



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE POR *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1355
ISOLADO DE SOLO DA CAATINGA-PE, BRASIL.**

GRAYCE KELLI BARBOSA DA SILVA

RECIFE

2015

GRAYCE KELLI BARBOSA DA SILVA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
Aspergillus niger UCP/WFCC 1355 ISOLADO DE SOLO DA CAATINGA-PE,
BRASIL**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia.

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

Co-orientadora: Profa. Dra. Kaoru Okada

RECIFE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Grayce Kelli Barbosa da

Isolamento, identificação, caracterização e potencial biotecnológico na produção de biossurfactante por *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1335 isolado da caatinga-PE, Brasil / Grayce Kelli Barbosa da Silva. – Recife: O Autor, 2015.

144 f.: il.

Orientadores: Galba Maria de Campos-Takaki, Kaoru Okada

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências

1. Agentes ativos de superfícies 2. Detergentes 3. Fungos I. Campos-Takaki, Galba Maria de (orient.) II. Okada, Kaoru (coorient.) III. Título.

668.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-082

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR
Aspergillus niger UCP/WFCC 1355 ISOLADO DE SOLO DA CAATINGA-PE,
BRASIL**

GRAYCE KELLI BARBOSA DA SILVA

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final exigido para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Microbiologia.

Data da aprovação: 24/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Galba Maria de Campos-Takaki (Orientadora), UNICAP

Profa. Dra. Kaoru Okada (Co-orientadora), UNICAP

Profa. Dra. Celuta Sales Alviano, UFRJ

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco - UFRPE

Profa. Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia - UFRPE

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, UFRPE

*Por toda ternura, afeto e cumplicidade,
Carinhosamente dedico este trabalho:*

*Aos meus pais, José Benedito da Silva e Bernadete José
Barbosa da Silva,*

Minha irmã Gabriela Kássia Barbosa da Silva,

A minha vó Raimunda Maria Barbosa (in memoriam)

Ao meu esposo Alberes Ferreira da Silva,

*“De nada vale o ganho sem a luta assim como
de nada vale a vida sem o aprendizado”.*

David Saleeby

AGRADECIMENTOS

Ó Deus agradeço profundamente pelos desafios impostos em minha vida. Agradeço pelo preparo realizado por Ti antes de ingressar no curso. Agradeço pelas dificuldades encontradas e pelas experiências vividas durante cada etapa do trabalho. Senhor ofereço este trabalho para que possa, a partir dele, surgir novas idéias e novos desafios a serem vencidos a fim de proporcionar o bem a toda criatura por Ti criada, pelo fruto de Seu trabalho. Amém.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Galba Maria de Campos Takaki, símbolo de inteligência, pela amizade, ensinamentos e extrema dedicação, e por acreditar no meu trabalho e na minha vontade de aprender.

À minha co-orientadora, Prof Dr^a Kaoru Okada, símbolo de sabedoria, pela extrema dedicação e atenção, além dos seus ensinamentos científicos, por passar tranquilidade e segurança.

À Prof^a Dr^a Aline Elesbão do Nascimento, pela atenção e contribuição científica.

À Prof^e Dr. Ranilson de Souza Bezerra, Coordenador do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que me deu a oportunidade, dando votos de confiança para a realização deste trabalho.

Aos meus Pais, José Benedito e Bernadete José, pelo exemplo de vida, dedicação e incentivo e compreensão das minhas ausências.

À minha querida irmã Gabriela, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À meu esposo Alberes Ferreira, pelo amor, incentivo e por compartilhar comigo todas as alegrias e dificuldades de todo esse tempo em que estamos juntos.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais (NPCIAMB) pelos momentos de companheirismo, confraternizações, amizades e ajuda na realização deste trabalho.

Aos funcionários do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida, Salatiel Joaquim de Santana (*in memoriam*), André Felipe Santos Lima e Sônia Maria de Souza, pela paciência e apoio durante o decorrer da pesquisa.

A secretária do CCB, Adenilda Eugênia de Lima, pela atenção e gentileza no atendimento prestado durante o curso.

