



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

Daniele Gilvanise de Souza

**PRODUÇÃO DE QUITINA, QUITOSANA E
BIOSURFACTANTE, POR *Cunninghamella elegans*
UCP/WFCC 0542 EM MEIO SUPLEMENTADO COM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Recife

2015

Daniele Gilvanise de Souza

**PRODUÇÃO DE QUITINA, QUITOSANA E
BIOSURFACTANTE, POR *Cunninghamella elegans*
UCP/WFCC 0542 EM MEIO SUPLEMENTADO COM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki

Co-orientadora: Profa. Dra. Anabelle Camarotti Lima Batista

Recife

2015

S729p

Souza, Daniele Gilvanise de

Produção de quitina, quitosana e biossurfactante, por *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 em meio suplementado com resíduos agroindustriais / Daniele Gilvanise de Souza ; orientador Galba Maria de Campos Takaki ; co-orientador Anabelle Camarotti Lima Batista, 2015.

77, [17] f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Coordenação Geral de Pós-graduação. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2015.

1. Fungos filamentosos. 2. Biorremediação. 3. *Cunninghamella elegans*. 4. Quitosana. 5. Biopolímeros. 6. Quitina. 7. Mucorales. 8. Biossurfactantes. 9. Quitina. I. Título.

CDU 582.281.21

**PRODUÇÃO DE QUITINA, QUITOSANA E
BIOSSURFACTANTE, POR *Cunninghamella elegans*
UCP/WFCC 0542 EM MEIO SUPLEMENTADO COM
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Daniele Gilvanise de Souza

Examinadores:

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientador)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profa. Dra. Maria Aparecida Resende Stoianoff
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me mostrado todos os caminhos e me guiado ao longo da jornada da vida;

A minha mãe Gilvanise Adriana, mulher forte, guerreira e sábia, por ter me incentivado e insistido para que eu fizesse o mestrado, minhas avós Quitéria Gomes e Severina Cândida (*In memoriam*) por ser símbolo de força e sabedoria;

A minha família que sempre me apoiou em todas as decisões tomadas até o momento;

A Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP, e ao Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S.J., por proporcionar condições essenciais para a realização deste trabalho dentro das dependências da universidade;

A professora Dra. Galba Maria de Campos Takaki por ter aceitado me orientar desde a iniciação científica até o presente momento, por todo o apoio e ensinamentos ao longo destes quatro anos e pelos próximos que virão;

A professora Dra. Anabelle Camarotti, minha co-orientadora, por toda a atenção prestada no desenvolvimento e elaboração dos trabalhos científicos;

Aos professores Carlos Alberto Alves da Silva e Kaoru Okada pelos ensinamentos e orientações nas disciplinas de Metodologia da pesquisa e Seminários, fundamentais para o decorrer dos experimentos e construção da dissertação de mestrado;

Aos professores Clarissa Daisy, Valdemir Alexandre e Aline Elesbão pelo conhecimento transmitido nas disciplinas cursadas;

As amigas Amanda Simas, Camila Amorim, Karla Villela e Luciana Rodrigues que ouviram sem reclamar e se estressaram junto comigo no decorrer dos anos desde a graduação, ajudando sempre com palavras e conselhos;

As doutoras Marta Cristina Freitas Silva e Patricia Mendes Souza por terem me acolhido e co-orientado na Iniciação Científica, sou grata por todos os ensinamentos e momentos de descontração;

Ao amigo Yuri Max por todo o trabalho prestado com dedicação, as ajudas no decorrer dos trabalhos, por toda a paciência durante os quebra-galhos nesses últimos anos;

Aos colegas da maravilhosa nona turma do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais intitulada “Do molho Fuzzy ao Flotador”, agradeço pelos momentos de descontração durante as disciplinas cursadas e confraternizações;

As doutoras Thayse Alves e Rosileide Fontenele pela ajuda prestada na reta final, agradeço pela paciência e disposição tanto na execução de alguns experimentos quanto no esclarecimento de dúvidas;

Aos demais amigos pesquisadores do NPCIAMB: Grayce Kelli Barbosa, Jaceline Negreiros, Manuela Lins, Adriana Souza, Dayana Montero, Daylin Rubio, Nairane Rosa, Roberta Reis, Vanessa Assis, Raphael Nascimento, Débora Souza, Davi Cavalcant, Amanda Alencar, Carlos Villar, Marcelo Andrade, Cláudia Rocha, Marcos Luna, Fabíola Almeida, Nathalia Sá, Nadielly Silva, Jupiranan Ferreira, Henrique Freitas, Layla Mahnke, Kyriale Morant e a todos que contribuíram de forma direta e indireta em cada etapa;

Aos técnicos Severino Humberto de Almeida e André Felipe Santos Lima que sempre se dispuseram a ajudar ao longo destes anos, Sônia Maria de Souza, Hildes Alves e demais funcionários do NPCIAMB por toda a paciência, atenção e apoio no decorrer da pesquisa;

A CAPES e ao CNPQ pela concessão das bolsas de Mestrado e Iniciação Científica, sem a qual este trabalho não seria possível;

A todos que contribuíram tanto para a realização deste trabalho quanto para a minha formação pessoal e profissional, palavras são pouco para agradecer a todos! Minha eterna gratidão e que Deus abençoe a todos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	12
ABSTRACT	13
CAPÍTULO I	
1.1. Introdução	15
1.2. Objetivos	18
1.2.1. Objetivo Geral	18
1.2.2. Objetivos Específicos.....	18
1.3. Revisão da Literatura	19
1.3.1. Fungos filamentosos	19
1.3.2. Quitina	21
1.3.3. Quitosana	22
1.3.4. Aplicações comerciais da quitina e quitosana	24
1.3.5. Produção de quitina e derivados	24
1.3.6. Surfactantes e biossurfactantes	25
1.3.7. Tipos de biossurfactantes	27
1.3.8. Propriedades	33
1.3.9 Biorremediação	35
1.3.10 Resíduos agroindustriais	36

1.4. Referências Bibliográficas.....	41
CAPÍTULO II – Artigo científico: Produção de co-polímeros quitina e quitosana por <i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542 em meio suplementado com ácido glutâmico, milhocina e óleo de soja pós fritura.....	62
CAPÍTULO III – Artigo científico: Produção de biossurfactante por <i>Cunninghamella elegans</i> UCP 0542 utilizando como substratos resíduos agroindustriais e aplicação na remoção de petróleo e derivados.....	71
CAPÍTULO IV	
Conclusões Gerais.....	85
ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 01: Imagem espécie <i>Cunninghamella elegans</i> UCP/WFCC 0542 mantida em meio de manutenção e de sua estrutura de reprodução.....	20
Figura 02: Estrutura química da quitina e celulose.....	21
Figura 03: Estrutura química da quitina e quitosana.....	22
Figura 04: Arranjo das estruturas alfa quitina (a) e beta quitina (b).....	22
Figura 05: Representação esquemática da estrutura de um surfactante, contendo uma extremidade polar (hidrofílica) e uma cadeia apolar (hidrofóbica).....	25
Figura 06: Estrutura química da Surfactina, um lipopeptídeo sintetizado por <i>Bacillus subtilis</i>	27
Figura 07: Estrutura química da Lichenisina, um lipopeptídeo sintetizado por <i>Bacillus licheniformis</i>	28
Figura 08: Estrutura química de Rhamnolipídeos de cadeia mono e dissacarídeos.....	29
Figura 09: Estrutura química do biossurfactante trealolipídeo.....	29
Figura 10: Estrutura química do biossurfactante Sorofolipídeo.....	30
Figura 11: Estrutura química do biossurfactante polimérico Emulsan.....	31
Figura 12: Representação da formação de micelas.....	32

CAPÍTULO II

Figura 01: Análise comparativa por FT-IR do espectro entre quitosana crustácea e quitosana de <i>C. elegans</i> UCP/WFCC 0542.....	52
Figura 02: Espectroscopia de Infravermelho de quitina extraída da massa micelial de <i>C. elegans</i> UCP/WFCC 0542.....	52

CAPÍTULO III

Figura 01: Concentração micelar crítica do biossurfactante produzido por <i>C. elegans</i> UCP 0542.....	77
Figura 02: Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2 ² com duas variáveis	

independentes (1) milhocina (2) óleo de soja pós-fritura, tendo como variáveis resposta tensão superficial.....	78
Figura 03: Índice de emulsificação obtido pelo biossurfactante produzido por <i>C. elegans</i> UCP 0542.....	78
Figura 04: Estudo de estabilidade do biossurfactante produzido por <i>C. elegans</i> UCP/WFCC 0542: a – tolerância a pH; b – tolerância a força iônica; c – tolerância a temperatura.....	79
Figura 05: Ensaio de remoção de derivados do petróleo por biossurfactante de <i>C. elegans</i> UCP/WFCC 0542.....	79
Figura 06: Teste de fitotoxicidade do biossurfactante produzido por <i>C. elegans</i> em diferentes condições.....	80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 01: Aplicações comerciais de quitina e quitosana.....	23
Tabela 02: Utilização de milhocina como fonte nutricional na produção biotecnológica.....	36
Tabela 03 Utilização de óleo residual de fritura como fonte nutricional na produção biotecnológica.....	37

CAPÍTULO III

Tabela 01: Tensão Superficial de acordo com o planejamento DCCR 2 ² utilizando <i>C. elegans</i> UCP/WFCC 0542 após 96 horas de cultivo.....	76
Tabela 02: ANOVA obtida a partir do segundo delineamento central composto rotacional 2 ² para interação das variáveis independentes (milhocina e óleo de soja pós-fritura) e variável dependente (tensão superficial).....	77

RESUMO

Um dos grandes desafios na produção biotecnológica é a produção de insumos de alto valor agregado a um baixo custo. Neste contexto, o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* apresenta em sua parede celular grandes quantidades de quitina e quitosana, como também é capaz de produzir biossurfactantes. A quitina e quitosana apresentam um vasto campo de aplicações biotecnológicas, e na biorremediação vem sendo utilizado na remoção e recuperação de diferentes resíduos, biotransformação de poluentes e descoloração de efluente têxtil. Estes biopolímeros possuem estruturas lineares, com unidades monoméricas β -1,4-N-acetil-D-glicosamina e β -1,4-D-glicosamina, respectivamente. Por outro lado, os biossurfactantes são compostos sintetizados por micro-organismos, apresentando propriedades como a redução da tensão superficial e interfacial, emulsificação, solubilização e dispersão de fases, sendo muito aplicado na indústria petroquímica. Estudos com *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 foram realizados com objetivo de avaliar o seu potencial biotecnológico para a produção de quitina, quitosana e biossurfactante com a utilização de resíduos agroindustriais (milhocina e óleo de soja pós-fritura), através de um delineamento central composto rotacional de 2². Os biopolímeros quitina e quitosana foram obtidos através de tratamento alcali-ácido, com hidróxido de sódio 1M, e posterior emprego de ácido acético a 2%. As propriedades tensoativas do biossurfactante foram avaliadas pela determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células. A produção de biomassa por *C. elegans* foi de 8,12 g/L de com rendimentos de 0,095 mg/g de quitina e 0,036 mg/g de quitosana, com um grau de desacetilação de 87,44%, na condição proposta. O biossurfactante obtido na condição 8 do planejamento com 2,15% de milhocina e 5,22% de óleo de soja pós-fritura demonstrou a melhor tensão superficial com 28,20 mN/m⁻¹ e apresentou estabilidade frente a diferentes condições ambientais, possuindo caráter aniônico e sua composição bioquímica preliminar sugere que o biossurfactante isolado seja constituído por proteínas e lipídeos. Também este se mostrou eficiente na remoção de compostos hidrofóbicos derivados do petróleo, com remoção de 55,15% de óleo de motor, 71,42% de petróleo bruto, 77,46% de querosene e 96,41% de óleo diesel em areia de praia. Testes de toxicidade do biossurfactante com sementes de *Brassica oleracea* provaram seu caráter atóxico. Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico de *C. elegans* a partir substratos agroindustriais alternativos e de baixo custo, possibilitando o seu emprego em processo de biorremediação na recuperação ambiental.

Palavras-Chave: Biopolímeros, Tensoativos, Biorremediação, Mucorales, *Cunninghamella*.

ABSTRACT

One of the biggest challenges in biotechnological production is to produce high value-added products at a low cost. In this context, the filamentous fungus *Cunninghamella elegans* presents in its cell wall large amounts of chitin and chitosan, but is also able to produce biosurfactants. Chitin and chitosan has a vast field of biotechnological applications, and the bioremediation has been used in the removal and recovery of different waste, pollutant biotransformation and textile effluent discoloration. These biopolymers have linear structures with monomeric units β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine and β -1,4-D-glucosamine, respectively. Furthermore, the surfactants are compounds synthesized by micro-organisms having properties such as reducing surface and interfacial tension, emulsification, solubilization and dispersion phases, being widely applied in the petrochemical industry. Studies with *C. elegans* UCP/WFCC 0542 were performed in order to evaluate their biotechnological potential for the production of chitin, chitosan and biosurfactant with the use of agroindustrial residues (corn steep liquor and soybean oil waste), using a central composite design rotational 2². The biopolymers chitin and chitosan were obtained by alkali-acid treatment with 1M sodium hydroxide, and subsequent use of 2% acetic acid. The surface-active properties of the biosurfactant were evaluated by measuring the surface tension of the metabolic liquid cell-free. Biomass production by *C. elegans* was 8.12 g/L with yields of 0.095 mg/g chitin and 0.036 mg/g of chitosan with a deacetylation degree of 87.44% in the proposed condition. The biosurfactant obtained in condition 8 of planning with 2.15% of corn steep liquor and 5.22% soybean oil waste has demonstrated the best surface tension with 28.20 mN/m⁻¹ and showed stability against to different environmental conditions, having anionic character and its preliminary biochemical composition suggests that the isolated biosurfactant consists of proteins and lipids. Also this proved effective in the removal of petroleum derivatives hydrophobic compounds, removing 55.15% of motor oil, 71.42% of crude petroleum, 77.46% of kerosene and 96.41% of diesel oil in sand beach. Biosurfactant toxicity tests with *Brassica oleracea* seeds proved their non-toxic nature. The results show the biotechnological potential of *C. elegans* from alternative and low cost agroindustrial substrates, allowing its use in bioremediation process in environmental recovery.

Key Words: Biopolymers, Tensioactives, Bioremediation, Mucoralean, *Cunninghamella*

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUÇÃO

Os fungos são os principais precursores do ecossistema no ciclo do carbono, tendo importante função na biodegradação de matérias lignocelulósicas, na produção de enzimas hidrolíticas como hidrolases, proteases e amilases, e pigmentos como carotenoides e quinonas. Apresentam importante papel na indústria alimentícia no processamento de alimentos e bebidas através de enzimas hidrolíticas e fermentação láctica. Outro papel fundamental da utilização de fungos na indústria alimentícia é a produção de queijos do tipo Blue Cheese (Roquefort, Gorgonzola e Stilton), Camembert e Brie. São capazes ainda de atuar na biorremediação de solos e efluentes, degradando hidrocarbonetos e descontaminando águas através de sua capacidade de adsorção (SILVA, ESPOSITO, 2010; DURÁN, 2010; SIVAKUMAR, 2014; BERNARDES et al., 2014; KYZAS, BIKIARIS, 2015; CVANCAROVA et al., 2015).

A ordem Mucorales compreende exemplares de gêneros de grande interesse econômico: *Mucor*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, *Rhizopus*, e *Backusella*, que são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos industriais importantes como ácidos, etanol e enzimas. Espécies pertencentes ao gênero *Cunninghamella*, em particular *C. elegans*, *C. blakesleeana* e *C. echinulata*, têm sido empregadas extensivamente na transformação de drogas e xenobióticos através das vias oxidativas e conjugativas. Dentre os exemplos citados pelos autores estão a degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) fenantreno, fluoranteno, glutationa-S-transferase, aril sulfotransferase, UDP-glucosil e transferase-glucuronosil (ASHA, VIDYAVATHI 2009; MURPHY, 2015).

A quitina é um polímero linear, natural e insolúvel, que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4-N-acetil-D-glicosamina e, está presente na carapaça de alguns invertebrados como alfa-quitina ou beta-quitina, e na parede celular de fungos como gama-quitina (STAMFORD et al., 2012). A quitosana é um polissacarídeo natural composto por unidades beta (1-4)-D-glicosamina, originada da desacetilação da quitina. A quitosana pode se apresentar com diferentes graus de desacetilação, a depender da quantidade de grupos acetil que foram removidos da molécula quitina (CARDOSO et al., 2012; LATHA, SURESH, 2013; SANTOS et al., 2013; BERGUER et al., 2014). A quitina e a quitosana apresentam propriedades peculiares, podendo ser utilizadas com sucesso em uma grande variedade de aplicações, tais como na remoção e recuperação de diferentes resíduos, na biotransformação de pesticidas, na degradação de corantes, aminoácidos e proteínas. A quitosana pode ainda ser utilizada como clareador em sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação

de embalagens e cosméticos (CARDOSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LATHA, SURESH, 2013; BARIKANI et al., 2014; ALJAWISH et al., 2015).

A produção de co-polímeros quitina e quitosana por via microbiológica vem ganhando atenção dos acadêmicos nos últimos anos, sendo as principais representantes fontes de produção alternativa os fungos filamentosos pertencentes à divisão Zygomycotina e Ascomycotina que contém os dois polissacarídeos, quitina e quitosana, em abundância (SITANGGANG et al., 2010; LIU et al., 2013; PATIL, JADHAV, 2014; ALJAWISH et al., 2015). A produção microbiana apresenta vantagens, além da ausência de fatores associados ao desencadeamento de processos alérgicos, a uniformidade da produção e a qualidade da biomassa eliminam as limitações oriundas do processamento da biomassa crustácea (HSIEH et al., 2007; CHMIELOWSKI et al., 2007; NIDHEESH, KUMAR, SURESH, 2015).

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e que possuem características de detergência, emulsificação, solubilização, diminuição da tensão superficial e interfacial, dispersão de fases, biodegradabilidade e baixa toxicidade. (NITSCHKE, PASTORE, 2002; TONINI et al., 2010; FRACCHIA et al., 2012; ARAUJO et al., 2013; MULLIGAN et al., 2014; MARIN et al., 2015). Reis et al., (2013) estimaram que a crescente demanda por biossurfactantes, principalmente de continentes como Ásia, África e America Latina, em 2018 o valor de sua produção esteja em torno de \$ 2,2 bilhões de dólares.

Os biossurfactantes vem sendo testados em aplicações ambientais, principalmente na facilitação de degradação de derivados de petróleo através de sua capacidade de dispersão e solubilização. Por ser um processo natural, a biorremediação utilizando biossurfactantes apresenta vantagens sobre outros métodos de tratamento, com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras (REZENDE, GRAVITOL, 2010; TONINI et al., 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MORAIS, ABUD, 2012; ZILIO et al., 2012; SOUZA, VESSONI-PENNA, OLIVEIRA, 2014; GEYS, SOETAERT, VAN BOGAERT, 2014; LIU et al., 2014).

Os resíduos gerados na prática urbana e agroindustrial têm se mostrado uma fonte de nutrientes bastante atrativa nos processos fermentativos e biotecnológicos. Uma variedade de substratos de baixo custo podem ser citados como nutrientes, incluindo óleos de origem vegetal, resíduos de petróleo, substâncias amiláceas, resíduos de soro de leite; resíduos de destilaria; águas residuais de mandioca; polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaços de

cana, cascas de frutas processadas, batatas e farinha de cereais (MONTONERI et al, 2009; MAKKAR et al., 2011; SILVA et al., 2014; MARTINS et al., 2014).

A milhocina, um resíduo agroindustrial gerado a partir da maceração por via úmida do milho para a fabricação da farinha de milho é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para micro-organismos. O óleo residual de fritura é um substrato muito nutritivo para processos biotecnológicos, sendo uma fonte deveras abundante, uma vez que grandes quantidades de óleo de fritura são gerados em restaurantes em todo o mundo. Seu descarte indevido além de ser um desperdício de fonte energética, contribui significativamente para a poluição ambiental (RUGGERI et al. 2009; MAKKAR et al., 2011; SILVA et al., 2013).

Neste contexto, a produção de insumos por via microbiológica utilizando resíduos agroindustriais gera novas alternativas para as indústrias, obtendo-se produtos que podem ser utilizados na área de alimentos, farmacêutica, cosmética e também na biorremediação.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 na produção dos co-polímeros quitina e quitosana, e biossurfactante, utilizando como substratos resíduos agroindustriais (milhocina e óleo de fritura).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento de *Cunninghamella elegans* utilizando resíduos agroindustriais (milhocina e óleo de soja pós-fritura), com o auxílio de um planejamento fatorial do tipo delineamento central composto rotacional 2².
- Produzir os polímeros quitina e quitosana na condição selecionada do planejamento fatorial;
- Caracterizar físico-quimicamente os co-polímeros quitina e quitosana;
- Investigar a produção de biossurfactante por *C. elegans* utilizando resíduos agroindustriais (milhocina e óleo de soja pós-fritura), com o auxílio de um planejamento fatorial do tipo delineamento central composto rotacional 2².
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido por *C. elegans* na melhor condição selecionada no planejamento fatorial;
- Isolar e caracterizar físico-quimicamente o biossurfactante;
- Avaliar a eficiência do biossurfactante em processos de biorremediação;
- Validar os resultados obtidos.

1.3. REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1. Fungos filamentosos

Os fungos são seres eucarióticos que podem apresentar-se sob a forma de leveduras, formar um pseudo-micélio ou constituir hifas que podem se agregar ou justapor-se, porém, nunca formando um tecido verdadeiro (ESPOSITO, AZEVEDO, 2010). São os principais precursores do ecossistema no ciclo do carbono, tendo importante função na biodegradação de matérias lignocelulósicas utilizando representantes dos grupos Ascomycetes, Deuteromycetes e Basidiomycetes, produtores de enzimas lignolíticas (FERRAZ, 2010; DURÁN, 2010; CVANCAROVA et al., 2015). São também explorados na produção de enzimas hidrolíticas como hidrolases, proteases e amilases (ÂNGELO, 2010; SIVAKUMAR, 2014; BERNARDES et al., 2014) e pigmentos como carotenoides e quinonas (DURÁN, TEXEIRA, ESPOSITO, 2010; ROUKAS, 2015; KANZY et al., 2015). Na indústria de alimentos, apresentam importância significativa no processamento de alimentos e bebidas através de enzimas hidrolíticas e fermentação láctica. Outro papel fundamental da utilização de fungos na indústria alimentícia é a produção de queijos do tipo Blue Cheese (Roquefort, Gorgonzola e Stilton), Camembert e Brie (PASTORE, MACEDO, 2010; DIEZHANDINO et al., 2015).

