007).

No entanto, o principal fator que limita o uso generalizado de biossurfactantes é o seu custo de produção quando comparado aos sintéticos homólogos (MUKHERJEE et al., 2006; GOMAA, 2013). O custo pode ser reduzido por melhoria de tensão, otimizado por métodos estatísticos a composição do meio ou por meio de substratos de baixo custo alternativos. A escolha de matérias-primas de baixo custo é importante no processo de economia global, já que essas correspondem a 50% do custo final de produção e também diminui os gastos com o tratamento de resíduos (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999). O custo elevado da produção de biossurfactante associado à recuperação e a purificação ainda restringe sua aplicação em técnicas de biorremediação de solos contaminados por petróleo (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998; MOLDES et al., 2011).

No momento, apenas alguns biossurfactantes estão disponíveis comercialmente, esses correspondem aos ramnolipídeos e a surfactina. Os ramnolipídeos são os únicos que foram aprovados pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA em diversos produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos, representados pela empresa Jeneil Biossurfactante Company e Ramnolipídicos, Inc (<http://www.rhamnolipidholdings.com>), proporcionando diferentes finalidades, como biofungicida, papel comprovado pelo FDA, e uma maior afinidade para moléculas orgânicas hidrofóbicas, que conferem ótimas características como portadores de poluentes em sistemas de solo (NITSCHKE; COSTA, 2007; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

Com o aumento gradativo do mercado global de biossurfactantes, a ampla preocupação de produção referente à sua competitividade de custo vem sendo restrita pelos benefícios da tecnologia verde, auxiliada pela engenharia recombinante de cepas produtoras mostrando atividade enzimática da esterase (SEKHON et al., 2012).

Muitos biossurfactantes não são afetados por condições ambientais, sendo assim, alguns micro-organismos psicrófilos produtores de biotensoativos e um lipopeptídeo são capazes de se manterem estáveis após determinadas alterações de pH, NaCl e temperatura. O recente interesse comercial pela produção de surfactantes microbianos extremófilos ultimamente vem ganhando destaque (NITSCHKE; COSTA, 2007).

A maioria dos dados literários correspondente à produção de biossurfactantes confirma baixa toxicidade quando comparados aos homólogos sintéticos, cujo valor de concentração os adequam ao uso, como produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentares (NITSCHKE; COSTA, 2007).

1.3.3 O papel e a importância dos biossurfactantes

Os micro-organismos exercem funções ecológicas vitais no ecossistema, dessa forma é necessário compreender sua fisiologia quanto ao potencial de produção e adequar sua aplicação comercial a partir de novas ferramentas biológicas. Os fungos são capazes de degradar e metabolizar uma grande variedade de substratos, assim, podem utilizar substâncias orgânicas complexas, como o metanol, amônio ou nitrato. Esses organismos apresentam uma enorme capacidade adaptativa e regular, de seu metabolismo, e são importantes como fonte de alimento, no ciclo de nutrientes, na estabilização e aeração do solo.

Os surfactantes microbianos são produzidos por uma gama de variedade de espécies com múltiplas funções e propriedades, além de possuírem estruturas muito diversificadas. Porém não são apenas úteis numa variedade de processos industriais e ambientais, os biossurfactantes também são extremamente importantes para os micro-organismos quanto à adesão, a emulsificação, a biodisponibilidade e dessorção, como também em estratégia de defesa (CAMEOTRA et al., 2010). Alguns de seus papéis são citados na literatura como mecanismo fisiológico para crescimento e sobrevivência celular por meio de interações atrativas com o meio, cujos resultados são comprovados por propriedades de adesão em *Pseudomonas aeruginosa* e

Acinetobacter calcoaceticus regulando a superfície celular, aumentando ou diminuindo, de acordo com a necessidade da estirpe.

A área interfacial e superficial pode ser um fator limitante para o crescimento microbiano em hidrocarboneto, cuja emulsificação é indireta e provocada pela ação de agentes extracelulares, que promove vantagem para o micro-organismo que o produz. Logo, seu potencial biológico é reconhecido na natureza e inspira novas possibilidades de aplicação.

Existem alguns mecanismos que interferem no aumento da biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos orgânicos, esses confirmados pela ação de crescimento dos biossurfactantes, uma vez que sua função biológica está relacionada captação de hidrocarbonetos e como sua liberação espontânea ocorre em diversos substratos, como óleo residual, diesel, entre outros carboidratos do tipo glicose, sacarose e glicerol (CHANDANKERE et al., 2013).

1.3.4 Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes

A produção de biossurfactante depende das fontes de carbono e das estirpes microbianas, e que podem ser produzidos por fermentação submersa, tradicionalmente mais utilizada, mas também por fermentação em estado sólido; no entanto, existem fatores ambientais e nutricionais que podem comprometer a produção desses biotensioativos, dentre esses está relacionado às condições de cultivo dos micro-organismos (DESAI; BANAT, 1997; PINTO, 2008). As pesquisas confirmam uma enorme variedade de fontes de carbono utilizadas para a biossíntese de surfactantes desde n-alcenos até o uso de fontes renováveis; entre alguns meios pode se citar, o hexadecano e alguns óleos (soja, oliva, algodão, milho) por Cirigliano e Carmam (1986); além de alguns substratos hidrofílicos e hidrofóbicos (FONTES et al., 2008). Entretanto, o comprimento da cadeia do n-alceno utilizada como fonte de carbono é um fator que pode alterar essa biossíntese.

A literatura também afirma a necessidade de ferro para aumento da produção de biossurfactante por *Pseudomonas* sp., e reforçar ainda mais poli hidrocarbonetos aromáticos (PAH) e a biodisponibilidade (SANTOS et al.,

2008). Ramnolipídeos são encontrados como sendo úteis na remoção de poli hidrocarbonetos aromáticos (POGGI-VARALDO; RINDERKNECHT-SEIJAS, 2003) e pentaclorofenol (MULLIGAN; EFTEKHARI, 2003) a partir do solo. Assim, biotensioativos apresentam aplicabilidade no setor agrícola, pois é capaz de eliminar patógenos de plantas.

A produção desses metabólitos também é influenciada pelo nitrogênio, importante para a síntese de proteínas e enzimas, conseqüentemente é primordial no crescimento celular, presente nos meios de cultura e no ambiente natural do solo (FONTES et al., 2008; BHARDWAJ et al., 2013). Entre os variados tipos de nitrogênio que influenciam, esses são encontrados na forma de NH^{4+} , NO^{3-} , uréia ou aminoácidos e, sua limitação proporciona efeitos estimulantes para superprodução por micro-organismos. Sendo assim, a aplicação na biorremediação tem relevância, uma vez que ocorre suplementação no sistema por nitratos e fosfatos, e que proporcionam o aumento da atividade microbiana. Logo, o tipo de biossurfactante formado depende das fontes nos quais crescem.

A qualidade e a quantidade do biossurfactante produzido também é comprometido pela presença de alguns elementos como, o fósforo, manganês e o magnésio e determinados fatores bem como, pH, temperatura, agitação e a forma de condução do processo fermentativo (FONTES et al., 2008). As diferentes formas de cultivo podem associar se ao crescimento celular, indução por substratos lipofílicos, otimização da composição dos meios, das condições de pH, adição de reagentes, mas também por crescimento em condições limitantes, de nitrogênio, cátions multivalentes, e “resting cell” (células livres ou imobilizadas).

1.3.5 Aplicação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são utilizados para aumentar a estabilidade da tecnologia de microbolhas que tem mais amplo escopo na formação de imagens moleculares, no diagnóstico de doenças, como também no custo-benefício da purificação de água, e no tratamento de águas residuais (ZHANG et al., 2011b; Xu et al., 2011b). Apresentam importantes atividades biológicas,

incluindo antibióticos, antifúngica, inseticida, antiviral, imunomoduladora e antitumorais, com várias aplicações como, controle biológico de pragas, tratamento de câncer, e cicatrização de feridas (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

Estudos relatam vantagens para a humanidade quanto ao emprego dessas biomoléculas como ferramenta útil em numerosas aplicações biotecnológicas, dentre várias áreas de atuação a agricultura é uma dessas, que enfatiza a importância delas na degradação de poluentes a partir do solo, sendo também utilizado na produção de nanopartículas, um novo campo de atuação que está emergindo da química verde (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

Esses compostos biotensoativos podem substituir rigorosamente os surfactantes presentes nas indústrias de pesticidas, que passam a serem utilizados como fonte de carbono pelos micro-organismos que habitam o solo e, assim, explica a remoção biológica do solo agrícola a partir dessas biomoléculas (SCOTT; JONES, 2000; TAKENAKA et al., 2007; LIMA et al., 2011; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

O setor agrícola é afetado por poluentes orgânicos e inorgânicos que são capazes de proporcionar estresse abiótico as plantas, no entanto, a técnica de biorremediação que enriquece a qualidade desse solo, é consolidada através do uso de micro-organismos produtores de moléculas tensoativas, responsável por aumentar a biodisponibilidade e efetuarem a biodegradação de compostos hidrofóbicos, no caso, dos hidrocarbonetos bem como os metais pesados (SUN et al., 2006), combinada à tecnologia de lavagem do solo (SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Além de promover dessorção de poluentes hidrofóbicos, os biosurfactantes são extraordinários também na degradação de alguns inseticidas químicos que se acumulam no solo. Há relatório sobre as bactérias pertencentes à *Pseudomonas* sp. e *Burkholderia* sp., no campo de arroz para surfactantes degradam (NISHIO et al., 2002).

Como frequente elemento de pesquisa, numerosos levantamentos referentes ao surgimento de novos produtores de biosurfactantes crescem, pelo simples fato da demanda de produção industrial associada tanto à

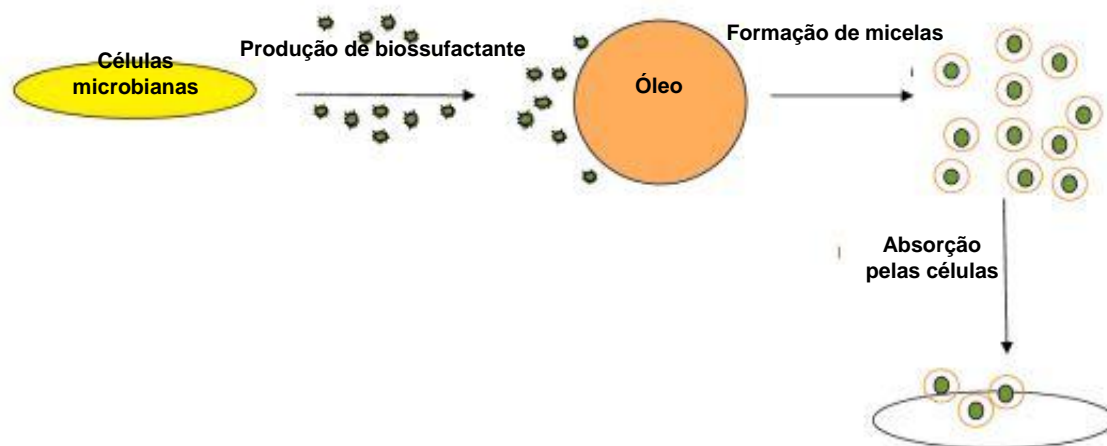
conscientização quanto a sustentabilidade ambiental; cujo papel mais comum destinado ao uso desses agentes biotensoativos é proporcionar melhoras quanto à distribuição de contaminantes na fase aquosa e, assim, aumentar a sua biodisponibilidade (LAWNICZAK et al., 2013).

Alguns fatores podem limitar a biodisponibilidade e, conseqüentemente reduz a eficiência da descontaminação, dentre esses deve se ressaltar a sorção de moléculas no interior da matriz do solo, a formação de fases não aquosas, interação com a matéria orgânica, a biotransformação e o envelhecimento de contaminantes, ou seja, processos comumente naturais (ALLARD; NEILSON, 1997; LAWNICZAK et al., 2013).

Nas últimas décadas tem se constatado inúmeros derramamentos de petróleo e seus derivados, proporcionando uma crescente contaminação dos solos e águas subterrâneas ocorridas por liberações acidentais de combustível em reservatórios, falhas operacionais de descarga, como também no transporte destes produtos químicos (REGINATTO et al., 2011).

Os processos biológicos se mostram como uma ferramenta tecnológica consistente na remoção de contaminantes oleosos, devidamente comprovados por sua alta eficiência e custo, quando comparado a outras alternativas (REGINATTO et al., 2011); porém, a eficiência de todo tratamento biológico é influenciada de forma direta pela biodisponibilidade do poluente (LAWNICZAK et al., 2013). A biorremediação consiste em um desses processos, no qual organismos vivos são utilizados para reduzir poluentes ambientais, ou seja, um tratamento que utiliza a ocorrência natural de micro-organismos para degradar substâncias altamente tóxicas, transformando-as em menos tóxicas ou em não tóxicas (ANDRADE et al., 2010). Ressaltando sua relação custo-eficácia e, sem interferir drasticamente no meio ambiente (REGINATTO et al., 2011). A aplicação de micro-organismos nesses processos é explicada por sua versatilidade nutricional em metabolizar poluentes tóxicos, na obtenção de energia e de biomassa (AFROZ; SHARMA, 2013). O mecanismo de degradação microbiana pode ser representado, conforme a seguinte figura 1.4.

Figura 1. 4 Processo estrutural de solubilização de óleo por biossurfactante e absorção por células microbianas.



Fonte: ABHA; CAMEOTRA

Os micro-organismos crescem em ambiente rico em hidrocarbonetos, ocorrem muitas adaptações, essa tal adequação proporciona a produção de biossurfactante, que influencia a absorção de hidrocarbonetos como substratos (MARIN et al., 1996; JOHNSEN et al., 2005; APARNA et al., 2011). A produção de biotensoativos auxilia na biodegradação dos hidrocarbonetos aumentando a disponibilidade biológica dos micro-organismos nos substratos hidrofóbicos, com conseqüentes mudanças como a redução da tensão de superfície do ambiente ao redor dos micro-organismos, mas também a redução da tensão interfacial entre moléculas da parede celular e dos hidrocarbonetos; essas modificações na membrana aumentam a hidrofobicidade da parede celular e reduz o teor de lipopolissacarídeos da parede sem danificar, e assim, melhora a dispersão do hidrocarboneto por encapsulação do hidrocarboneto em micelas. (APARNA et al., 2011; SOUZA et al., 2014). Muitos hidrocarbonetos utilizados pelas bactérias e fungos possuem atividade emulsionante, devido à célula inteira ou à superfície extracelular ativa dos compostos (APARNA et al., 2011).

Outras aplicações incluem a dispersão no derramamento de óleos, a remoção e mobilização de resíduos oleosos de tanques de armazenamento e a recuperação melhorada de petróleo. No caso, os biossurfactantes adicionados a este tipo de sistema podem promover o crescimento de bactérias em hidrocarbonetos aumentando a área de superfície entre o óleo e a água. Logo, interessantes estudos têm sido relatados nos últimos 2 anos referentes a mobilização de metais pesados, como arsênio sob condições alcalinas, cádmio, chumbo, zinco, entre outros (BANAT et al., 2010). Como também estudos citam a capacidade de crescimento do fungo *Cladosporium resinae*, isolado de tanques combustíveis, ao utilizar misturas de alcanos, produzindo ácidos graxos e fosfolipídios extracelulares, principalmente o ácido dodecanóico e a fosfatidilcolina, aumentando a taxa de degradação do alcano em aproximadamente 30% (MORAIS; ABUD, 2012).

Muitos micro-organismos têm capacidade de produzir uma ampla gama de biossurfactantes, cujos estudos recentes são empregados na remediação de metais pesados produzido por *Candida lipolytica* (RUFINO et al., 2011; Luna et al., 2011). A atividade antimicrobiana de vários biossurfactantes tem sido relatada na literatura para muitas diferentes aplicações (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004). Essa característica pode evitar a competição entre demais micro-organismos. Alguns biossurfactantes são conhecidos por ter aplicações terapêuticas como antibióticos e compostos antivirais.

O potencial de aplicação desses bioprodutos se baseia em suas propriedades, logo apresentam certas enzimas que facilitam a sua ação na redução das tensões superficiais dos líquidos ou até mesmo proporcionando melhoras quanto à solubilidade em água dos substratos imiscíveis. Dentre as enzimas, a esterase, uma das quais é encontrada no meio de cultura, quando a produção encontra-se elevada (SEKHON et al., 2012). O processo de biodegradação dos hidrocarbonetos é complexo, o qual depende da natureza e da quantidade dos mesmos, presentes no meio (COELHO et al., 2011). Com base no aumento expressivo da degradação enzimática dos hidrocarbonetos, assim, tornando possível em aplicações ambientais (CASTIGLIONI et al., 2009).

Como moléculas anfifílicas, os biotensoativos facilitam a degradação desses compostos hidrofóbicos através da interação específica que resultam na solubilização e micelização; proporcionam aumento na mobilização de poluentes e potencialmente suscetível na biodegradação. Heteroátomos são comumente presentes em suas estruturas, existem vários grupos químicos ativos (tais como hidroxila, carbonila, ou de amina), os quais participam no processo de formação de complexos com íons metálicos pesados. Este processo permite a remoção desses metais podem aumentar a sua eficiência em métodos biológicos de extração utilizando (OCHOA-LOZA et al., 2001; ASCI et al., 2008)

Apresentam forte atividade biológica, especialmente em nível de membrana celular; essas modificações podem resultar numa maior hidrofobia, o que é considerado como sendo relevante em termos eficiência de biodegradação ou alterar a permeabilidade das membranas celulares, o que seria potencialmente benéfico durante bioextração (JOHNSEN; KARLSON, 2004). Porém tenha sido estabelecido que as alterações nas propriedades celulares podem não estar necessariamente relacionado com a capacidade de utilizar certas fontes de carbono (CHAKRABORTY et al., 2010), e, por conseguinte não podem ser facilmente correlacionados com eficiência biorremediação.