A toda minha turma de doutorado, companheiros e amigos.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Padre Pedro Rubens de Oliveira, pelo acesso aos laboratórios de pesquisa do NPCIAMB para realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo e CNPQ, FINEP pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para esta etapa da minha vida, agradeço.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
CAPITULO 1	5
1.INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
3. REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Aspectos gerais sobre o bioma da Caatinga	12
3.2 Isolamento, identificação e diversidade dos fungos filamentosos do solo	14
3.3 Aspectos gerais: <i>Aspergillus</i> sp.....	16
3.3.1 <i>Aspergillus niger</i>	18
3.4 Biossurfactantes	20
3.4.1 Propriedades dos biossurfactantes.....	22
3.4.2 Classificação de biossurfactantes	27
3.4.3 Micro-organismos produtores	28
3.4.4 Metabolismo microbiano para produção de biossurfactantes	33
3.4.5 Função fisiológica dos biossurfactantes	35
3.4.6 Condições que influenciam a produção de biossurfactantes	35
3.4.7 Potencial de aplicação dos biossurfactantes.....	36
3.4.8 Vantagens de utilização dos biossurfactantes	40
3.4.9 Sabão, Detergente e Biodetergente	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPITULO 2	67
5. Artigo 1	68
CAPITULO 3	76
6. Artigo 2	77
CAPITULO 4	107
7. Artigo 3	108
CAPITULO 5	121
8. Artigo 4	122
9. CONCLUSÕES GERAIS	137
10. ANEXOS	138

LISTA DE FIGURAS

Página

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Foto ilustrativa vegetação da Caatinga	12
Figura 2. Localização dos municípios de Serra Talhada e Varginha – PE.....	13
Figura 3. Mapa das regiões de rDNA de fungos	16
Figura 4. Aspectos gerais e morfológicos do <i>A.niger</i>	18
Figura 5. Representação esquemática moléculas anfipáticas de surfactante.....	20
Figura 6. Representação esquemática do comportamento de um surfactante em solução aquosa após a CMC	23
Figura 7. Tipos de estruturas de surfactantes em solução	24
Figura 8. Tensões superficiais dos líquidos.....	25
Figura 9. Esquema do comportamento do surfactante entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC	26
Figura 10. Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípídeo (A e B), lipopeptídeo (C) e polimérico (D).....	27
Figura 11. Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos.....	34

LISTA DE TABELAS

Página

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos..... 31

Tabela 2. Potencial de aplicação dos biossurfactantes 37

RESUMO

Biossurfactantes são compostos de superfície ativa produzidos por micro-organismos e que têm recebido crescente interesse nas últimas décadas, considerando as vantagens sobre os surfactantes químicos, destacando-se baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade sob condições extremas de pH e temperatura e salinidade e produção a partir de fontes renováveis. A busca de agentes tensoativos naturais (biossurfactantes) tem sido de grande interesse na biotecnologia. Tendo em vista as propriedades aplicadas na agricultura, nas indústrias de alimentos, papel, metal, têxtil e farmacêuticas, apresentando maior potencial de aplicação na indústria petrolífera. Nesta tese, realizou-se o isolamento de *Aspergillus niger* oriundo de solos da caatinga de Pernambuco, Brasil, através da técnica de diluição seriada e meios seletivos. A identificação dos micro-organismos foi realizada através das análises morfológicas e moleculares. A seleção do micro-organismo produtor de biossurfactante foi realizada através do teste de hemólise, tensão superficial e índice de emulsificação. O meio de produção do biossurfactante foi constituído por uma base de sais (elementos traços), suplementado com 10% de farelo de trigo, tendo como variáveis cloreto de sódio, extrato de levedura e óleo de soja pos-fritura, de acordo com o planejamento fatorial 2^3 , como variável resposta a composição do meio de produção de biossurfactante, o biossurfactante foi isolado e caracterizado quanto as propriedades físico-químicas e avaliado quanto ao quanto ao potencial de aplicação na formulação de detergentes. O líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante na condição selecionada, após 96 horas de cultivo a 150 rpm, apresentou tensão superficial para 29 mN/m, e interfacial 15,3 mN/m. O biossurfactante demonstrou estabilidade em condições extremas de pH (2-12), temperatura (0,5,70 e 100°C) e salinidade (2 – 12%). O rendimento do biossurfactante de 3,2 g/L, Concentração Micelar Crítica (CMC) de 1,5%. De caracter polimérico e aniônico, constituído de lípidos (31,5%), carboidratos (10,8%) e proteínas (14,8%). O teste de dispersão do petróleo demonstrou um halo de 21,03cm², além de apresentar atividade antiadesiva para os micro-organismos *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos indicaram que o biossurfactante não apresentou efeito inibitório sobre a germinação das sementes e sobre o alongamento das raízes, como também a letalidade das larvas de *Artemia salina*. O Biossurfactante testado apresentou ausência de citotoxicidade para as células. O biossurfactante quando aplicado na formulação de um biodetergente mostrou-se mais eficiente no poder espumante, emulsificante e ação detergente quando comparado a um detergente sintético comercial. Os resultados obtidos demonstraram o potencial biotecnológico promissor do biossurfactante produzido por *A. niger* sugerindo diferentes aplicabilidades em setores industriais e ambientais.