Como agentes ambientais, os fungos são ainda capazes de atuar na biorremediação de solos e efluentes. São relatados atuação de fungos na degradação de hidrocarbonetos, pesticidas, plásticos, explosivos e metais de solos e sedimentos, além de sua eficiência como adsorventes na descontaminação de águas e recuperação da qualidade do ar através da utilização de filtro biológico confeccionado com perlite como suporte inerte para a formação de biofilme do fungo leveduriforme *Exophiala jeanselmei* (SILVA, ESPOSITO, 2010; KYZAS, BIKIARIS, 2015).

O potencial biotecnológico dos fungos filamentosos vem sendo explorado visando melhoria nos processos produtivos. Gêneros como *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*, *Cunninghamella sp.* são os principais representantes em se tratando de produção enzimática, na síntese de biopolímeros como quitina, quitosana, glicosamina, biossurfactantes e também como bioadsorventes devido as qualidades presentes em sua parede celular (TAIRA et al., 2011; TIGINI et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2013; SOUZA

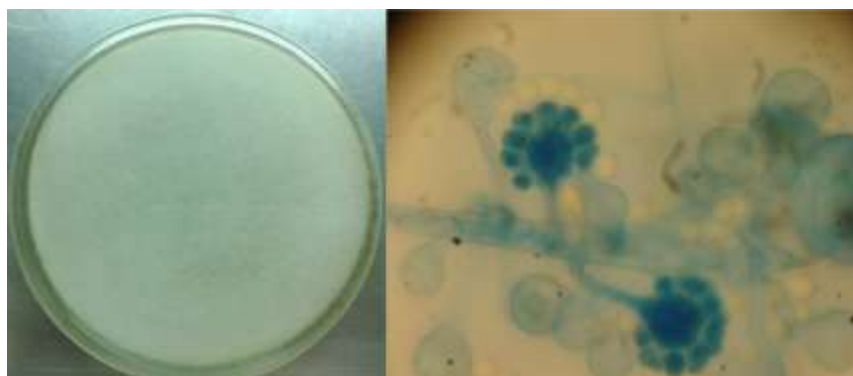
et al., 2013; QAZI et al., 2013; QAZI et al., 2014; CASTIGLIONI et al., 2014; PATIL, JADHAV, 2014; BERGUER et al., 2014).

A classe Zygomycetes distingue-se das demais por apresentar produção de um esporo de resistência de origem sexual, denominado zigósporo. Quanto à nutrição podem ser saprófitos (*Absidia sp*, *Mortierella sp*), parasitas (*Rhizopus stolonifer*, *Absidia corymbifera*), predadores (*Zoophagus sp*) e simbioses formadores de endomicorrizas e ectomicorrizas. Apresentam micélios cenocíticos e septados, alguns podem apresentar dimorfismo, parede celular composta por quitina, quitosana fibrilar e ácido poliglucurônico. Quanto à reprodução, ocorre a diferenciação de hifas especializadas em esporangióforos que originam em suas extremidades uma estrutura denominada esporângio. No interior do esporângio, originam inúmeros esporos denominados esporangiósoros, entretanto, quando produzidos em menor número, os esporângios recebem o nome de esporangiólos (LEITE, 2010).

A ordem Mucorales compreende exemplares de gêneros de grande interesse econômico: *Absidia*, *Cunninghamella*, *Syncephalastrum*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Beauveria*, que são utilizados pelas indústrias por sintetizarem produtos industriais importantes como ácidos, etanol e enzimas. Também são conhecidos por degradar moléculas de estruturas mais simples como glicose e sacarose, apresentando micélio denso e compacto. Reproduzem-se assexuadamente através de esporângios com grande quantidade de esporos ou por esporangiólos. Já a reprodução sexuada ocorre por meio de zigósporos; são cosmopolitas em sua maioria e poucas espécies podem parasitar animais e plantas. (HAWKSWORTH et al., 1996; PUTZKE et al., 2004; SILVA, 2010; SILVA, 2011; SILVA, 2014;).

As espécies pertencentes ao gênero *Cunninghamella* (figura 01) possuem colônias de coloração variando entre o branco e o cinza, esporangióforo ereto, ramificado e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporangiólos. O micélio quando jovem não exibe septo. A septação está associada ao amadurecimento da cultura (BAIJAL, MEHROTRA, 1980; DOMSCH et al., 1980; ALEXOPOULOS et al., 1996; VICTOR, 2009; ESPOSITO, AZEVEDO, 2010). Espécies deste gênero, em particular *C. elegans*, *C. blakesleeana* e *C. echinulata*, têm sido empregadas extensivamente na transformação de drogas e xenobióticos através das vias oxidativas e conjugativas. Dentre os exemplos citados pelos autores estão a degradação de hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH) fenantreno, fluoranteno, glutationa-S-transferase, aril sulfotransferase, UDP-glucosil e transferase-glucuronosil (ASHA, VIDYAVATHI 2009; MURPHY, 2015).

Figura 01: Imagem da espécie *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 mantida em meio de manutenção e de sua estrutura de reprodução.



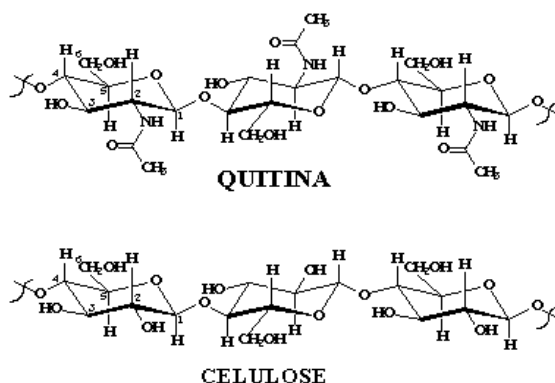
Fonte: A autora

As aplicações mais recentes desse gênero na biotecnologia incluem produção de biossurfactantes (SILVA et al., 2014;); remoção de cádmio relacionado metabolismo de polifostato (LIMA et al., 2013); biossorção (TIGINI et al., 2012); produção de biopolímeros quitina e quitosana (SANTOS et al., 2013; AMBRÓSIO et al., 2013; SOUZA et al., 2013; BERGUER et al., 2014a, 2014b) lipídeos (BERNAT et al., 2014), metabolismo de hidrocarbonetos poliaromáticos (BOLL et al., 2014) e produção de biocombustíveis (SUKRUTHA, JANAKIRAMAN, 2013).

1.3.2. Quitina

A quitina é um polímero linear, natural e insolúvel, que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4-N-acetil-D-glicosamina e, está presente na carapaça de alguns invertebrados como alfa-quitina ou beta-quitina, e na parede celular de fungos como gama-quitina (ANDRADE et al., 2003; STAMFORD et al., 2012). Merzendorfer (2005) afirmou que a quitina pode ser considerada como um derivado da celulose devido as suas semelhanças na estrutura molecular. A celulose apresenta em sua estrutura um radical hidroxila no carbono da posição dois da cadeia monomérica, enquanto que na quitina, neste carbono, ocorre a presença do radical acetamida (figura 01), (MERZENDORFER, 2005; SILVA, 2007).

Figura 02: Estrutura química da quitina e celulose



Fonte: Polymar. Disponível em:

http://www.polymar.com.br/pagina.php?diretorio=ped/&menu=0&cod_secao=30&arquivo=quitina.php.

Acesso em: 29/01/2015

Por terem estruturas semelhantes, a quitina e a celulose desempenham funções semelhantes, servindo principalmente como componentes estruturais da célula. Enquanto a quitina compõe a parede celular de fungos e exoesqueleto de artópodes, a celulose está presente na parede celular dos vegetais e ambos os polímeros conferem o caráter de rigidez destas estruturas (SYNOWIECKY, AL-KHATEEB, 1997; LEHNINGER et al., 1995; ALEXOPOULOS et al., 1996; DALLAN, 2005; SILVA, 2007; SILVA, 2010).

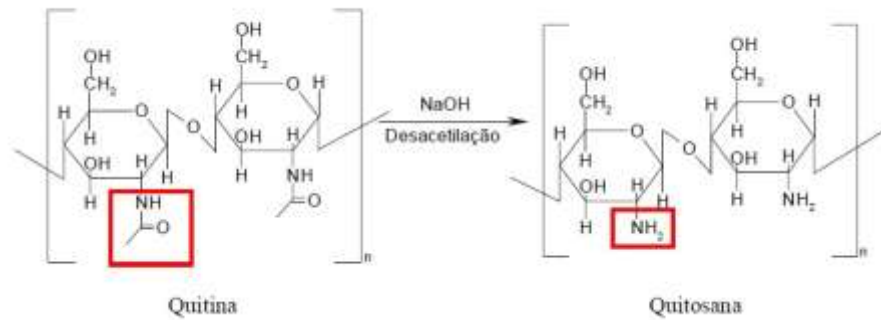
1.3.3. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo natural composto por unidades beta (1-4)-D-glicosamina, originada da desacetilação da quitina. É solúvel em meio ácido (pH <5,5) devido a presença de grupos amino livres ao longo da cadeia do polímero. A quitosana pode se apresentar com diferentes graus de desacetilação, a depender da quantidade de grupos acetil que foram removidos da molécula quitina (PEDRO et al., 2009; CARDOSO et al., 2012; LATHA, SURESH, 2013; SANTOS et al., 2013; BERGUER et al., 2014a, 2014b).

Quitina e quitosana (figura 03) são polissacarídeos conhecidos por apresentarem polimorfismo, podendo assumir três conformações. As cadeias destes polímeros ligam-se através do hidrogênio em três diferentes estruturas cristalinas (α , β , γ), cujo arranjo depende da polaridade adquirida pelas cadeias de açúcar. A estrutura α é a mais abundante na natureza e encontra-se geralmente nos crustáceos, enquanto que a β é encontrada comumente nos fungos. A estrutura beta é mais flexível e menos dura que a estrutura alfa, tal característica

apresenta melhor reatividade na preparação de derivados químicos (JAWORSKA et al, 2003; CAMPOS-TAKAKI, 2005; STAMFORD et al., 2012).

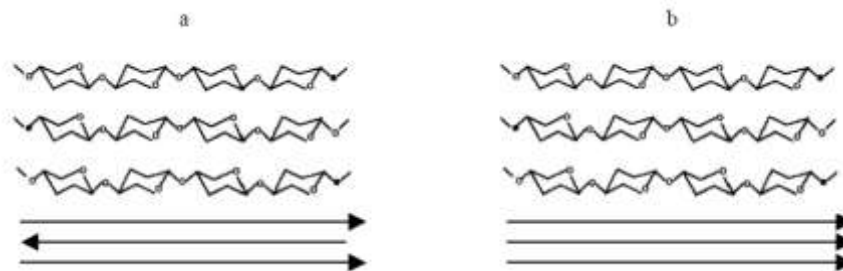
Figura 03: Estrutura química da quitina e quitosana



Fonte: STAMFORD et al., 2012.

Os arranjos na estruturas das cadeias apresentam diferentes orientações (figura 04), sendo comum a estrutura do tipo alfa (α) apresentar arranjo antiparalelo e a estrutura do tipo beta (β) apresentar arranjo paralelo (CARDOSO et al., 2012; STAMFORD et al., 2012).

Figura 04: Arranjo das estruturas alfa quitina (a) e beta quitina (b)



Fonte: Stamford, (2006)

1.3.4. Aplicações comerciais da quitina e quitosana

A quitina é o segundo maior polímero em produtividade mundial, atrás apenas da celulose, e os valores estimados são de cerca de 10^{10} toneladas anuais (MUZZARELLI et al., 2012). A quitina e a quitosana apresentam propriedades peculiares, podendo ser utilizadas com sucesso em uma grande variedade de aplicações, tais como na remoção e recuperação de diferentes resíduos, na biotransformação de pesticidas, na degradação de corantes, aminoácidos e proteínas. A quitosana pode ainda ser utilizada como clareador em sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos (CARDOSO et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LATHA, SURESH, 2013; BARIKANI et al., 2014; ALJAWISH et al., 2015). A tabela 01 mostra as principais aplicações comerciais dos co-polímeros quitina e quitosana.

Tabela 01: Aplicações comerciais de quitina e quitosana

Principais aplicações de quitina e quitosana	
Campo	Aplicação
Agricultura	Formulação de bactericida e fungicida
Indústria alimentícia	Formação de filmes biodegradáveis, preservação dos alimentos contra micro-organismos, desacidificação de sucos de fruta, clarificador
Indústria de cosméticos	Fungicida, dissolução de ácidos orgânicos
Medicina	Imunologia, hemostasia e cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, regeneração neural, controle de colesterol do sangue, antioxidante, atividade antimicrobiana
Ambiental	Remoção de metais pesados e outros poluentes
Engenharias	Capacitor e eletrólitos, bio-nanotecnologia, terapia gênica

Fonte: KHOUSHAB, YAMABHAI (2010); BARIKANI et al., (2014); ALJAWISH et al., (2015)

1.3.5. Produção de quitina e derivados

O processo produtivo de derivados da quitina se torna relativamente caro uma vez que a obtenção de matéria prima derivada de crustáceos apresenta um alto potencial alergico, além dos problemas com sazonalidade e uniformidade da biomassa (BERGUER et al., 2014; BARIKANI et al., 2014). A falta de uniformidade da biomassa de crustáceos acontece, por

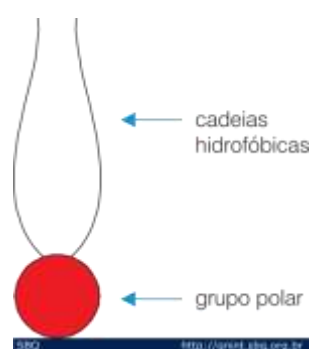
exemplo, porque muitas vezes esses animais variam muito em tamanho, idade e espécie, sendo extremamente dependentes de fatores ambientais precisos. Além disso, a carapaça de crustáceos pode conter um teor elevado de cinzas e metais pesados, além de apresentarem potencial alérgico, de acordo com Waibel et al., (2011). O processo de acetilação usando reagentes orgânicos como anidrido acético é oneroso, além de ter baixos rendimentos. O processo de purificação ocorre com o tratamento combinado de ácidos e bases que remove minerais, proteínas e outras impurezas, despolimerizando e desacetilando a quitina pela utilização do ácido hidrocloreto concentrado em altas temperaturas (HOKKO CHEMICAL IND.CO., 2010; ARKION LIFE SCIENCES, 2012). Devido a isso, a produção por via microbiológica vem ganhando atenção dos acadêmicos nos últimos anos, sendo as principais representantes fontes de produção alternativa os fungos filamentosos pertencentes à divisão Zygomycotina e Ascomycotina que contém os dois polissacarídeos, quitina e quitosana, em abundância (SUMBALI, 2005; BOWMAN, FREE, 2006; HSIEH et al., 2007; SITANGGANG et al., 2010; LIU et al., 2013; PATIL, JADHAV, 2014; ALJAWISH et al., 2015). A produção microbiana de co-polímeros quitina e quitosana apresenta vantagens, além da ausência de fatores associados ao desencadeamento de processos alérgicos. A fermentação fúngica é de grande interesse para produção de produtos bioativos uma vez que a uniformidade da produção e a qualidade da biomassa eliminam as limitações oriundas do processamento da biomassa crustácea (HSIEH et al., 2007; CHMIELOWSKI et al., 2007; SITANGGANG et al., 2010; LIU et al., 2013; PATIL, JADHAV, 2014; NIDHEESH, KUMAR, SURESH, 2015).

1.3.6. Surfactantes e biossurfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas com uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. São capazes de reduzir a tensão superficial (TS - força existente entre uma superfície ar-líquido) e interfacial (TI - força existente entre uma superfície líquido-líquido). Possuem um vasto campo de aplicações industriais devido as suas propriedades detergente, emulsificante, lubrificante, espumante e umidificadora na solubilização e na dispersão de fases. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo, e são, em sua maioria, utilizados na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (Figura 05) (NITSCHKE, PASTORE, 2002; BUGAY, 2009; LIMA JUNIOR, 2012; ZILIO et al., 2012; FRACCHIA et al., 2012; GEYS, SOETAERT, VAN BOGAERT, 2014; LIU et al., 2014; MULLIGAN, SHARMA, MUDHOO, 2014; ROSA, FREIRE, FERRAZ, 2015; MARIN et al., 2015).

Segundo Kitamoto et al., (2002); os surfactantes são utilizados nas indústrias têxtil, cosmética, farmacêutica, alimentícia, de papel, polímeros e de plásticos. Durante a última década, a demanda de surfactantes aumentou em aproximadamente 300% na indústria química dos EUA. Sua produção mundial excede 3 milhões de toneladas por ano, o que totaliza uma economia de 4 bilhões de dólares (CASTIGLIONE et. al., 2009; ANDRADE, 2010), sendo a maioria utilizado como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico.

Figura 05: Representação esquemática da estrutura de um surfactante, contendo uma extremidade polar (hidrofílica) e uma cadeia apolar (hidrofóbica).



Fonte: <http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarConceito.php?idConceito=42>.

Em 2011, o valor do biossurfactante no mercado global correspondia a \$ 1,7 bilhões de dólares. Existe uma crescente demanda na Ásia, África e América Latina, estima-se que em 2018, o volume de biossurfactante produzido seja de 476.512,2 toneladas com valor estimado em \$ 2,2 bilhões de dólares, de acordo com Reis et al., (2013).

Os surfactantes sintéticos possuem sérias desvantagens, uma vez que são derivados de produtos petrolíferos, seu custo de produção é muito alto, além serem tóxicos ao meio ambiente e não são biodegradáveis. Desse modo, torna-se necessária a busca por biossurfactantes, que são produzidos por organismos vivos, principalmente por microorganismos e possuem várias vantagens em relação ao surfactante sintético, destacando: baixa toxicidade, tolerância à temperatura, pH e força iônica, natureza biodegradável, além da possibilidade de serem produzidos a partir de substratos renováveis (BUGAY, 2009; FELIX, 2012; LIMA JUNIOR, 2012; FRACCHIA et al., 2012; PERFUMO, 2013; GEYS, SOETAERT, VAN BOGAERT, 2014; MARIN et al., 2015).

Os estudos sobre biossurfactantes tem atraído a atenção como agentes de dissolução de hidrocarbonetos a partir da década de 1960, e suas aplicações têm sido muito estendidas

nas últimas cinco décadas como uma alternativa melhorada para surfactantes químicos (carboxilatos, sulfonatos e ésteres de ácido sulfato), especialmente em alimentos, produtos farmacêuticos e óleo indústria (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA, 2000; DESAI, BANAT, 1997; MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; MULLIGAN, SHARMA, MUDHOO, 2014; HUANG et al., 2015). Ao contrário dos surfactantes químicos, que são na sua maioria derivados do petróleo, estas moléculas podem ser produzidos por processos de fermentação microbiana, usando substratos mais baratos provenientes da agroindústria e materiais residuais, como por exemplo óleos residuais de fritura e milhocina (ROCHA E SILVA et al., 2014; ANDRADE E SILVA et al., 2014), Gordura animal (SANTOS et al., 2013, 2014), Manipueira (MORAIS E ABUD, 2012), Okara e bagaço de cana (SLIVINSKI et al., 2012).

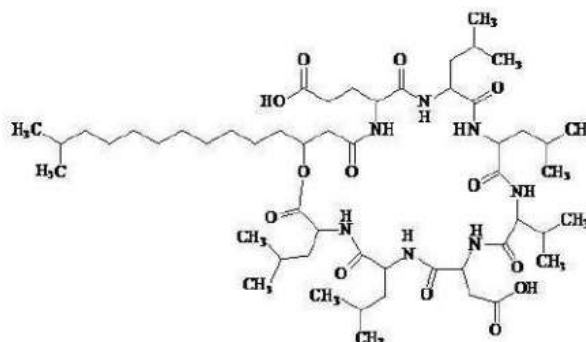
A síntese microbiana dos biossurfactantes ocorre especialmente durante o crescimento em substratos imiscíveis em água. Há uma grande quantidade de micro-organismos com a capacidade de degradar e/ou assimilar hidrocarbonetos. Alguns também são capazes de emulsificar esses hidrocarbonetos durante o processo da degradação do substrato (COLLA, COSTA, 2003; CASTIGLIONE et al., 2009, LIU et al., 2014; HUANG et al., 2015). Os micro-organismos são capazes de sintetizar biossurfactantes em diferentes tipos de substratos, desde carboidratos até hidrocarbonetos, entretanto, o substrato utilizado pode alterar a composição química e estrutural da molécula e conseqüentemente todas as suas propriedades. A síntese geralmente ocorre durante a fase estacionária, mas alguns organismos são capazes de produzir biossurfactantes na fase exponencial (RON, ROSENBERG, 2001; FONTES et al., 2008). Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados aos meios de produção. Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção apolar do biossurfactante produzido (FONTES et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; LIMA JUNIOR, 2012; SOUZA, VESSONI-PENNA, OLIVEIRA, 2014; GEYS, SOETAERT, VAN BOGAERT, 2014; HUANG et al., 2015).

1.3.7. Tipos de biossurfactantes

Os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar, enquanto que os biossurfactantes são classificados principalmente pela a sua composição química e origem. Na classificação por composição química, os biossurfactantes podem ser separados em dois grandes grupos que são os de alto peso molecular (bons formadores de emulsão) e os de baixo peso molecular (bons redutores de tensão superficial). As principais classes de biossurfactantes de baixo peso molecular incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos; e os de alto peso molecular os biossurfactantes poliméricos e particulados. (ROSENBERG, RON, 1999; MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; FELIX, 2012; MULLIGAN, SHARMA, MUDHOO, 2014; HUANG et al., 2015).