Contudo, qualquer modificação ocorrida na estrutura superficial celular bacteriana proporciona aumento na acessibilidade dos hidrocarbonetos para a célula microbiana; comprovados por ramnolipídeos, em pequenas concentrações, causam alterações químicas e estruturais na membrana externa através das proteínas e da liberação de lipopolissacarídeos, na presença de hexadecano (Al-TAHHAN et al., 2000; SOTIROVA et al., 2009; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011)

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana, como: *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.*, e leveduras (FONTES et al., 2008). No entanto, existem diversos estudos referentes à produção dessas biomoléculas quanto à utilização de fungos com potencial enzimático, como *Aspergillus fumigatus*,

Phialemonium sp. (CASTIGLIONI et al., 2009), *Aspergillus* ssp. e do gênero *Trichoderma* sp (COLLA et al., 2012). Na literatura dentro do grupo dos fungos degradadores de xenobióticos, destacam-se os lignolíticos que utilizam o citocromo P-450 monoxigenase e enzimas extracelulares lignolíticas (MACIEL et al., 2010).

A versatilidade e diversidade das propriedades dos biotensoativos são úteis na aplicação terapêutica pela inibição de células cancerígenas, apresentando capacidade em promover a lise nas células da membrana por via de apoptose, como promissores veículos de entrega de drogas os lipopeptídeos e os glicolipídeos, destacando um novo ramo de aplicações (GUDIÑA et al., 2013). Além do desenvolvimento na área da nanotecnologia, os biossurfactantes são promissores.

1.3.6 Resíduos agroindustriais

Como estratégia para viabilizar a produção de metabólitos microbianos são utilizados substratos alternativos que apresentem uma composição nutricional adequada na bioconversão de produtos úteis, conforme a necessidade de aplicação pretendida pelas várias indústrias (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MORAIS; ABUD, 2011).

O uso de resíduos minimiza os custos relacionados à produção como também permite a valorização econômica de sua co-utilização, e conseqüentemente o tratamento e os impactos ao meio ambiente, assim, o sucesso para uma produção econômica ocorre pelo equilíbrio do desperdício permitindo o acúmulo do produto. Além de considerar o potencial enzimático de vários micro-organismos de sintetizar biomoléculas em diversos substratos imiscíveis em água, como os recursos renováveis de óleos vegetais e resíduos de destilarias e laticínios, entre outros (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Os resíduos de óleo vegetal obtidos de indústria alimentar têm sido utilizados como substratos apropriados por apresentarem potencial para o crescimento microbiano e a produção de metabólitos (SAHARAN et al., 2011). O óleo de fritura é produzido em larga escala e após seu uso, sua composição é alterada em 30% de seus componentes polares, que depende da variedade

do produto alimentar, do tipo de fritura e a quantidade de vezes que foi utilizado (KOCK et al., 1996; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Estudos realizados por HABA et al., (2000) detectaram a presença de 22,52% de ácido graxo de baixo comprimento de cadeia, além de ácido mirístico e láurico em relação ao óleo padrão e comprovou que cepas de *Pseudomonas* (produtora de biossurfactante do tipo ramnolipídeo) apresentaram aceitáveis resultados de crescimento, redução de tensão em óleo usado comparado com o óleo padrão, no entanto, a produção e o crescimento por *Bacillus* (produtor de biossurfactante do tipo lipopeptídeo) não correspondeu de forma satisfatória. O surfactante produzido por *Pseudomonas* em meio contendo sais minerais e glicose também apresentou resultado eficaz de atividade emulsificante com a adição de óleo diesel estéril (BENTO; GAYLARDE, 1996); e similarmente estudo de Muriel et al., (1996) observou o crescimento extracelular de biossurfactante produzido por *Cladosporium resinae* em meio contendo combustível de aviação. Deste modo, pesquisas relacionadas à produção de biossurfactante através de diversos óleos como substratos é uma estratégia de gestão de resíduo, para a indústria de alimento e de automóvel (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Além dos ramnolipídeos, estudos relacionados à produção de biossurfactante a partir da reutilização de óleo de fritura também revelaram o potencial de viabilidade dos soforolipídeos e dos glicolipídeos, em ambos os casos eles demonstraram rendimentos elevados e com capacidade de emulsificação e aplicação promissora em locais contaminados com hidrocarbonetos e na recuperação melhorada por petróleo (MAKKAR et al., 2011).

Na última década as utilizações desses tipos de resíduos combinando a outro substrato solúvel atuaram bem por espécies de *Candida*, embora que, para cada tipo de substrato o crescimento celular vai depender do comportamento do micro-organismo, mesmo que apresente resultado relevante à redução de tensão (RUFINO et al, 2013).

A milhocina é subproduto obtido a partir do beneficiamento do milho que serve como fonte de nitrogênio, porém também apresenta variada composição de aminoácidos entre outros nutrientes, a qual depende da condição e da qualidade do grão de milho utilizado no processamento (AMARTEY & LEUNG,

2000; DOMINGOS, 2009). Estudos realizados quanto as características físico-química da milhocina correspondem a valores que variam de pH (3,5 a 4,1), concentrações de nitrogênio (acima de 3,8 a 40,1%), teores de açúcares e ácido lático de 5% e entre 5 e 15%, respectivamente, além da presença de matéria orgânica (LIGGET & KOFFLLER, 1998).

Diversos trabalhos utilizam a milhocina e o óleo residual vegetal, apresentado resultados satisfatórios na produção de biomoléculas (PAIVA, 2004; COSTA et al., 2007; FONTES et al., 2008; ANTUNES et al., 2013). A diversidade de resíduos agroindustriais com potencial ambiental e econômico na produção de biomoléculas é crescente, desde meios de processamento de batata, o soro de leite, o melaço subproduto da indústria açucareira, como também resíduo de destilaria, o caju, manipueira entre outros (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; DUBEY; JUWARKAR, 2001; RODRIGUES et al., 2006; ROCHA et al., 2007).

1.3.7 Micro-organismo

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos por não possuírem pigmentos fotossintéticos, capazes de absorver energia luminosa e utilizá-la para síntese de compostos orgânicos, e capazes de aproveitarem a energia contida nas ligações químicas de vários nutrientes por absorção; possuem parede celular constituída por quitina e β -glucano; cujo material de reserva energética é encontrado na forma de glicogênio ou lipídeos (SIDRIM et al., 2004; KIRK et al., 2008).

Eles exibem características próprias que os diferenciam dos demais seres, possuindo estruturas somáticas representadas por hifas, sendo seu conjunto constituído de micélio. Podem ser unicelulares e/ou multicelulares, microscópicos e/ou macroscópicos; com reprodução assexuada e/ou sexuada, resultando na formação de esporos.

A Ordem Mucorales integrante da Divisão Zygomycota inclui micro-organismos com grande potencial econômico-biotecnológico, e esses apresentam capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, em resposta às variações de suas atividades fisiológicas, bioquímicas, genéticas,

exibindo elementos fundamentais para a compreensão de seu comportamento celular (GRIFFIN, 1984; CARLILE; WATKINSON, 1996). Os Mucorales, atualmente classificados como Mucoromycotina, são sapróbios ou parasitas fracos amplamente distribuídos pelos diversos ambientes e admitem várias espécies cosmopolitas, das quais registradas 90 espécies no Brasil (HESSELTINE; ELLIS, 1973; ALEXOPOULOS et al., 1996; HIBBERT et al., 2007; SANTIAGO et al., 2012).

Esses micro-organismos são resistentes a condições de estresse e podem ser facilmente isolados de solos, águas, estercos, plantas, até em outros fungos; mas também reconhecidos como agentes causadores de infecções sistêmicas, principalmente em pessoas imunocomprometidas (RIBES et al., 2000; BENNY, 2009; SANTIAGO, et al., 2013)

Com exceção dos micro-organismos patógenos, os fungos filamentosos benéficos são fascinantes devido ao seu modo de crescimento apical e a capacidade enzimática e metabólica, estes podem exibir potencial industrial, desenvolvendo diversificadas aplicabilidades, como a produção extracelular de enzimas (amilase, lipase, inulinase, pectinase, renina e protease), produção de bioemulsificantes, pigmentos, entre outros bioprodutos (ALVES et al., 2000; SANTIAGO; SOUZA-MOTA, 2006; SANTIAGO et al., 2013). A literatura relata *Chonephora*, *Mycotipha*, *Cunningamella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum* e *Radiomyces*, como exemplares de gêneros de grande interesse econômico, pois esses fungos são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos relevantes como ácidos (lático, oxálico, cítrico, linolênico, araquidônico), enzimas e etanol; além do mais o papel dos Mucorales na biorremediação, como controle biológico (YIN et al., 1998; ZHOU et al., 1999; MAGNUSON; LASURE, 2004; WEKESA et al., 2007; ZAFAR et al., 2007; SANTIAGO et al., 2013).

O Brasil expõe breves mudanças ambientais que justificam a precariedade de conhecimento acerca da diversidade de Mucorales, ganhando destaque apenas 13 espécies encontradas nas regiões semi-áridas (SANTIAGO et al., 2013). Esse grupo de fungos são importantes indicadores

de mudanças no ambiente, além de compor a microbiota, também influenciam ecologicamente na manutenção do ecossistema.

1.3.7.1 O gênero *Cunninghamella* e aplicações

O gênero *Cunninghamella* exibe como características morfológicas, colônias com crescimento rápido, coloração variando entre branca a cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação, formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangiólos. São descritas mais de 12 espécies (DOMSCH et al., 1980; FREITAS SILVA et al., 2007).

A *Cunninghamella* sp., considerada um fungo filamentosos de importância na micologia médica e em processos biotecnológicos, pois exibe uma capacidade de metabolizar uma ampla diversidade de xenobióticos (compostos aromáticos, drogas farmacológicas, ácido γ -linoleico), semelhantes ao sistema de enzimas de mamíferos, esses micro-organismos são encontrados em solos e plantas de zonas mediterrâneas e subtropicais (SIH; CHEN, 1984; DAVIS, 1988; ANDRADE et al., 2000).

As espécies mais comuns são a *Cunninghamella bertholletiae*, *elegans* e *echinulata*. A *Cunninghamella bertholletiae* e *elegans* apresentam estruturas reprodutivas semelhantes, tornando difícil sua identificação e possui ação patogênica nos animais e no ser humano (SUN et al., 2004). Segundo estudos comprovados por WHANG et al (2000), apresenta em sua parede celular altos rendimentos de quitina e quitosana equivalentes aos encontrados nos moluscos e crustáceos, assim, de grande aplicabilidade em processos de biodegradação, biorremediação, biotransformação e biossorção de metais.

A *Cunninghamella echinulata* é um bom produtor de ácido γ -linoleico e lipídeos, uma das mais estudadas, sendo cultivada em glicose, casca de laranja e resíduo de tomate, entre os meios (GEMMA et al., 2002; VICENTE et al., 2010; ROSSI et al., 2011).

1.3.7.2 Caatinga

A Região Nordeste tem seu território constituído por clima semi-árido, comportando sua biota a condições extremas e com vegetação denominada por Caatinga. O solo é um reservatório rico em populações de micro-organismos e, dentre estes, encontram-se os fungos, seres decompositores e produtores de metabólitos incluindo enzimas de uso biotecnológico tais como amilase, celulase e protease (PAUL; CLARK, 1989; SILVA; LINS, 2008). Neste habitat, os fungos são encontrados em comunidades variando de 104 a 106 organismos por grama de solo (ALEXOPOULOS et al., 1996), sua presença está relacionada a vários fatores, tais como umidade, aeração, pH, riqueza de substratos, entre outros.

Os fungos nessa região ainda são pouco conhecidos e ganham destaque pelo potencial que representam, justificando estudos em busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e ambiental (MAIA; GIBERTONI, 2002). Os micro-organismos nos diversos ambientes são ubíquos, e podem ser encontrados em regiões úmidas ou desérticas, em águas doces ou salgadas, desde o solo superficial ao de qualquer profundidade, no ar, em ambientes domésticos ou industriais, em altas ou baixas temperaturas, em ambientes poluídos ou não, e apresentam uma imensa diversidade genética, desempenhando funções únicas e importantes no funcionamento dos ecossistemas (MARÇAL, 2005).

1.4 Referências Bibliográficas

AFROZ, A.; SHARMA, V. Environmental Biotechnology – A Review. **Researcher**, v. 5, c. 4, p. 71-93, 2013.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory Mycology. John Wiley and Sons, **New York**-4th ed. 1996.

AI-TAHHAN, R.; SANDRIN, T.R.; BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, p. 3262–3268, 2000.

ALLARD, A-S.; NEILSON, A.H. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. **Int. Biodeter. Biodegr.**, 39:253–285, 1997.

ANTUNES, A.A.; ARAÚJO, H.W.C.; ALVES DA SILVA, CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.80, n.3, p. 334-341, 2013.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e seus Derivados. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; HEDGE, S. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sps. on biodegradation of crude oil. In: **2nd International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering**, v. 6IACSITPress, Singapore, 71-75, 2011.

APARNA, A.; SRINIKETHANA, G.; SMITH, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 95, 23– 29, 2012.

ASCI, Y.; NURBAS, M.; ACIKEL, Y.S. Removal of zinc ions from a soil component Na-feldspar by a rhamnolipid biosurfactant. **Desalination**, 233:361–5, 2008.

BANAT, I.M. Characterization of biosurfactant and their use in pollution removal state of the art (Review). **Acta Biotechnology**, n. 15, p. 251-267, 1995.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 495-508, 2000.

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

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. de; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicações em Alimentos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BENTO, F.M.; GAYLARDE, C.C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from diesel. **Int. Biodeterior Biodegrad.**, v. 38, p.31–33, 1996.

BEZERRA, M. S.; HOLANDA, V. C. D.; AMORIM, J. A.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. PRODUÇÃO DE BIOTENSOATIVO UTILIZANDO *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) E RESÍDUO AGROINDUSTRIAL (MANIPUEIRA) COMO SUBSTRATO. **HOLOS**. n. 28, v.1, 2012.

BHARDWAJ, G; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. BIOSURFACTANTS FROM FUNGI: A REVIEW. **Journal Petroleum Environmental Biotechnology**, v. 4, 2013.

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

CAMEOTRA, S. S.; MAKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr. Opin. Microbial.**, v.7, p.262-266, 2004.

CARLILE, M. J. e WATKINSON, S. C. The Fungi. **Tokyo, Academicpress**. 1996.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de Biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* Utilizando Resíduos Agroindustriais como Substrato. **Química Nova**. v. 32, n. 2, p. 292-295, 2009.

CHAKRABORTY, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading *Burkholderia* strains and their interactions with NAPLs and surfaces. **Colloids Surf. B. Biointerfaces** 78:101–108, 2010.

CHANDANKERE, R.; YAO, J.; CHOI, M.M.F.; MASAKORALA, K.; CHAN, Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTB a isolated from petroleum reservoir. **Biochemical Engineering Journal** 74 46– 53, 2013.

COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M.; GIL, A. S. L. BIOSSORÇÃO DE CÁDMIO E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS FILAMENTOSOS EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA. **Revista CIATEC**, v. 4, n.1, p.1-10, 2012.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2007.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil sample. **Applied Microbial Biotechnology**, v.69, p.192-199, 2006.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Mol Biol Rev**. v.61 p.47-56,1997.

DOMSCH K. H, GAMS, W, ANDERSON, T-H. Compendium of soil fungi. **Academic, London**, 1980.

EPA - Environmental Protection Agency of United States. Water Quality Assessment and Total Maximum Daily Loads Information. Office of Water, U.S., Washington, DC, 2008.

FELIX, A.K.N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química, Fortaleza, 2012.

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

FREITAS SILVA, M. C. et al. Effect of enviromental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. **Asian Chitin Journal**, 2007.

GEMMA, H.; KAVADIA, A; DIMOU, D.; TSAGOU, M.; AGGELIS, G. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 2002.

GEORGIU, G.; LIN, S.; SHARMA, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. **Bio/Technology**, v.10, p. 60-65, 1992.

GOMAA, E. Z. Antimicrobial Activity of a Biosurfactant Produced by

Bacillus licheniformis Strain M104 Grown on Whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 2, p. 259-268, March-April, 2013.

GRIFFIN, D. H. Fungal Physiology. **John Willey & Sons Incorporation Publishers**, p.458, 1994.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p.379–387, 200.

HESELITINE, C. W. & ANDERSON, R. F. Microbiological production of carotenoides. I. Zygospor and carotene produced by intraspecific and interspecific clones of Choanephoraceae in liquid media. **Mycologia**, v. 49, p. 449-452, 1957.

HIBBETT, et al. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. **Mycol. Res.**, 3:509-547, 2007.

IVSHIVA, I. B.; CHRISTOFI, N. A REVIEW: Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915–929, 2002.

JOHNSEN, A.R.; KARLSON, U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 63:452–459, 2004.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH degradation in soil. **Environ. Pollut.**, 133:71–84, 2005.

KIRAN, et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 73: p. 250- 256, 2009.

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

KOCK, J.L.F.; BOTHA, A.; BLERH, J.; Nigam, S. Used cooking oil: science tackles a potential health hazard. **S. Afr. J. Sci.**, v. 50, p.513–514, 1996.

LI, Q.; KANG, C.; WANG, H.; LIU, C.; ZHANG, C. Application of microbial enhanced oil recovery technique to Daqing Oilfield. **Biochemical Engineering Journal**, v.11, p.197-199, 2002.

LIN, C.W.; CHEN, L.H.; YET-POLE, I.; LAI, C.Y. Microbial communities and biodegradation in lab-scale BTEX-contaminated groundwater remediation using an oxygen-releasing reactive barrier. **Bioproc. Biosyst. Eng.** 33, 383 e 391, 2010.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; ALBUQUERQUE, C.D.C.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.G. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP 0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. **International Journal of Molecular Sciences**, 12, 2463-2476, 2011.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.C. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **J Surf Deterg.** v. 2, p.237–241, 1999.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.C. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 58, p.428–434, 2002.

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

MARIN, M.; PEDREGOSA, A.; RIOS, S.; LABORDA, F. Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. **Int. Biodeterior. Biodegradation** 38:67–75, 1996.

MARTI, et al. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2013.

MOLDES, et al. Ex situ treatment of hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants from *Lactobacillus pentosus*. **J. Agric. Food Chem.**, 59, 9443–9447, 2011.

MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **SCIENTIA PLENA**, v. 8, n. 10, 2012.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n.11, 2006.

MULLIGAN, C. N; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: Kosaric, N. (Ed.), *Biosurfactants, Production, Properties, Applications*. **Marcel Dekker, New York**, p. 329 - 371. 1993.

MULLIGAN, C.N.; EFTEKHARI, F. Remediation with surfactant foam of PCP contaminated soil. **Eng. Geol.**,70:269–79, 2003.

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 14, 372–378, 2009.

MURIEL, J.M.; BRUQU, J.M.; OLFAS, J.M.; JIMENEZ-SANCHEZ, A. Production of biosurfactant by *Cladosporium resinae*. **Biotechnol. Lett.** v.18, p. 235–240, 1996.

NISHIO, E.; ICHIKI, Y.; TAMURA, H.; MORITA, S.; WATANABE, K.; YOSHIKAWA, H. Isolation of bacterial strains that produce the endocrine disruptor, octylphenol diethoxylates, in paddy fields. **Biosci Biotechnol Biochem** 66:1792–1798, 2002.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772 – 776, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Review: Biosurfactants in Food Industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 252 – 259, 2007.

OCHOA-LOZA, F.J.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. **J. Environ. Qual.** 30:479–485, 2001.

OLIVEIRA, F.J.S.; VAZQUEZ, L.; DE CAMPOS, N.P.; DE FRANÇA, F.P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process. Biochem.** 44:383–389, 2009.

PACWA-PLOCINICZAK, M; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Review Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 12, p. 633-654, 2011.

PATIL, S.N. *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1, A Potent Biosurfactant Producer: Exploring Enhanced Oil Recovery Under Laboratory Conditions. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 4, Issue 11, 2013.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.

POGGI-VARALDO, H.M.; RINDERKNECHT-SEIJAS, N. A differential availability enhancement factor for the evaluation of pollutant availability in soil treatments. **Acta Biotechnol.**, 23, 271–280, 2003.

REGINATTO, C.; COLLA, L. M.; THOMÉ, A. Biorremediação de Resíduos Oleosos em Solos. **Revista CIATEC/UPF**, v. 3, p. 19-31, 2011.

RIBES, J.A.; VANOVER-SAMS, C.L.; BAKER, D.J. Zygomycetes in human disease. **Clin. Microbiol. Rev.** 13:236-301, 2000.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSSI et al. TENSOATIVOS: UMA ABORDAGEM BÁSICA E PERSPECTIVAS PARA APLICABILIDADE INDUSTRIAL. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR, v. 25, n.1-2, p. 73-85, 2006.

ROSSI, M., AMARETTI, A., RAIMOND, S., LEONARD, A. Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi, Biodiesel - Feedstocks and Processing Technologies. Ed. Dr. Margarita Stoytcheva., 2011.

RUFINO, R.D.; RODRIGUES, G.I.B.; CAMPOS-TAKAKI G.M.; SARUBBO, L.A.; FERREIRA, S.R.M. Application of a Yeast Biosurfactant in the Removal of Heavy Metals and Hydrophobic Contaminant in a Soil Used as Slurry Barrier. **Applied and Environmental Soil Science**, p.1 – 7, 2011.

RUFINO, R.D; LUNA, J.M.; CAMPOS-TAKAKI, G.M; SARUBBO, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, 2013.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Mini-Review: Biosurfactants in Agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.97, p.1005–1016, 2013.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v.29, 2011: GEBJ, accepted version, Nov 7, 2011.

SANTIAGO, A.L.C.M.A.; Souza-Motta, C.M. Mucorales isolados do solo de mineração de cobre e produção de amilase e inulinase. **Acta Bot. Bras.** 20:641-647, 2006.

SANTIAGO, A.L.C.M.A. Mucorales. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB120276>. (2012)

SANTIAGO, A.L.C.M.A.; SANTOS, P.J.P.; MAIA, L.C. Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 44, 1, p. 299-305, 2013.

SANTOS, E.C.; JACQUES, R.J.; BENTO, F.M.; PERALBA, M.do C.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.; CAMARGO, F.A. Anthracene biodegradation and

surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. **Bioresour. Technol.**, 99, 2644–2649, 2008.

SCOTT, M.J.; JONES, M.N. The biodegradation of surfactants in the environment. **Biochim Biophys Acta** 1508:235–251, 2000.

SHAH, V.; JURJEVIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnol. Prog.**, v. 23, p.512–515, 2007.

SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. **J. Petroleum Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 7, 2012.

SIDRIM JJC, Rocha MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. 1ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2004.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 142-146, 2004.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: A General Overview. In: Soberón-Chávez G (ed) Biosurfactants. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 1–11, 2011.

SOEMO, A.R. Microenvironment of Monorhamnolipid Biosurfactant Aggregates and Monorhamnolipid Effects on Aqueous Dispersion Properties of Metal Oxide Nanoparticles. The University of Arizona. Dissertation (DOCTOR OF PHILOSOPHY WITH A MAJOR IN CHEMISTRY). DEPARTMENT OF CHEMISTRY & BIOCHEMISTRY, p.525, 2013.

SOTIROVA, A.; SPASOVA, D.; VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiol. Res.** v. 164, p. 297–303, 2009.

SOUZA, E.S.; VESSONI-PENNA, T.C.; OLIVEIRA, R.P.S. Review Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.89, p.88-94, 2014.

SUN, L.; HUANG, H.H.; LIU, L.; ZHONG, D.F. Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.2722–7, 2004.

TAKENAKA, S.; TONOKI, T.; TAIRA, K.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7–6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways. **Appl. Environ. Micro.** 73:1797–1802, 2007.

URUM, K.; PEKDEMIR, T.; COPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, p. 456-464, 2004.

VICENTE, G.; BAUTISTA, L. F.; RODRIGUEZ, R.; GUTIERREZ, F. J.; S_ADABA, I.; RUIZ-VAZQUEZ, R. M.; TORRES-MARTINEZ, S.; GARRE, V. Direct Transformation of Fungal Biomass from Submerged Cultures into **Biodiesel. Biochem.**, 2010.

WEKESA, V.W.; MORAES, G.J.; KNAPP, M.; DELALIBERA, I.J. Interactions of two natural enemies of *Tetranychus evansi*, the fungal pathogen *Neozygites floridana* (Zygomycetes, Entomophthorales) and the predatory mite, *Phytoseiulus longipes* (Acari, Phytoseiidae). **Biol. Control.** 41:408-414, 2007.

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

WANG, X.; LI, D.; HENDRY, P.; VOLK, H.; RASHID, A.; LIU, K.; AHMED, M.; GONG, S.; DAUD, W. A. B. W.; SUTHERLAND, T. D. Effect of Nutrient Addition on an Oil Reservoir Microbial Population: Implications for Enhanced Oil Recovery. **J. Pet. Environ. Biotechnol.**, v. 3, p. 1-10, 2012.

XU, Q.; NAKAJIMA M.; LIU Z.; SHIINA, T. Biosurfactant from microbubble preparation and application. **International J. of Molecul. Sci.**, 12, 462–475, 2011.

YAKUBU, M. B. Review: Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2735-2739, 2007.

YIN, P.M.; YAHIRO, K.; ISHIGAKI, T.; PARK, Y.; OKABE, M. L (+)-Lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. **J. Ferm. Bioeng.** 85:96-100, 1998.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Biores. Technol.** 98:2557-2561, 2007.

ZHANG, F.; GU, W.; XU, P.; TANG, S.; XIE, K.; HUANG, X.; HUANG, Q. Effects of alkyl polyglycoside (APG) on composting of agricultural wastes. **Waste Manag.**, 31,1333–1338, 2011.

ZHOU, Y.; DOMINGUEZ, J.M.; CAO, N.J.; DU, J.X.; TSAO, G.T. Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 77:401-407, 1999.

ZHU, Y.; GAN, J-j.; ZHANG, G-l.; YAO, B.; ZHU, W-j.; MENG, Q. Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. **Journal of Zhejiang University - Science A** 8:1514–1520, 2007.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Biossurfactante-Bioemulsificante Produzido por *Cunninghamella echinulata* um Promissor isolado do solo da Caatinga no Nordeste do Brasil

**Nadielly R. Andrade Silva^{1,4}, Marcos A. Luna^{1,4}, André L.C.M.A. Santiago²,
Luciana O. Franco³; Grayce K. B. Silva⁴, Patrícia M. de Souza⁴, Clarissa D. C.
Albuquerque⁴, Carlos A. Alves da Silva⁴ and Galba M. Campos-Takaki⁴**

¹ Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900 Recife-PE, Brasil, E-Mail: nadi.elly@hotmail.com (N.R.A.S.);

² Unidade Acadêmica de Serra Talhada-UAST, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, e-mails: andrelocabral@msn.com (A.L.C.M.A.S.);

³ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, e-mails: lucianafranco@terra.com.br (L.O.F.);

⁴ Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590 Recife-PE, Brasil, e-mails: grayce_kelli@yahoo.com.br (G.K.B.S.); tyttams@hotmail.com (P.M.S.); albqqs@yahoo.com.br (C.D.C.A.) calves@unicap.br (C.A.A.S.); galba_takaki@yahoo.com.br (M.G.C.T.).

† Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho.

* Autor para correspondência: G.M.Campos-Takaki. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br; Tel.: +55 81 21194017 - Fax: +55 81 21194043

Recebido: / Aceito: / publicada:

Resumo

O fungo Mucorales foi isolado de solo Caatinga de Pernambuco, Nordeste do Brasil, e foi identificado como *Cunninghamella echinulata* por testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Esta linhagem foi avaliada para produção de biossurfactante/bioemulsificante utilizando óleo residual de soja (ORS) e milhocina (M) como substratos, sendo acrescentada uma solução salina como base e produção do biossurfactante/bioemulsificante foi determinada pela medição da tensão superficial e índice e atividade emulsificante. Os melhores resultados mostraram uma redução da tensão superficial da água de 72 para 36mN/m, e índice de emulsificação (E_{24}) de 80%, utilizando óleo de motor e óleo queimado de motor, respectivamente. A nova molécula de biotensioativo mostrou carga aniônica e composição química polimérica constituída por lípideos (40,0%), carboidratos (35,2%) e proteína (20,3%). Além disso, a solução a 1% do biotensioativo demonstrou uma área de dispersão do óleo (ODA) de (37,36cm²), bastante semelhante ao Triton X-100 (38,46 cm²). A estabilidade da redução da tensão superficial da água, bem como o índice de emulsificação mostrou ser estável em ampla faixa de temperatura, pH e concentração de sal (4-6%). O biotensioativo demonstrou capacidade para reduzir e aumentar a viscosidade de substratos hidrofóbicos, sugerindo que essa molécula pode ser uma candidata adequada para a recuperação melhorada de petróleo. Ao mesmo tempo, estes estudos indicam que os recursos renováveis, relativamente baratos e facilmente disponíveis podem ser utilizados para importantes processos biotecnológicos.

Palavras-chave: *Cunninghamella echinulata*; substratos agroindustriais; biossurfactante; bioemulsificante; dispersão de óleo, redução da viscosidade; molécula polimérica.

1 . Introdução

Os biossurfactantes foram descobertos pela primeira vez como compostos extracelulares por fermentação de bactérias, e que têm claramente definido ambos os grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Inicialmente, foram vistos como interessante devido à sua capacidade para aumentar a solubilidade de hidrocarbonetos insolúveis ou fracamente solúveis. Elas ocorrem na natureza em bactérias, leveduras e fungos filamentosos [1].

No entanto, alguns fungos filamentosos são produtores de biossurfactantes utilizando fontes renováveis. Uma visão geral do biossurfactantes produzidos por fungos são informadas por espécie bacteriana bem mais explorada, no entanto relativamente menos fungos são conhecidos por produzir biossurfactantes [2]. Entre os fungos, *Candida bombicola* [3,4,5,6], *Candida lipolytica* [7,8,9], *Candida sphaerica* [10,11], *Candida ishiwadae* [12], *Candida batistae* [13], *Aspergillus ustus* [14] *Ustilago maydis* [15], e *Trichosporon ashii*, [16] são os explorados. Muitos deles são conhecidos por produzir biossurfactante em baixo custo de matérias-primas. Os quatro tipos principais de biotensioativo são descritos: (a) glicolípideos, (b) fosfolípideos, (c) lipoproteínas ou lipopéptideos, (d) poliméricos. O principal tipo de biossurfactante produzido por essas cepas é sophorolípideo (glicolípideo) [2] .

Os biossurfactantes são compostos tensioativos anfílicos produzidos por uma variedade de micro-organismos, com atraentes e ambientalmente aceitável no mercado industrial, devido propriedades peculiares, aplicadas principalmente na recuperação melhorada de petróleo [17].

Os biossurfactantes são considerados superiores aos produtos químicos sintéticos devido a sua origem, diversidade estrutural, maior seletividade do substrato, baixa concentração micelar crítica, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Nos últimos anos, estas características vantajosas das biomoléculas têm ganho destaque no setor terapêutico e biomédico, como uso na agricultura, produtos farmacológicos, dermatologia, na indústria de alimentos e cosméticos [18,19]. Os biossurfactantes apresentam propriedades como atividade antimicrobiana, e atividade anti-adesiva contra micro-organismos patógenos [20,21].

As composições químicas dos biossurfactants são descritas como glicolípideos, lipopeptideos, fosfolípideos, ácidos graxos, lipopolissacarídeos, complexos de proteínas, lípideos neutros, e polímeros [19,22].

O biotensioativo é considerado metabólito secundário extracelular ou associado a membrana celular, cuja estrutura depende da relação entre as fontes de carbono e nitrogênio, que influenciam fortemente a produção [21,23].

As patentes em nível de produção industrial de biossurfactante vem aumentando, e também o aumento da biodiversidade de micro-organismos que produzem biotensioativo ou bioemulsificante a partir de fontes renováveis [20,24,25] .

No entanto, o uso destas biomoléculas são limitadas, considerando o alto custo de produção, e também o baixo potencial de produção [9,26,27]. A fim de aumentar a produtividade de biossurfactante vários pesquisadores sugerem a otimização dos bioprocessos, métodos estatísticos, uso de matérias-primas de baixo custo, mas a disponibilidade de resíduos varia de país [25,28,29].

Assim, a literatura descreve que o êxito na produção de um tensioativo depende da utilização de substratos de fontes renováveis de processos biotecnológicos que minimizem cerca de 50% do custo total, bem como o processo de purificação se torna mais um obstáculo para a produção desses compostos a partir de origem microbiana [11,30,31,32].

Neste estudo, o isolamento de fungos indígenas do solo da Caatinga de Pernambuco, Brasil, foi capaz de produzir uma nova molécula de biossurfactante/bioemulsificante. O fungo isolado foi identificado por estudos morfológicos e fisiológicos e produção de biossurfactante/bioemulsificante foram investigados utilizando resíduos agroindustriais milhocina (M) e óleo residual de soja (ORS). Além disso, algumas propriedades do biossurfactante/bioemulsificante foram investigadas para confirmar as perspectivas comerciais e aplicabilidade.

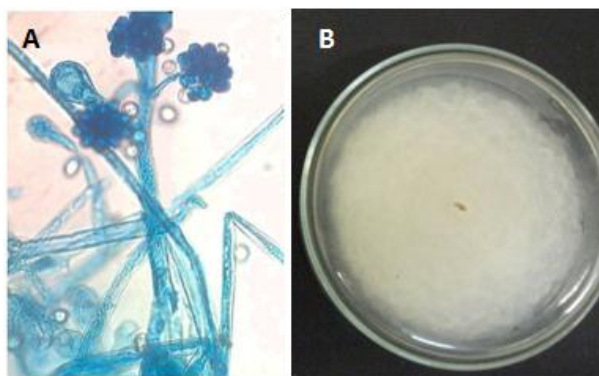
2 . Resultados e Discussão

2.1 . Descrição da *Cunninghamella echinulata*

O fungo isolado do solo da caatinga apresentou colônias cotonosas, creme claro ao castanho-claro; os esporóforos apresentam ramos primários monopodiais, pseudoverticais, raramente verticilado; ramificações longas e curtas podem surgir a partir da mesmo basidioma, que pode ser formado ramos simples ou ser ramificado várias vezes. Foram observados dois tipos de esporangiólos: 1-subhialino ou hialino, elipsóide equinulates alguns punctates em uma extremidade, 8,5-17,5 (-21,5) x 7-13,5 (-15,5) μ m ou globosa (8-14,5 milímetros de diâmetro), 2 - esporangiólos, em comum, somente globosa, 8,5-19,5 (-27) de diâmetro μ m obviamente equinulado e espinhos longos e finos, escuros e culturas gigante mais velha. O fungo foi identificado como *C. echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee, de acordo com Zeng & Chen [33] .

Colônias de *Cunninghamella echinulata* apresentam crescimento rápido em temperaturas de 28°C a 45°C, bom desenvolvimento em pH 4, 7 e 9, e nível de salinidade de até 15 %. O crescimento da colônia é aveludado verso da colônia apresenta coloração branca, assim como o reverso da colônia. A microscopia óptica da cultura mostrou hifas sem septos, muitas vesículas, esporóforos simples e curtos. As suas características podem ser observados na Figura 1 (A-B). Estes dados são confirmados pela literatura [33,34,35].

Figura 1. Características microscópicas e macroscópicas de *Cunninghamella echinulata* isolada do solo da Caatinga do Nordeste do Brasil.



2.2 Curva de crescimento, consumo de carboidratos, pH e produção de biossurfactante.

Neste trabalho foram utilizados dois resíduos milhocina (M) e óleo residual de soja (ORS) como fontes de carbono e nitrogênio na solução salina para a produção de biossurfactante por *C. echinulata* crescido por 96 horas, utilizando um planejamento fatorial completo 2², com variáveis dependentes e independentes. Os resultados demonstraram que o fungo tem a capacidade de reduzir a tensão de superfície, e a melhor condição foi confirmada utilizando 3 % de M e 4 % ORS e 7 % de cloreto de sódio, descritos no quadro 2. Todas as análises foram realizadas a partir desta condição selecionada para investigar a produção de biossurfactante .