Palavra-chave: Tenso ativo, emulsificante, atividade antiadesiva, ação detergente, *A. niger*

ABSTRACT

Biosurfactants are composed of active surface produced by microorganisms and have received increasing interest in recent decades, considering the advantages over chemical surfactants, especially low toxicity, biodegradability, stability under extreme conditions of pH and temperature and salinity and production from renewable sources. The search for natural surfactants (biosurfactants) has been of great interest in biotechnology. In view of the properties applied in agriculture, in the food, paper, metal, textile and pharmaceutical, with higher potential for the oil industry. In this thesis, there was the isolation of *Aspergillus niger* of savanna soils of Pernambuco, Brazil, by serial dilution technique and selective media. The identification of microorganisms was based in their morphological and molecular analyzes. The selection of the biosurfactant producing microorganism was performed by hemolysis test, surface tension and emulsification index. The biosurfactant production medium was composed of a base salt (trace elements), supplemented with 10% wheat bran, having as variables sodium chloride, yeast extract and soybean oil post frying in accordance with the planning factor 2^3 as the response variable composition of the biosurfactant production medium, the biosurfactant was isolated and characterized as the physicochemical properties and evaluated for the potential application as detergents in the formulation. The metabolic free liquid in the cells containing the biosurfactant selected condition after 96 hours of cultivation at 150 rpm and presented surface tension to 29.0 mN/m and the interfacial 15.3 mN/m. The biosurfactant showed stability at extremes of pH (2-12), temperature (0, 5, 70 and 100 °C) and salinity (2 - 12%). The yield of the biosurfactant of 3.2 g / L Critical Micelle Concentration (CMC) by 1.5%. And polymeric anionic character, composed of lipids (31.5%), carbohydrates (10.8%) and proteins (14.8%). The oil dispersion test showed a halo of 21.03 cm², and to provide anti adhesive microorganisms *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*. The results indicated that the biosurfactant showed no inhibitory effect on seed germination and the elongation of roots, as well as the mortality of the larvae of *Artemia salina*. The biosurfactant tested showed no cytotoxicity to the cells. The biosurfactant when applied in formulating a biodetergent was more efficient in the sparkling power, emulsifier and detergent action when compared to a commercial synthetic detergent. The results demonstrated the promising biotechnological potential of the biosurfactant produced by *A. niger* suggesting applicability in different industrial and environmental sectors.

Keyword: Active Tense, emulsifier, anti adhesive, detergent action, *A. niger*

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Considerando a elevada biodiversidade existente em regiões tropicais de espécies de plantas, animais e micro-organismos demonstrados nos últimos anos, os fungos se destacam por apresentarem funções importantes e produzem uma infinidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários, com diferentes aplicações biotecnológicas, em especial, vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos e biossurfactantes, representando um mercado de bilhões de dólares em todo o mundo (AZEVEDO e ARAÚJO, 2006).

Nas regiões tropicais a Caatinga destaca-se como o único bioma exclusivamente brasileiro, o que significa que grande parte do seu patrimônio biológico não é encontrado em nenhum outro lugar do planeta. A Caatinga ocupa uma área de aproximadamente 750.000 km², 11% do território nacional, englobando de forma contínua parte dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e parte do Norte de Minas Gerais (Sudeste do Brasil) (DRUMOND et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2014; LIMA et al., 2014).

Estudos recentes demonstram que o bioma Caatinga apresenta uma biota diferente, quando comparado de outras florestas tropicais secas da América do Sul (GIULIETTI et al., 2002; RODRIGUES, 2003; ROSA et al., 2003; QUEIROZ, 2006). Particularmente, elevada diversidade em fungos filamentosos vem sendo observada em solos da Caatinga (GUSMÃO & MAIA, 2006).