Lipopeptídeos

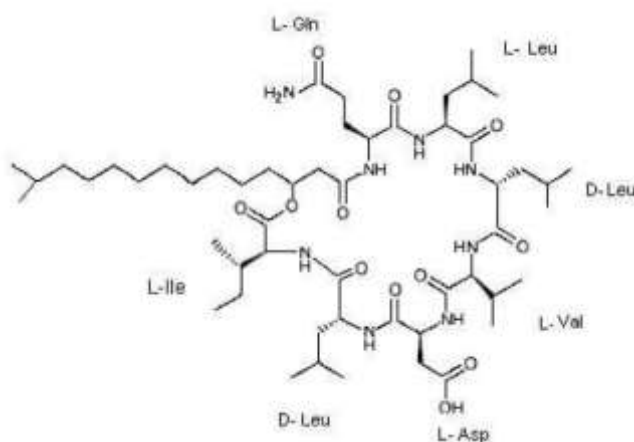
Os lipopeptídeos são produzidos principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*; e as principais classes consistem em Surfactina e Lichenisina, que diferem entre suas variantes pela sua cadeia de ácidos gráxo. (DASTGHEIB et al., 2008; JACQUES, 2010; THAVASI et al., 2008, 2011; FRACCHIA et al., 2012). A Surfactina é um lipopeptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis* e é considerado o biossurfactante mais ativo descoberto até agora. Sua estrutura consiste em um anel de sete aminoácidos acoplados a uma cadeia de ácido graxos através de uma ligação de lactona (figura 06). A cadeia de aminoácidos pode variar de acordo com o tipo de Surfactina, e tais variações podem estar relacionadas com as alterações nas condições de cultura, tais como tipo e quantidade de fonte nutricional (RON, ROSENBERG, 2001; MUTHUSAMY et al., 2008; PRATAP et al., 2013; NITE, KRUMMEL, 2014; HUANG et al., 2015; MARIN et al., 2015).

Figura 06: Estrutura química da Surfactina, um lipopeptídeo sintetizado por *Bacillus subtilis*.

Surfactin

Fonte: FRACCHIA et al., 2012.

Lichenisina (figura 07) apresenta bastante similaridade com a Surfactina no que diz respeito às propriedades estruturais e físico-químicas. É produzida pela espécie bacteriana *Bacillus licheniformis* e apresenta excelente estabilidade frente à temperatura, pH e força iônica. Os biossurfactantes produzidos por *B. licheniformis* são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m^{-1} para 27 mN/m^{-1} e a tensão interfacial entre a água e n-hexadecano para $0,36 \text{ mN/m}^{-1}$ (MCINERNEY et al., 1990; MUTHUSAMY et al., 2008; JACQUES, 2010; MATSUYAMA et al., 2010; FRACCHIA et al., 2012; ZHANG et al., 2014; MARIN et al., 2015).

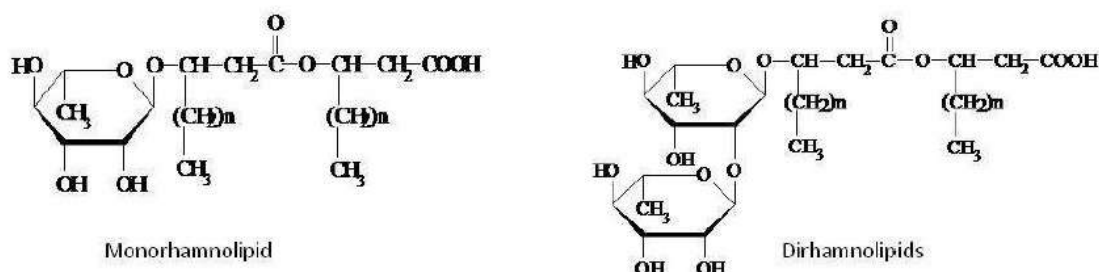
Figura 07: Estrutura química da Lichenisina, um lipopeptídeo sintetizado por *Bacillus licheniformis*.

Fonte: VATER et al., 2002

Glicolipídeos

Os glicolipídeos são hidratos de carbono formados por mono ou dissacarídeos combinados com ácidos graxos de cadeia longa ou ácidos hidroxialifáticos. Os biossurfactantes mais conhecidos pertencem a esse grupo e as classes mais conhecidas são Rhamnolipídeos, Trehalolipídeos e sophorolipídeos (MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; MULLIGAN, SHARMA, MUDHOO, 2014). Rhamnolipídeos são produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* e pelo gênero *Burkholderia*. Sua estrutura pode ser vista na figura 08, consistindo em uma ou duas moléculas de rarnose ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico (PERFUMO et al., 2006; RAZA, KHALID, BANAT, 2009). Apresentam atividades tensoativas elevadas e potenciais aplicações no campo biomédico devido à sua ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e anti-adesiva. Eles também têm sido usados na preparação de nanopartículas e microemulsões (ABALOS et al., 2001; COSSON et al., 2002; KIM et al., 2000; REMICHKOVA et al., 2008; SOTIROVA et al., 2008;. YOO et al., 2005; PALANISAMY, RAICHUR, 2009; XIE et al., 2006; NGUYEN, SABATINI, 2009; XIE et al., 2007; MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; RANDHAWA, RAHMAN, 2014; HUANG et al., 2015).

Figura 08: Estrutura química de Rhamnolipídeos de cadeia mono e dissacarídeos



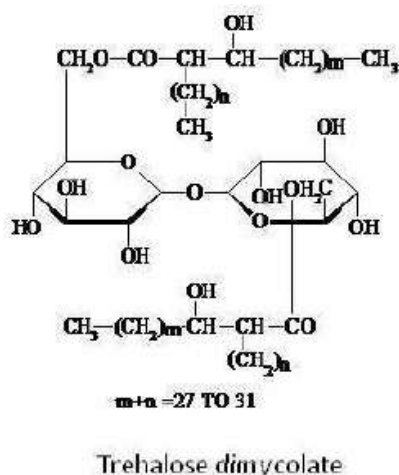
Fonte: FRACCHIA et al., 2012.

Os chamados trehalolipídeos apresentam sua síntese a partir de espécies de *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Corynebacterium*. Sua estrutura consiste numa molécula dissacarídeo não redutor de açúcar trealose unidas a duas unidades de glicose por uma ligação α , α -1, 1-glicosídica (figura 09). Suas aplicações industriais conhecidas estão relacionadas às funções na interação da membrana celular e seu potencial como agentes terapêuticos antitumorais. Os biossurfactantes dessa classe possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial para algo em torno de 40 a 25 mN/m⁻¹ e a tensão interfacial de 1 a 5 mN/m⁻¹ (MUTHUSAMY et al., 2008; HARLAND et al., 2009; SHAO, 2010;

ZARAGOZA et al., 2009, 2010; FRANZETTI et al., 2010; FRACCHIA et al., 2012; TERUEL, ORTIZ, ARANDA, 2014).

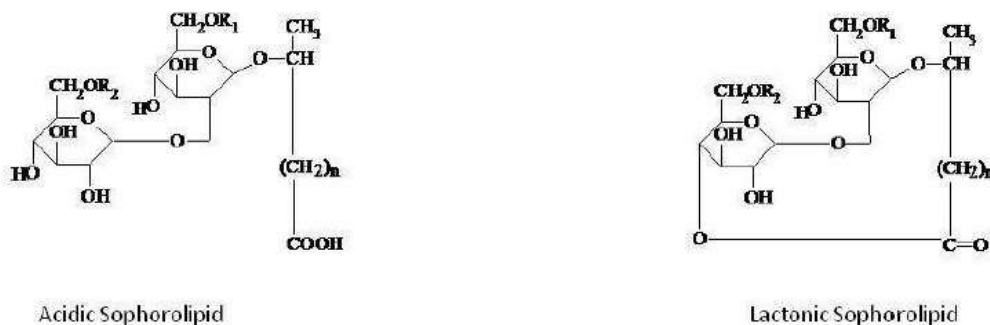
Os sorofolipídeos são sintetizados principalmente por espécies fúngicas leveduriformes, sendo seus principais representantes as espécies: *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum*, *T. apicola*, *Candida bombicola*, *Candida apícola*, *Rhodotorula bogoriensis*, *Wickerhaminella domercqiae* e *Candida batistae*. Sua estrutura consiste em um hidrato de carbono sofrorose dimérico ligado a uma hidroxila ácido graxo de cadeia longa por ligação glicosídica (figura 10). Esse grupo de biossurfactante vem sendo aplicado no campo da biomedicina, incluindo o uso como antimicrobianos, anti-viral e anti-cancerígeno. Eles também têm sido utilizados na síntese de nanopartículas ligados a metais em produtos cosméticos e farmacodermatológicos (VAN BOGAERT, SOETAERT, 2010; MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; KONISHI, YOSHIDA, HORIUCHI, 2014; MADDIKERI, GOGATE, PANDIT, 2015).

Figura 09: Estrutura química do biossurfactante trealolipídeo



Fonte: FRACCHIA et al., 2012.

Figura 10: Estrutura química do biossurfactante Sorofolipídeo

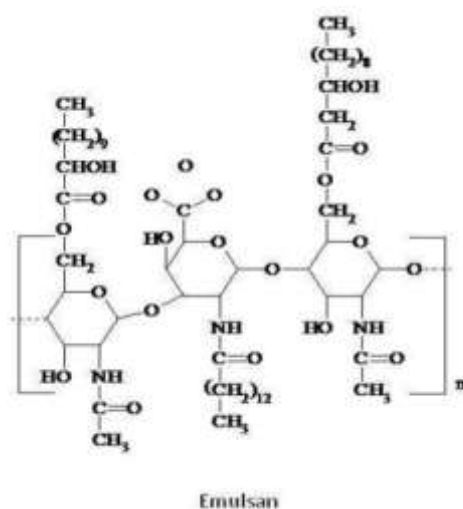


Fonte: FRACCHIA et al., 2012.

Biossurfactantes poliméricos

Os biossurfactantes poliméricos são considerados os principais representantes do grupo dos biossurfactantes de alto peso molecular, que tem como característica principal a formação e a estabilidade de emulsões. Consistem em complexos de polissacarídeos e proteínas lipoproteínas, lipopolissacáridos ou complexos contendo vários destes tipos estruturais, como mostra a figura 11. Os biossurfactantes mais conhecidos e estudados são Emulsan, Liposan, Alasan e Lipomanan. Podem ser sintetizados por espécies bacterianas como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Halomonas eurihalina*, *Pseudomonas tralucida* e espécies leveduriformes como *Candida lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*. Esses biopolímeros possuem eficácia como agentes emulsificantes de hidrocarbonetos em água mesmo em baixas concentrações (ROSENBERG, RON, 1999; VAN BOGAERT, SOETAERT, 2010; MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012, RUFINO et al., 2014; VERMA et al., 2015).

Figura 11: Estrutura química do biossurfactante polimérico Emulsan.



Fonte: FRACCHIA et al., 2012.

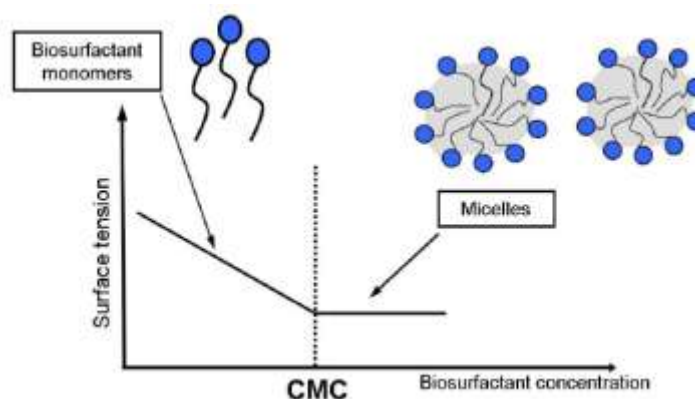
1.3.8. Propriedades

Tensão superficial, tensão interfacial e emulsificação

Dentre as principais propriedades apresentadas pelos biossurfactantes estão a redução da tensão superficial e interfacial de compostos e a capacidade de formar emulsões. A tensão superficial é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos, quando a tensão superficial diminui significa que a concentração de surfactante aumenta, formando micelas (figura 12). A concentração de micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC), que corresponde a mínima concentração de surfactante necessária para que haja a redução máxima da tensão superficial, de acordo com Van-Hamme et al., (2006) e Cortis, Ghezzehei, (2007).

Segundo Mulligan (2005) um bom agente tensioativo pode diminuir a tensão superficial da água de 72-35 mN/m⁻¹, e a tensão interfacial de água/hexadecano 40-1 mN/m⁻¹. Biossurfactantes do tipo Ramnolipídios são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m, tensão interfacial da água/hexadecano de 43 mN/m para <1 mN/m e a concentração micelar crítica entre 10 e 200 mg/L (DUBEAU et al.,2009; HÖRMANN et al., 2010; SYLDATK et al., 1985; YAMAGUCHI, SATO, 1976; MÜLLER et al., 2012, LIU et al., 2014; MARIN et al., 2015). Já o biossurfactante do tipo Surfactina é capaz de reduzir a tensão superficial da água para 27 mN/m⁻¹, e a concentração micelar crítica (CMC) de 12.2 mg L⁻¹, de acordo com Slivinski et al., (2012).

Figura 12: Representação da formação de micelas



Fonte: Pacwa-Płociniczak et al., (2011)

Os glicolípídeos e os lipopeptídeos são considerados biossurfactantes de baixo peso molecular e são os mais efetivos na redução da tensão superficial. Os biossurfactantes como

polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos e lipoproteínas, apresentam elevado peso molecular e são considerados os mais efetivos em estabilizar emulsões óleo/água (CHRISTOFI, IVSHINA, 2002; MUTHUSAMY et al., 2008; FELIX, 2012; FRACCHIA et al., 2012; MULLIGAN et al., 2014; VERMA et al., 2015).

Tolerância a temperatura, pH e força iônica

Uma propriedade muito importante para o estudo de biossurfactantes consiste na estabilidade frente a condições ambientais adversas tais como variação de temperatura, pH e força iônica. Lichenisina é estável até uma temperatura de 50°C, variação de pH entre 4,5 e 9 concentração salina entre 50 e 25g/L de acordo com McInerney et al., (1990) apud Muthusamy et al., (2008), Fracchia et al., (2012) e Zhang et al., (2014). O estudo da estabilidade é fundamental para propor a utilização do biossurfactante em ambientes com condições drásticas sem que ele perca suas propriedades (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Biodegradabilidade e baixa toxicidade

Diferente dos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes oriundos de micro-organismos são considerados compostos de baixa toxicidade ou não tóxicos, além de ser facilmente degradados em água e solo, o que se torna atraente para aplicações na área ambiental como biorremediação, dispersão de óleos em derramamentos e lavagens de tanques. Devido a sua baixa toxicidade, são adequados para uso na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia pois apresentem baixíssimo potencial alérgico (NITSCHKE, PASTORE, 2002; MUTHUSAMY et al., 2008; FRACCHIA et al., 2012; GEYS, SOETAERT, VAN BOGAERT, 2014; MARIN et al., 2015).

1.3.9. Biorremediação

A grande preocupação mundial nas últimas décadas é a liberação em grandes quantidades de hidrocarbonetos para o meio ambiente, proveniente de inúmeras atividades industriais e em especial, desastres petrolíferos. Ao longo dos anos, diversas técnicas (físicas, químicas e biológicas) vêm sendo desenvolvidas para retirada do petróleo derramado ou para

redução de seus efeitos sobre os ecossistemas, dentre eles a biorremediação, que é uma tecnologia que utiliza micro-organismos ou seus bioprodutos para minimizar ou remover poluentes de hidrocarbonetos de petróleo do ambiente ou a sua redução a níveis de concentração aceitáveis. Neste contexto, os biossurfactantes vêm sendo testados em aplicações ambientais, tornando a biorremediação uma opção atraente na degradação de petróleo, pois, sendo um processo natural, apresenta vantagens sobre outros métodos de tratamento, com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras (REZENDE, GRAVITOL, 2010; TONINI et al., 2010; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MORAIS, ABUD, 2012; ZILIO et al., 2012; SOUZA, VESSONI-PENNA, OLIVEIRA, 2014; GEYS, SOETAERT, VAN BOGAERT, 2014; LIU et al., 2014).

Os biossurfactantes aumentam a biorremediação por hidrocarbonetos utilizando dois mecanismos: (1) aumento da biodisponibilidade do substrato para os micro-organismos e envolve a interação com a superfície da célula; (2) aumento da hidrofobicidade da superfície, permitindo que substratos hidrofóbicos se associem mais facilmente com células microbianas. Os biossurfactantes aumentam as áreas de superfície de compostos insolúveis, aumentando assim a disponibilidade de hidrocarbonetos, e suas propriedades de solubilização e emulsificação se tornam eficazes (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MULLIGAN, SHARMA, MUDHOO, 2014; MAO et al., 2015).

Biossurfactantes também estão envolvidos na recuperação avançada de petróleo por micro-organismos (MEOR). Este método é usado para recuperar o óleo restante nos reservatórios após procedimentos primários (mecânicos) e secundários (físicos) de recuperação. A aplicação de biossurfactantes em recuperação avançada de petróleo é um dos métodos mais promissores. O óleo remanescente muitas vezes está localizado em regiões do reservatório de difícil acesso e o óleo é preso nos poros por pressão capilar. Biossurfactantes reduzem a tensão interfacial entre o óleo/água e óleo/rocha, reduzindo as forças de capilaridade que impedem que o óleo mova-se através dos poros da rocha (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; CAI et al., 2014; SILVA et al., 2014; RANDHAWA, RAHMAN, 2014; MAO et al., 2015; ROSA, FREIRE, FERRAZ, 2015).

1.3.10. Resíduos agroindustriais

Nos processos biotecnológicos, o principal problema na produção de bioprodutos consiste nos elevados custos da produção. Na tentativa de reduzi-los, rejeitos industriais e

agroindustriais vem sendo amplamente empregados em processos fermentativos como fontes nutricionais para micro-organismos na produção de biossurfactantes, permitindo assim a obtenção de insumos de alto valor agregado reduzindo custo ao fabricante (MUTHUSAMY et al., 2008; BIERGI, RINALDI, 2009; SINGH, SAINI, 2014; BERGUER et al., 2014).

A sociedade moderna produz elevada quantidade de resíduos gerados através de atividades relacionadas com as indústrias de alimentos e agricultura. O acúmulo desses resíduos resulta em vários problemas ambientais prejudicando a saúde humana, o equilíbrio ambiental e o desenvolvimento sustentável. Diretrizes legais e diretrizes constitucionais vem sendo implementadas para reduzir a geração de resíduos e promover a sua valorização, incentivando assim sua reutilização, reciclagem e recuperação de energia. A Resolução nº 275 de 25 de abril de 2001 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, descreve que a reciclagem de resíduos deve ser incentivada, facilitada e expandida no país, para reduzir o consumo de matérias-primas, recursos naturais não-renováveis, energia e água, considerando que as campanhas de educação ambiental são peças chaves para essa prática (CONAMA, 2001). Os resíduos gerados na prática urbana e agroindustrial têm se mostrado uma fonte de nutrientes bastante atrativa nos processos fermentativos e biotecnológicos. Uma variedade de substratos de baixo custo podem ser citados como nutrientes, incluindo óleos de origem vegetal (óleos de babaçu, milho, girassol, soja, jojoba, entre outros), resíduos de petróleo, substâncias amiláceas, resíduos de soro de leite; resíduos de destilaria; águas residuais de mandioca; polpa de café, farelo de cereais, palhas, bagaços de cana, cascas de frutas processadas, batatas e farinha de cereais (GUTIERREZ et al., 1992; MAKKAR, CAMEOTRA, 2002; MARTINS et al., 2006.; MOLDES et al., 2007; MUTHUSAMY et al., 2008; SILVA, 2008; MONTONERI et al, 2009a, b; ANDRADE, 2010; MAKKAR et al., 2011; SILVA et al., 2014; MARTINS et al., 2014).

Milhocina

A milhocina é um resíduo agroindustrial gerado a partir da maceração por via úmida do milho para a fabricação da farinha de milho que é comercializada para diferentes setores agroindustriais. Segundo Cardinal e Hendrik (1947) e Akhtar e colaboradores (1997) a milhocina é uma excelente fonte de carbono e/ou nitrogênio para micro-organismos, sendo sua composição geral consistente em 21% a 45% de proteínas, 20% a 26% de ácido láctico, aproximadamente 8% de cinzas (contendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , etc.), 3% de carboidratos e baixo

teor de gordura (0,9% - 1,2%) (CARDINAL, HEDRICK, 1947; AKHTAR et al., 1997; SILVA et al., 2013).

Devido ao seu alto valor de nitrogênio, a utilização da milhocina como fonte de nutricional para o crescimento microbiano e produção de metabólitos vem crescendo nos últimos anos (SILVEIRA et al., 2001; ANDRADE, 2010). A tabela 02 mostra os últimos relatos da utilização de milhocina como fonte nutricional.

Berguer et al., (2014a) obtiveram rendimentos de 26.29 e 33.13 mg.g⁻¹ de quitosana obtida a partir de *Cunninghamella elegans* utilizando concentrações de 2% e 5%, respectivamente, de Milhocina. Já *Rhizopus arrizus*, sob os mesmos tratamentos apresentou um rendimento de 49,31 e 40,67 mg/g⁻¹. Em outro estudo, Berguer et al., (2014b) reportou que *C. elegans* apresentou rendimentos de 89,39mg/g⁻¹ de quitina e 57mg/g⁻¹ de quitosana quando cultivada em 4% de Milhocina. Santos et al., (2013) obtiveram rendimento de 2,14 g/L⁻¹ de quitosana obtida a partir de *C. elegans* utilizando suplementação de 0,45% de milhocina associada a demais aminoácidos. Em ambos os estudos, os autores também reportaram que a milhocina apresentou efeitos positivos quando analisados estatisticamente.

Tabela 02: Utilização de milhocina como fonte nutricional na produção biotecnológica

Bioproduto	Referência
Biossurfactante	Gudiña et al., (2015)
Quitina e Quitosana	Berguer et al., (2014a)
Quitina e Quitosana	Berguer et al., (2014b)
Quitosana	Oliveira et al., (2014)
Biossurfactante	Rocha e Silva et al., (2014)
Biossurfactante	Campos, Stamford, Sarubbo, (2014)
Biossurfactante	Andrade e Silva et al., (2014)
Biossurfactante	Silva et al., (2014)
Biossurfactante	Rocha e Silva et al., (2014)
Biossurfactante	Santos et al., (2013)
Biossurfactante	Luna et al., (2013)
Biossurfactante	Sobrinho et al., (2013)
Quitosana	Santos et al., (2013)
Quitosana	Batista et al., (2013)
Quitina e quitosana	Souza et al., (2013)
Quitosana	Cardoso et al., (2012)

Fonte: A autora

Em relação à utilização de milhocina na produção de biossurfactantes, Santos et al., (2014) utilizaram 2,5% de milhocina como fonte nutricional para o micro-organismo *Candida lipolytica*, que foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para valores abaixo de 20 mN/m⁻¹ e rendimento em torno de 6g/L em condições otimizadas. Silva et al., (2014) e Rocha e Silva et al., (2013) conseguiram reduzir a tensão superficial do meio de 70 para 27 mN/m⁻¹

utilizando 2% milhocina como fonte de nitrogênio para o micro-organismo *Pseudomonas cepacia*.