De acordo com a literatura, alguns fungos podem ser eficazes na redução da tensão de superficial em relação às bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, que possuem resultados mais significativos no que diz respeito à redução da tensão. No entanto, as leveduras demonstraram

valores consistentes de tensoativos de acordo Bhardwaj et al. [2]. A melhor produção de biotensoativo conseguida por *Fusarium* sp foi BS-8 reduziu a tensão superficial da água de 72-32 mN / m sob a condição de pH 7,0, temperatura 30 ° C [37].

As fontes de carbono e nitrogênio, além da associação com a solução base de sais e componentes nutricionais influenciam o tipo e as propriedades dos biosurfactantes, tais como a acumulação de biomassa. A literatura descreve vários substratos hidrofílicos e hidrofóbicos alternativos, tais como fontes de carbono e de nitrogênio para a síntese de biomoléculas. Neste estudo, de condições semelhantes foi usado, isto é, ORS como substrato hidrofóbico e M molécula hidrófila [40,41].

O estudo demonstrou um perfil de crescimento gradual nas primeiras 48 horas, com pequenas modificações, até ao fim do cultivo (Tabela 1). O fungo é capaz de reportar que o óleo vegetal (ORS) como fonte de carbono, proporcionando um efeito adicional com a biomassa e o processo de indução da produção biotensoativo. A literatura relata que a produção de biosurfactante ocorreu por meio da ativação de genes responsáveis pela sua biossíntese, e também através dos ácidos graxos que prolongam a cadeia lipídica no domínio hidrofóbico [37,41].

O crescimento nas primeiras 48 horas de cultura mostrou atingindo um valor máximo de 30,0 gL⁻¹, e aumenta levemente a seguir até 96 horas. A tensão superficial reduziu até às 48 horas de crescimento, com valores inferiores a 40mN/m, e contínua a reduzir para 36.0mN/m. O pH é um fator que também determina a produção de biomoléculas, a escala variou entre espécies de *Candida* 5.0 , 5.7 , 6.0 , 7.8, no entanto, *Pichia anamola* e *Aspergillus ustus* MFS3 mostrou produção máxima com os valores de 7,0 e 5,5, respectivamente. Assim, a produção de moléculas de tensoativos torna-se possível, com a possibilidade de utilizar substratos de baixo custo, permitindo o processo biotecnológico [2,13,14,37,38,39].

A produção do biotensoativo é também influenciada pelo tempo de incubação, e vários micro-organismos são capazes de produzir em intervalos de tempo diferentes, como observado em *Aspergillus ustus* após 5 dias, em *Fusarium* sp. BS-8 para 15 dias de incubação, enquanto a produção por *Candida bombicola* foi no período de 7 a 11 dias [1,37,42].

Considerando que o crescimento fungo de *C. echinulata* sobre as condições de produção do tensoativo por consumo total de fontes oferecidas pela ORS e resíduos M. A produção dessas biomoléculas foi observada pela redução da tensão superficial e consumo de carboidratos gradualmente ao longo de 96 horas de cultivo.

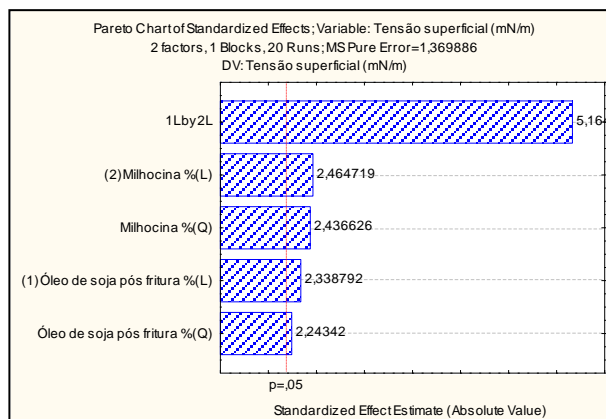
Tabela 1. Curva de crescimento, pH, consumo de carboidratos e produção de biosurfactante utilizando resíduos industriais (M e ORS).

Tempo (h)	Biomassa g.L ⁻¹	pH	Consumo de carboidratosg.L ⁻¹	*Tensão superficial do biosurfactante mN/m
24	15.0	5.0	2.30	42.9
48	30.0	5.7	1.72	41.0
72	31.0	7.1	0.17	37.0
96	32.0	7.1	0.07	36.0

* Tensão superficial da água: 72mN / m

A figura 2 ilustra o gráfico de Pareto, com 95% de nível de confiança, para os efeitos estimados da M sobre a redução da tensão superficial. É possível observar que a interação nos dois substratos M (hidrofílica) e ORS (hidrofóbico) é baixa nas condições de 3% e 4% M, e 7% de NaCl, as quais influenciaram significativamente a redução da tensão superficial. Ambos os substratos foram estatisticamente significativos para a produção biosurfactante por *C. echinulata*. Estes resultados estão em conformidade com a literatura, que descreve que a produção de biotensoativo fisiologicamente está relacionada com o mecanismo de assimilação em resposta à exposição a substratos hidrofóbicos [1,2,17].

Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados do caldo livre de células de *Cunninghamella echinulata* após 96 h de cultivo para os experimentos do planejamento fatorial completo de 2^2 . O ponto que estima o efeito estatístico significativo (em $p = 0,05$). (A) Tensão Superficial.

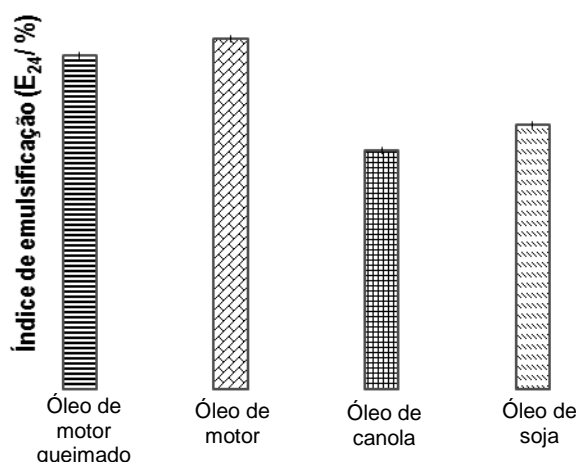


2.3 Características de emulsificação do biossurfactante

Durante as duas últimas décadas os biossurfactantes têm estado sob investigação contínua, esperando um com potencial para substituir os surfactantes sintéticos. Várias aplicações industriais e ambientais relacionadas, principalmente a propriedades como a detergência, emulsificação, dispersão e a solubilização de compostos hidrofóbicos [30]. Devido as suas propriedades, como biodegradabilidade, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, alta seletividade e atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade terem conquistado uma maior importância em aplicações industriais e ambientais, tais como biorremediação, lavagem do solo, recuperação avançada de petróleo e outros processamentos de óleo relacionados às indústrias em geral [22,23,24,25,28].

Amiriyani et al. [39] sugere que a atividade emulsionante depende da afinidade do bioemulsificante com os substratos como hidrocarbonetos, que envolve uma interação direta com o próprio em vez de um efeito sobre a tensão superficial do meio. No presente estudo, uma emulsão consistente foi formada em ambos os substratos hidrofóbicos do óleo motor e com o óleo queimado de motor, com valores acima de 80%. No entanto, os óleos vegetais de canola e soja mostraram valores próximos de 60% (Figura 2). Os nossos resultados com bioemulsificante confirmaram a produção de um biotensoativo por *C. echinulata* constituído por radicais polares e não polares, e que as moléculas eram capazes de causar a emulsificação de sistemas bifásicos (água e óleo). Estes valores obtidos foram compatíveis com a produção bioemulsificante fúngica e bacteriana descritas na literatura [2,9,10,37,43,44].

Figura 3. Índice de Emulsificação (E_{24}) (B) do biossurfactante produzido por *Cunninghamella echinulata* usando milhocina e óleo residual de soja.



2.4 Os estudos de estabilidade

Como pode ser observado nas Figuras 4 (A, B, C) e 5 (A, B, C), os resultados de estabilidade de biossurfactante são bastante impressionantes em comparação com o biotensioativo mais potente descrito na literatura [45,46,47].

A estabilidade da tensão superficial e o índice de emulsificação são fatores importantes para a utilização de biossurfactantes em condições ambientais específicas. A capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial é um parâmetro fundamental para a detecção da produção de compostos tensoativos. Por outro lado, a formação da emulsão é também um indicador da propriedade emulsificante do biotensioativo isolado [48,49,50].

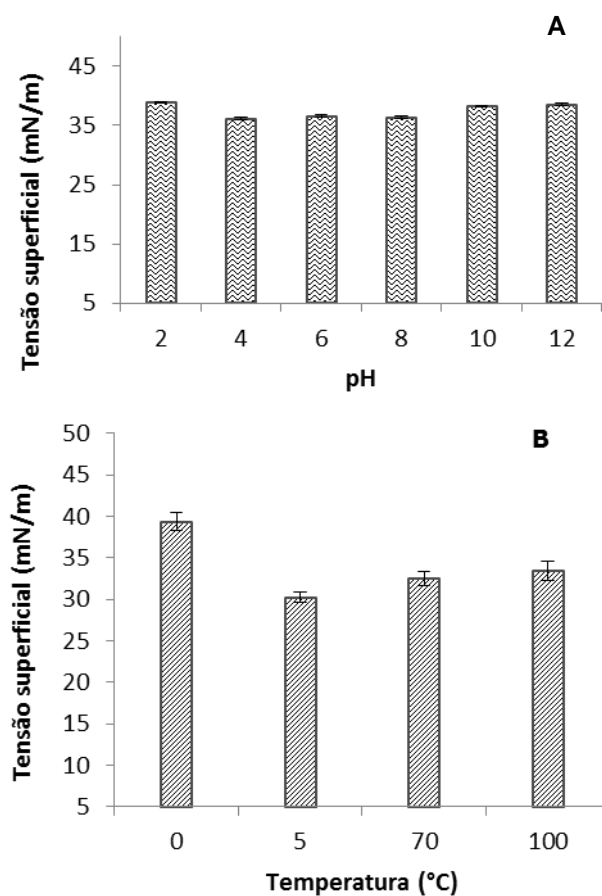
Os efeitos da temperatura, do pH e da salinidade concentração são fatores que influenciam a atividade e a estabilidade da tensão superficial e o índice de emulsificação, como devido à presença dos grupos funcionais são importantes propriedades do biotensioativo produzido por *C. echinulata* (Figuras 4 e 5). Estes resultados obtidos do biotensioativo produzido por *C. echinulata* mostrou que o caldo sem células foi termicamente estável. Com o aumento gradual do pH foi observado uma estabilidade notável no valor de tensão superficial até pH 12. O caldo livre de células de *C. echinulata* foi ajustado a vários pH na razão de 2-12, a temperatura ambiente, após foram medidas a atividade de superficial. As tensões superficiais foram mantidas praticamente uniforme em todos os pHs, indicando que a variação do pH não teve efeito significativo sobre a tensão superficial ou índice de emulsificação.

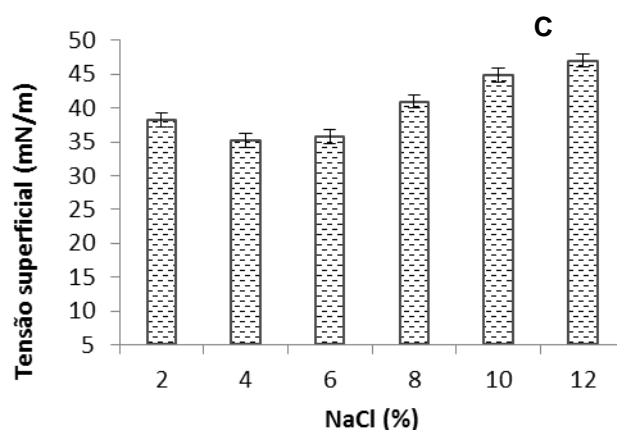
No entanto, uma pequena mudança foi observada a um pH de 12, deve ser consequência da desnaturação de compostos proteicos do biotensioativo sob condições extremas de pH, como sugerido por Ghurye et al. [51]. No entanto, nas variações na concentração de sais, foi observado valores estáveis em concentrações de 8 e 10%. Também foram observados comportamentos similares em termos de estabilidade para os biossurfactantes produzidos pelo *Fusarium* sp [37], *Candida lipolytica* [8], e *Candida sphaerica* [11]. Foram observadas alterações com o aumento dos efeitos de cloreto de sódio.

A estabilidade do biotensioativo *C. echinulata* a diferentes temperaturas foi testado e mostrou-se estável durante um hora de incubação a 0-100 °C, tal como na Figura 4 (B). A estabilidade foi mantida em ambos os óleos a 5°C, usando o óleo de motor mostrou uma eficiência máxima de 80%, quando o aumento da temperatura diminuiu o índice. No entanto, os resultados da queima de óleo do motor mostrou mais de 60%, quando se atingiu 100 °C.

Em diferentes concentrações de NaCl o biossurfactante foi estável em toda a atividade de emulsificação. Os valores são correspondentes a 50% de óleo de motor queimado, embora o óleo de motor apresente valores mais baixos do que 40% nas concentrações de 4 e 12. O maior aumento de emulsificação do biotenssoativo nos dois óleos (motor e motor queimado) e sugeriu que dependem da afinidade com os substratos, como mostrado na Figura 5 (C). Os resultados do índice de emulsificação obtidos são corroborados também pela interação da porção hidrofóbica do biotenssoativo com os substratos de hidrocarbonetos, de acordo com Shavandi et al. [52].

Figura 4. Estabilidade do biossurfactante produzido por *Cunninghamella echinulata* usando M (milhocina) e (óleo residual de soja) ORS.





2.5 Rendimento, CMC, carga iônica e composição química preliminar do biossurfactante

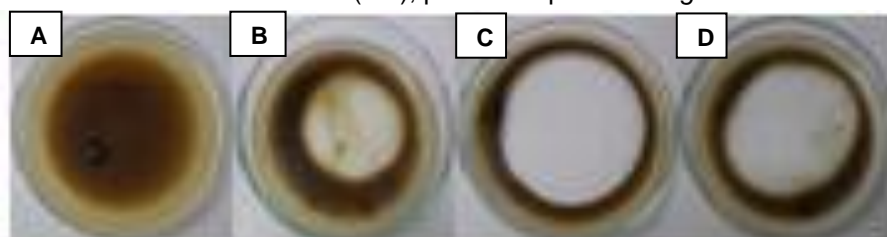
Os resultados obtidos mostraram um maior rendimento de $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ do biotensoativo isolado produzido por *C. echinulata*. Estes resultados mostraram que fungo Mucorales *C. echinulata* é excelente produtor tensoativo/bioemulsificante, quando comparado com fungos mencionados como produtores de biossurfactante a partir de fontes renováveis, tais como glicerol, ácido oleico e outros resíduos [1,3,53].

A caracterização química da molécula do biotensoativo isolado mostrou a presença de lipídeos (40%), carboidratos (35,2%) e proteínas (20,3%). O biotensoativo mostrou um perfil aniônico por metro Zeta com $-64,9 \text{ ZPmv}$, 4.13 uS/cm a $26,4 \text{ °C}$, escala completa. O potencial Zeta determina a função da carga de superfície da partícula que servem para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais e emulsões, e confirmou os valores mais elevados obtidos indicam uma boa estabilidade por repulsão entre as partículas hidrófilas, de acordo com a literatura [46,48, 54].

2.6 Área de dispersão do óleo (ODA)

A Figura 5 (A, B, C, D) apresenta resultados da área de dispersão do óleo. Os resultados indicam ausência de área foi formada por adição de água correspondente a 0 (Fig. 5-A); o uso de detergente comercial apresentou $19,52 \text{ cm}^2$ (Fig. 5-B); o uso de Triton X-100 (1%) mostrou uma área de $38,46 \text{ cm}^2$, (Fig. 5-C), e a aplicação do biotensoativo produzido por *C. echinulata* (solução a 1%) foi de $37,36 \text{ cm}^2$ de área de deslocamento do óleo (Fig. 5-D). No entanto, são poucas informações sobre a área de dispersão do óleo (ODA) por biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos na literatura. No entanto, de *Bacillus* spp (SH SH 20 e 26) cultivados no meio ISM complementado com óleos vegetais, eles falharam em produzir biossurfactantes ativos, enquanto que na presença de melação que eles foram capazes de produzir os tensoativos com halos de $51,2 \pm 3,5$ e $32,1 \pm 2,7 \text{ cm}^2$, respectivamente. Os mesmos autores relataram que *Pseudomonas aeruginosa* foi cultivada em meio ISM suplementado com óleo de resíduos, foi capaz de produzir um biossurfactante e ODA correspondeu a $45,3 \pm 2,8 \text{ cm}^2$ [55].

Figura 5. Área de dispersão do óleo formado de acordo com substratos: (A) óleo motor queimado + água destilada; (B) óleo de motor queimado + detergente comercial; (C) óleo de motor queimado + Triton X-100 (1%), e (D) óleo de motor queimado + biossurfactante isolado (1%), produzida por *Cunninghamella echinulata*.



2.7 Efeito da viscosidade do biossurfactante.

Foi determinada a viscosidade do óleo do motor, óleo do motor queimado, Diesel, Biodiesel, óleo de canola, óleo de milho, óleo de soja, óleo residual de soja, óleo de girassol, óleo de palma, óleo de arroz, óleo mineral e água (controle) isolado e após a adição de biossurfactante *C. echinulata*. A determinação foi realizada em (cP) e porcentagem (%) dos substratos hidrófobos, antes e após a solubilização pela utilização de biotensioativo em solução a 1% durante 30 min. Portanto, os melhores resultados que alcançamos pela ordem de uso do biossurfactante. A determinação da viscosidade foi diminuída com óleo do motor 736,6 cP a 179,0 cP; Diesel 159,1-43,8 cP; óleo de canola 374,0 cP a 110,9 cP; e óleo de mamona 187,9 cP para 185,4cP (Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades de redução e aumento dos substratos de viscosidade pelo biossurfactante produzido por *Cunninghamella echinulata*.