Dentre os metabólitos secundários, a produção de biossurfactantes vem sendo bastante investigada por bactérias, e em menor frequência leveduras e mais raramente ainda por fungos filamentosos (BHARDWAJ et al., 2013).

O mercado mundial dos surfactantes corresponde aproximadamente a US\$ 9,4 bilhões de dólares por ano, com uma demanda prevista de aumento de 35% ao ano. Contudo, os surfactantes atualmente utilizados, na sua maioria são derivados do petróleo. Neste sentido, há um crescente interesse por biossurfactantes considerados

ecologicamente seguros, podendo ser aplicados em processos de biorremediação. Os micro-organismos que produzem biossurfactantes também podem ser utilizados nas tecnologias de biorremediação, como solubilização e remoção de contaminantes hidrofóbicos, na remoção de lodo em tanques de armazenamento de óleo, na recuperação melhorada do petróleo (Meor), demonstrando serem processos ecológicos de recuperação de petróleo, podendo também ser utilizados em aplicações médicas e no processamento de alimentos (KIM, 2000; SHARMA e SAHARAN, 2014).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas com diferentes graus de polaridade, com capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial, além de formar emulsões água e óleo, reduzir a viscosidade entre líquidos, conferindo propriedades de detergência, ação emulsionante e dispersante (JANEK et al., 2012; RUFINO et al., 2014).

Portanto, o potencial de aplicação de biossurfactantes está baseado em suas propriedades funcionais: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, demulsificação, inibição da corrosão, redução de viscosidade e da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas na agricultura, na indústria alimentícia, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; SILVA et al., 2014; SHARMA et al., 2015).

Considerando a biodiversidade do bioma Caatinga, estudos foram realizados com solos de Pernambuco (Brasil), buscando o isolamento, caracterização morfológica, identificação taxômica e molecular do fungo *Aspergillus niger*, além de avaliar seu potencial biotecnológico na produção de biossurfactantes, caracterização físico-química, conhecimento das propriedades, com aplicação a formulação detergentes.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar, identificar, caracterizar e selecionar amostras de *Aspergillus niger*, com potencial biotecnológico para produção de biossurfactantes na aplicação de formulação de detergente.

2.2 Específicos

- Isolar e identificar fungos do gênero *Aspergillus spp* de solos da Caatinga de Pernambuco;
- Realizar a caracterização morfológica e molecular das amostras *Aspergillus spp*;
- Selecionar as amostras de *Aspergillus niger* produtores de biossurfactantes;
- Produzir do biossurfactante por *Aspergillus niger*, de acordo com um planejamento fatorial 2³;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante;
- Isolar e caracterizar bioquimicamente o biossurfactante produzido pela amostra selecionada;
- Avaliar a eficiência do biossurfactante através da determinação da concentração micelar crítica;
- Avaliar a toxicidade sobre a germinação das sementes, letalidade sobre as larvas de *Artemia salina* e citotoxicidade para as linhagens de células cancerígenas e normais;
- Investigar o potencial de aplicação do biossurfactante na formulação de um biodetergente.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aspectos gerais sobre o bioma da Caatinga

Caatinga (do tupi: *caa* (mata) + *tinga* (branca) = mata branca) é o único bioma exclusivamente brasileiro, o que significa que grande parte do seu patrimônio biológico não pode ser encontrada em nenhum outro lugar do planeta. Este nome decorre da paisagem esbranquiçada apresentada pela vegetação durante o período seco: a maioria das plantas perde as folhas e os troncos tornam-se esbranquiçados e secos (DRUMOND et al., 2012) como pode ser observado na (Figura 1).

A Caatinga ocupa cerca de 800.000 Km², inclui parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais. É caracterizada por ser uma floresta seca, e por apresentar uma vegetação xerófila de porte arbóreo, arbustivo e herbáceo, com uma ampla variação de fisionomia e diversidade de espécies (DRUMOND et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; COSTA et al., 2014).