Óleo residual de fritura

Tem sido observado a eficiência de óleos vegetais residuais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. É importante destacar que os micro-organismos são capazes de crescer nos óleos vegetais ou em gordura, produzindo novos produtos com potencial industrial, tais como a lipase e o biodiesel. Vários micro-organismos mostraram-se capazes de sintetizarem ramnolipídios e soforolipídios utilizando óleos vegetais tais como óleo de girassol e de soja. O óleo residual de fritura é um substrato muito nutritivo para processos biotecnológicos, sendo uma fonte de verdadeiramente abundante, uma vez que grandes quantidades de óleo de fritura são gerados em restaurantes em todo o mundo. Seu descarte indevido além de ser um desperdício de fonte energética, contribui significativamente para a poluição ambiental. A reutilização de óleos vegetais residuais de processos de frituras de alimentos tem se mostrado atraente para a produção de biossurfactantes, pois o reaproveitamento desses óleos, como fonte de carbono para as transformações microbianas após a sua utilização na cadeia alimentar, resulta numa destinação alternativa a um resíduo da produção de alimentos (LIMA, 2007; HABA et al., 2000; ALCANTARA, et al., 2000; MANEERAT, 2005; LIU et al. 2009; LIMA et al. 2009; RUGGERI et al. 2009; MAKKAR et al., 2011; SILVA, 2012). A tabela 03 apresenta os estudos mais recentes da utilização de óleo residual de fritura na produção de metabólitos.

Tabela 03: Utilização de óleo residual de fritura como fonte nutricional na produção biotecnológica

Bioproduto	Referência
Biossurfactante	Maddikeri, Gogate, Pandit, (2015)
Biossurfactante	Rocha e Silva et al., (2014)
Biossurfactante	Campos, Stamford, Sarubbo, (2014)
Biossurfactante	Andrade e Silva et al., (2014)
Quitina e quitosana	Souza et al., (2013)
Biossurfactante	Moraes, Abud, (2012)

Fonte: A autora

Embora o óleo residual de fritura não seja um substrato convencional para produção de co-polímeros quitina e quitosana, Souza et al., (2013) obtiveram estes co-polímeros em meio

contendo 2,75% de óleo de soja pós fritura, onde a quitosana produzida microbiologicamente apresentou um grau de desacetilação de 87,44%, ligeiramente superior que a quitosana crustácea que apresenta grau de desacetilação de 78,52%.

Estudos recentes na produção de biossurfactantes destacam a importância do óleo de fritura residual como substrato: Campos, Stamford, Sarubbo (2014) obtiveram rendimento de 21.86 g/L de biossurfactante por espécies de *Candida sp.* utilizando 6% de óleo de canola residual. O biossurfactante produzido por Silva et al., (2014) foi capaz de reduzir a Tensão Superficial do meio de 70 mN/m-1 para 27 mN/m-1 utilizando 2% de óleo de soja residual como fonte de carbono para *Pseudomonas cepacia*. Rocha e Silva et al., (2013) utilizou 2% de óleo de soja residual como fonte de carbono para produção de biossurfactante por *P. cepacia*, obtendo um rendimento de 5.2 g/L quando o crescimento celular estava na fase estacionária, sendo capaz de reduzir a tensão superficial do meio de 70 mN/m-1 para 27.57 nas primeiras 24h da produção. Já o biossurfactante produzido por Silva et al., (2014) utilizando 2% de óleo de soja residual para *Mucor circinelloides* apresentou uma redução da tensão superficial da água de 72 mN/m⁻¹ para 26 mN/m⁻¹. Os estudos mencionados acima enfatizam o potencial de aplicação de óleo vegetal residual e substratos amiláceos como milhocina na produção de biossurfactante.

A redução de custos e maximização dos rendimentos é importante nos processos produtivos, e no caso dos processos fermentativos, a otimização do rendimento e da produtividade pode ser realizada pelo estudo das variáveis que influenciam o processo. A redução de custo faz-se pela busca de matérias-primas de menor custo (LIMA et al; 2009). Neste contexto, a produção de insumos por via microbiológica utilizando resíduos agroindustriais gera novas alternativas para as indústrias, obtendo-se produtos que podem ser utilizados na área de alimentos, farmacêutica, cosmética e também na biorremediação.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS A. et al. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**. V. 17, p. 1367–1371. 2001.

AHMED A. T. et al. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 69 p. 471–475. 2014.

AKHTAR, M. et al. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **Tappi journal**, v. 80, n. 6, p. 161-164, 1997.

ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W., BLACKWELL, M. – **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, Pub., 233p.1996.

ALJAWISHA, A. et al. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 112 p. 25–39. 2015.

AMBRÓSIO, S. T. et al. A Biosorption Isotherm Model for the Removal of Reactive Azo Dyes by Inactivated Mycelia of *Cunninghamella elegans* UCP542. **Molecules** v. 17, p. 452-462. 2012.

ANDRADE, R. F. S. **Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes de *Candida lipolytica* e *C. glabrata* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos**. 132p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2010.

ANDRADE, R. F. S. et al. Production of surface active agent and biodegradation fuel by acclimated *Rhodotorula glutinis* UCP/WFCC 1555 on diesel oil. In: **Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2013) Mad**. Wageningen Academic Publishers, p. 158. 2014.

ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 8. p. 263-289.

ARAUJO, L. V; FREIRE, D. M. G; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 06, p. 757-761. 2013.

ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* — a microbial model for drug metabolism studies — a review. **Biotechnology advances** v. 27 p. 16–29. 2009.

AUTRY, A. R.; ELLIS, G. H. Bioremediation: An effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Environmental Progress**, v. 11, p. 318-323, 1992.

BAI, G.Y.; BRUSSEAU, M.L.; MILLER, R.M. Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 25, p. 157–170. 1997.

BAIJAL, U; MEHROTRA, B.S. The genus *Cunninghamella* – a reassessment. **Sydowia**, v. 33, p. 1-13, 1980.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 53, p. 495–508. 2000.

BARIKANI, M. et al. Preparation and application of chitin and its derivatives: a review. **Iranian Polymer Journal** v. 23 p. 307–326. 2014.

BARROS, F. F. C; QUADROS, C. P; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N.; Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural Porto Alegre**, p. 1-14, 2009.

BERGER, L. R. R. et al. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 5, p. 9082-9102, 2014.

BERGER, L. R. R. et al. Growth and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and *Rhizopus arrhizus* varying the carbon/nitrogen ratio. In: **Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2013) Mad.** Wageningen Academic Publishers, p. 408. 2014.

BERNARDES, A. V. et al. Utilização de subprodutos agroindustriais para produção de α -amilase por *Rhizomucor miehei*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 08, n. 02: p. 1439-1451. 2014.

BERNAT, P. et al. Tributyltin (TBT) induces oxidative stress and modifies lipid profile in the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 6, p. 4228-4235, 2014.

BOLL, E. S.; JOHNSEN, A. R.; CHRISTENSEN, J. H. Polar metabolites of polycyclic aromatic compounds from fungi are potential soil and groundwater contaminants. **Chemosphere**, v. 119, p. 250-257. 2015.

BORDOLOI, N.K.; KONWAR, B.K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces** v. 63, p. 73–82. 2008.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CAI, Q. et al. Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine pollution bulletin**, v. 86, n. 1, p. 402-410, 2014.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 6, p. 3234-3252, 2014.

CARDINAL, E.V.; HEDRICK, L.R. Microbiological assay of cornsteep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry** v. 172, p. 609–612. 1948.

CARDOSO, A. et al. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules** v. 17, p. 4904–4914. 2012.

CARLILE, M. J. & WATKINSON, S. C. - **The Fungi**. 3rd Edition. Academic Press Ltd. Londres. 482, p, 1996.

CASTIGLIONE, L.G; BERTOLIN, T. E; COSTA, J.A. Produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, vol. 32, n 2, p. 292-295, 2009.

CASTIGLIONI, G. L. et al. Analytical modeling and numerical optimization of the biosurfactants production in solid-state fermentation by *Aspergillus fumigates*. **Acta Scientiarum Technology**, vol. 36, núm. 1, pp. 61-67, 2014.

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

COLLA, L. M; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor, Rio Grande**, v. 13, p.85-103, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução N° 275/01. Brasília, 2001.

COSSON, P. et al. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. **Journal of Bacteriology** V. 184(11), p. 3027-3033. 2002.

ČVANČAROVÁ, M. et al. Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi–Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. **Chemosphere**, v. 136, p. 311-320, 2015.

DASTGHEIB, S. M. M. et al. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. **Biotechnology letters**. v. 30 n.2, p. 263-270. 2008.

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

DÉZIEL, E. et al. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and environmental microbiology** v. 62, p. 1908–1912. 1996.

DIEZHANDINOVA, I. et al. Microbiological, physico-chemical and proteolytic changes in a Spanish blue cheese during ripening (Valdeón cheese). **Food Chemistry** v. 168, 1 February p. 134–141. 2015.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. **New York: Academic Press**, v. 1, p.120, 1980.

DUBEAU, D. et al. Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC Microbiology** v. 9, p. 263. 2009.

DURÁN, N. Enzimas Ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 7. p. 245-263.

DURÁN, N.; TEXEIRA, M. F. S.; ESPOSITO, E. Pigmentos fúngicos e seu potencial bioecnológico. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 9. p. 289-311.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 638 p . 2010.

FELIX, A. K. N. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* lami005 a partir do suco de caju**. 2012. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 6. p. 215-245.

FRACCHIA, L. et al. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. **Biomedical Science, Engineering and Technology**, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), ISBN: 978-953-307-471-9. 2012.

FRANZETTI, A. et al. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European journal of lipid science and technology**. v. 112, p. 617–627. 2010.

GEORGE, S. **Microbial production of biosurfactants**. 2012. 266 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Faculdade de Ciências, Mahatma Gandhi University, Kottayan - Kerala (Índia), 2014. Disponível em: <<http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/25732>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

GUDIÑA, E. J. et al. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology** v. 177 p. 87–93. 2015.

GUTIERREZ, R. M. et al. Solid state fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials. **Biotechnology Letters**, v.10, n. 5. p. 203-380, 1992.

GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current opinion in biotechnology**, v. 30, p. 66-72, 2014.

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology** V. 88, p. 379–387. 2000.

HABA, E. et al. Isolation of lipase screening bacteria by developing used frying oil as selective substrate. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 26, p. 40-44, 2000.

HÖRMANN, B. et al. Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM9509T. **European Journal of Lipid Science and Technology** v. 112, p. 674–680. 2010.

HUANG, X. et al. Improved volatile fatty acid production during waste activated sludge

anaerobic fermentation by different bio-surfactants. **Chemical Engineering Journal** v. 264 p. 280–290. 2015.

JQUES, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus spp.* In: **Biosurfactants: From Genes to Applications**, Soberón-Chávez G Ed., pp. 57-91. 2010.

KANZY, H. M. et al. Optimization of Carotenoids production by yeast strains of *Rhodotorula* using salted cheese whey. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 4 n. 1 pp. 456-469. 2015.

KIM, B.S.; LEE, J.Y.; HWANG, B. K. In vivo control and in vitro antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*. **Pest Management Science**. v. 56, p. 1029-1035. 2000.

KIM, H. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida sp.* SY16 using fed batch fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 70, p. 391–396. 2006.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 3, p. 187-201, 2002.

KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2014.

KYZAS, G. Z., BIKIARIS, D. N. Recent Modifications of Chitosan for Adsorption Applications: A Critical and Systematic Review. **Marine Drugs** v. 13 p. 312-337. 2015.

LATHA, S.; SURESH, G. Studies on chitosan production from different fungal mycelium, **International Journal of Current Biotechnology**. v. 1 n.1, p. 9-11. 2013.

LEITE, C. L. Taxonomia dos fungos. In: ESPOSITO, E. AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: EducS - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 2. p. 47-91.

LIMA JUNIOR, G. A. **Obtenção de surfactina pelo micro-organismo Bacillus subtilis ATCC 6633** 48f. Universidade Federal do Paraná, Dissertação (Mestrado), 2012.

LIMA, C. et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 152(1), p. 156-168, 2009.

LIMA, M. A. B. et al. Cadmium Tolerance and Removal from *Cunninghamella elegans* Related to the Polyphosphate Metabolism. **International journal of molecular sciences**. v. 14, p. 7180-7192. 2013.

LIU, H. et al. Biosurfactant-producing strains in enhancing solubilization and biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater. **Environmental monitoring and assessment**, p. 1-9, 2014.

MADDIKERI, G. L.; GOGATE, P. R.; B. PANDIT, A. B. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound. **Chemical Engineering Journal** v. 263 p. 479–487. 2015.

MAKKAR, R. S; CAMEOTRA, S.S. An update on use of unconventional substrates for biosurfactante production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewblabe-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MAOA, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**. v. 285 p. 419–435. 2015.

MARIN, C. P. et al. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products** v. 66 p. 239–245. 2015.

MARTINS, S. C. S.; ARAGÃO, V. O.; MARTINS, C. M. *Pichia spp.* yeasts from Brazilian industrial wastewaters: Physiological characterization and potential for petroleum hydrocarbon utilization and biosurfactant production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 7, p. 664-672, 2014.

MATSUYAMA, T.; TANIKAWA, T.; NAKAGAWA, Y. Serrawettins and other surfactants produced by *Serratia*. In: **Biosurfactants: From Genes to Applications**, Soberón-Chávez G Ed., pp. 93-120. 2010.

MCINERNEY, M. J.; JAVAHERI, M.; NAGLE JR, D. P. Properties of the biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. **Journal of industrial microbiology**, v. 5, n. 2-3, p. 95-101, 1990.

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, p. 1-7, 2012.

MÜLLERA, M. M. et al. Rhamnolipids—Next generation surfactants?. **Journal of Biotechnology** v. 162, p. 366– 380. 2012.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental pollution**. V. 133, p. 183–198. 2005.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. 12 Biosurfactants. **Biosurfactants: Research Trends and Applications**, p. 309, 2014.

MURPHY, C. D. Drug metabolism in microorganisms. **Biotechnology letters** v. 37 p. 19–28. 2015.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, n. 6, p. 25. 2008.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**. v. 87 (2), p. 995-1012. 2012.

NGUYEN, T.T.; SABATINI, D.A. Formulating alcohol-free microemulsions using rhamnolipid biosurfactant and rhamnolipid mixtures. **Journal of surfactants and detergents**. V. 12, p. 109–115. 2009.

NGUYEN, T.T. et al. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water research**. v. 42, p. 1735–1743. 2008.

NIEVAS, M.L. et al. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. **Journal of hazardous materials** v. 154, p. 96–104. 2008.

NITSCHKE, M. et al. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LB1. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562–1566. 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M; Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International journal of food microbiology**, v. 171, p. 54-61, 2014.

ORTIZ, A. et al. Interactions of a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**. V. 1778, p. 2806–2813. 2008.

ORTIZ, A. et al. Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. **Chemistry and physics of lipids**. v. 158, p. 46–53. 2009.

PACWA-PLOCINICZAK, M. et al. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International journal of molecular sciences**. v. 12, p. 633-654. 2011.

PAL, T. N.; KUMAR, G.; SURESH, P. V. Enzymatic degradation of chitosan and production of D-glucosamine by solid substrate fermentation of exo-b-D-glucosaminidase (exochitosanase) by *Penicillium decumbens* CFRNT15. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 97 p. 97-106. 2015.

PALANISAMY, P.; RAICHUR, A.M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique. **Materials Science and Engineering: C**. v. 29, p. 199–204. 2009.

PASTORE, G.; MACEDO, G. A. Utilização de fungos na indústria de alimentos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 10. p. 311-337.

PATIL, N. S.; JADHAV, J. P. Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine by solid state fermentation of chitinase by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 using agricultural residues. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 91, p. 9-17. 2014.

PEDRO, A.S. et al. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 501-508. 2009.

PEKIN, G. et al. Production of sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 using Turkish corn oil and honey. **Engineering in life sciences**. v. 5, p. 357–362. 2005.

PERFUMO, A. et al. Rhamnolipid production by a novel thermotolerant hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. **Applied microbiology and biotechnology**. V. 75, p. 132-138. 2006.

PERFUMO, A. et al. Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: implications for their biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 16, p. 7297-7306, 2013.

POLYMAR. **A Quitina, precursora da Quitosana, é a fibra natural mais abundante depois da celulose.** Disponível em: <http://www.polymer.com.br/pagina.php?diretorio=ped/&menu=0&cod_secao=30&arquivo=quitina.php>. Acesso em: 29/01/2015.

PRATAP, S. S. et al. Surfactin: a review on novel microbial surfactant. **International Journal of Bioassays**. v. 02 n. 05, p. 740-745. 2013.

QAZI, M. A. et al. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium sp.* BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 6, November. 2013.

QAZI, M. A. et al. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium sp.* BS-8 from oil contaminated soil. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 5, p. 1065-1075, 2014.

RAHMAN, K. S. M. et al. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**. v. 18, p. 1277–1281. 2002.

RAHMAN, K.S.M. et al. The potential of bacterial isolates for emulsification with range of hydrocarbons. **Acta biotecnologica** v. 4, p. 335–345. 2003.

RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. **Biologia Vegetal**. 6a edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2002.

RAZA, Z. A.; KHALID, Z.M.; BANAT, I.M. Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**. v. 44, p. 1367-1373. 2009.

REMICKOVA, M. et al. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 75-81, 2008.

REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14 n.4, p. 1025-1035. 2010.

ROCHA E SILVA, N. M. P. et al. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 132-139, 2014.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental microbiology**. v. 3, p. 229–236. 2001.

ROSA, C. F. C.; FREIRE, D. M. G.; FERRAZ, H. C. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. **Journal of Environmental Chemical Engineering** v. 3 p. 89–94. 2015.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z., High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 52, p. 154–162. 1999.

ROUKAS, T. The role of oxidative stress on carotene production by *Blakeslea trispora* in submerged fermentation. **Critical reviews in biotechnology**, n. preprint, p. 1-10, 2015.

RUFINO, R. D. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.

SAMPAIO, R. M. **Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytic* por fermentação em óleo-diesel comercial**. Campinas, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1995.

SANTOS, D. K. et al. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 48–57. 2014.

SANTOS, E. R. et al. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 Biomass and Chitosan with Amino Acid Supply. **Molecules**. v. 18, p. 10095-10107. 2013.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science** v. 34, p. 714–724. 2008.

SHAO, Z. Trehalolipids, In: **Biosurfactants: From Genes to Applications**, Soberón-Chávez G Ed., pp. 121-143. 2010.

SILVA, A. C. **Produção de quitina e quitosana em cultura submersa de *Rhizopus arrhizus* nos meios milhocina e sintético para mucorales**. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2007.

SILVA, A. M. **Produção de Quitosana por Absidia corymbifera em meio de baixo custo e aplicação na descoloração de efluente industrial**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, E. J. et al. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** v. 117, p. 36–41. 2014.

SILVA, G. K. B. et al. Characterization of *Aspergillus niger* isolated from Caatinga soil with potential of biosurfactant production. In: **Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2013) Mad**. Wageningen Academic Publishers, p. 65. 2014.

SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Educs - Editora da Universidade Caxias do Sul, 2010. Cap. 11. p. 337-379.

SILVA, M. E. et al. Biosurfactant production by *Myrcia guianensis* endophytic fungi. In: **BMC Proceedings**. BioMed Central Ltd, p. 213. 2014.

SILVA, N. R. A. et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in Northeastern of Brasil. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

SILVA, P. A. C. **Influência dos parâmetros físico-químicos nas propriedades e na produção de biosurfactantes isolados do gênero *Cândida***. Dissertação (Mestrado) 76p - Universidade Católica de Pernambuco, 2008.

SILVA, R. C. F. S. **Resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de biosurfactantes para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo**. 149p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, R. D. C. F. et al., Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014.

SILVA, T. A. L. et al. Influence of two agroindustrial by-products in the production of biosurfactant by *Mucor circinelloides*. In: **Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2013) Mad**. Wageningen Academic Publishers, p. 114. 2014.

SILVEIRA, M.M. et al. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 55, p. 442-445, 2001.

SINGH, P. B.; SAINI, H. S. Exploitation of Agro-Industrial Wastes to Produce Low-Cost Microbial Surfactants. In: **Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals**. Springer New York, p. 445-471. 2014.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F., SEN, B. H. Fungi in endodontics infection. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 97 n. 5, p. 632-641, 2004.

SIVAKUMAR. T. Recent trends in Fungal Biotechnology – Review. **International Journal of Advanced Multidisciplinary Research** v. 1 n.1 p. 01–08. 2014.

SLIVINSKI, C. T. et al. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent - **Process Biochemistry** v. 47, p. 1848–1855. 2012.

SOBRINHO, H.B.S. et al. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 4-4, 2013.

SOTIROVA, A.V. et al. Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**. v. 56, p. 639–644. 2008.

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

SOUZA, D. G. et al. Production of the co-polymers chitin and chitosan by *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 supplemented with glutamic acid, corn steep liquor and post-frying soybean oil. **Asian Chitin Journal**, v. 9, p. 11-14. 2013.

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

STAMFORD, T. C. M. **Produção, caracterização e atuação anticariogênica da quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542**. 2006. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SUKRUTHA, S. K.; JANAKIRAMAN, S. Harnessing Indigenous Plant Seed Oil for the Production of Bio-fuel by an Oleaginous Fungus, *Cunninghamella blakesleeana* - JSK2, Isolated from Tropical Soil. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 172, n. 2, p. 1027-1035. 2014.

SUTHAR, H. et al. Evaluation of bioemulsifier mediated microbial enhanced oil recovery using sand pack column. **Journal of microbiological methods**. v. 75, p. 225–230. 2008.

SYLDATK, C. et al. Chem. and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes. **Zeitschrift fur Naturforschung Section C: Biosciences** v. 40, p. 51–60. 1985.

TABATABAEE, A. et al. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering**, v. 2 n. 1, p. 6-12. 2005.

TAIRA, C. L. et al. Virulence potential of filamentous fungi isolated from poultry barns in Cascavel, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 47, n. 1, p. 155-160, 2011.

TELLES, F. Q. Infecções por fungos filamentosos invasores. **Revista Prática Hospitalar**, v. 36, p. 1-6, 2004.

TERUEL, J. A.; ORTIZ, A.; ARANDA, F. J. Interactions of a bacterial trehalose lipid with phosphatidylglycerol membranes at low ionic strength. **Chemistry and physics of lipids**, v. 181, p. 34-39, 2014.