Substratos hidrofóbicos	Viscosidade sem o biossurfactante		Viscosidade com o biossurfactante	
	(cP)	(%)	(cP)	(%)
Óleo de motor	736.6	59.9	179.0	72.5
Óleo de motor queimado	148.9	48.3	210.7	87.9
Diesel	154.1	25.1	43.8	35.7
Biodiesel	36.0	29.3	51.3	41.9
Óleo canola	374	60.8	110.9	78.5
Óleo de milho	47.6	38.8	404.0	66.1
Óleo de soja	472.8	38.2	970.1	38.9
Óleo de soja pós-fritura	380.1	61.9	556.3	45.3
Óleo de mamona	187.9	75.1	185.4	61.6
Óleo de girassol	355.5	57.6	493.3	40.9
Óleo de palma	403.0	67.7	536.3	45.1
Óleo de arroz	459.9	74.8	461.1	75.2
Óleo mineral	27.0	22.0	102.2	83.3
Água (Controle)	0.96	0.9	1.35	1.1

A viscosidade foi aumentada após a adição de biossurfactante como: óleo de queimado de motor 148,9 cP a 210,7 cP; Biodiesel 36,0 cP para 51,3cP; óleo de milho 47,6cP para 404,0cP; 472,8cP para 970,1cP; resíduos de óleo de soja para 380,1cP 556,3cP; Girassol óleo 355,5 cP para 493,3;

óleo de palma 403,0 cP a 536,3 cP; 459,9cP óleo de arroz para 461,1 cP; óleo mineral 27,0cP para 102,2 cP e água como controle e, por vezes, observada o aumento se justifica por sua propriedade, uma vez que são doadores consistentes.

Por conseguinte, os resultados do biotensioativo produzida por *C. echinulata* é indicado para limpeza das placas de óleo contaminado, tal como descrito. Os resultados indicam dois mecanismos de aumentar e diminuir a viscosidade usando substratos hidrófobos através da utilização do novo biotensioativo solução a 1%. Os resultados sugerem que a viscosidade novo biossurfactante é um candidato para a recuperação avançada de petróleo mediada e outras aplicações quando é necessário aumento da viscosidade de acordo com a literatura [56,57].

3 . Seção Experimental

3.1 Isolamento, Identificação e preservação de micro-organismo

O isolamento do microorganismo foi realizada durante o período de verão a partir de solo da Caatinga de Pernambuco , Nordeste do Brasil. O isolamento foi realizado utilizando o método de diluição sucessiva do solo / água (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) . Para o isolamento de fungos foi realizada através da mídia : marTT in (1,0 g K₂HPO₄ , MgSO₄ 0,5 g ; H₂O , 5,0 g peptona , 10g de dextrose ; 0,03 g Rosa Bengala ; 16g de ágar para 1000 mL de água destilada, com cloranfenicol 0,008 %) ; Sabouraud agar de dextrose (5 g de peptona , 20 g de glicose , 15 g de agar , 1000 mL de água destilada , pH 6,5) . As placas foram incubadas a 28°C até que as colônias foram contadas, e as colônias purificadas foram transferidas para novas placas de Petri contendo o meio semelhante e incubou-se a 28°C. Após este período, a cultura monospórica foi transferida para tubos de ensaio contendo agar de dextrose Sabouraud e preservada, a 5 °C. Cada experimento foi realizado em triplicata. A identificação foi feita utilizando a chave para fungos Mucoralean descritos [37]. O fungo foi isolado e identificado preservadas por congelamento e em solução de glicerol liofilizada .

3.2 Substratos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais foram gentilmente cedidos de Corn Products-Cabo, PE, Brasil (milhocina) e informal de alimentos indústria - Recife , PE, Brasil (óleo residual de soja-ORS).

3.3 Condições culturais e produção de biossurfactante

O fungo foi inoculado isolamento em placas de Petri contendo meio de agar dextrose de batata e incubados a 28°C durante 72 horas até esporulação . Após estas sporangioles período foram contados (10^7 / mL) utilizando câmara heamatimeter , e alíquotas de 5% de suspensão foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade , contendo 100 ml do meio de produção biotensioactivo [KH₂PO₄ 2,0 g , MgSO₄ 1,0 g] e além de elementos 1 mL / L solução rastrear [FeSO₄.7H₂O 0,63 mg , 0,01 mg de MnSO₄ , ZnSO₄ 0,62 mg / L , pH 5,0]. A água de maceração do milho e substratos óleo de soja pós fritura e foram utilizados como substratos agroindustriais, de acordo com planejamentos fatoriais 2². Os frascos foram incubados num agitador orbital a 150 rpm , 28 ° C. As células livres de líquidos metabólicas foi obtido a partir de centrifugação a 10.000G durante 15 minutos, depois filtrada.

3.4 . Cinética de crescimento e produção de biossurfactante.

O crescimento de estirpes de *C. echinulata* foi acompanhada por biomassa e os resultados foram expressos em (g/L). Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo definidos e submetidos à análise para determinação de biomassa, o consumo total de carboidratos, pH, tensão superficial, estabilidade de bioprodutos, extração e caracterização de biossurfactante. Todas as experiências foram realizadas em triplicata .

3.5 Determinação do pH

Aliquotas de células livres metabólicas líquidas foi realizado para a determinação do pH por Orion potenciômetro (Modelo 310).

3.6 Determinação tensão Superficial

A tensão superficial foi monitorizada a produção de biotensioativo célula líquido metabólico utilizando o modelo tensiometro Sigma 70 (KSV Instruments Ltd. , Finlândia), utilizando o método do anel de Du Nouy à temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) , de acordo com Kuyukina et al. [58]. As medições da tensão superficial da água destilada e do meio convencional foram usados como controle .

3.7 Determinação do índice e atividade de emulsificação

Para a determinação da emulsificação, as amostras retiradas após 96 horas de fermentação foram centrifugados a 10.000G durante 15 minutos e, em seguida, analisados de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg [59]. Foi adicionado a um tubo graduado de 1,0 mL de substratos hidrofóbicos e 2 mL de células livres contendo líquido metabólico do biotensioativo, e a mistura foi agitada em vórtex durante 2 minutos. Os substratos hidrofóbicos óleo do motor e o óleo do motor queimado foram testados. A percentagem de emulsificação foi calculado pela seguinte fórmula: $IE (E_{24}) = AT \setminus AE \times 100$.

3.8 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica de biossurfactante isolado durante 96 horas de cultivo foi determinado em solução aquosa a medição da tensão superficial em tensiômetro automático (modelo Sigma 70 KSV Ltd., Finlândia) usando um anel de platina - irídio. A amostra do biotensioativo isolado foi diluído em diferentes concentrações, começando com uma concentração mínima de 0,001 mg/mL até alcançar a CMC observada com o objetivo de atingir um valor constante de tensão de superficial . Um gráfico da concentração em percentagem do biotensioativo (%) x TS (tensão superficial) foi representada graficamente.

3.9 Determinação da estabilidade do biossurfactante

Os estudos de estabilidade foram realizados usando o caldo livre de células obtido a centrifugação das culturas a 10.000 g durante 15 min. Quatro mililitros do meio de cultura livre de células foi aquecida a 0, 5, 70, e 100 °C durante 1 h, e resfriada até à temperatura ambiente, em seguida a tensão superficial e a atividade de emulsificação foram medidas. A tensão superficial e índice de emulsificação do caldo de cultura livre de células foram também determinadas após a exposição às mesmas temperaturas. Para estudar a estabilidade do caldo livre de células, o pH foi ajustado para diferentes valores de pH (2-12) e a atividade de tensão superficial e emulsificação foi medido. O pH da cultura líquida foi ajustada com NaOH 1 M. O efeito das concentrações de NaCl (2-12%) na redução da superfície e capacidade de emulsificação do caldo de cultura livre de células também foram determinados. Os testes foram realizados em triplicado .

3.10 Isolamento do biossurfactante

O biotensioativo produzido por *C. echinulata* foi isolado pelo método de precipitação utilizando o período de líquido isento de células metabólica com acetona 1:1 (v/v) de acordo com a Paraszkiwicz et al [20]. O precipitado foi deixado em repouso durante 24h a 4°C, e após este período foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 min, a 5°C. O sobrenadante foi descartado e o biotensioativo

isolado foi submetido a diálise contra água desionizada durante 96 horas a 5°C, e muda a cada 3 horas. O biossurfactante foi coletado e liofilizado [52].

3.11 Carga iônica e viscosidade

A determinação da carga iônica do biossurfactante foi realizada através do potencial zeta Modelo ZM3 -DG, Zeta Medidor 3,0 sistema+, com Imagem Direta parágrafo Vídeo da Zeta medidor, Inc., EUA. A linha de topo do poço foi cheio com um composto puro da conhecida carga iônica. A substância foi conhecido aniônico de dodecil sulfato de sódio (SDS) a uma concentração de (0,02 M) substância catiônica e o cloreto de bário (0,05 M). A placa de Petri foi mantida à temperatura ambiente durante 48 horas. O resultado foi obtido com a aparência de linhas de precipitação, de acordo com Meylheuc [60].

3.12 Teste de dispersão do óleo (área de dispersão óleo - ODA)

O teste de dispersão do óleo foi realizado utilizando a metodologia descrita por Diab e El Din (2013) [55], a fim de avaliar o efeito do biotensioativo sobre a área de dispersão do óleo. O teste foi introduzida em cada placa de Petri (diâmetro de 9 mm) 20 ml de óleo de motor queimado, e seguido o foi espalhada sobre o centro da película de óleo, 1 ml de água destilada (A), 1 mL de detergente comercial (B), 1 mL de surfactante sintético Triton X-100 (C), e 1 ml de biotensioativo bruto produzido por *Cunninghamella echinulata* (D). As placas de Petri foram incubadas a temperatura ambiente (28°C) durante 24 h. Após este período, o diâmetro das zonas claras dos ensaios foram medidos em cm². Água destilada foi utilizada como controle. Todos os dados foram registados como a gama de amostras em triplicado .

O diâmetro da zona clara formado foi medido e, em seguida, a área de clara círculo zona foi calculada como área de deslocamento de óleo (ODA), utilizando a seguinte equação:

$$ODA = 3,14 \times r^2$$

3.13 Determinação da viscosidade do Óleo

A fim de investigar os efeitos do biotensioativo produzido nos testes de viscosidade foram realizadas a teste foi fixada ao volume de 6 mL . Estas viscosidades foram medidas usando um viscosímetro de nível (Brookfield - TC 500) a 25 ° C. Os substratos hidrofóbicos foram o óleo de motor, óleo de motor queimado, Diesel, Biodiesel, óleo de milho, óleo de coco, óleo mineral, óleo de soja , óleo de soja pós- fritura e água como controle foram testados . Na mesma sequência dos substratos hidrófobos que adicionado 2 mL de solução de biotensioactivo em 1,0% (w/v), para vórtices 1min. e a viscosidade foi medida de novo. Os resultados de viscosidade foram expressos em cP e %.

3.14 A análise estatística

A fim de verificar o efeito das variáveis independentes (concentração de resíduos industriais, milhocina e óleo de soja pós- fritura) sobre a produção de biossurfactante, planejamento fatorial completo 2², com três valores centrais, foi utilizado (Tabela 3). Os resultados foram, então, examinados para determinar os principais efeitos de todos os fatores e foram realizados para determinar quais fatores são estatisticamente significativas. A análise dos dados e gráficos , e todos os cálculos foram realizados utilizando o pacote de software estatístico 7.0, eo significado dos resultados foi testada em (p ≤ 0,05).

Tabela 3. Nível e fatores aplicados ao composto planejamento fatorial 2²

Ensaio	(-1.68)	(-1)	0	(+1)	(+1.68)
Óleo residual de soja (%)	0.62	3	6.5	10	12.38
Milhocina (%)	2.64	4	6	8	9.36

4. Conclusões

O novo biossurfactante produzido pelo fungo Mucorales *C. echinulata*, além de ser um bom surfactante, tem propriedades atraentes como um composto tensoativo e emulsificante. O biossurfactante tem várias propriedades e não é afetado pela temperatura, pH e concentração de cloreto de sódio. A composição bioquímica preliminar sugere que a molécula é novo biotensioativo polimérico, constituído por lipídeos (40%), carboidratos (35,2%) e proteínas (20,3%). O biossurfactante induziu uma área de maior dispersão de óleo utilizando óleo do motor queimado, e reduziu a viscosidade. Estas características são desejáveis para os processos industriais, considerando as várias propriedades que têm e podem ser atraentes, um composto de superfície ativo e emulsificante útil em muitos campos da indústria. Esta abordagem do biotensioativo produzido por *C. echinulata* representam uma ferramenta promissora, simples e de custo eficaz para o tratamento de lamas oleosas gerado durante a limpeza de tanques de armazenamento de petróleo, e outras indústrias, com outras aplicações, quando um aumento na viscosidade é necessário.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (563382/2010-4-SISBIOTA e 308245/2010-5 GTCM), e pela Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE (Recife-PE., Brasil) (APQ N °,0086-2,12 / 11), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior Nível, Brasília-DF, Brasil). Os autores são gratos a Corn Products (Cabo de Santo Agostinho-PE, Brasil) que gentilmente forneceram o substrato milhocina. Os autores são gratos pela bolsa concedida pelo CNPq, ao técnico Severino Humberto de Almeida, e também para a Universidade Católica de Pernambuco pela uso dos laboratórios.

Referências

1. Kitamoto, D.; Morita, T.; Fukuoka T.; Konishi, M.; Imura, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2009**, *14*, 315–328.
2. Bhardwaj, G.; Cameotra, S.S.; Chopra, H.K. Biosurfactants from Fungi: A Review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **2013**, *4*, 160-166.
3. Felse, P.A.; Shah, V.; Chan, J.; Rao, K.J.; Gross, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme Micro. Tech.* **2007**, *40*, 316-323.
4. Deshpande, M.; Daniels, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresource Technol.* **1995**, *54*,143-150.

5. Casas, J.A.; Garcia de Lara, S. ; Garcia-Ochoa, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb. Tech.* **1997**, *21*, 221-229.
6. Williams, K. Biosurfactants for cosmetic applications: Overcoming production challenges. *MMG 445 Basic Biotechnol.* **2009**, *5*, 78-83.
7. Sarubbo, L.A.; Farias, C.B.; Campos-Takaki, G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **2008**, *54*: 68-73.
8. Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World. J. Microb. Biot.* **2007**, *23*, 729-734.
9. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A.; Rodrigues, L.R.M.; Texeira, J.A.C.; Campos-Takaki, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* **2011**, *84*, 1– 5.
10. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Albuquerque, C.D.C.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphaerica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, *12*, 2463-2476.
11. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* **2013**, *102*, 202– 209.
12. Thanomsub, B.; Watcharachaipong, T.; Chotelersak, K.; Arunrattiyakorn, P.; Nitoda, T. et al. Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 588-592.
13. Konishi, M.; Fukuoka, T.; Morita, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J Oleo Sci* **2008**, *57*, 359-369.
14. Kiran, G.S.; Hema, T.A.; Gandhimathi, R.; Selvin, J.; Thomas, T.A. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2009**, *73*, 250-256.
15. Alejandro, C.S.; Humberto, H.S.; María, J.F. Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *African Journal of Microbiology Research* **2011**, *5*, 2512-2523.
16. Chandran, P.; Das, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Engineering Science and Technology* **2010**, *2*, 6942-6953.

17. Chandankere, R.; Yao, J.; Choi, M.M.F.; Masakorala, K.; Chan, Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochemical Engineering Journal* **2013**, *74*, 46– 53.
18. Gudiña, R.; Rangarajan, V.; Sen, R.; Rodrigues, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences* **2013**, *34*, 12.
19. Donio, M.B.S.; Ronica, S.F.A.; Thanga Viji, V.; Velmurugan, S.; Adlin Jenifer, J.; Michaelbabu, M.; Citarasu, T. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **2013**, 873-886.
20. Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A.; Mei, H.C.; Oliveira, R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloid Surfaces B*. **2006**, *49*, 79-86.
21. Janek, T.; Łukaszewicza, M.; Krasowska, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *110*, 379– 386.
22. Pacwa-Plociniczak, M; Plaza, G. A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S. S. Review Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* **2011**, *12*, 633-654.
23. Ron, E.Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* **2002**, *13*, 249–52.
24. Mukherjee, S.; Das, P.; Sen, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 509–515.
25. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* **2011**, *1*,5-24.
26. Solaiman, D.; Ashby, R.; Zerkowski, J.; Foglia, T Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*,1341–1347.
27. Batrakov, S.G.; Konova, I.V.; Sheichenko, V.I.; Galanina, L.A. Glycolipids of the filamentous fungus *Absidia corymbifera* F-295. *Chem. Phys. Lipids.* **2003**, *123*, 157-64.
28. Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*: 495-508.
29. Nitschke, M.; Costa, S.G. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci Technol* **2007**, *18*, 252–259.

30. Banat, I. M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M. G.; Fracchia, L.; Smyth, T. J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2010**, *87*, 427–444.
31. Rocha e Silva, N.M.P.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2013**.
32. Santos SC, Fernandez LG, Rossi-Alva JC, Roque MRA. Evaluation of substrates from renewable resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. *Afric. J. Biotechnol.* **2010**. *9*, 5704-5711.
33. Zheng, R.Y.; Chen, G.Q. *Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee var. *echinulata* and var. *verticillata* (Paine) comb. nov., *Mycosystema* **1996**, *8*, 1–13
34. Domsch K. H, Gams, W, Anderson, T-H. Compendium of soil fungi. *Academic*, London, **1980**.
35. Freitas Silva, M. C. et al. Effect of enviromental conditions on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* UCP542 Using Factorial Design. *Asian Chitin Journal*, **2007**.
36. Rufino, R.D; Luna, J.M.; Campos-Takaki, G.M; Sarubbo, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic J. Biotechnol.*, **2013**, *17*, 34-38.
37. Qazi, M. A.; Subhan, M.; Nighat, F.; Ali, M. I.; Ahmed, S. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp. BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. *International J. Biosci., Biochem. Bioinformatics* **2013**, *3*, 6-10.
38. Sarubbo, L.A, de Luna, G.M., de Campos-Takaki, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Elec. J. Biotechnol.* **2006**, *9*, 400-406.
39. Amiriyan, A.; Mazaheri Assadi, M.; Sajadian, V.A.; Noohi, A.A. Bioemulsan production by Iranian oil reservoirs microorganism. *Iranian J Env Health Sci Eng* **2004**, *1*:28-35.
40. Fontes, G. C.; Amaral, P. F. F.; Coelho, M. A. Z. Produção de Biossurfactante por Levedura. *Quím. Nova* **2008**, *31*, 8, 2091-2099.
41. Morita, T., Ishibashi, Y., Fukuoka, T., Imura, T., Sakai, T., Abe, M., Kitamoto, D., Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **2009**, *73*(3):788–92.