Figura 1- Foto ilustrativa da vegetação da Caatinga

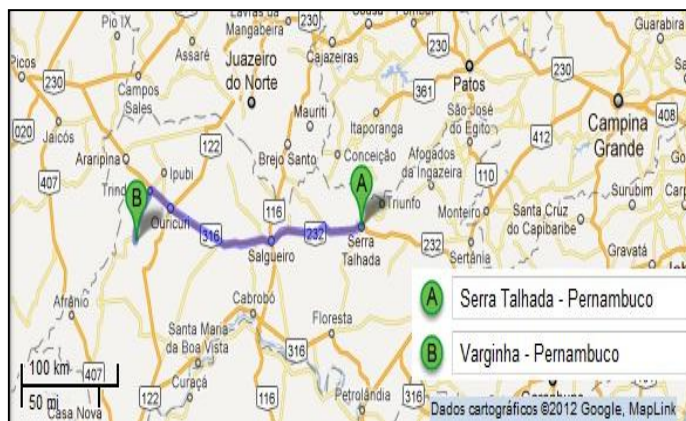


Fonte: <http://www.comunidadebancodoplaneta.com.br/profiles/blogs/fundo-financia-projetos-de>.

A caatinga encontra-se hoje em acentuado processo de desertificação ocasionado, principalmente, pelo desmatamento e uso inadequado dos recursos naturais o que ressalta a necessidade de estudos acerca da biodiversidade, destacando as comunidades microbianas e os processos por elas desencadeados, não apenas para se conhecer os indivíduos e respectivas funções, mas também os efeitos dos distúrbios ou estresses ambientais sobre tais comunidades (DRUMOND et al., 2012).

Os locais selecionados para o estudo da microbiota do solo da Caatinga estão localizados em Pernambuco são eles os municípios de Varginha - Pernambuco, que está localizado a 08°06'10" latitude sul, longitude 40°28'23" Oeste, e Serra Talhada - Pernambuco, a uma altitude de 444m, latitude 07°59'31" Sul, longitude 38°17'54" Oeste Identificados no mapa na (Figura 2). Apresentam temperatura anual média entre 25,9°C para mínima, médias máximas de 37°C e precipitação média anual de 887,9 mm. O solo apresenta-se como Argissolos, Latossolos, Luvisolos e Neossolos (EMBRAPA, 1999).

Figura 2 - Localização dos municípios de Serra Talhada e Varginha – PE



Fonte: <https://maps.google.com.br/maps>.

3.2 Isolamento, identificação e diversidade dos fungos filamentosos do solo

A técnica microbiológica pela qual se obtém as culturas puras que fornece produtos de interesse é denominada isolamento. Na fase do isolamento ocorre a seleção de uma colônia através da observação da produção de determinado produto ou morfologia, tamanho, pigmentação, aspecto e consistência da colônia (STANBURY et al., 1995).

Apesar de existir a possibilidade de utilizar micro-organismos geneticamente modificados, ainda é possível encontrar uma grande variedade de novos micro-organismos no meio ambiente, sendo que muitos podem ser até comercialmente interessantes (MORAIS, 2012).

O isolamento se inicia com a escolha da fonte mais provável de conter micro-organismo desejado, podendo variar desde solo até águas, ar, lodo, alimento ou órgãos. Características que um determinado organismo possui para se desenvolver em certo ambiente são usadas como fatores seletivos no processo de isolamento de uma colônia (STANBURY et al., 1995). Normalmente, as colônias apresentam características morfológicas diferentes, as quais permitem a distinção entre micro-organismos. No entanto, para conseguir uma visualização das colônias independentes no meio sólido, é necessária a distribuição uniforme das bactérias, dos micro-organismos sobre a placa de Petri (TORTORA et al., 2006; MUNIZ et al., 2014).

Os micro-organismos isolados podem ser obtidos a partir de ambientes naturais ou a partir de bancos de cepas. Esses centros de cepas podem fornecer micro-organismos de características já conhecidas, mas nem sempre estão presentes os melhores caracteres desejados, enquanto o ambiente possui uma infinidade de variações.