THAVASI, R. et al. Production and characterization of a glycolipid biosurfactant from *Bacillus megaterium* using economically cheaper sources. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 24, p. 917-925. 2008.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I.M. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by maring isolates of *Bacillus megaterium* and *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioresouce Technology**. v. 102, p. 772-778. 2011.

TIGINI, V. et al. Influence of Culture Medium on Fungal Biomass Composition and Biosorption Effectiveness. **Current Microbiology**. v. 64, p. 50–59. 2012.

TONINI, R. M. C. W; REZENDE, C. E; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por Bactérias: revisão. **Oecologia Australis**. v. 14 n. 4, p. 1025-1035, Dezembro, 2010.

TRUMMLER, K. et al. An integrated microbial/enzymatic process for production of rhamnolipids and l-(+)-rhamnose from rapeseed oil with *Pseudomonas sp.* DSM 2874. **European Journal of Lipids Science Technology**. v. 105, p. 563–571. 2003.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere** v. 57, p. 1139–1150. 2004.

VAN BOGAERT, I.N.A.; SOETAERT, W. Sophorolipids. In: **Biosurfactants: From Genes to Applications**, Soberón-Chávez G Ed., p. 179-210. 2010.

VANCE-HARROP, M. H. et al. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and Babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 120–123. 2003.

VATER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219. 2002.

VELIOGLU, Z.; UREK, R. O. Concurrent Biosurfactant and Ligninolytic Enzyme Production by *Pleurotus spp.* in Solid-State Fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1354-1364, 2014.

VERMA, A. et al. Multifactorial Approach to Biosurfactant Production by Adaptive Strain *Candida tropicalis* MTCC 230 in the Presence of Hydrocarbons. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 18 p. 145–153. 2015.

VICTOR, F. L. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos em dentes com indicação de retratamento**. 91 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

XIE, Y.; YE, R.; LIU, H. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 279, p. 175–178. 2006.

XIE, Y.W.; YE, R.Q.; LIU, H.L. Microstructure studies on biosurfactant-rhamnolipid/nbutanol/water/n-heptane microemulsion system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 292 p. 189–195. 2007.

YAMAGUCHI, M.; SATO, A. Microbial production of sugar-lipids. **Chemistry and Industry** v. 17, p. 741–742. 1976.

YOO, D.S.; LEE, B.S.; KIM, E.K. Characteristics of microbial biosurfactant as an antifungal agent against plant pathogenic fungus. **Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 15, p. 1164-1169. 2005.

ZHANG, R. et al. Isolation, Identification, and Quantification of Lichenysin, a Novel Nonvolatile Compound in Chinese Distilled Spirits. **Journal of food science**, v. 79, n. 10, p. 1907-1915, 2014.

ZILIO, R. L. et al. Biorremediação de solo arenoso contaminado por derrame simulado com benzeno, tolueno e xileno. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.2, p. 39-47, 2012.

CAPÍTULO II

**PRODUÇÃO DE CO-POLÍMEROS QUITINA E
QUITOSANA POR *Cunninghamella elegans*
UCP/WFCC 0542 EM MEIO SUPLEMENTADO COM
ÁCIDO GLUTÂMICO, MILHOCINA E ÓLEO DE SOJA
PÓS FRITURA**

PRODUÇÃO DE CO-POLÍMEROS QUITINA E QUITOSANA POR *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 EM MEIO SUPLEMENTADO COM ÁCIDO GLUTÂMICO, MILHOCINA E ÓLEO DE SOJA PÓS FRITURA

Daniele Gilvanise de Souza¹; Nathalia Sá Alencar Amaral Marques⁵; Thayse Alves de Lima e Silva; Patrícia Mendes de Souza; Marta Cristina Freitas Silva³; Anabelle Camarotti de Lima Batista e Galba Maria de Campos-Takaki⁴.

¹Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – Coordenação Geral de Pós-Graduação, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, 50.050-900 Recife-PE, Brasil

²Programa de Pós-Doutorado da CAPES, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, 50.050-900 Recife-PE, Brasil

³Universidade Federal de Roraima – UFRR

⁴Departamento de Ciências Animais (DCAN), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572 – Costa e Silva – 59625-000 Mossoró, RN, Brasil

⁵Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais, Coordenação Geral de Pesquisa, Pró-Reitoria Acadêmica, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP/PE

RESUMO

Quitina e quitosana são polissacarídeos abundantes e amplamente distribuídos, encontrados em invertebrados e parede celular fúngica, que apresentam propriedades peculiares que permitem a sua aplicação na remoção de resíduos, degradação de corantes, produção de filmes biodegradáveis, fabricação de embalagens e cosméticos. O presente estudo teve como finalidade obter e caracterizar quitina e quitosana através de um isolado de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542, cultivada em meio composto por sais inorgânicos e resíduos agroindustriais como substratos. Os resultados obtidos são compatíveis com os relatos da literatura onde em relação à quitina, a ocorrência das bandas amidas está na faixa de 1600 a 1400 cm^{-1} e quanto à quitosana as bandas são evidenciadas na faixa de 1900 a 1400 cm^{-1} , comprovando que *C. elegans* é um micro-organismo altamente viável para a produção de biopolímeros em meio de baixo custo.

INTRODUÇÃO

A quitina é um polímero linear, natural e insolúvel, que apresenta o mesmo tipo de unidade monomérica β -1,4-N-acetil-D-glicosamina e, com exceção da celulose, é o polissacarídeo mais abundante e largamente distribuído, servindo como elemento estrutural encontrado especialmente em animais invertebrados e na parede celular de fungos, principalmente os pertencentes à ordem Mucorales. A quitosana é um co-polímero derivado da N-desacetilação da quitina, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação, gerando assim diversos derivados da quitosana. A quitosana é caracterizada de acordo com o seu nível de desacetilação e massa molar, uma vez que essas características podem influenciar na degradabilidade e na hidrólise de polissacarídeos¹⁻⁶.

A quitina e a quitosana apresentam propriedades peculiares, podendo ser utilizadas com sucesso em uma grande variedade de aplicações, tais como na remoção e recuperação de diferentes resíduos, na biotransformação de pesticidas, na degradação de corantes, aminoácidos e proteínas. A quitosana pode ainda ser utilizada como clareador em sucos e na produção de filmes biodegradáveis para fabricação de embalagens e cosméticos⁴⁻¹².

Comercialmente, a quitosana é obtida através da desacetilação química da quitina de crustáceos através de tratamentos alcalinos. A quitosana crustácea é inconsistente nas suas propriedades físico-químicas devido à variabilidade das matérias-primas, a dureza dos processos de isolamento e conversão, os efeitos corrosivos dos produtos químicos utilizados no processo de isolamento, a variabilidade nos níveis de contaminação de proteína e desacetilação⁶. A quitina e quitosana fúngica torna-se atrativa, pois os seus produtos específicos podem ser obtidos sob condições padronizadas através da manipulação cuidadosa das variáveis de crescimento, tais como o pH, composição do meio de cultivo e tipo de fermentação¹³⁻¹⁶. Outro fator a ser considerado é custo de obtenção destes polímeros. Neste contexto, a utilização de substratos agroindustriais aparece como uma alternativa viável, uma vez que torna a produção econômica. Entre as fontes renováveis obtidos a partir de agronegócio, a milhocina é sem dúvida um dos produtos mais utilizados o qual é eficaz como uma fonte de Nitrogênio em vários processos fermentativos na obtenção de insumos de alto valor agregado^{4,6,17-18}.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo: O micro-organismo utilizado no experimento foi o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* UCP 0542, disponível no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas

em Ciências Ambientais e Biotecnologia, NPCIAMB, UNICAP, PE, Brasil, registrada na World Federation of Culture Collection-WFCC.

Meio de manutenção: Ágar Sabouraud, composto por Peptona – 10g/L, Glicose – 40g/L e Ágar – 15g/L; pH 5,5; esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos e posteriormente distribuído em placas de Petri.

Substratos: Foram utilizados como substratos o óleo de soja pós-fritura e milhocina – resíduo obtido do beneficiamento do milho, cedido pela empresa CornProducts, Brasil.

Condições de Cultivo: O cultivo para produção de quitina e quitosana por *C. elegans* foi realizados em 4 frascos Erlenmeyeres de capacidade 500 ml contendo 200 ml do meio básico (NH₄NO₃ - 1 g/L; KH₂PO₄ - 0,2 g/L; MgSO₄.7H₂O - 0,2 g/L e ácido glutâmico –10 g/L) suplementado com 2,75% de óleo de soja pós-fritura e 2,15% de milhocina¹⁹. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 5,5, e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, alíquotas (2mL) da suspensão de esporos contendo 10⁷ esporangiólos/mL foram inoculadas nos Erlenmeyers. As amostras foram mantidas sob agitação orbital de 150 rpm, por 96 horas à temperatura de 28°C.

Extração de Quitina e Quitosana: Para a extração dos polissacarídeos, foi utilizada a biomassa seca em estufa a 50° de *C. elegans* UCP/WFCC 0542, de acordo com a metodologia de Jin Hu et al.,²⁰. A biomassa, adicionada a uma solução de NaOH 1M foi autoclavada a 121°C para a quebra da parede celular fúngica, e posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos a 10°C. O resíduo foi adicionado a uma solução de Ácido Acético 2% e autoclavado em Vapor Fluente a 100°C. Depois de centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos a 10°C, foi separada a quitina do sobrenadante. A quitina extraída foi lavada com água destilada gelada até sua neutralização de pH e depois, colocada em placa de petri para secagem. O Sobrenadante foi alcalinizado em pH 9 e mantido na geladeira por 24h para precipitação da quitosana. Posteriormente, o resíduo foi separado do sobrenadante através de centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 10°C. A quitosana foi lavada até sua neutralização de pH e depois, colocada em placa de petri para secagem.

Caracterização de Quitina e Quitosana: A caracterização da quitina e quitosana obtidas da massa micelial de *C. elegans* foi submetida à análise por espectroscopia de infravermelho, em

pastilhas de KBr, utilizando-se espectrofotômetro com transformada de Fourier (FTIR), BRUKER Mod. IFS 66. O grau de desacetilação da quitina e quitosana microbiológica foi determinado usando a espectroscopia de infravermelho, utilizando a razão da absorbância A1665/A3450, calculado de acordo com a seguinte equação:

$$GD(\%)=(A1665/A3450) \times 100/1.33$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

C. elegans produziu 8.12 g/L de biomassa seca usando meio básico contendo sais, suplementado com 10g/L de ácido glutâmico, 2,75% de óleo de soja pós-fritura e 2,15% de milhocina. Santos et al.⁶ conseguiu produzir 16,95 g/L de biomassa seca utilizando o mesmo micro-organismo crescido em meio contendo milhocina suplementado com aminoácidos. No entanto, o alto custo para suplementar o meio com aminoácidos justifica este estudo para escolher o melhor meio de obtenção microbiológica, sendo mais barato que a quitosana crustácea.

Na figura 01, a análise espectrofotométrica por FT-IR mostra a quitosana comercial e a microbiológica e seus graus de desacetilação, determinado pela porcentagem de grupos amins livres no carbono 2 nos resíduos. A análise por FT-IR estimou que a quitosana microbiológica apresenta um grau de desacetilação de 87,44% e a quitosana comercial um grau de desacetilação de 78,52%. As regiões mais significativas dos espectros são aquelas que revelam bandas amida em 1665, 1555 e 1313 cm⁻¹ as quais mostram dicroísmo perpendicular atribuído, respectivamente, à interação de acoplamento com C=O, à deformação de N– H no plano CONH e a ligação CN com deslocamento de CH₂. A presença de picos característicos na quitosana microbiológica estimula a sua produção com potencial comercial por fontes alternativas nutricionais associadas com outras variáveis testadas neste trabalho.

A figura 02 mostra a caracterização físico-química da quitina obtida de *C. elegans* por espectroscopia de infravermelho. As características mais importantes obtidas para quitina de *C. elegans* são as bandas amida entre 1600 a 1400 cm⁻¹. Em relação a quitosana, as bandas mais características estão entre 1900-1400cm⁻¹.

Os dados obtidos neste estudo condizem com os encontrados na literatura quando se comparam com os espectros de infravermelho, tanto para a quitina e quitosana obtidas por via microbiológica. Resultados similares foram obtidos por Fai et al.,¹⁶ onde *Mucor circinelloides* apresentou espectros nas bandas amida para quitina e quitosana de aproximadamente 1665, 1555 e 1313 cm⁻¹ e quitina de *C. elegans* mostra bandas na região amida II em 1153, 1378, e

1558 cm^{-1} . Santos et al.,⁶ também reporta resultados similares na obtenção de quitosana por *C. elegans* utilizando meio de cultivo contendo milhocina como substrato.

Figura 01: Análise comparativa por FT-IR do espectro entre quitosana crustácea (grau de desacetilação de 78,52%) e quitosana de *C. elegans* (grau de desacetilação de 87,44%)

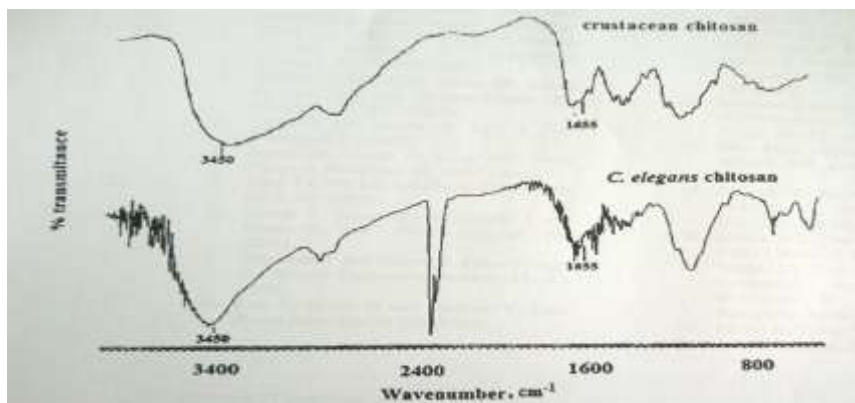
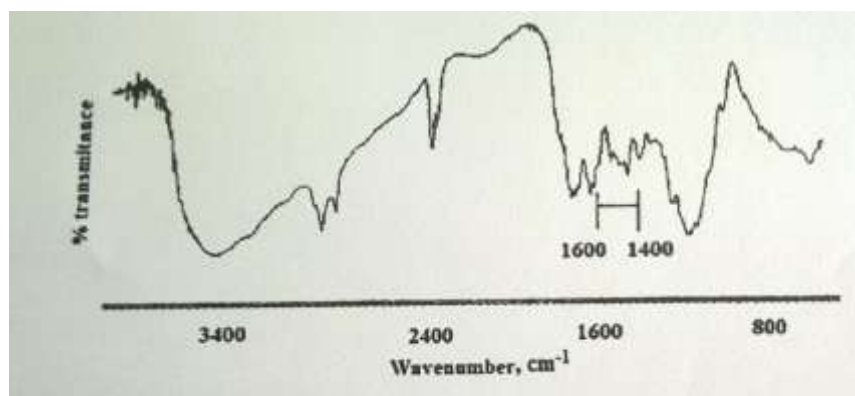


Figura 02: Espectroscopia de Infravermelho de quitina extraída da massa micelial de *Cunninghamella elegans* UCP 542



CONCLUSÕES

Cunninghamella elegans é um fungo filamentoso onde a obtenção de biopolímeros quitina e quitosana se mostra altamente viável através de cultivos em meio de baixo custo. Os resultados para caracterização de quitina e quitosana por *C. elegans* UCP 542 condizem com os reportados na literatura por fungos filamentosos da ordem Mucorales quando produzidos em meio contendo substratos agroindustriais.

REFERÊNCIAS

- [1] ANDRADE, V.S.; NETO, B.B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial desing analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.** V. 46, P. 1042-1045. 2000.
- [2] COSTA SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quimica Nova**; V. 29(4), P. 776-785. 2006.
- [3] PEDRO, A.S.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chtosan: na option for development of essencial oil delivery systemes for oral cavity care? **Carbohydrate Polymers**, V. 76, P. 501-508. 2009.
- [4] CARDOSO, A.; LINS, C.I.M.; SANTOS, E.R.; FREITAS DA SILVA, M.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. **Molecules** V. 17, P. 4904–4914. 2012.
- [5] LATHA, S.; SURESH, G. Studies on chitosan production from different fungal mycelium, **Int.J.Curr.Biotechnol.** v. 1(1), P. 9-11. 2013.
- [6] SANTOS, E. R.; FREITAS DA SILVA, M.C.; SOUZA, P. M.; CARDOSO, A. S.; PAIVA, S.C.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; NASCIMENTO, A. E.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 Biomass and Chitosan with Amino Acid Supply. **Molecules**. V. 18, P. 10095-10107. 2013.
- [7] KHAN, T. A.; PEH, K.K.; CH'NG, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. **J Pharm Pharmaceut Sci.** V. 5(3), P. 205-212. 2002.

[8] OKAWA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Comparative Study of Protective Effects of Chitin, Chitosan, and N-Acetyl Chitohexaose against *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* Infections in Mice. **Biol. Pharm. Bull.** V. 26(6), P. 902—904. 2003.

[9] SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.** V. 13 P. 383-420. 1995.

[10] KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field. **Curr Pharm Biotechnol.** V. 4(5) P. 303-9. 2003.

[11] RUDRAPATNAM, N. T.; FAROOQAHMED, S. K. Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, V. 43(1), P. 61.87. 2003.

[12] SYNOWIECK, J.; AL-KHATTEB, N. A. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, V. 43(2), P.144-171. 2003.

[13] JAWORSKA, M.; SAKURAI, K.; GAUDON, P.G.E. Influence of chitosan characteristics on polymer: Crystallographic properties. **Polym. Int.** V. 52, P. 198-205. 2003.

[14] KITTUR, F.S.; PRASHANTH, K.V.H.; SANKAR, K.V.; THARANATHAN, R.N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydr. Polym.** V. 49, P. 185-193. 2002.

[15] MARTÍNEZ-CAMACHO, A.P.; CORTEZ-ROCHA, M.O.; EZQUERRA-BRAUER, J.M.; GRACIANO-VERDUGO, A.Z.; RODRIGUEZ-FÉLIX, F.; CASTILLO-ORTEGA, M.M.; YÉPIZ-GÓMEZ, M.S.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. **Carbohydr. Polym.** V. 82, P. 305-315. 2010.

[16] FAI, A. E. C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD-ARNAUD, T.M.; SANTA-CRUZ, P.D.A.; FREITAS DA SILVA, M.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; STAMFORD, T.L.M. Physico-Chemical

Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**. V. 16, P. 7143-7154. 2011.

[17] OBAYORI O.S; ADEBUSOYE, S.A.; ILORI, M.O.; OYETIBO, G.O.; OMOTAYO, A.E; AMUND, O.O. Effects of corn steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. **Curr. Microbiol.** V. 60, P. 407–411. 2010.

[18] BATISTA, A.C.L.; CARDOSO, A.; SANTOS, E.; FREITAS, S.M.C.; ALVES, S.C.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M Influence of simultaneous factors on chitosan production by *Syncephalastrum racemosum* (UCP/WFCC 0148) in corn steep liquor culture media. *Asian Chitin J.* v. 7, P. 63–67. 2011.

[19] SOUZA, D.G.; SILVA, N.R.A.; SOUZA, P.M.; SILVA, M.C.F.; ANTUNES, A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Cunninghamella elegans* UTILIZANDO MEIOS DE BAIXO CUSTO COMO SUBSTRATOS [Anais do] I Congresso Nacional de Ciências Biológicas. E, [anais do] IV Simpósio de Ciências Biológicas. Recife, Pernambuco, **2011**.

[20] JIN HU, K.; YEUNG, W.W.; HO, K.P.; HU, J.L. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *Absidia glauca*. **Journal of Food Biochemistry** V. 23. P.187-196. 1999.

Recebido: 27 de Setembro de 2013

Aceito: 30 de Novembro de 2013

CAPÍTULO III

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR
Cunninghamella elegans UCP 0542 UTILIZANDO
COMO SUBSTRATOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
E APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE PETRÓLEO E
DERIVADOS**

Produção de biossurfactante por *Cunninghamella elegans* UCP 0542 utilizando como substratos resíduos agroindustriais e aplicação na remoção de petróleo e derivados

Daniele G. Souza^{1,2}, Nathalia Sá A. A. Marques^{1,2}, Thayse A. Lima e Silva²; Rosileide F. Andrade²; Anabelle Camarotti L. Batista³ e Galba M. Campos-Takaki^{2,*}

¹ Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais (MDPA), Universidade Católica de Pernambuco 50050-900 Recife, PE, E-mail: dany.l.s@hotmail.com

² Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-590, Recife, PE, Brasil;

³ Departamento de Ciências Animais (DCAN), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572 – Costa e Silva – 59625-000 Mossoró, RN, Brasil

*Autor para correspondência; Universidade Católica de Pernambuco, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900 Recife, PE, Brasil. Tel.: +55-81-2119-4017; Fax: +55-81-2119-4043.

E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Resumo: Biossurfactantes são metabólitos de origem microbiana que exibem propriedades tensoativas e possuem elevada capacidade emulsificante, podendo ser aplicados em diversos setores como indústria farmacêutica, indústria alimentícia e biorremediação. Neste trabalho foi avaliado o potencial biotecnológico do fungo filamentosso *Cunninghamella elegans* na produção de biossurfactante utilizando meio básico, com milhocina e óleo pós-fritura como fontes de carbono e nitrogênio. A produção foi realizada em 200 mL do meio de cultura, pH 5,5, com 1% de inóculo de 10^7 esporangólios/mL, mantidos à 150 rpm, por 96 horas, a 28°C. As propriedades surfactantes foram avaliadas através da determinação da tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico, livre de células. A estabilidade do biossurfactante foi avaliada com amostras retiradas no tempo 96h, através da redução da tensão superficial do líquido metabólico, em diferentes temperaturas, em diferentes pH e diferentes concentrações salinas. A aplicação na biorremediação utilizou solo arenoso contaminados por petróleo e derivados. Os resultados demonstram que *C. elegans* é capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 28 mN/m^{-1} , mantendo-se estável em condições ambientais adversas e satisfatória aplicação na biorremediação de solo contaminado. Tais resultados demonstram o elevado potencial biotecnológico de *C. elegans* na produção de biossurfactante, considerando sua estabilidade e aplicabilidade.