42. Cavalero, D.A.; Cooper, D.G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.* **2003**, *103*, 31-41.
43. Diab, A.; and Din, S.G.E. Production and Characterization of Biosurfactants Produced by *Bacillus* spp and *Pseudomonas* spp Isolated from the Rhizosphere Soil of an Egyptian Salt Marsh Plant. *Nature Sci.* **2013**, *11*.
44. Colla, L.M.; Hemkemeier, M.; Gil, A.S.L. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Revista CIATEC – UPF* **2012**, *4*, 1-10.
45. Deleu, M.; and Paquot, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: New trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie* **2004**, *7*, 641-646.
46. Satpute, S.K.; Banpurkar, A.G.; Dhakephalkar, P.K.; Banat, I.M.; Chopade, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol* **2010**, *30*, 127-144.
47. Youssef, N. H.; Duca, K. E.; Nagle, D. P.; Savager, K. N.; Kapp, R. M.; McInemey, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *J. of Microbiol. Methods*, **2004**, *56*, 339-346.
48. Pornsunthorntawe, O.; Wongpanit, P.; Chavadej, S.; Abe, M.; Rujiravanit, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Biores. Technol.* **2008**, *99*, 1589-1595.
49. Whang, L.M.; Liu, P.W.G.; Ma, C.C.; Cheng, S.S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater* **2008**, *151*, 155–163.
50. Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollution* **2005**, *133*, 183–98.
51. Ghurye, G.L.; Vipulanandan, C.; Willson, R.C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol Bioeng*, **1994**, *44*, 661–666
52. Shavandi, M.; Mohebbali, G.; Haddadib, A.; Shakaramia, H.; Nuhic, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *82*, 477–482.

53. Kim, H.S.; Jeon, J.W.; Lee, H.W.; Park, Y.I.; Seo, W.T. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett* **2002**, *24*, 225-229.
54. Patil, J.R.; Chopade, B.A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *J Appl Microbiol* **2001**, *91*, 290-298.
55. Ali Diab, A.; El Din, S.G. Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil - contaminataed vessels and enhancing the biodegradation of oily sludge. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* **2013**, *7*, 671-679.
56. Banat, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technol* **1995**, *51*, 1-12.
57. Sen, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Prog Energy Combust* **2008**, *34*, 714-724.
58. Kuyukina, M. S.; Ivshina, I. B.; Makarov, S. O.; Litvinenko, L. V.; Cunningham, C. J.; Philip, J. C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environment International* **2005**, *31*, 155-161.
59. Cooper, D. G.; Goldenberg, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **1987**, *53*, 2, 224-229 .
60. Meylheuc, T.; Van, Oss. C.J.; Bellon-Fontiane, M.N. Adsorption of biosurfactants on solid surface and consequences regarding the biohesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal Applied of Microbiology* **2001**, *91*, 822-832.

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

Cunninghamella echinulata (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee, fungo indígena isolado da microbiota da Caatinga de Pernambuco.

O biossurfactante produzido apresenta atividade surfactante e emulsificante.

O micro-organismo *C. echinulata* demonstra ser produtora de biossurfactante.

O biossurfactante/emulsificante produzido é estável frente diferentes temperaturas, pH e concentrações de NaCl.

O biossurfactante/emulsificante apresenta carga anionica e constituição química preliminar polimérica constituído por lipídeos (40,0%), carboidratos (35,2 %) e proteínas (20,3%).

O biossurfactante/emulsificante demonstra elevado potencial na dispersão de óleos, na redução e aumento da viscosidade de substâncias hidrofóbicas.

O isolado *C. echinulata* neste trabalho indica uma alternativa promissora em processos de Biorremediação auxiliando na redução da concentração dos vários componentes do petróleo, na limpeza de tanques, em caso de derramamento, como também em outras aplicações industriais.

Os próximos passos a serem realizados incluem a identificação molecular e por Maldi Tof, como também, otimização do processo de produção e ampliação da escala de produção.

ANEXOS

Article

Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil

Nadielly R. Andrade Silva ^{1,4}, Marcos A. C. Luna ^{1,4}, André L. C. M. A. Santiago ²,
Luciana O. Franco ³, Grayce K. B. Silva ⁴, Patrícia M. de Souza ⁴, Kaoru Okada ⁴,
Clarissa D. C. Albuquerque ⁴, Carlos A. Alves da Silva ⁴ and Galba M. Campos-Takaki ^{4,*}

¹ Master's Course in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50050-900 Recife, PE, Brazil; E-Mails: nadi.elly@hotmail.com (N.R.A.S.); macluna@bol.com.br (M.A.C.L.)

² Academic Unit of Serra Talhada-UAST, Federal Rural University of Pernambuco, 56900-000 Serra Talhada, PE, Brazil; E-Mail: andrelcabral@msn.com

³ Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brazil; E-Mail: lucianafranco@terra.com.br

⁴ Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590 Recife, PE, Brazil; E-Mails: grayce_kelli@yahoo.com.br (G.K.B.S.); tyttams@hotmail.com (P.M.S.); kao@unicap.br (K.O.); albqqs@yahoo.com.br (C.D.C.A.); calves@unicap.br (C.A.A.S.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: galba_takaki@yahoo.com.br; Tel.: +55-81-2119-4017; Fax: +55-81-2119-4043.

Received: 25 February 2014; in revised form: 22 May 2014 / Accepted: 21 July 2014 / Published: 1 September 2014

Abstract: A Mucoralean fungus was isolated from Caatinga soil of Pernambuco, Northeast of Brazil, and was identified as *Cunninghamella echinulata* by morphological, physiological, and biochemical tests. This strain was evaluated for biosurfactant/bioemulsifier production using soybean oil waste (SOW) and corn steep liquor (CSL) as substrates, added to basic saline solution, by measuring surface tension and emulsifier index and activity. The best results showed the surface water tension was reduced from 72 to 36 mN/m, and an emulsification index (E_{24}) of 80% was obtained using engine oil and burnt engine oil, respectively. A new molecule of biosurfactant showed an anionic charge and a polymeric chemical composition consisting of lipids (40.0% w/w), carbohydrates (35.2% w/w) and protein (20.3% w/w). In addition, the biosurfactant solution (1%) demonstrated its ability

for an oil displacement area (ODA) of 37.36 cm², which is quite similar to that for Triton X-100 (38.46 cm²). The stability of the reduction in the surface water tension as well as of the emulsifier index proved to be stable over a wide range of temperatures, in pH, and in salt concentration (4%–6% w/v). The biosurfactant showed an ability to reduce and increase the viscosity of hydrophobic substrates and their molecules, suggesting that it is a suitable candidate for mediated enhanced oil recovery. At the same time, these studies indicate that renewable, relatively inexpensive and easily available resources can be used for important biotechnological processes.

Keywords: *Cunninghamella echinulata*; agroindustrial substrates; biosurfactant; bioemulsifier; spread oil; reduction in viscosity; polymeric molecule

1. Introduction

Biosurfactants were first discovered as extracellular compounds of fermentation by bacteria but which have both clearly defined hydrophilic and hydrophobic groups. Initially they were regarded as interesting due to their ability to increase the solubility of insoluble or poorly soluble hydrocarbons. They occur in nature in bacteria, yeasts, and filamentous fungi [1].

However, there are few filamentous fungi that produce biosurfactants from renewable sources. An overview of biosurfactants produced by reported bacterial species is well investigated, however relatively fewer fungi are known to produce biosurfactants [2]. Among fungi, *Candida bombicola* [3–6], *Candida lipolytica* [7–9], *Candida sphaerica* [10,11], *Candida ishiwadae* [12], *Candida batistae* [13], *Aspergillus ustus* [14], *Ustilago maydis* [15], and *Trichosporon ashii* [16] have been investigated. Many of these are known to produce biosurfactants from low cost raw materials. The four main classes of biosurfactant are: (a) glycolipids; (b) phospholipids; (c) lipoproteins or lipopeptides; and (d) polymeric biosurfactants. The best known glycolipids produced by these strains are sophorolipids [2].

Biosurfactants are amphiphilic surface active compounds produced by a variety of micro-organisms, with an attractive and environmentally acceptable industrial market due to their properties, and are mainly applied in enhanced oil recovery [17].

Biosurfactants are considered superior to chemically synthetic products due to their origin, structural diversity, greater substrate selectivity, low critical micelle concentration, biodegradability and low toxicity. In recent years, these advantageous features and biomolecules have gained prominence in the therapeutic and biomedical sector, and are used in pharmacological and dermatological products, and in the agricultural, food and cosmetics industries [18,19]. Biosurfactants have properties such as antimicrobial activity, and anti-adhesive activity against pathogenic microorganisms [20,21].

The chemical compositions of biosurfactants are described as glycolipids, lipopeptides, phospholipids, fatty acids, lipopolysaccharides, protein complexes, neutral lipids, and polymers [19,22].

Biosurfactants are considered extracellular secondary metabolites or associated with the cell membrane, the structure of which depends on the ratio of carbon and nitrogen sources. This has a strong influence on total production [21,23].

Patents on producing biosurfactants at an industrial level have increased, as have those that exploit the biodiversity of microorganisms for biotensioactive production, or to produce bioemulsifiers from renewable sources [20,24,25].

However, the use of these biomolecules is limited since the cost of production is high, and the production potential is low [9,26,27]. In order to raise the productivity of biosurfactant, several researchers have suggested: optimizing the bioprocess; statistical methods; using low cost, raw materials; and noted that greater availability of waste varies from country to country [25,28,29].

Thus, the literature affirms that the successful production of a tensioactive material depends on the use of renewable substrates from biotechnological processes as this cuts total costs by around 50%, despite the purification process being another obstacle to producing these compounds from a microbial origin [11,30–32].

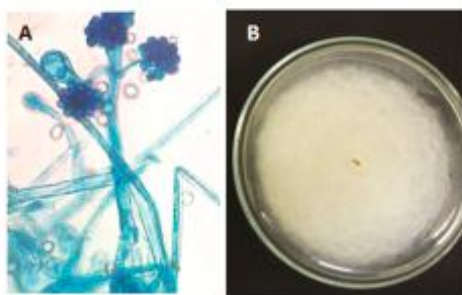
In this study, an isolate of indigenous fungus from Caatinga soil of Pernambuco, Brazil is shown to be capable of producing a new biosurfactant/bioemulsifier molecule. The isolated fungus was identified by morphological and physiological studies and biosurfactant/bioemulsifier production was investigated using corn steep liquor (CSL) and soybean oil waste (SOW) which are agroindustrial wastes. In addition, some properties of the biosurfactant/bioemulsifier were investigated to confirm what the commercial prospects are and their applicability.

2. Results and Discussion

2.1. Description of the Isolate of *Cunninghamella echinulata*

The isolated fungus from caatinga soil was seen to have pale cream to light brown, cottony colonies; its sporophores present primary monopodial, pseudoverticillate, rarely verticillate branches; Long and short ramifications can arise from the same sporophore, which can form single branches or be branched several times. Two types of sporangioles were observed: (1) subhialines or hyaline, ellipsoid equimulates with some punctates in one end, 8.5 to 17.5 – 21.5×7 to 13.5 – 15.5 μm or globose (8 – 14.5 μm in diameter); (2) sporangioles, in common, only globose, 8.5 to 19.5 – 27 μm in diameter which were obviously equimulates and dark, giant, long, thin spines in older cultures. The fungus was identified as *C. echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee, as per Zeng and Chen [33].

Figure 1. Light microscopic and macroscopic characteristics of *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil of Northeastern Brazil. Photographes of light microscopy (A) and growth on Sabouraud dextrose agar (B).



Cunninghamella echinulata colonies display fast-growing at temperatures of 28 to 45 °C, develop well at pH 4, 7 and 9, and have a salinity level of up to 15%. The growth of the colony has a velvety appearance with a white coloring, as does the reverse of the colony. The light microscopy culture showed hyphae without septum, many vesicles, and single and short sporophores; its features can be observed in Figure 1A,B and these data are in agreement with that found in the literature [34,35].

2.2. Time-Course of Growth, Carbohydrate Consumption, pH, and Biosurfactant Production

In this study, two residues—corn steep liquor (CSL) and soybean oil waste (SOW)—were used as carbon and nitrogen sources in the saline solution to produce biosurfactant by *C. echinulata*, grown within 96 h, using a full 2³ factorial design, with its dependent and independent variables and their values. The results demonstrated that the fungus had the ability to reduce surface tension, and the best condition was confirmed using SOW (3% w/v) and CSL (4% w/v) and NaCl (7% w/v), described in Table 1. From this selected condition, all analyses to investigate the biosurfactant production were performed.

According to the literature, there are few fungi that can be effective in reducing surface tension in relation to bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*, which have the most significant results with regard to reducing such tension. However, yeasts demonstrate consistent values of tensioactives [2,36]. The best biosurfactant production achieved by *Fusarium* sp was BS-8 and this reduced the water surface tension from 72 to 32 mN/m under the condition pH 7.0, temperature 30 °C [37].

The carbon and nitrogen sources, in addition to the association with the basic solution of salts and trace elements, influenced the type and properties of biosurfactants, such as biomass accumulation. The literature describes various alternative hydrophilic and hydrophobic substrates, such as additional sources of carbon and nitrogen for synthesizing biomolecules. In this study, similar conditions were used, namely SOW as hydrophobic and CSL as hydrophilic substrates [38–40].

The study demonstrated a profile of growth in the first 48 h, with slight modifications until the end of cultivation (Table 1). The fungus is able to use the vegetable oil (SOW) as a carbon source that provides additional effect to biomass and the process of inducing biosurfactant production. The literature reports that biosurfactant production occurred by activating the genes responsible for their biosynthesis, and also by providing fatty acids that lengthen the lipid chain in the hydrophobic domain [41].

Table 1. Time-course of growth, pH, carbohydrate consumption and biosurfactant production using industrial wastes (corn steep liquor—CSL and soybean oil waste—SOW).

Time (h)	Biomass (g·L ⁻¹)	pH	Carbohydrate Consumption (g·L ⁻¹)	* Biosurfactant Surface Tension (mN/m)
24	15.0	5.0	2.30	42.9
48	30.0	5.7	1.72	41.0
72	31.0	7.1	0.17	37.0
96	32.0	7.1	0.07	36.0

* Surface tension of water: 72 mN/m and the average was 65 mN/m.

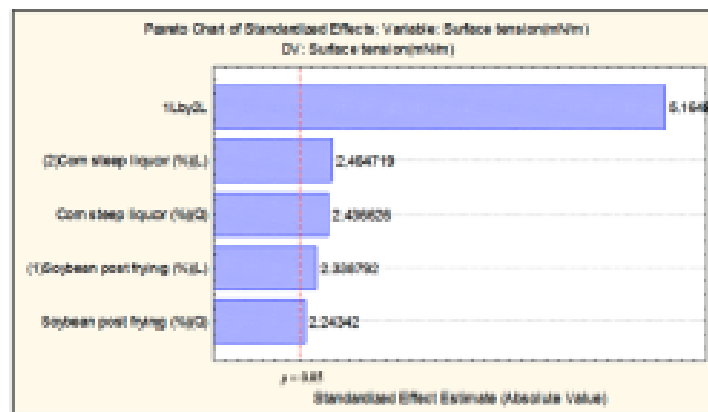
The growth in the first 48 h of culture reached a maximum value of 30.0 g·L⁻¹, and slightly increased thereafter until 96 h. The surface tension decreased at 48 h of growth with values less than 40 mN/m, and continuously decreased to 36.0 mN/m. The pH is a factor that also determines the production of biomolecules, scales ranged from *Candida* species 5.0, 5.7, 6.0 and 7.8. However, *Pichia anomala* and *Aspergillus ustus* MFS3 showed maximum production with values in 7.0 and 5.5 pH, respectively. Thus, the production of tensioactives becomes feasible if it is possible to use low cost substrates that enable the biotechnological process [2,13,14,37–39].

The production of the biosurfactant is also influenced by the length of incubation, and various microorganisms are able to produce at different intervals of time as observed for *Aspergillus ustus* after 5 days, *Fusarium* sp. BS after 8 to 15 days, and *Candida bombicola* after 7 to 11 days of incubation [1,37,42].

The *C. echinulata* growth in such working conditions is related to the consumption of the sources offered by SOW and CSL residues. At the same time, the production of biosurfactant showed the surface tension reduced gradually during the 96 h of cultivation (Table 1).

Figure 2 illustrates the Pareto chart, with a 95% confidence level, for the estimated effects of CSL and SOW in reducing the surface tension. It was seen that the interaction of the two substrates CSL (hydrophilic) and SOW (hydrophobic) at 3% SOW and 4% CSL, and 7% of NaCl had a significant influence on reducing the surface tension. Both substrates were statistically significant for biosurfactant production by *C. echinulata*. These results are in accordance with the literature that affirms that physiological biosurfactant production is associated with the assimilatory mechanism in response to exposure to hydrophobic substrates [1,2,17].

Figure 2. Pareto Chart of standardized effects of the cell-free broth by *Cunninghamella echinulata* after 96 h of cultivation for the 2³ full experimental factorial designs on surface tension. The point estimates the statistical significance (at $p = 0.05$).