Palavras-chaves: biossurfactante; fungo filamentosso; *Cunninghamella elegans*; biorremediação

1. Introdução

A grande preocupação mundial nas últimas décadas é a liberação em grandes quantidades de hidrocarbonetos para o meio ambiente, proveniente de atividades industriais e em especial, os desastres petrolíferos. Ao longo dos anos, diversas técnicas (físicas, químicas e biológicas) vêm sendo desenvolvidas para retirada do petróleo derramado ou para redução de seus efeitos sobre o ecossistema [01-03]. Neste contexto, os biossurfactantes vêm sendo testados em aplicações ambientais tornando a biorremediação uma opção atraente na degradação de petróleo, pois, sendo um processo natural, apresenta vantagens sobre outros métodos de tratamento, com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras [04-08]. Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e possuem características de detergência, emulsificação, solubilização, diminuição da tensão superficial e interfacial, dispersão de fases, biodegradabilidade e baixa toxicidade [02, 03, 08-11]. Pela sua variada aplicação, a demanda mundial por surfactantes vem crescendo muito ao longo das últimas décadas, tendo 13 milhões de toneladas produzidas em 2008 e uma estimativa de que em 2018 sejam produzidas aproximadamente 476 milhões de toneladas, com um valor estimado em \$2,2 bilhões de dólares, segundo Reis et al., [12].

Embora bactérias e leveduras sejam os produtores mais explorados devido a sua velocidade de crescimento e adaptação, os bioprodutos fúngicos vem sendo amplamente utilizados em diversas áreas tais quais a indústria alimentícia e farmacêutica. Nas últimas décadas, o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos vem sendo explorado visando melhoria nos processos produtivos. Gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cunninghamella* e *Rhizopus* são os principais representantes em se tratando de produção biotecnológica na obtenção de bioprodutos [13-19]. A fim de minimizar os custos da produção, substratos como os resíduos e rejeitos industriais e agroindustriais vem sendo utilizados como excelentes fontes nutricionais. Tal prática, além de tornar a produção economicamente viável, proporciona uma destinação mais adequada a esses rejeitos, minimizando assim o impacto ao ambiente. [20-24].

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico da espécie fúngica *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 na produção de biossurfactantes utilizando fonte nutricional meio básico suplementado com milhocina e óleo de soja pós-fritura.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado nos experimentos foi o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 isolado do manguezal pernambucano e disponível no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia NPCIAMB – UNICAP – PE. O micro-organismo foi mantido em meio Ágar Sabouraud, composto por peptona – 10g/L, glicose – 40g/L e ágar – 15g/L; pH 5,5; esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos, distribuído em placas de Petri e incubados a 28 °C.

2.2. Substratos utilizados

Foram utilizados como substratos, óleo de soja pós-fritura, cedido pelo Restaurante Galinha de Cabidela (BR 232, KM 75, Gravatá – PE) e milhocina – resíduo obtido do beneficiamento do milho, cedido pela empresa CornProducts Brasil.

2.3. Inóculo

Foi preparada uma suspensão de esporos em água destilada previamente esterilizada em autoclave, contendo uma concentração aproximada de 10^7 esporangiólos/mL. Os esporangiólos foram contados por microscopia óptica, utilizando um hemocitômetro.

2.4. Condições de Cultivo

Os cultivos para produção de biossurfactante por *C. elegans* foram realizados em 12 frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio básico composto por sais (NH_4NO_3 - 1 g/L; KH_2PO_4 - 0,2 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 g/L e ácido glutâmico – 10 g/L) suplementado com óleo de soja pós-fritura e milhocina de acordo com o planejamento do tipo Delineamento Central Composto Rotacional de dois níveis, descrito na tabela 1. O pH inicial dos meios de culturas foi ajustado para 5,5 e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Em seguida, foi inoculado um volume da suspensão de esporos equivalente a 1% do total do meio de cultura nos frascos, que foram mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, por 96 horas à temperatura de 28 °C. Passado esse período, as amostras foram filtradas e centrifugadas a 4000 rpm, à temperatura de 10 °C, durante 15 minutos. A biomassa foi liofilizada para determinação do peso seco e o sobrenadante submetido às análises de tensão superficial, índice de emulsificação, pH, estabilidade, fitotoxicidade, remoção de derivados de petróleo, precipitação por solvente orgânico, determinação da carga iônica e composição bioquímica preliminar.

2.5. Planejamento experimental

Foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) de dois níveis, com 8 ensaios sendo 4 repetições no ponto central. Os resultados dos efeitos das variáveis independentes (milhocina e óleo de soja pós-fritura) sobre a variável resposta tensão superficial foram analisados pelo software STATISTICA versão 7.0 da StatSoft®. A tabela 1 apresenta os níveis e as concentrações para as variáveis independentes milhocina e óleo de soja pós-fritura do planejamento.

2.6. Determinação da tensão superficial e CMC

Os líquidos metabólicos livres de células, contendo o biossurfactante após 96 horas de cultivo, foram submetidos à determinação da tensão superficial, através de um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltd. Finland) utilizando-se o anel de Du Nouy, através de sua imersão no líquido, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido, de acordo com Kuyukina et al., [25]. A concentração de monômeros de biossurfactante capazes de juntar-se e formar micelas é chamada de concentração crítica micelar (CMC), onde de acordo com a concentração pode ser observado mudanças na tensão superficial do tensoativo. A CMC do biossurfactante foi determinada através da determinação da tensão superficial da água destilada contendo diferentes concentrações do biossurfactante isolado até obtenção de um valor de tensão superficial constante.

2.7. Índice de emulsificação

O sobrenadante foi analisado segundo o método de Cooper e Goldenberg, [26]. Foram adicionados 2,0 mL do líquido metabólico isento de células a 1,0 mL de petróleo bruto, óleo queimado de motor, óleo diesel, querosene, óleo de milho e óleo de canola em tubos de ensaio, a mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos em sua velocidade máxima. Após 24 horas de repouso, das emulsões formadas, foi calculada a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicado por 100, sendo o índice de emulsificação expresso em porcentagem.

2.8. Estabilidade

A estabilidade do biossurfactante produzido na condição selecionada no DCCR proposto foi avaliada pela determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células, em duas temperaturas (100 °C em vapor fluente, e 121 °C sob pressão); em diferentes concentrações de pH (2, 4, 6, 7, 8, 10, 12 e 13) e em diferentes concentrações de NaCl (2, 2,5, 4, 5, 10 e 20%) de acordo com as metodologias propostas por Barros et al., [27] e Felix, [28]. A determinação do pH foi obtida por potenciometria (potenciômetro digital Quimis Mod. 400 A). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o resultado final expresso pela média aritmética dos resultados obtidos.

2.9. Aplicação na remoção de derivados de petróleo

Os ensaios para remoção de derivados de petróleo foram realizados em Erlenmeyeres de 125mL contendo solo arenoso, coletado da praia de Boa Viagem (Recife, PE), contaminado artificialmente por petróleo, querosene, óleo diesel e óleo queimado de motor, respectivamente. Foram utilizados 50g de solo arenoso (Granulometria: Abert 100 – ABNT 18 – Tyler Mesh 16), acrescidos de 5mL do contaminante, com adição de 50mL da solução de biossurfactante. Água destilada foi utilizada como controle na mesma proporção da solução de biossurfactante. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital por 72h a 28°C, de acordo com o que foi proposto por Santos et al., [29]. Posteriormente, as amostras de solo foram separadas da solução de biossurfactante e água destilada por centrifugação a 4000 rpm e a quantidade de óleo removido determinado por gravimetria. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo o resultado final expresso pela média aritmética dos resultados obtidos.

2.10. Isolamento

O biossurfactante foi isolado através da técnica de precipitação por solvente orgânico. Foi adicionado etanol na proporção de 2:1 (solvente:soluto) e o material mantido em repouso por 24h em 4°C. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado centrifugado a 4000 rpm, à temperatura de 10 °C, durante 30 minutos. Posteriormente, o extrato bruto foi re-suspenso duas vezes com etanol gelado, centrifugado e liofilizado, de acordo com a metodologia utilizada por Bueno [30]. O rendimento do biossurfactante pré-purificado foi expresso em g/L⁻¹.

2.11. Composição Bioquímica e determinação da carga iônica

O biossurfactante isolado na melhor condição do planejamento foi caracterizado quanto a sua composição bioquímica através da determinação do índice de proteínas de acordo com o kit Labtest (Brasil), os carboidratos foram quantificados de acordo com a metodologia de Dubois et. al., [31], utilizando fenol ácido-sulfúrico e os lipídios foram quantificados pela metodologia de Manocha et al., [32] utilizando extração por clorofórmio e

metanol. A carga iônica do biossurfactante foi determinada utilizando aparelho potencial Zeta modelo ZM3-DG, Zeta Meter System 3.0+, com imagens diretas para o vídeo do Medidor Zeta, San Francisco, CA, EUA.

2. 12. Teste de fitotoxicidade

A toxicidade do biossurfactante foi avaliada através de ensaios de germinação e crescimento de raiz em sementes de repolho popularmente conhecido como “repolho chato de quintal” (*Brassica oleracea var. capitata*). Foi preparado uma solução do biossurfactante em água destilada contendo duas concentrações (1g/L e 2,5g/L), em contrapartida, foi utilizado soluções de Triton-X nas concentrações de 1% e 2,5% como controle negativo e água destilada como controle positivo. Os ensaios foram realizados em placas de petri de 9cm forradas com papel filtro Whatman n.º 1 previamente esterilizadas, a sementes foram tratadas previamente utilizando uma solução de hipoclorito de sódio 1% e posteriormente, 10 sementes foram inoculadas em cada placa de Petri contendo 5mL da solução de biossurfactante, Triton-X100 e água destilada. Após um período de incubação de 96h a 28°C no escuro, as placas foram retiradas e foi realizada a contagem de germinação de sementes, alongamento das raízes e índice de germinação de acordo com a metodologia proposta por Tiquia et al. [33], onde:

Germinação de sementes (%) = (número de sementes germinadas no teste/número de sementes germinadas no controle) x 100

Crescimento da raiz (%) = (comprimento radicular do teste/comprimento radicular no controle) x 100

Índice de germinação (%) = [(% Germinação de sementes) X (% Comprimento da raiz)]/100

3. Resultados e Discussão

3.1. Tensão superficial e CMC

A tensão superficial é um dos critérios mais utilizados na seleção de micro-organismos produtores de biossurfactantes. O estudo dessa propriedade é fundamental, uma vez que é através da redução da tensão superficial que se dá a formação de micelas, capazes de se agregar a partículas oleosas fazendo com que estas se dispersem. Um biotensioativo eficiente pode reduzir a tensão superficial entre a água pura e o ar de 72 mN/m⁻¹ para valores abaixo de 35 mN/m⁻¹ [03, 34-37]. A tabela 1 apresenta os resultados obtidos na análise da tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células, produzido por *C. elegans* UCP 0542 no planejamento DCCR.

Tabela 1. Tensão Superficial de acordo com o planejamento DCCR 2² utilizando *C. elegans* UCP/WFCC 0542 após 96 horas de cultivo.

Condições	Componentes meio de cultura		Tensão superficial mN/m ¹
	Milhocina (%)	Óleo pós-fritura (%)	
01	-1	-1	31,70
02	-1	+1	29,10
03	+1	-1	29,50
04	+1	+1	29,00
05	-1,41	0	28,50
06	+1,41	0	31,50
07	0	-1,41	31,90
08	0	+1,41	28,20
09	0	0	29,10
10	0	0	28,70
11	0	0	29,20
12	0	0	29,20

Concentração de milhocina (% v/v): -1,41 (0,46 mL); -1 (0,3 mL); 0 (2,15 mL); +1 (4 mL); +1,41 (4,76 mL)

Concentração de óleo de soja pós-fritura (% v/v): -1,41 (0,28 mL); -1 (1 mL); 0 (2,75 mL); +1 (4,5 mL); +1,41 (5,22 mL)

A condição 08 (milhocina 2,15% e óleo pós-fritura 5,22%) foi considerada a melhor atividade tensoativa, sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m⁻¹ para 28,2 mN/m⁻¹. O tempo zero nas condições

estudadas foram em torno de 38 mN/m^{-1} . Este fato já demonstra que o micro-organismo selecionado tem um bom potencial produtor de biossurfactante de interesse comercial.

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os recentes avanços na utilização de fungos filamentosos: Qazi et al., [17] reportaram a obtenção de um biossurfactante utilizando *Fusarium sp.* em meio mineral e óleo vegetal, onde a redução da tensão superficial foi de 32 mN/m^{-1} . Andrade Silva et al., [38] utilizando *Cunninghamella echinulata* foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 36 mN/m^{-1} utilizando resíduos como milhocina e óleo de fritura como fontes adicionais de carbono e nitrogênio. A capacidade de reduzir a tensão superficial depende da concentração do composto específico com atividade de superfície, ou seja, a CMC que é definido como a concentração mínima do biossurfactante necessária para que aconteça a redução máxima da tensão superficial da água e iniciar a formação de micelas [38]. Neste estudo, a tensão superficial da água foi capaz de baixar gradualmente a medida que aumentou-se a concentração de biossurfactante na solução. Concentrações a partir de $0,01 \text{ g/L}$ foram testadas, e a menor redução da tensão superficial foi obtida na concentração de $0,1 \text{ g/L}$ onde a partir deste ponto manteve-se constante, como mostra a figura 01.

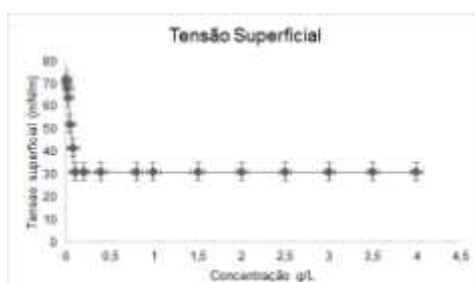


Figura 1. Concentração micelar crítica do biossurfactante produzido por *C. elegans* UCP 0542

3.2. Análise estatística:

A tabela 2 mostra a análise de variância (ANOVA) dos efeitos das variáveis independentes e dependentes obtidas no segundo delineamento central composto rotacional de 2^2 . Os dados obtidos foram estatisticamente satisfatórios apresentando significância quando analisados no nível de confiança de 95%, apresentando baixo erro puro de 0,0566667 resultando em um satisfatório coeficiente de regressão de 0,91764. O diagrama de Pareto (figura 2) evidencia os dados apresentados pela ANOVA, mostrando os efeitos e interação das variáveis independentes milhocina e óleo de soja de fritura para a variável resposta tensão superficial do líquido metabólico isento de células, produzido por *C. elegans*. Os efeitos estimados são estatisticamente significativos quando estão a direita da linha tracejada vertical ($P = 0,05$).

Tabela 2. ANOVA obtida a partir do segundo delineamento central composto rotacional 2^2 para interação das variáveis independentes (milhocina e óleo de soja pós-fritura) e variável dependente (tensão superficial)

Efeito	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	P
(1)Milhocina(L)	1,02652	1	1,02652	18,1150	0,023779
Milhocina(Q)	10,40400	1	10,40400	183,6000	0,000869
(2)Óleo pós fritura(L)	1,55255	1	1,55255	27,3980	0,013570
Óleo pós fritura(Q)	1,02400	1	1,02400	18,0706	0,023857
1L x 2L	1,10250	1	1,10250	19,4559	0,021620
Falta de ajuste	1,35093	3	0,45031	7,9466	0,061268
Erro puro	0,17000	3	0,05667		
Total	18,46667	11			

ANOVA; Var.:Tensão Superficial; $R^2=,91764$; Adj:.,84901 2 fatores, 1 Bloco, 12 Ensaios; Média quadrática Erro puro=,0566667

A análise do diagrama de Pareto, ilustrado na figura 2, confirma que a milhocina teve um efeito positivo significativo na produção do biossurfactante e o óleo de fritura apresentou um efeito negativo na interação quadrática enquanto as variáveis apresentaram efeitos negativos na interação linear. A combinação das variáveis apresentou efeitos satisfatórios para variável resposta tensão superficial. O Gráfico de Superfície, apresentado na figura 4 evidenciam os dados obtidos no Diagrama de Pareto.



Figura 2. Diagrama de Pareto para planejamento DCCR 2² com duas variáveis independentes (1) milhocina (2) óleo de soja pós-fritura, tendo como variáveis resposta tensão superficial.

Embora os dados apresentem significância dentro dos níveis de confiança e o coeficiente de regressão esteja acima de 0,9, uma otimização dos processos produtivos se faz necessária a fim de melhorar a interação das variáveis independentes.

3.3. Índice de emulsificação

Emulsificação é a dispersão de um líquido em outro, consistindo em gotas microscópicas que variam de tamanho entre 0,1 e 100nm de diâmetro. Geralmente, quanto menor o diâmetro das gotículas, mais estável será a emulsão formada [39]. A capacidade de estabilizar emulsões é também um parâmetro importante, utilizado para observar a atividade emulsificante de biossurfactante. Substâncias que apresentam essa capacidade têm importância relevante na composição de produtos alimentícios, detergentes ou mesmo na utilização em biorremediação [40]. No presente estudo foi utilizado petróleo bruto, óleo queimado de motor, óleo diesel, querosene, óleo de milho e óleo de canola como substratos hidrofóbicos para avaliar a capacidade de emulsificação do agente surfactante produzido por *C. elegans* UCP 0542. Os resultados estão expressos na figura 03.

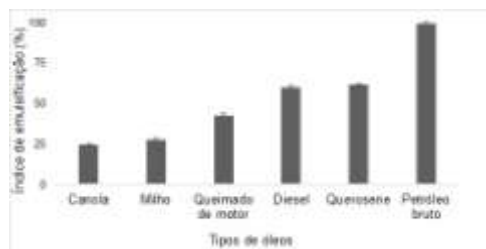


Figura 03: Índice de emulsificação obtido pelo biossurfactante produzido por *C. elegans* UCP 0542

Os resultados apresentados na figura 03 demonstram que o biossurfactante produzido por *C. elegans* foi capaz de emulsionar o petróleo bruto em aproximadamente 100%, o óleo diesel e querosene foram capazes de formar emulsões próximos de 60%, o óleo queimado de motor foi capaz de formar emulsão em torno de 42% enquanto que os óleos vegetais apresentaram baixa formação de emulsão. Qazi et al., [17], obtiveram índice de emulsificação de aproximadamente 71% utilizando querosene como substrato hidrofóbico para *Fusarium sp.* Andrade Silva et al., [38], obtiveram resultado similar ao utilizar óleo queimado de motor para *C. echinulata*, conseguindo um índice de emulsificação próximo a 80%. É notável que substratos derivados de petróleo apresentam maior capacidade de formar emulsões, o que pode ser explicado pela afinidade do biossurfactante pelos substratos de cadeias estruturais mais complexas. Demais literaturas exaltam a capacidade emulsificante de fungos filamentosos como *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.* através da análise de sua atividade de emulsificação. Estudos como o de Castiglioni et al., [18] e Colla; Hemkemeier; Gil [41] são importantes para demonstrar a capacidade das espécies filamentosas dentro da biotecnologia na produção de biossurfactantes, que pode ser equiparada a capacidade produtiva de leveduras e bactérias.

3.4. Estabilidade

De acordo com Mulligan [42], fatores ambientais como salinidade e temperatura influenciam diretamente na atividade e na estabilidade de um biossurfactante. Consequentemente, é de fundamental importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos. O

estudo de estabilidade foi realizado quanto a capacidade do biossurfactante manter suas propriedades frente a condições ambientais adversas tais como variação de temperatura, pH e força iônica. O biossurfactante produzido por *C. elegans* UCP/WFCC 0542 foi testado utilizando a condição do planejamento fatorial que demonstrou a menor redução da tensão superficial.

Os resultados mostraram que o biossurfactante apresentou estabilidade na maioria das condições propostas mantendo-se abaixo de 40mN/m^{-1} . Em relação à mudança de pH, o menor resultado da tensão superficial foi de $34,6\text{ mN/m}$ para pH 13, apresentando precipitação nas condições de pH 12 e 13. Em relação à variação da concentração de salinidade, o biossurfactante se manteve estável na concentração mais baixa de NaCl, com tensão superficial de $30,4\text{ mN/m}$. Com relação a temperatura, o biossurfactante manteve-se estável às altas temperaturas, com tensão superficial em $32,1\text{ mN/m}$ quando submetido à 100°C , e $30,4\text{ mN/m}$ quando submetido à 121°C . Tais resultados podem ser observados na figura 4a, 4b e 4c.

Andrade e Silva et al., [38] produziram um biossurfactante utilizando o fungo filamentosso *C. echinulata* em condições similares ao presente estudo, que se mostrou estável em condições diferentes de temperatura, salinidade e pH. Também foi reportado por Andrade e Silva et al., [38] a precipitação em pH 12, que pode estar relacionado com a desnaturação de proteínas, de acordo com Ghurye et al., [43]. Comportamentos similares em relação à estabilidade também foram reportados por Quazi et al., [17] e Luna et al., [44] para biossurfactantes fúngicos produzidos em meios contendo resíduos agroindustriais.

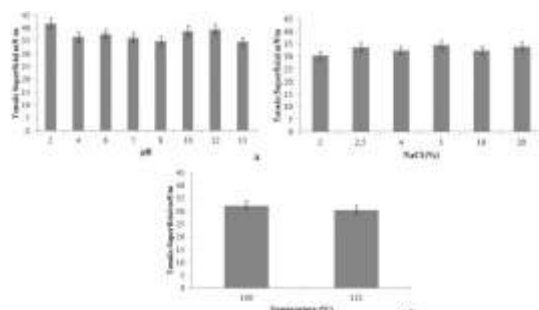


Figura 4. Estudo de estabilidade do biossurfactante produzido por *C. elegans* UCP/WFCC 0542: a – tolerância a pH; b – tolerância a força iônica; c – tolerância a temperatura

3.5. Aplicação na remoção de derivados de petróleo

Biossurfactantes possuem habilidade de emulsificar hidrocarbonetos aumentando a solubilidade da água, reduzindo a tensão superficial e aumentando a dispersão de substâncias oleosas em partículas de solo [45-48]. As amostras de solo artificialmente contaminadas foram submetidas a dois tratamentos: o líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante após 96h de cultivo e água destilada (controle). Os resultados obtidos nos ensaios para remoção de derivados de petróleo em solo estão descritos na figura 5.

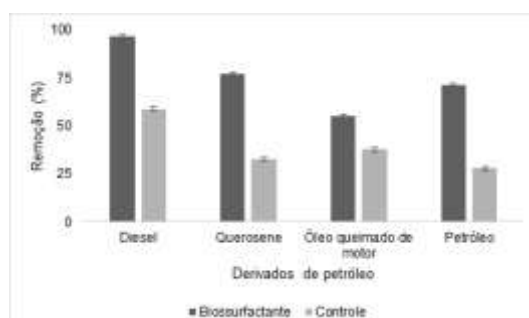


Figura 5. Ensaio de remoção de derivados do petróleo por biossurfactante de *C. elegans* UCP/WFCC 0542

Todos os ensaios apresentaram resultados satisfatórios na aplicação de biossurfactante em solo contaminado em relação às amostras controle, apresentando percentual de remoção acima de 50% em óleo queimado de motor, acima de 70% para petróleo bruto e querosene e aproximadamente 90% de remoção em óleo diesel, devido possivelmente ao fato de querosene e óleo diesel serem substâncias menos viscosas, o que torna sua solubilização mais fácil que o petróleo bruto em si. Resultados similares foram reportados por Sobrinho et al., [49] e Luna et al., [50] utilizando biossurfactante de *Candida sphaerica* capaz de remover entre 55% a 95% de óleo queimado de motor em solo arenoso. Silva et al., [51] utilizou o biossurfactante de *Candida lipolytica* e obteve remoção de 70,5% a 92,3% de

óleo queimado de motor em solo arenoso. Coimbra et al., [48] e Luna et al., [44] obtiveram resultados satisfatórios utilizando biossurfactantes obtidos de espécies de *Candida lipolytica*, com 86,2% e *Candida sphaerica* com 95% de remoção de óleo queimado de motor em solo arenoso, respectivamente.

3.6. Isolamento

O biossurfactante foi obtido através da precipitação por solvente orgânico e o seu rendimento determinado por análise gravimétrica após a secagem por liofilização. O rendimento do biossurfactante foi de 1,1304 g/L⁻¹. Qazi et al., [17] utilizando sistemas de isolamento por solventes orgânicos obteve rendimentos em torno de 2 e 3 g/L⁻¹ utilizando *Fusarium sp.*, enquanto Andrade e Silva et al., [38] obteve rendimento em torno de 4 g/L⁻¹ para *C. echinulata*.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que melhores resultados nas propriedades surfactantes bem como o rendimento do bioproduto podem ser obtidos através de uma otimização nos processos produtivos.

3.7. Composição Bioquímica e carga iônica

O biossurfactante isolado e pré-purificado de *C. elegans* UCP/WFCC 0542 foi submetido à determinação e quantificação bioquímica. A caracterização preliminar da composição bioquímica na concentração de 0,1 mg/mL apresenta em sua composição aproximadamente 66,6% de proteínas, 14,4% de lipídeos e 19% de carboidratos, sugerindo que o isolado pertença ao grupo dos lipopeptídeos ou lipoproteínas. O biossurfactante apresentou perfil aniônico quando analisado por Zeta meter com -37.0 ZPmv, 164.2 µS/cm à 24.4 °C, em escala total. Resultados similares foram relatados por Rufino et al., [46] quando analisados a composição preliminar de um biossurfactante do tipo lipoproteína aniônico produzido por *Candida lipolytica* UCP/WFCC 0988.

3.8. Teste de fitotoxicidade

O biossurfactante de *C. elegans* foi testado para toxicidade em ensaio biológico de curto prazo utilizando sementes de repolho (*B. oleracea*), onde os resultados obtidos indicaram a sua baixa toxicidade. Tiquia et al., [33] estabeleceram que um valor acima de 80% para índice de germinação (IG) tem sido utilizado para indicar o desaparecimento de fitotoxicidade. Neste contexto, os resultados apresentados na figura 06 demonstram valores elevados nas duas concentrações de biossurfactantes testadas em germinação, crescimento de raiz e índice de germinação. Em contrapartida, os ensaios realizados com Triton-X apesar de ter apresentado germinação de sementes, o percentual de crescimento da raiz e índice de germinação são praticamente insignificantes.

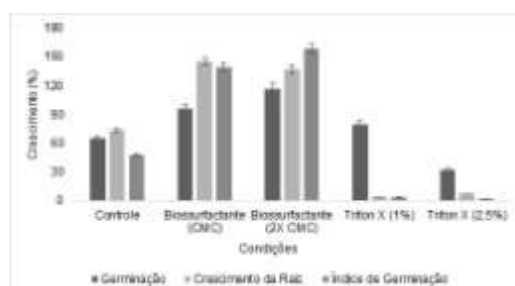


Figura 06: Teste de fitotoxicidade do biossurfactante produzido por *C. elegans* em diferentes condições

Valores acima de 100% obtidos neste estudo referentes ao índice de germinação (139,12% na concentração CMC e 158,96% para concentração 2X CMC) podem ser justificados pelo fato do biossurfactante conter em sua composição proteínas, lipídeos e carboidratos em grandes quantidades, servindo de nutriente para o crescimento das sementes, diferente da água utilizada como controle positivo que apresenta sais minerais em baixas quantidades. Já em relação as condições tratadas com Triton-X, foi observado uma diminuição na taxa de germinação e no tamanho das raízes a medida que se aumentou a concentração da solução, sugerindo que Triton-x é altamente tóxico para ensaios biológicos. Resultados similares foram reportados por Luna et al [50] e Sobrinho et al., [49] para o biossurfactante produzido por *C. sphaerica*.

4. Conclusões

Cunninghamella elegans é capaz de produzir biossurfactante em presença de óleo pós-fritura e milhocina. O biossurfactante produzido apresentou propriedades tensoativas significativas, mantendo-se estável quando

submetido às altas temperaturas, baixas concentrações salinas e variação de pH. A composição preliminar do biossurfactante sugere que o isolado seja do tipo lipoproteína com caráter aniônico, sua aplicação em solo contaminado por petróleo e derivados mostrou-se satisfatória e os testes de fitotoxicidade demonstraram que o biossurfactante apresenta baixa toxicidade.

Estudos futuros na produção otimizada de biossurfactante deverão ser considerados, bem como sua caracterização estrutural e aplicabilidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio das agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasília - D.F, Brasil), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Brasília - D.F, Brasil) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE (Recife - PE, Brasil), ao suporte do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia e a todos que contribuíram diretamente e indiretamente a realização deste trabalho.

Conflitos de Interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Rezende, C. E.; Grativol, A. D. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis* 2010, Vol. 14(4), p. 1025-1035.
2. Tonini, R. M. C. W; Rezende, C. E; Grativol, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por Bactérias: revisão. *Oecologia Australis* 2010 Vol. 14 n° (4), P. 1025-1035.
3. Fracchia, L.; Cavallo, M.; Martinotti, M. G.; Banat, I. M. Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials. *Biomedical Science, Engineering and Technology* 2012, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), ISBN: 978-953-307-471-9.
4. Morais, R. K. S; Abud, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. *Scientia Plena* 2012, Vol. 8, p. 1-7.
5. Zilio, R. L; Holz, J. C. P; Goularte, P. G; Radmann, E. M; Treichel, H; Costa, J. A. V. Biorremediação de solo arenoso contaminado por derrame simulado com benzeno, tolueno e xileno. *Biochemistry and Biotechnology Reports* 2012, vol.1, n.2, p. 39-47.
6. UZOIGWE, Chibuzo; ENNIS, Christopher J.; RAHMAN, Pattanathu KSM. Production of Biosurfactants Using Eco-friendly Microorganisms. In: *Environmental Sustainability*. Springer India, 2015. p. 185-204.
7. RAMÍREZ, Ignacio Moya et al. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresource technology*, v. 198, p. 231-236, 2015.
8. RANDHAWA, K. K. S.; RAHMAN, P. K. S. M. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology*, 2014, v. 5.
9. Liu, H. et al. Biosurfactant-producing strains in enhancing solubilization and biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater. *Environmental monitoring and assessment* 2014, p. 1-9.
10. Mulligan, C. N.; Sharma, S. K.; Mudhoo, A. 12 Biosurfactants. *Biosurfactants: Research Trends and Applications* 2014, p. 309.
11. Yakubu, M.B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology* 2007, Vol. 6 (24) p. 2735-2739.

12. Lima Junior, G. A. Obtenção de surfactina pelo micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 48f. Universidade Federal do Paraná, Dissertação (Mestrado), 2012.
13. Araujo, L. V.; Freire, D. M. G.; Nitschke, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quim. Nova*, **2013**, Vol. 36, No. 06, p. 757-761.
14. Reznik, G.O. et al. Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Applied microbiology and biotechnology* **2010**, Vol. 86, p. 1387–1397.
15. Taira, C. L.; Marcondes, N. R.; Mota, V. A.; Svidzinski, T. I. E. Virulence potential of filamentous fungi isolated from poultry barns in Cascavel, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, Vol. 47, n. 1.
16. Tigini, V.; Prigione, V.; Donelli, I.; Freddi, G.; Varese, G. C. Influence of Culture Medium on Fungal Biomass Composition and Biosorption Effectiveness. *Curr Microbiol* **2012**, Vol. 64, p. 50–59.
17. Vasconcelos, A. K. P; Aquino, M. D; Fabrício, T. N; Braga, M. A; Lima, I. S; Araújo, R. S. A biodegradação de corantes têxteis associada ao cultivo de *Geobacillus stearothermophilus*: uma alternativa para produção de biossurfactante. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica* **2013**, Vol. 6, No. 1, p 49 – 61.
18. Souza, D. G.; Marques, N. S. A. A.; Lima e Silva, T. A.; Souza, P. M.; Silva, M. C. F.; Batista, A. C. L.; Campos-Takaki, G. M. Production of the co-polymers chitin and chitosan by *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 supplemented with glutamic acid, corn steep liquor and post-frying soybean oil. *Asian Chitin Journal* **2013**, Vol. 9, p. 11-14.
19. Qazi, M. A.; Subhan, M.; Fatima, N.; Ali, M. I.; Ahmed, A. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium sp.* BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* **2013**, Vol. 3, No. 6.
20. Castiglioni, G. L.; Stanescu, G.; Oliveira Rocha, L. A.; Vieira Costa, J. A. Analytical modeling and numerical optimization of the biosurfactants production in solid-state fermentation by *Aspergillus fumigates*. *Acta Scientiarum. Technology*, **2014**, Vol. 36, v. 1, p. 61-67.
21. Berger, L. R. R. et al. Growth and chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and *Rhizopus arrhizus* varying the carbon/nitrogen ratio. In: *Industrial, Medical and Environmental Applications of Microorganisms: Current Status and Trends: Proceedings of the V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2013)* Mad. Wageningen Academic Publishers, 2014, p. 408.
22. Muthusamy, K.; Gopalakrishnan, S.; Ravi, T. K.; Sivachidambaram, P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science* **2008**, Vol. 94, N° 6, p. 25.
23. Bieger, A.; Rinaldi, R. N.; Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*, 2009 p. 1-14.
24. Andrade, R. F. S. Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes de *Candida lipolytica* e *C. glabrata* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos. 132p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2010.
25. Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Exp* **2011**, Vol. 1, p. 1-19.

26. Singh, P. B.; Saini, H. S. Exploitation of Agro-Industrial Wastes to Produce Low-Cost Microbial Surfactants. In: *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. Springer New York, 2014, p. 445-471.
27. Kuyukina, M. S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., Ritchkova, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal of Microbiological Methods* **2001**, Vol. 46, p. 109-120.
28. Cooper, D.G.; Goldenberg, B.G. Surface-active agents two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, p.224-229, 1987.
29. Barros, F. F. C; Quadros, C. P; Pastore, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2008**, Vol.28, n. 4, p. 979-985.
30. Bueno, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2008.
31. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, Vol. 29 p. 350-356.
32. Manocha, M. S., San- Blas. G., Centeno. S. Lipid composition of paracciodioids brasilienses: Possible correlation witer virulence of different strains. *Journal of General Microbioly* **1980**, Vol. 177 p 147-154.
33. Tiquia SM, TamNFY, Hodgkiss IJ. Effects of composting on phytotoxicity of spent pigmanure sawdust litter. *Environ Pollut* 1996;93:249-56. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00052-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00052-8).
34. Santos, D. K. F.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Santos, V. A.; Salgueiro, A. A.; Sarubbo, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and cornsteep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 2013, Vol. 105 p. 43-50.
35. Arutchelvi, J.; Doble, M. Mannosylerythritol lipids: microbial production and their applications, In: *Biosurfactants: From Genes to Applications*, Soberón-Chávez G Ed., Springer, Münster, Germany. 2010. p. 145-177.
36. Shao, Z. Trehalolipids, In: *Biosurfactants: From Genes to Applications*, Soberón-Chávez G Ed. Springer, Münster, Germany. 2010, p. 121-143.
37. Teruel, J. A.; Ortiz, A.; Aranda, F. J. Interactions of a bacterial trehalose lipid with phosphatidylglycerol membranes at low ionic strength. *Chemistry and physics of lipids* **2014**, Vol. 181, p. 34-39.
38. Konishi, M.; Yoshida, Y.; Horiuchi, J. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2014.
39. Andrade e Silva, N. R.; Luna, M. A.; Santiago, A. L. C. M. A.; Franco, L. O.; Silva, G. K. B.; Souza, P. M.; Albuquerque, C. D. C.; Alves Da Silva, C. A.; Campos-Takaki, G. M. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in Northeastern of Brasil. *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, Vol. 15, p. 15377-15395.
40. Zajic, J.E., Seffens, W. In: *CRC Critical Reviews in Biotechnology, Biosurfactants*, v.1, n.2, 1984.
41. Giro, M. E. A.; Martins, J. J. L.; Rocha, M. V. P.; Melo, V. M. M.; Gonçalves, L. R. B. Seleção de cepas de *Bacillus* produtoras de biossurfactantes utilizando suco de caju como meio de cultura. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 17, 2008, Recife. Anais... Recife: UFPE, 2008.

42. 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**, vol.4 (1), p.p.1-10, 2012.
43. Mulligan, C. N., Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut* **2005**, Vol. 133, p. 183–198.
44. Ghurye, G.L.; Vipulanandan, C.; Willson, R.C. A practical approach to biosurfactant production using non aseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng* **1994**, Vol. 44, p. 661–666.
45. 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* UCP 0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surf. B* **2013**, Vol. 102, p. 202–209.
46. 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* **2014**, Vol. 17 p. 34–38.
47. Felix, A. K. N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* lami005 a partir do suco de caju. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, 2012.
48. Coimbra, C.D.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. Studies of the Cell Surface Properties of *Candida* Species and Relation to the Production of Biosurfactants for Environmental Applications. *Curr Microbiol*, 2009, Vol. 58 p. 245–25.
49. Sobrinho, H. B. S.; Rufino, R. D.; Luna, J. L.; Salgueiro, A. A.; Campos-Takaki, G. M.; Leite, L. F. C.; Sarubbo, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995, *Process Biochemistry* **2008**, Vol. 43 p. 912–917.
50. 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**, Vol. 12 p. 2463-2476.
51. Silva, E. J.; Rocha e Silva, N. M. P.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Silva, R. O.; Sarubbo, L. A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, Vol. 117 p. 36–41.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

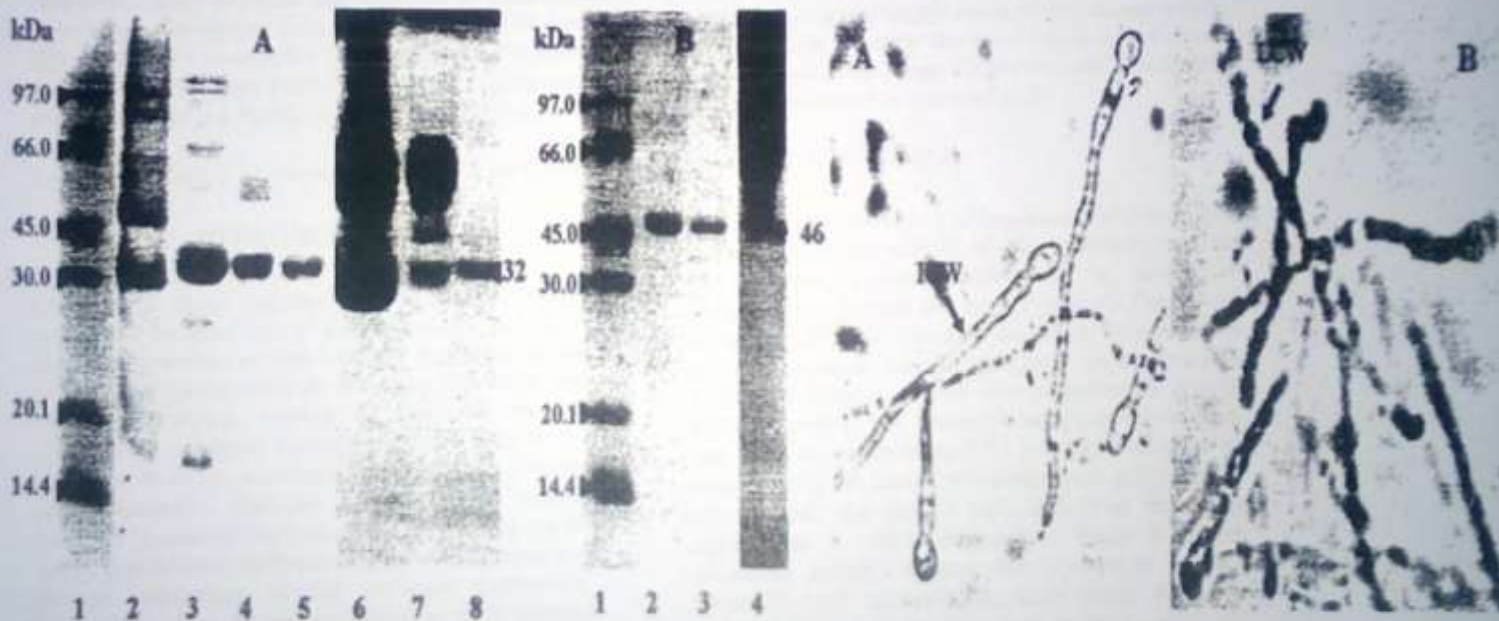
- O isolado de *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 proveniente do manguezal pernambucano é capaz de utilizar rejeitos agroindustriais como fonte nutricional, adaptando-se bem aos substratos propostos;
- A produção de co-polímeros quitina e quitosana mostrou-se satisfatória, com grau de desacetilação acima do padrão para quitina e quitosana comercial;
- O isolado de *C. elegans* é também produtor de biossurfactante ao utilizar os substratos propostos como fonte nutricional, mostrando-se estável diante de condições ambientais adversas;
- O biossurfactante mostrou-se efetivo em suas propriedades quando aplicado em solo contaminado por derivados de petróleo, demonstrando assim seu potencial de uso na área ambiental;
- A produção de bioprodutos diferentes tanto em estruturas quanto em aplicabilidade é viável quando provenientes de um mesmo processo produtivo, visando assim aproveitar ao máximo a maior quantidade de matéria prima que originará o produto final (biomassa, onde se obtém quitina e quitosana e líquido metabólico, onde se obtém biossurfactante);
- Apesar de necessitar uma otimização nos processos produtivos a fim de melhorar os resultados e os rendimentos dos produtos finais, os resultados obtidos neste trabalho são satisfatórios.

ANEXOS

A
C
J

ASIAN CHITIN JOURNAL

An International Journal



SSM International Publication

www.asianchitinjournal.org

Production of the co-polymers chitin and chitosan by *Cunninghamella Elegans* Ucp/Wfcc 0542 supplemented with glutamic acid, corn steep liquor and post-frying soybean oil

DANIELE GILVANISE DE SOUZA^{1,5}; NATHALIA SÁ ALENCAR DO AMARAL MARQUES⁵; THAYSE ALVES DE LIMA E SILVA^{2,5}; PATRÍCIA MENDES DE SOUZA^{2,5}; MARTA CRISTINA FREITAS SILVA³; ANABELLE CAMAROTTI DE LIMA BATISTA^{4,5} and GALBA MARIA DE CAMPOS-TAKAKI⁵

¹Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Coordenação Geral de Pós-Graduação, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, 50.050-900 Recife- PE, Brazil

²Programa de Pós-Doutorado da CAPES, Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP, 50.050-900 Recife- PE, Brazil

³Universidade Federal de Roraima – UFRR

⁴Departamento de Ciências Animais (DCAN), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, 572 – Costa e Silva – 59625-900 Mossoró, RN, Brazil

⁵Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Coordenação Geral de Pesquisa, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, 50.050-590 Recife- PE, Brazil

ABSTRACT

Chitin and chitosan are polysaccharides abundant and broadly distributed on invertebrates and fungal cells wall, which have peculiar properties that allow their application to waste disposal, dye degradation, the production of biodegradable films, packaging and manufacture of cosmetics. This study aimed the production and characterization of chitin and chitosan by *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542 grown in culture medium consisting of inorganic salts and agroindustrials residues corn steep liquor and post-fry soybean oil, as substrates. The results are compatible with reports in the literature where in relation to chitin the occurrence of the bands amides is in the range 1600-1400 cm^{-1} and chitosan as the bands are evident in the range 1900-1400 cm^{-1} , indicating that *C. elegans* is a highly viable microorganism for the production of biopolymers in low-cost way.

Key Words: Chitin, chitosan, glutamic acid, corn steep liquor, soyabean oil, Ucp/Wfcc 0542

INTRODUCTION

Chitin is a linear polymer, natural and insoluble, which has the same type of monomeric unit β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine and with the exception of the cellulose polysaccharide is the most abundant and widely distributed, serving as structural element found in invertebrate animals and especially in the cell wall of fungi, especially those belonging to the order Mucorales. Chitosan is a copolymer derived from the N-deacetylation of chitin, except that the N-acetyl groups have different degrees of deacetylation, thereby generating several chitosan derivatives. Chitosan is characterized according to their level of deacetylation and molecular weight, since these characteristics can affect the degradability and hydrolysis of polysaccharides¹⁻⁶. Chitin and chitosan have peculiar properties and may be used successfully in a wide variety of applications such as the removal and recovery of different waste in the biotransformation of pesticides, degradation of dyes, aminoacids and proteins. Chitosan can still used as bleaching in juices and the production of biodegradable films for packaging and manufacture of cosmetics⁴⁻¹². Commercially, chitosan is obtained by deacetylation of chitin of crustacean through alkali chemical treatment. The Crustacean chitosan is inconsistent in their physico-chemical properties because of variability of the raw materials, the

hardness of the processes of isolation and conversion from the corrosive effects of the chemicals used in the isolation process, variability in levels of contaminating protein and deacetylation⁶. The fungal chitin and chitosan becomes attractive because their specific products can be obtained under standard conditions through careful manipulation of growth variables such as pH, composition of culture medium and type of fermentation¹³⁻¹⁶. Another factor to be considered is the cost of obtaining these polymers. In this context, the use of agro industrial substrates appears as a viable alternative, since it makes economic output. Among the renewable sources obtained from agribusiness, corn steep liquor is undoubtedly one of the most used products which are effective as a source of nitrogen in various fermentative processes in obtaining supplies of high added value^{4, 6, 17-18}.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism

The microorganism used in the experiment was the filamentous fungus *Cunninghamella elegans* UCP/WFCC 0542, belongs the Cultures Collection of Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, NPCIAMB, UNICAP, PE, Brazil,

registered in the World Federation of Culture Collection-WFCC.