2.3. Emulsification Characteristic of the Biosurfactant

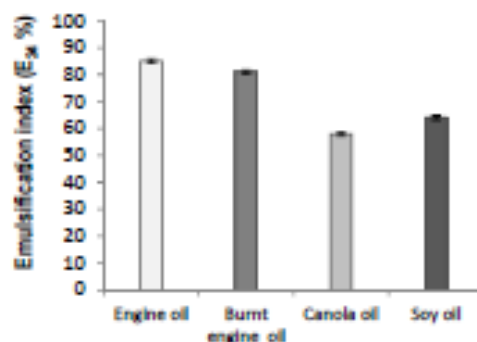
During the past two decades, biosurfactants have been under continuous investigation as a potential replacement for synthetic surfactants. Due to their having properties such as biodegradability, environmental compatibility, low toxicity, high selectivity and specific activity at extreme temperatures,

pH and salinity, they have steadily gained in significance in industrial and environmental applications such as bioremediation, soil washing, enhanced oil recovery and other general oil processing and related industries [22–25,28,30].

Amiriyani *et al.* [39] suggested that emulsifier activity depends on the affinity of bioemulsifier for hydrocarbon substrates which involves a direct interaction with itself rather than an effect on surface tension of the medium. In the present study, a consistent emulsion was formed with the hydrophobic substrates of burnt engine oils and engine oils, and showed values above 80%. However, the vegetable oils of canola and soybean showed values near 60% (Figure 3). The supplementary Figure S1 was used as control of emulsification activity by culture medium; and the Figure S2 showed stable emulsion to four hydrophobic substrates using the CMC (20 g/L) of the isolate biosurfactant produced by *C. echinulata* forming 65%, 70%, 80% and 85% index (E_{24}) to soybean oil, canola oil, motor oil and burnt motor oil, respectively.

Among the various bioactive compounds, biosurfactant (BS)/bioemulsifiers (BE) are attracting major interest and attention due to their structural and functional diversity. Our results show the bioemulsifier (BE) property of the biosurfactant (BS) produced by *C. echinulata*, a compound which compound comprises the polar and nonpolar moieties of the molecule and is able to emulsify biphasic systems (water and oil). The emulsification values obtained were compatible with those of the fungal and bacterial bioemulsifiers described in the literature [2,9,10,37,43].

Figure 3. Emulsifier Index (E_{24}) of the biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* using corn steep liquor (CSL) and soybean oil waste (SOW) tested with engine oil, burnt engine oil, canola and soy oil.

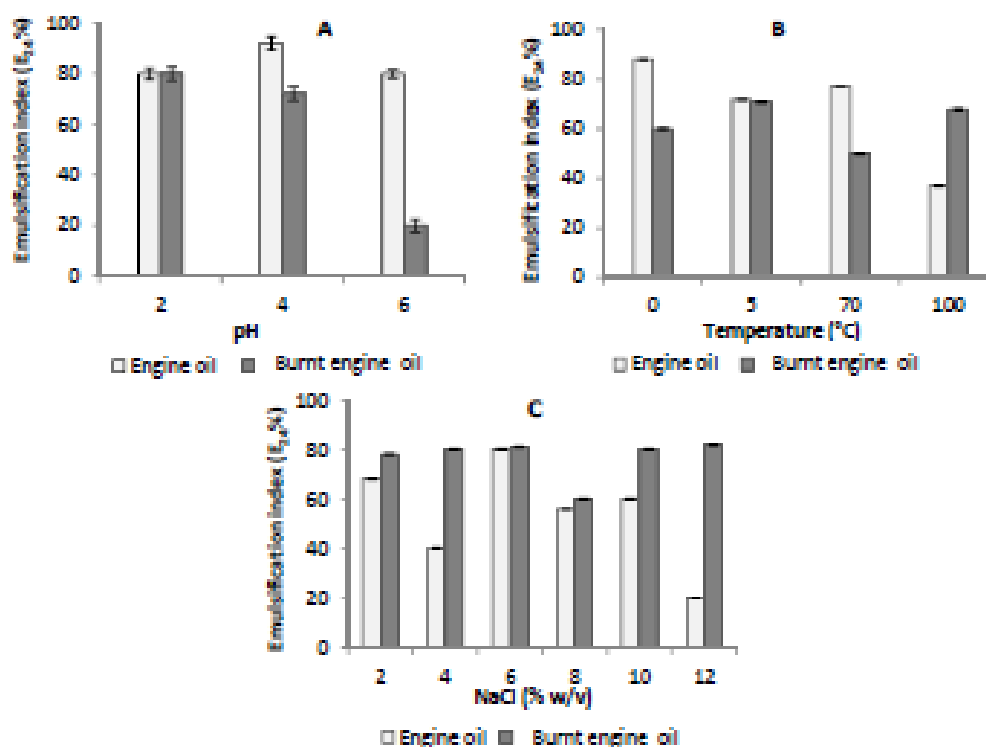


2.4. Stability Studies

As observed in Figures 4A–C and 5A–C, the biosurfactant stability results of some of these results are quite impressive compared to those of the most potent biosurfactant described in the literature [44–46].

The stability of the surface tension and emulsifier index are important factors for using biosurfactants under specific environmental conditions. The ability to reduce the surface and interfacial tension is a key parameter for detecting the production of surface-active compounds. On the other hand, the formation of emulsion is also an indicator of the emulsifier property of isolated biosurfactant [47–49].

Figure 5. Stability of bioemulsifier of the biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* using CSL (corn steep liquor) and SOW (soybean oil waste). Studies of the effect of pH (A); temperature (B); and sodium chloride concentrations (C) on emulsifier index (E_{50}).



At different NaCl concentrations, the biosurfactant was stable throughout the emulsification activity. Values correspond to 50% of burnt motor oil, although the engine oil showed values lower than 40% in the concentrations of 4 and 12. The major increase of biosurfactant emulsification for the two oils (engine and burnt engine) suggested that this depends on the affinity for substrates, as shown in Figure 5C. The results obtained for the emulsification index are corroborated as is the interaction of the hydrophobic portion of the biosurfactant with hydrocarbon substrates, according to Shavandi *et al.* [51].

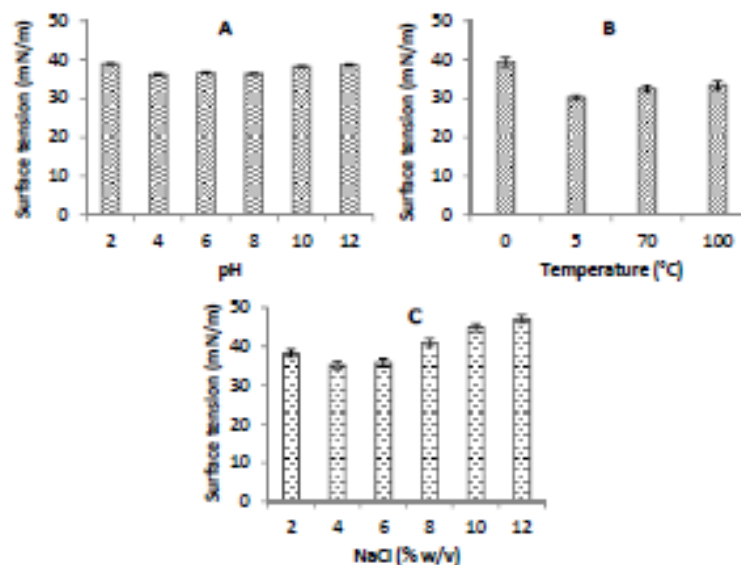
2.5. Yield, CMC, Ionic Charge and Preliminary Chemical Composition of Biosurfactant

The results obtained showed a higher yield of $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of isolated biosurfactant produced by *C. echinulata*. These results show that the Mucoralean fungus *C. echinulata* is an excellent tensioactive/bioemulsifier producer, when compared with fungi mentioned as producing biosurfactant from renewable sources such as glycerol, oleic acid and other wastes [1,3,52].

The chemical characterization of the isolate molecule of the biosurfactant showed the presence of lipids (40%), carbohydrates (35.2%) and proteins (20.3%). The biosurfactant showed an anionic profile by Zeta meter with -64.9 ZPmv , $4.13 \text{ }\mu\text{S}/\text{cm}$ at $26.4 \text{ }^\circ\text{C}$, full scale. The zeta potential determines the function of the surface charge of the particle that serves to predict and control the

The effects of temperature, pH and salinity concentration are factors that influenced the activity and stability of the emulsifier index and surface tension due to the presence of their functional groups and are important properties of the biosurfactant produced by *C. echinulata* (Figures 4 and 5). These results obtained for biosurfactant produced by *C. echinulata* showed that the cell-free broth was thermally stable. When the pH was gradually increased, there was a noticeable stability in the surface tension value until pH 12 was observed. The cell-free broth of *C. echinulata* was adjusted for various pH in the range 2–12 at room temperature, following which the surface activities were measured. The surface tensions remained practically uniform at all pHs, indicating that variation in pH had no appreciable effect on surface tension or the emulsifier index.

Figure 4. Stability of surface tension of biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* using corn steep liquor (CSL) and soybean oil waste (SOW). Influence of pH (A); temperature (B); and sodium chloride concentrations (C) on surface tension stability.



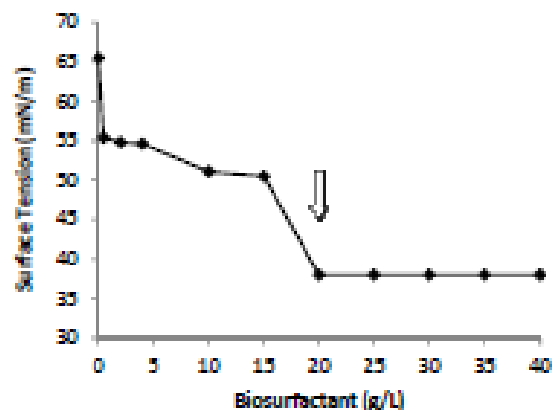
However, a small change was observed at pH 12 which must be the consequence of the denaturation of proteinaceous compounds of the biosurfactant under extreme pH, as suggested by Ghurye *et al.* [50]. However, the variations in salt concentration values were stable at 8% and 10%. Similar behaviors regarding stability were also observed for the biosurfactants produced by *Fusarium sp* [37], *Candida lipolytica* [8], and *Candida sphaerica* [11]. Changes were observed with the increase of sodium chloride effects.

The stability of the biosurfactant *C. echinulata* at different temperatures was tested and demonstrated to be stable during one hour of incubation at 0–100 °C as shown in Figure 4B. The stability was maintained in both oils at 5 °C, using the engine oil, and showed a maximum efficiency of 80% while increasing the temperature decreases the index. However, the burnt engine oil results showed a maximum efficiency of over 60% when the temperature reached 100 °C.

stability of colloidal suspensions and emulsions, and confirmed the higher values obtained, indicating good stability by repulsion between hydrophilic particles, as per the literature [45,47,53].

The critical micelle concentration (CMC) is the minimum biosurfactant concentration needed to reduce the surface tension to the maximum extent. The biosurfactant from *C. echinulata* showed a great capacity for reducing surface tension since the water surface tension was reduced from 70 to 36 mN/m when the CMC was increased to 20 g/L (Figure 6). Above this point, increasing the biosurfactant concentration did not lead to further reductions in water surface tension, thus indicating that the CMC had been reached. The results obtained show that the biosurfactant produced by *C. echinulata* possesses an increased capacity to reduce tension as compared to the biosurfactants produced by yeasts [2,8–11].

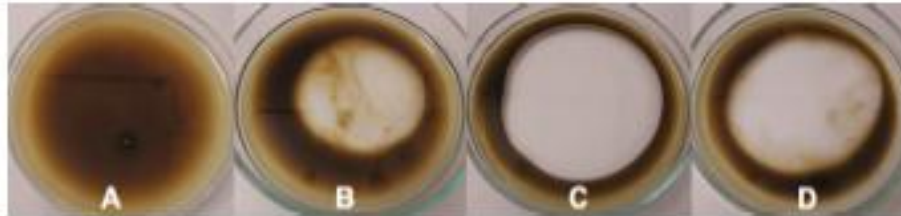
Figure 6. Surface tension versus concentration of isolated biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* grown in soybean oil waste (SOW) and corn steep liquor (CSL) as substrates, added to basic saline solution on the Critical Micelar Concentration (CMC).



2.6. Oil Displacement Area-ODA

Figure 7A–D shows oil displacement area results. These results indicated a low area was formed when water was added, corresponding to 0 (Figure 5A), using commercial detergent resulted in 19.52 cm² (Figure 5B), the use of Triton X-100 (1%) in 38.46 cm², (Figure 5C), and the application of the biosurfactant produced by *C. echinulata* (1%) in a 37.36 cm² oil displacement area (Figure 5D). However, there is little information about oil displacement areas (ODA) brought about by biosurfactants produced by filamentous fungi in the literature. However, *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) were grown in ISM medium supplemented with vegetable oils but this failed to produce active biosurfactants, while in the presence of molasses they were able to produce surfactants of 51.2 ± 3.5 and 32.1 ± 2.7 cm² ODA, respectively. The same authors reported that *Pseudomonas aeruginosa*, grown in ISM medium supplemented with waste oil, was able to produce biosurfactant and an ODA corresponding to 45.3 ± 2.8 cm² [54].

Figure 7. Oil displacement area formed according to substrates: (A) Burnt engine oil + distilled water; (B) Burnt engine oil + commercial detergent; (C) Burnt engine oil + Triton X-100 (1%); and (D) Burnt engine oil + isolated biosurfactant (1%) produced by *Cunninghamella echinulata*.



2.7. Effect of the Biosurfactant on Viscosity

We determined the viscosity in Engine oil, Burnt Engine oil, Diesel, Biodiesel, Canola oil, Corn oil, Soybean oil, Soybean waste oil, Sunflower oil, Palm oil, Rice oil, Mineral oil and Water (Control) isolate and after adding biosurfactant isolate from *C. echinulata*. The centipoise (cP) and percentage (%) of the hydrophobic substrates was determined before and post solubilisation by using biosurfactant at 1% solution for 30 min. The best results were achieved when biosurfactant was used. Viscosity decreased as follows: Engine oil from 736.6 to 179.0 cP; Diesel from 159.1 to 43.8 cP; Canola oil from 374.0 to 110.9 cP, and Castor oil from 187.9 to 185.4 cP (Table 2).

Table 2. Influence of the biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* in the viscosity of hydrophobic substrates

Hydrophobic Substrates	Viscosity without Biosurfactant		Viscosity with Biosurfactant	
	(cP)	(%)	(cP)	(%)
Engine oil	736.6	59.9	179.0	72.5
Burnt engine oil	148.9	48.3	210.7	87.9
Diesel	154.1	25.1	43.8	35.7
Biodiesel	36.0	29.3	51.3	41.9
Canola oil	374.0	60.8	110.9	78.5
Corn oil	47.6	38.8	404.0	66.1
Soybean oil	472.8	38.2	970.1	38.9
Soybean waste oil	380.1	61.9	556.3	45.3
Castor oil	187.9	75.1	185.4	61.6
Sunflower oil	355.5	57.6	493.3	40.9
Palm oil	403.0	67.7	536.3	45.1
Rice oil	459.9	74.8	461.1	75.2
Mineral oil	27.0	22.0	102.2	83.3
Water(Control)	0.9	0.9	1.3	1.1

The viscosity increased after adding biosurfactant as follows: Burnt engine oil from 148.9 to 210.7 cP; Biodiesel from 36.0 to 51.3 cP; Canola oil 374.0 to 110.9 cP; Corn oil from 47.6 to 404.0 cP; Soybean from 472.8 to 970.1 cP; Soybean waste oil from 380.1 to 556.3 cP; Sunflower oil from 355.5 to 493.3 cP;

Palm oil from 403.0 to 536.3 cP; Rice oil from 459.9 to 461.1 cP; Mineral oil from 27.0 to 102.2 cP and Water as Control. And sometimes the increase observed is justified because of the oils' properties, since they are consistent donors. Accordingly, the result of the biosurfactant produced by *C. echinulata* for cleaning oil contaminated plates is described. The results indicate two mechanisms that increase and decrease the viscosity using hydrophobic substrates when the new biosurfactant solution is used at CMC (20 g/L). The viscosity results suggest the new biosurfactant is a candidate for mediated enhanced oil recovery and other applications when it is necessary to increase viscosity and this is in accordance with the literature [55,56].

3. Experimental Section

3.1. Isolation, Identification and Preservation of the Microorganism

The isolation of the microorganism from Caatinga soil of the Pernambuco, Northeast of Brazil was carried out during the summer period. The isolation was performed using the successive dilution method soil/water (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}). The isolation of fungi was carried out using media: Martin (1.0 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4$, H_2O , 5.0 g peptone, 10 g dextrose; 0.03 g Rose Bengal; 16 g agar to 1000 mL of distilled water, with chloramphenicol 0.008%); Sabouraud dextrose agar (peptone 5 g, glucose 20 g, 15 g agar, 1000 mL distilled water, pH 6.5). Plates were incubated at 28 °C until colonies appeared and were then counted. The purified colonies were transferred to new Petri dishes containing a similar medium and incubated at 28 °C, at 5 days. After this period, the monosporic culture was transferred to test tubes containing Sabouraud dextrose agar and preserved at 5 °C. Each experiment was carried out in triplicate. Identification was made using the key to Mucoralean fungi given by [37]. The isolated and identified fungus was preserved by freeze-drying and freezing in glycerol solution.

3.2. Agroindustrial Substrates

The agroindustrial residues were kindly provided from Corn Products, (Cabo, PE, Brazil) (corn steep liquor-CSL) and from street stalls that sell hot food in Recife-PE (soybean waste oil-SOW).

3.3. Culture Conditions and Biosurfactant Production

The isolate of the fungus was inoculated in Petri dishes containing Potato dextrose agar medium and incubated at 28 °C for 72 h until sporulation. After this period, the sporangioles were counted (10^7 /mL) using a hemacytometer chamber, and aliquots of 5% (v/v) suspension were inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the medium for biosurfactant production (KH_2PO_4 2.0 g, $MgSO_4$ 1.0 g) and 1 mL/L elements of trace solution was added ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.63 mg, $MnSO_4$ 0.01 mg, $ZnSO_4$ 0.62 mg/L, pH 5.0). The substrates of soybean waste oil (SOW) and corn steep liquor (CSL) were used as agroindustrial substrates, according to factorial designs 2^2 . The flasks were incubated in an orbital shaker at 150 rpm, at 28 °C at 96 h. The cell-free metabolic liquid was obtained from centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min, and then filtered.

3.4. Kinetics of Growth and Biosurfactant Production

The growth of strains of *C. echinulata* was accompanied by a biomass and results were expressed in (g/L). Aliquots were collected at defined intervals of time and submitted to analysis to determine the biomass, total carbohydrate consumption, pH, surface tension, the stability of bioproducts, and to extract and characterize the biosurfactant. All experiments were performed in triplicate.

3.5. Determining the pH

Aliquots of the cell-free metabolic liquid were used to determine pH using an Orion potentiometer (Model 310) (Orion Research Inc., Cambridge, MA, USA).

3.6. Determining the Surface Tension

The surface tension was monitored for biosurfactant production from the cell-free metabolic liquid using a Tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland) by the Du Noury ring method at room temperature (± 28 °C), as per Kuyukina *et al.* [57]. Measurements of surface tension from distilled water and from the conventional medium were used as control.

3.7. Determining the Emulsification Index and Activity

To determine the percentage of emulsification, the samples removed after 96 h fermentation were centrifuged at $10,000\times g$ for 15 min and then analyzed according to the methodology described by Cooper and Goldenberg [58]. 1.0 mL of hydrophobic substrates and 2 mL of cell-free metabolic liquid containing the biosurfactant was added to a graduated tube, and the mixture was vortexed for 2 min. Hydrophobic substrates of engine oil and burnt engine oil were tested. The percentage of emulsification (E_{24}) index is given as percentage of height of emulsified layer (mm) divided by total height of the liquid column (mm).

3.8. Determining the Critical Micelle Concentration (CMC)

The critical micelle concentration of biosurfactant isolated during 96 h of cultivation was determined in aqueous solution. The surface tension was measured on an automatic tensiometer (model Sigma 70 KSV Ltd., Helsinki, Finland) using a platinum-iridium ring. The sample of the isolated biosurfactant was diluted in different concentrations, starting with a minimum concentration of 0.001 mg/mL until reaching the CMC was seen to have produced a surface tension of a constant value. A graph of the percentage concentration of biosurfactant (%) / TS (surface tension) was plotted.

3.9. Determining the Stability of the Biosurfactant

Stability studies were undertaken using the cell-free broth obtained after centrifuging the cultures at $10,000\times g$ for 15 min. Four milliliters of this broth were heated at 0, 5, 70, and 100 °C for 1 h, and cooled to room temperature, after which the surface tension and emulsification activity were measured. The surface tension and emulsification index of the broth were also determined after exposure at the same temperatures. To study the pH stability of the cell-free broth, its pH was adjusted to different

pH values (2–12) and the surface tension and emulsification activity were measured. The liquid-culture pH was adjusted with 1 M NaOH. The effect of NaCl concentrations (2%–12%) on reducing the surface tension and emulsification capacity of the cell-free culture broth were also determined. The tests were performed in triplicate.

3.10. Isolation of the Biosurfactant

The biosurfactant produced by *C. echinulata* was isolated by the precipitation method using the cell-free metabolic liquid with acetone 1:1 (v/v) as per Paraszkievicz *et al.* [20]. The precipitate was allowed to stand for 24 h at 4 °C, and after this period was centrifuged at 4000 rpm for 15 min, at 5 °C. The supernatant was discarded and the isolated biosurfactant was submitted to dialysis against deionized water, which was changed every 3 h, for 96 h at 5 °C. The biosurfactant was collected and freeze-dried [51].

3.11. Characterization of the Biosurfactant

Protein content in the isolated biosurfactant was estimated by total protein test kit from Labtest Diagnostica S.A., Minas Gerais, Brazil. The total carbohydrate content was estimated by the phenol-sulphuric acid method [59]. The lipid content was determined according to Manocha *et al.* [60].

3.12. Ionic Charge and Viscosity

The ionic charge of the biosurfactant was determined by using a Zeta potentiometer model ZM3-D-G, Zeta Meter System 3.0+, with direct images to the video of the Zeta Meter, San Francisco, CA, USA. The top row was filled with a pure compound of a known ionic charge. The substance is known as anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) at a concentration of (0.02 M) cationic substance and barium chloride (0.05 M). The Petri dish was kept at room temperature for 48 h. The result was calculated when the precipitation lines appear, as per Meylheuc *et al.* [61].

3.13. Oil Spread Test (Oil Displacement Area-ODA)

The oil spreading test was carried out using the methodology described by Diab and El Din [54] in order to evaluate the effect of the biosurfactant on the oil displacement area. Twenty milliliter of burnt engine oil was placed on each Petri dish (9 mm diameter), and this was followed by spreading 1 mL of distilled water (A), 1 mL of commercial detergent (B), 1 mL of synthetic surfactant Triton X-100 (C), and 1 mL of crude biosurfactant produced by *Cunninghamella echinulata* (D) in the centre of a film of oil. The Petri dishes were incubated at room temperature (28 °C) for 24 h. After this period, the diameters of clear zones of the assays were measured in cm². Distilled water was used as control. All data were reported as the range of triplicate samples. The diameter of the clear zone formed was calculated as an oil displacement area (ODA) according to Morikawa *et al.* [62] using the following equation [60]: $ODA = 22/7 (\text{radius})^2 \text{ cm}^2$.

3.14. Determining Oil Viscosity

In order to investigate the effects that the biosurfactant produced on the viscosity, tests were carried out at a fixed volume of 6 mL. These viscosities were measured at 25 °C using a standard viscometer (Brookfield (Middleboro, MA, USA) TC 500). The hydrophobic substrates of Engine oil, burned engine oil, Diesel, Biodiesel, Corn oil, Coconut oil, Mineral oil, Soybean oil, Soybean post-frying oil and water as control were tested. In the same sequence as the hydrophobic substrates we added 2 mL of biosurfactant solution at 1.0% (w/v), which was vortexed for 1 min. and the viscosity was measured again. The viscosity results were expressed in cP and %.

3.15. Statistical Analysis

In order to verify the effect of independent variables (the concentrations of industrial residues, corn steep liquor-CSL and soybean oil waste-SOW) on biosurfactant production, a complete factorial design 2^2 , with three central values, was used (Table 3). The results were then examined to determine the main effects of all factors and tests were performed to determine which factors are statistically significant. Analysis and graphs of the data, and all calculations were performed using the Statistica version 7.0 software package (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), and the significance of the results was tested at ($p \leq 0.05$).

Table 3. Level and factors applied to the factorial design compound 2^2 .

Parameters	(-1.68)	(-1)	0	(+1)	(+1.68)
Soybean oil waste (SOW) (%)	0.62	3.00	6.50	10.00	12.38
Corn steep liquor(CSL) (%)	2.64	4.00	6.00	8.00	9.36

4. Conclusions

The new biosurfactant produced by the Mucoralean fungus *C. echinulata*, besides being a good surfactant, has attractive properties as a tensioactive and emulsifier compound. The biosurfactant has several properties and it is not affected by temperature, pH, nor the sodium chloride concentration. The preliminary biochemical composition suggests that the molecule is a new polymeric biosurfactant, comprising lipids (40%), carbohydrates (35.2%) and proteins (20.3%). The biosurfactant induced a larger oil displacement area using burnt engine oil, and reduced viscosity. These are characteristics that are desirable for industrial processes, given that it has several properties which could be attractive and is a potent emulsifier and surface-active compound which are useful in many fields of industry. This approach to the biosurfactant produced by *C. echinulata* represents a promising, simple and cost effective tool for treating the oily sludge generated during the periodical cleaning of oil storage tanks and by other petroleum industries, and has other applications when an increase in viscosity is necessary.

Supplementary Materials

Supplementary materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/9/15377/s1>.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development-CNPq (Brasilia-D.F., Brazil) (563382/2010-4-SISBIOTA and 308245/2010-5 G.M.C.T.), and the Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco-FACEPE (Recife-PE., Brazil) (APQ N°.0086-2.12/11, and Master fellowship), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Education, Brasilia-D.F., Brazil). The authors are grateful to Corn Products (Cabo de Santo Agostinho-PE, Brazil) who kindly provided the substrate corn steep liquor. The authors are grateful for the CNPq-fellowship awarded to the technician Severino Humberto de Almeida, and also to the Catholic University of Pernambuco for the use of laboratories.

Author Contributions

Nadielly R. Andrade Silva: Development and execution of the all subjects, fungal isolation, stability of biosurfactant, viscosity tests, revision, writing and discussion of the results (Master Course).

Marcos A. C. Luna: Support to stability of biosurfactant.

André L. C. M. A. Santiago: Support to identification of *Cunninghamella echinulata*.

Luciana O. Franco: Support to identification the area for collect the soil from Caatinga of Pernambuco (PE-Brazil) and abiotic factors tests.

Grayce K. B. Silva: Support to fungal isolation, stability and oil displacement area-ODA.

Patrícia M. de Souza: Support to bioemulsification tests.

Kaoru Okada: Support to fungal physiology for biosurfactant production.

Clarissa D. C. Albuquerque: Support to factorial designs for biosurfactant production.

Carlos A. Alves da Silva: Co-supervisor N.R.A. Silva: Support to chemical analysis for identification of biosurfactant composition and discussion of the results.

Galba M. Campos-Takaki: Supervisor N.R.A. Silva, scope of the paper, Fermentative process using wastes as carbon and nitrogen sources for biosurfactant production, revision and discussion of the results.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kitamoto, D.; Morita, T.; Fukuoka T.; Konishi, M.; Imura, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 315–328.
2. Bhardwaj, G.; Cameotra, S.S.; Chopra, H.K. Biosurfactants from Fungi: A Review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* **2013**, *4*, 160–166.
3. Felse, P.A.; Shah, V.; Chan, J.; Rao, K.J.; Gross, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzym. Microb. Technol.* **2007**, *40*, 316–323.
4. Deshpande, M.; Daniels, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour. Technol.* **1995**, *54*, 143–150.

5. Casas, J.A.; Garcia de Lara, S.; Garcia-Ochoa, F. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzym. Microb. Technol.* **1997**, *21*, 221–229.
6. Williams, K. Biosurfactants for cosmetic applications: Overcoming production challenges. *MMG 445 Basic Biotechnol.* **2009**, *5*, 78–83.
7. Sarubbo, L.A.; Farias, C.B.; Campos-Takaki, G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Curr. Microbiol.* **2008**, *54*, 68–73.
8. Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *23*, 729–734.
9. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A.; Rodrigues, L.R.M.; Teixeira, J.A.C.; Campos-Takaki, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surf. B* **2011**, *84*, 1–5.
10. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Albuquerque, C.D.C.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Economic Optimized Medium for Tensio-Active Agent Production by *Candida sphearica* UCP0995 and Application in the Removal of Hydrophobic Contaminant from Sand. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2463–2476.
11. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphearica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surf. B* **2013**, *102*, 202–209.
12. Thanomsab, B.; Watcharachaipong, T.; Chotelersak, K.; Arumrattiyakorn, P.; Nitoda, T.; Kanzaki, H. Monoacylglycerols: Glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 588–592.
13. Konishi, M.; Fukuoka, T.; Morita, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J. Oleo Sci.* **2008**, *57*, 359–369.
14. Kiran, G.S.; Hema, T.A.; Gandhimathi, R.; Selvin, J.; Thomas, T.A.; Rajeetha Ravji, T.; Natarajaseenivasan, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf. B* **2009**, *73*, 250–256.
15. Alejandro, C.S.; Humberto, H.S.; Maria, J.F. Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, *5*, 2512–2523.
16. Chandran, P.; Das, N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **2010**, *2*, 6942–6953.
17. Chandankere, R.; Yao, J.; Choi, M.M.F.; Masakorala, K.; Chan, Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *74*, 46–53.
18. Gudiña, R.; Rangarajan, V.; Sen, R.; Rodrigues, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 667–675.
19. Donio, M.B.S.; Ronica, S.F.A.; Thanga Viji, V.; Velmurugan, S.; Adlin Jenifer, J.; Michaelbabu, M.; Citarasu, T. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2013**, *6*, 873–886.

20. Rodrigues, L.R.; Teixeira, J.A.; Mei, H.C.; Oliveira, R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf. B* 2006, 49, 79–86.
21. Janek, T.; Lukaszewicz, M.; Krasowska, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf. B* 2013, 110, 379–386.
22. Pacwa-Plociniczak, M.; Plaza, G.A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S.S. Review Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 633–654.
23. Ron, E.Z.; Rosenberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002, 13, 249–252.
24. Mukherjee, S.; Das, P.; Sen, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 2006, 24, 509–515.
25. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 2011, 1, 5–24.
26. Solaiman, D.; Ashby, R.; Zerkowski, J.; Foglia, T. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. *Biotechnol. Lett.* 2007, 29, 1341–1347.
27. Batrakov, S.G.; Konova, I.V.; Sheichenko, V.I.; Galanina, L.A. Glycolipids of the filamentous fungus *Absidia corymbifera* F-295. *Chem. Phys. Lipids* 2003, 123, 157–164.
28. Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53, 495–508.
29. Nitschke, M.; Costa, S.G. Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 2007, 18, 252–259.
30. Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.G.; Fracchia, L.; Smyth, T.J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87, 427–444.
31. Rocha e Silva, N.M.P.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2014, 3, 132–139.
32. Santos, S.C.; Fernandez, L.G.; Rossi-Alva, J.C.; Roque, M.R.A. Evaluation of substrates from renewable resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. *Appl. J. Biotechnol.* 2010, 9, 5704–5711.
33. Zheng, R.Y.; Chen, G.Q. *Cunninghamella echinulata* (Thaxt.) Thaxt. ex Blakeslee var. *echinulata* and var. *verticillata* (Paine) comb. nov. *Mycosystema* 1996, 8, 1–13.
34. Domsch, K.H.; Gams, W.; Anderson, T.-H. *Compendium of Soil Fungi*; Academic Press: London, UK, 1980.
35. Zheng, R.Y.; Chen, G.Q. A monograph of *Cunninghamella*. *Mycotaxon* 2001, 80, 1–75.
36. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Campos-Takaki, G.M.; Sarubbo, L.A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron. J. Biotechnol.* 2013, 17, 34–38.

37. Qazi, M.A.; Subhan, M.; Nighat, F.; Ali, M.I.; Ahmed, S. Role of biosurfactant produced by *Fusarium* sp. BS-8 in enhanced oil recovery (EOR) through sand Pack column. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform.* 2013, 3, 6–10.
38. Sarubbo, L.A.; de Luna, G.M.; de Campos-Takaki, G.M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. *Electron. J. Biotechnol.* 2006, 9, 400–406.
39. Amiriyan, A.; Mazaheri Assadi, M.; Sajadian, V.A.; Noohi, A.A. Bioemulsan production by Iranian oil reservoirs microorganism. *Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.* 2004, 1, 28–35.
40. Fontes, G.C.; Amaral, P.F.F.; Coelho, M.A.Z. Biosurfactant production by yeasts. *Quim. Nova* 2008, 31, 2091–2099.
41. Morita, T.; Ishibashi, Y.; Fukuoka, T.; Imura, T.; Sakai, T.; Abe, M.; Kitamoto, D. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009, 73, 788–792.
42. Cavaleiro, D.A.; Cooper, D.G. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.* 2003, 103, 31–41.
43. Diab, A.; Din, S.G.E. Production and characterization of biosurfactants produced by *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. isolated from the rhizosphere soil of an egyptian salt marsh plant. *Nat. Sci.* 2013, 11, 103.
44. Deleu, M.; Paquot, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: New trends in surfactants. *Comptes Rendus Chim.* 2004, 7, 641–646.
45. Satpute, S.K.; Banpurkar, A.G.; Dhakephalkar, P.K.; Banat, I.M.; Chopade, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2010, 30, 127–144.
46. Youssef, N.H.; Duca, K.E.; Nagle, D.P.; Savager, K.N.; Kapp, R.M.; McInamey, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *J. Microbiol. Methods* 2004, 56, 339–346.
47. Pornsunthornthawee, O.; Wongpanit, P.; Chavadej, S.; Abe, M.; Rujiravanit, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 1589–1595.
48. Whang, L.M.; Liu, P.W.G.; Ma, C.C.; Cheng, S.S. Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 2008, 151, 155–163.
49. Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 2005, 133, 183–198.
50. Ghurye, G.L.; Vipulanandan, C.; Willson, R.C. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 1994, 44, 661–666.
51. Shavandi, M.; Mohebbi, G.; Haddadib, A.; Shakaramia, H.; Nuhic, A. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids Surf. B* 2011, 82, 477–482.
52. Kim, H.S.; Jeon, J.W.; Lee, H.W.; Park, Y.I.; Seo, W.T.; Oh, H.-M.; Katsuragi, T.; Tami, Y.; Yoon, B.-D. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* 2002, 24, 225–229.

53. Patil, J.R.; Chopade, B.A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 290–298.
54. Ali Diab, A.; El Din, S.G. Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil-contaminated vessels and enhancing the biodegradation of oily sludge. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* **2013**, *7*, 671–679.
55. Banat, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresour. Technol.* **1995**, *51*, 1–12.
56. Sen, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. *Prog. Energy Combust.* **2008**, *34*, 714–724.
57. Kuyukina, M.S.; Ivshina, I.B.; Makarov, S.O.; Litvinenko, L.V.; Cunningham, C.J.; Philip, J.C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environ. Int.* **2005**, *31*, 155–161.
58. Cooper, D.G.; Goldenberg, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 224–229.
59. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
60. Manocha, M.S.; San-Blas, G.; Centeno, S. Lipid composition of paracoccidioides brasilienses: Possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol.* **1980**, *177*, 147–154.
61. Meylheuc, T.; van Oss, C.J.; Bellon-Fontaine, M.N. Adsorption of biosurfactants on solid surface and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 822–832.
62. Morikawa, M.; Daido, H.; Takao, T.; Murata, S. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.* **1993**, *173*, 6459–6466.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).