Maintenance medium

Sabouraud agar, composition: Peptone - 10 g/L, glucose - 40 g/L and Agar - 15 g/L, pH 5.5, autoclaved at 121°C for 20 minutes and then distributed in Petri dishes.

Substrates

The substrates used in the experiments soybean oil was obtained from post-frying oil, and corn steep liquor from the residue of beneficiation of corn, from industry Corn Products, Brazil.

Conditions of Cultivation

The cultivation for the production of chitin and chitosan by *C. elegans* was performed in 4 Erlenmeyer's flasks with 500 ml capacity containing 200 ml of the basic medium (NH₄NO₃ - 1 g/L, KH₂PO₄ - 0.2 g/L, MgSO₄·7H₂O - 0.2 g/l and glutamic acid - 10 g/L) supplemented with 2.75% post-frying soybean oil and 2.15% of corn steep liquor¹⁹. The initial pH of the medium was adjusted

Characterization of Chitin and Chitosan

Chitin and chitosan obtained from mycelial mass of *C. elegans* was submitted to analysis by infrared spectroscopy on KBr pellets, using a Fourier transform spectrometer (FTIR) Bruker IFS 66 Mod. The degree of deacetylation for microbiologic chitin and chitosan were determined using the infrared spectroscopy using the absorbance ratio A1655/A3450, calculated according to the following equation:

$$DD(\%) = \frac{(A1655/A3450) \times 100}{1.33}$$

RESULTS AND DISCUSSION

C. elegans produced 8.12 g/L of dry biomass using salt basic medium supplemented with 10 g/L of glutamic acid, 2.75% post-frying soybean oil and 2.15% of corn steep liquor at pH 7.0. In Santos⁶ et al. (2013) this microorganism grown in corn steep liquor supplemented with amino acids and produced 16.95

to 5.5, and sterilized by autoclaving at 121°C for 20 minutes. An aliquot (2ml) of 10⁷ sporangiole/mL suspension was inoculated in the Erlenmeyer flasks. The samples were kept under orbital agitation of 150 rpm for 96 hours at 28°C.

Extraction of Chitin and Chitosan

For extraction of polysaccharides, was used to *C. elegans* UCP 542 dry biomass in an oven at 50°C²⁰. The biomass added to a 1M NaOH solution was autoclaved at 121°C for breaking the fungal cell wall, and then centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes at 10°C. The residue was added to a solution of 2% Acetic Acid and steam autoclaved at 100°C. The residue was centrifuged at 4000 rpm for 15 minutes at 10°C. Chitin was separated from the supernatant. The chitin extracted was washed with cold distilled water until its pH neutralization and then placed in petri dishes to dry. The supernatant was alkalized to pH 9 and kept in the refrigerator for 24 hours to precipitate the chitosan.

Subsequently, the residue was separated from the supernatant by centrifugation at 4000 rpm for 15 minutes at 10°C. Chitosan was washed until its pH neutralization and then placed in petri dishes to dry.

g/L of dry biomass. However, the high cost to supplement medium with amino acids justified this study to choose the better medium to obtain microbiological chitosan cheaper than crustacean chitosan.

In Figure 1, the spectrophotometric analysis by FT-IR of both commercial and microbiological chitosans allowed the characterization of the degree of deacetylation, which determine the percentage of free amino groups in carbon 2 of the residues. FT-IR estimated these quantity, being that microbiological chitosan presented 87.44% of degree of deacetylation and commercial chitosan 78.52% of degree of deacetylation. The more meaningful regions of the spectrum are those which reveal amide bands at 1665, 1555 and 1313 cm⁻¹ which showed dichroism perpendicular assigned respectively to interact with coupling C = O, N-H deformation in the plane and connecting CONHCN with displacement of CH₂. The presence of characteristic peaks in microbiological chitosan stimulates its production with commercial potential by alternative nutritional sources associated with others variables tested in this work.

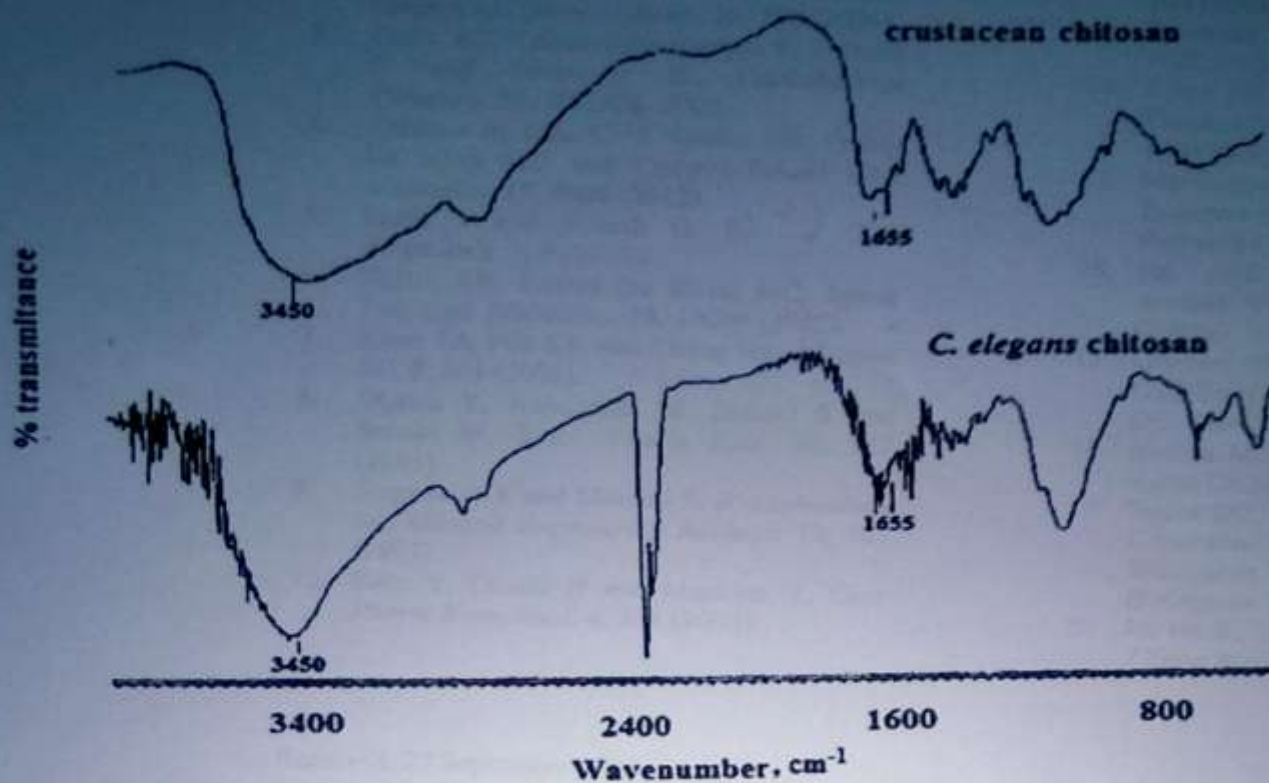


Fig. 1. Comparative FTIR spectrum between crustacean chitosan (deacetylation degree of 78.52%) and *C. elegans* chitosan (deacetylation degree of 87.44%)

Fig. 2 shows the physical-chemical characterization by infrared absorption spectroscopy obtained from chitin by *C. elegans*. The most important characteristics for chitin obtained from *C. elegans*

UCP 542 were amide bands near 1600 to 1400 cm^{-1} . In relation to chitosan, the main characteristic bands were highlighted in the range 1900- 1400 cm^{-1} .

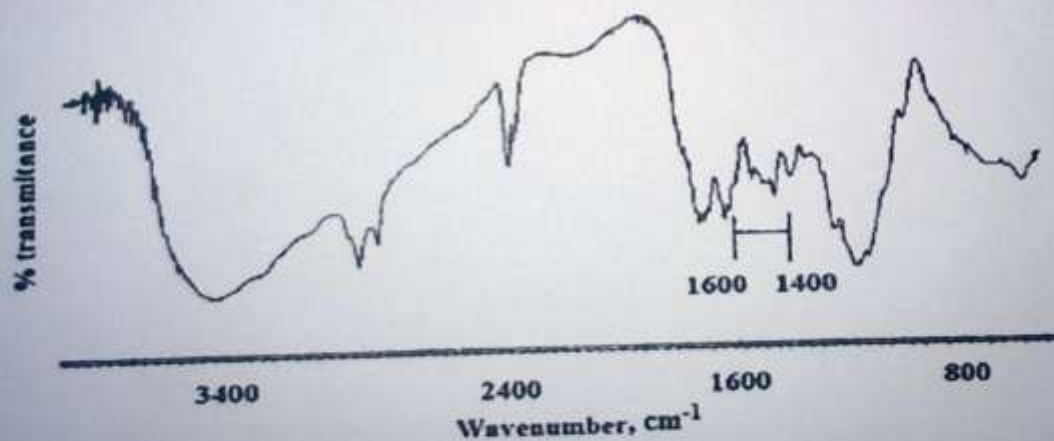


Fig. 2. Infrared Spectroscopy of chitin extracted from dry biomass of *Cunninghamella elegans* UCP 542

The data of this study are consistent with those found in the literature when comparing with the infrared spectra for both chitin and chitosan obtained through microbiology. Similar results were obtained by Fai¹⁶ et al. (2011) where *Mucor circinelloides* spectra showed amide bands for chitin and chitosan of approximately 1665, 1555 and 1313 cm^{-1} and chitin shows the region amide II bands 1153, 1378 and 1558 cm^{-1} . Santos⁶ et al. (2013) reports similar results in obtaining a chitosan from *C. elegans* using culture medium containing corn steep liquor as a substrate.

CONCLUSIONS

Cunninghamella elegans is a filamentous fungus where obtaining biopolymers chitin and chitosan shows itself highly achievable through culture medium at low cost. The results for the characterization of chitin and chitosan by *C. elegans* UCP 542 are in agreement with those reported in the literature by filamentous fungi of the order Mucorales when produced in a medium containing agroindustrial substrates.

REFERENCES

1. Andrade VS, Neto BB, Souza W and Campos-Takaki GMA, *Can J Microbiol*, 46, 1042 (2000).
2. Costa Silva HSR, Santos KSCR and Ferreira EI, *Química Nova*, 29, 776 (2006).
3. Pedro AS, Cabral-Albuquerque E, Ferreira D and Sarmiento B, *Carbohydrate Polymers*, 76, 501-508. 2009.
4. Cardoso A, Lins CIM, Santos ER, Freitas Da Silva MC and Campos-Takaki GM, *Molecules*, 17, 4904 (2012).
5. Latha S and Suresh G, *Int J Curr Biotechnol*, 1, 9 (2013).
6. Santos ER, Freitas Da Silva, MC, Souza PM, et.al. *Molecules*, 18, 10095 (2013).
7. Khan TA, Peh KK and Cheng HS, *J Pharm Sci*, 5, 205 (2002).
8. Okawa Y, Kobayashi M, Suzuki S and Suzuki M, *Biol Pharm Bull*, 26, 902 (2003).
9. Shigemasa Y and Minami S, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13, 383 (1995).
10. Kato Y, Onishi H and Machida Y, *Curr Pharm Biotechnol*, 4, 303 (2003).
11. Rudrapatnam NT and Farooqahmed SK, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 61 (2003).
12. Synowieck J and Al-Khatteb NAA, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 144 (2003).
13. Jaworska M and Sakurai K and Gaudon PGE, *Polym Int*, 52, 198 (2003).
14. Kittur FS, Prashanth KVH, Sankar KV and Tharanathan RN, *Carbohydr Polym*, 49, 185 (2002).
15. Martínez-Camacho AP, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, et. al., *Carbohydr Polym*, 82, 305 (2010).
16. Fai AEC, Stamford TCM, Stamford-Arnaud TM, et.al., *Molecules*, 16, 7143 (2011).
17. Obayori OS, Adebuseybeane SA, Ilori MO, Oyetibo GO, Omotayo AE and Amund, OO, *Curr Microbiol*, 60, 407 (2010).
18. Batista ACL, Cardoso A, Santos E., et. al., *Asian Chitin J*, 7, 63 (2011).
19. Souza DG, Silva NRA, Souza PM, et.al., *I Congresso Nacional de Ciências Biológicas. IV Simpósio de Ciências Biológicas*. Recife, Pernambuco, 2011.
20. Jin Hu K, Yeung WW, Ho KP, and Hu JL, *J Food Biochem*, 23,187 (1999).

Received: 27 September 2013

Accepted: 30 November 2013



COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES

An International Journal Devoted to Fundamental and Applied Research on Colloid and Interfacial Phenomena in Relation to Systems of Biological Origin

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0927-7760

DESCRIPTION

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces is an international journal devoted to fundamental and applied research on colloid and interfacial phenomena in relation to systems of biological origin, having particular relevance to the medical, pharmaceutical, biotechnological, food and cosmetic fields.

Each Editor of *Colloids and Surfaces B* has specific fields of expertise. To ensure a smooth and rapid refereeing process, please submit your article to the Editor related to the topic of your research (you can select the correct editor in the drop down menu in our online submission system: <http://ees.elsevier.com/colsub>):

John Brash

- Interactions of biomolecules (proteins, enzymes, peptides, polysaccharides, DNA) at the solid-solution and air-solution interfaces;
- Surface/interfacial interactions of tissue and blood; Biomaterials development and interfacial properties;
- Drug delivery/controlled release

Henk Busscher

- Physico-chemical mechanisms of microbial adhesion, biofilm formation and tissue cell interaction to surfaces
- Microbial adhesion and biofilm formation
- Role of surface characteristics, surface modification and protein adsorption on microbial adhesion and biofilm formation
- Physico-chemical mechanisms providing biolubrication to surfaces

Hong Chen

- Surface modification including structured surfaces;
- Biocompatible materials;
- Anti-fouling materials;
- Bio-detection/bio-imaging materials;
- Interactions of biomolecules and cells at interfaces.

Dganit Danino

- Self-assembly and molecular assemblies (proteins, polymers, peptides, surfactants)
- Structure of biological fluids
- Drug delivery vehicles at nano and meso scales

- 1D structures - fibrils, ribbons, nanotubes
- Milk proteins

Submissions that: (1) deal solely with biological phenomena and do not describe the physico-chemical or colloid-chemical background and/or mechanism of the phenomena, and (2) deal solely with colloid/interfacial phenomena and do not have appropriate biological content or relevance, are outside the scope of the journal and will not be considered for publication.

The journal publishes regular research papers, reviews, short communications and invited perspective articles, called BioInterface Perspectives. The BioInterface Perspective provide researchers the opportunity to review their own work, as well as provide insight into the work of others that inspired and influenced the author. Regular articles should have a maximum total length of 6,000 words. In addition, a (combined) maximum of 8 normal-sized figures and/or tables is allowed (so for instance 3 tables and 5 figures). For multiple-panel figures each set of two panels equates to one figure. Short communications should not exceed half of the above. It is required to give on the article cover page a short statistical summary of the article listing the total number of words and tables/figures.

AUDIENCE

Colloid and Surface Chemists, Chemical Engineers, (Bio) Pharmaceutical, Cosmetic and Food Chemists, Physical Chemists, Polymer Chemists, Biological and Bioengineers, Organic Chemists, Microbiologists, Medicinal Chemists.

IMPACT FACTOR

2014: 4.152 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

Chemical Abstracts
Current Contents/Physics, Chemical, & Earth Sciences
EMBASE
INSPEC
PASCAL/CNRS
Applied Polymers Literature
APOLLIT
Scopus
EMbiology

EDITORIAL BOARD

Editors:

J.L. Brash, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada
H.J. Busscher, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, Netherlands
H. Chen, Soochow University, Suzhou, China
D. Danino, Technion - Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Editorial Board:

K. Bohinc, Ljubljana, Slovenia
T. Camesano, Worcester, Massachusetts, USA
E. Dickinson, Leeds, UK
Y.F. Dufrêne, Louvain-la-Neuve, Belgium
C. Dupont-Gillain, Louvain-la-Neuve, Belgium
J. Dutcher, Guelph, Ontario, Canada
D.L. Elbert, St Louis, Missouri, USA
H. Elwing, Göteborg, Sweden
C. Gao, Hangzhou, Zhejiang Province, China
T.A. Horbett, Seattle, Washington, USA
K. Ishihara, Tokyo, Japan

K.D. Jandt, Jena, Germany
L. Jiang, Beijing, China
K. Kataoka, Tokyo, Japan
J. Kizhakkedathu, Vancouver, British Columbia, Canada
R. Leblanc, Coral Gables, Florida, USA
C. Leidy, Bogota, Colombia
K. Makino, Tokyo, Japan
W. Norde, Wageningen, Netherlands
H. Ohshima, Tokyo, Japan
T. Okano, Tokyo, Japan
K. Park, West Lafayette, Indiana, USA
W. Pitt, Provo, Utah, USA
K. Prasad, Bhagalpur, India
B. Ratner, Seattle, Washington, USA
G. Reid, London, Ontario, Canada
C.A. Siedlecki, Hershey, PA, Pennsylvania, USA
P. Tengvall, Linköping, Sweden
W-B. Tsai, Taipei, Taiwan
N. Tufenkji, Montreal, Quebec, Canada
H. van der Mei, Groningen, Netherlands
S. Wang, Beijing, China
G. H. Whitesides, Cambridge, Massachusetts, USA
X. Zhang, Beijing, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces is an international journal devoted to fundamental and applied research on colloid and interfacial phenomena in relation to systems of biological origin, having particular relevance to the medical, pharmaceutical, biotechnological, food and cosmetic fields.

Each Editor of *Colloids and Surfaces B* has specific fields of expertise. To ensure a smooth and rapid refereeing process, please submit your article to the Editor related to the topic of your research (you can select the correct editor in the drop down menu in our online submission system: <http://ees.elsevier.com/colsub>):

John Brash

- Interactions of biomolecules (proteins, enzymes, peptides, polysaccharides, DNA) at the solid-solution and air-solution interfaces;
- Surface/interfacial interactions of tissue and blood; Biomaterials development and interfacial properties;
- Drug delivery/controlled release

Henk Busscher

- Physico-chemical mechanisms of microbial adhesion, biofilm formation and tissue cell interaction to surfaces
- Microbial adhesion and biofilm formation
- Role of surface characteristics, surface modification and protein adsorption on microbial adhesion and biofilm formation
- Physico-chemical mechanisms providing biolubrication to surfaces

Hong Chen

- Surface modification including structured surfaces;
- Biocompatible materials;
- Anti-fouling materials;
- Bio-detection/bio-imaging materials;
- Interactions of biomolecules and cells at interfaces.

Dganit Danino

- Self-assembly and molecular assemblies (proteins, polymers, peptides, surfactants)
- Structure of biological fluids
- Drug delivery vehicles at nano and meso scales
- 1D structures - fibrils, ribbons, nanotubes
- Milk proteins

Submissions that: (1) deal solely with biological phenomena and do not describe the physico-chemical or colloid-chemical background and/or mechanism of the phenomena, and (2) deal solely with colloid/interfacial phenomena and do not have appropriate biological content or relevance, are outside the scope of the journal and will not be considered for publication.

The journal publishes regular research papers, reviews, short communications and invited perspective articles, called *BioInterface Perspectives*. The *BioInterface Perspective* provide researchers the opportunity to review their own work, as well as provide insight into the work of others that inspired and influenced the author. Regular articles should have a maximum total length of 6,000 words. In addition, a (combined) maximum of 8 normal-sized figures and/or tables is allowed (so for instance 3 tables and 5 figures). For multiple-panel figures each set of two panels equates to one figure. Short communications should not exceed half of the above. It is required to give on the article cover page a short statistical summary of the article listing the total number of words and tables/figures. **Cover Letter**

A cover letter is mandatory and should give the justification of the submission, highlights of the article, and a general impact statement. A short statistical summary of the article listing the total number of words and tables/figures is also required.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2850**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 24 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

For submitting your manuscript to Colloids and Surfaces B: Biointerfaces please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: <http://ees.elsevier.com/colsub/>.

Referees

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, affiliation and email addresses of four potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of any of the Authors.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be no longer than 250 words

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

The use of nomenclature and symbols adopted by IUPAC is recommended (Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford, 1988).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/colloids-and-surfaces-b-biointerfaces>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference Style

1. All references made to publications in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the information given in the text is exactly the same as that given in the reference list.

References to the literature should be made according to the numerical system described below.

2. In the text refer to the subject or to the author's name (without initial), followed by the reference number in square brackets.

3. If reference is made in the text to publications written by more than two authors, the name of the first author should be used, followed by "et al.". Note that in the reference list the names of authors and co-authors should be given in full.

4. References should be arranged in the order in which they appear in the text.

5. Use the following system for arranging the references:

(i) For journals

N. Levy, N. Garti and S. Margdassi, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 97 (1995) 91.

(ii) For monographs

B.E. Conway, *Ionic Hydration in Chemistry and Biophysics*, Elsevier, Amsterdam, 1981.

(iii) For edited books

R.D. Thomas, in E. Bunce and J.R. Jones (Eds.), *Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1991, Chapter 7.

For conference proceedings, symposia etc.

A.G. Marshall, in P.G. Kistemaker and N.M.M. Nibbering (Eds.), *Advances in Mass Spectrometry*, Proc. 12th International Mass Spectrometry Conference, Amsterdam, 26-30 August 1991, Elsevier, Amsterdam, 1992, p. 37.

6. Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the Chemical Abstract Service (*Bibliographic Guide for Editors and Authors*, The American Chemical Society, Washington, DC, 1974). If the correct abbreviation is not known, the title should be given in full.

7. Reference to a personal communication should be followed by the year, e.g. A.N. Other, personal communication, 1989.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-itwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly

as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

3D molecular models

You can enrich your online articles by providing 3D molecular models (optional) in PDB, PSE or MOL/MOL2 format, which will be visualized using the interactive viewer embedded within the article. Using the viewer, it will be possible to zoom into the model, rotate and pan the model, and change display settings. Submitted models will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each molecular model will have to be uploaded to the online submission system separately, via the '3D molecular models' submission category. For more information see: <https://www.elsevier.com/3DMolecularModels>.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. For instructions please go to <https://www.elsevier.com/interactiveplots>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