Os fungos filamentosos são tradicionalmente caracterizados, classificados e identificados através de características morfológicas e fisiológicas. A identificação de fungos filamentosos tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia e

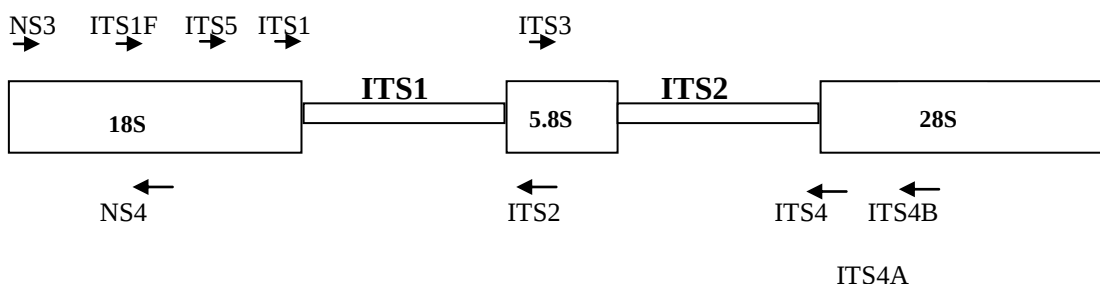
aspectos microscópicos. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias) é fundamental para identificação presuntiva do fungo (MINAMI, 2003).

Métodos de identificação, com base em técnicas de biologia molecular, têm colaborado significativamente para a caracterização genética das espécies. O método de PCR (Polymerase Chain Reaction) descrita por Kary Mullis em meados da década de 80 tem sido apontado como sendo a ferramenta mais satisfatória para uma rápida identificação de fungos permitindo avanços significativos na organização taxonômica destes indivíduos (GRANCHI et al., 1999; MARÇAL, 2005).

PCR é uma técnica baseada na amplificação de uma região específica do DNA delimitada pela sequência dos oligonucleotídeos iniciadores. Esta reação consiste em três passos chave: fase de desnaturação da dupla fita de DNA em alta temperatura, geralmente em temperaturas de 94 °C a 96 °C; fase de anelamento, onde o par de oligonucleotídeos iniciadores se liga à sequência complementar na fita de DNA; e, finalmente, a fase de extensão da fita de DNA (CHEN, 2002).

O uso de técnicas moleculares que exploram as variações na sequência de nucleotídeos no gene que codifica o RNA ribossomal e os espaços intergênicos, fez com que ocorresse, na última década, progresso no estudo da ecologia de fungos (PINHEIRO, 2004; ANDERSON, 2007). Duas regiões que rodeiam os genes rDNA apresentam sequência de nucleotídeos que permite a distinção entre micro-organismos. Denominados Espaçadores Internos Transcritos, ou no inglês *Internal Transcribed Spacer*, ITS 1 e ITS 2, estas regiões permaneceram pouco conservadas no curso da evolução (LARENA et al., 1999) (Figura 3). A região ITS 1 foi descrita por possuir uma rápida evolução e a região ITS 2 uma evolução moderada (OLIVEIRA et al., 2010).

Figura 3 - Mapa das regiões de rDNA de fungos



Fonte: LARENA et al., 1999.

Devido ao seu alto grau de variabilidade, a sequência correspondente aos ITS é a região de escolha para a identificação de micro-organismos em nível específico (ANDERSON; CAIRNEY, 2004; PINHEIRO, 2004; ANDERSON; PARKIN, 2007). Estudos têm revelado que até mesmo espécies de fungos estreitamente relacionadas, contêm sequências distintas nessas regiões que podem ser exploradas para a identificação destes micro-organismos usando uma sequência específica de oligonucleotídeos iniciadores (HAUGLAND; HECKMAN; WYMER, 1999). Esta região com cerca de 600 a 800 pares de bases pode ser amplificada usando oligonucleotídeos iniciadores universais. Por estar presente como múltiplas cópias no genoma, é uma região relativamente fácil de amplificar, mesmo o material genético sendo diluído ou degradado (LARENA et al., 1999).

3.3 Gênero *Aspergillus*: Aspectos gerais

A denominação *Aspergillus* foi proposta em 1729, por Michaeli, pela semelhança com o aspersório, instrumento com o qual se aspergia a água benta em cerimônias religiosas (ALCALÁ et al., 2012).

Morfologicamente, todas as espécies de *Aspergillus* possuem colônias filamentosas que apresentam hifas septadas com aproximadamente 4µm de espessura. A estrutura de frutificação, típica do gênero, é caracterizada por um conidióforo com uma célula pé e uma dilatação no ápice chamada de vesícula, onde se inserem as métulas em espécies bisseriadas, ou as fiálides em espécies unisseriadas, as quais dão origem aos conídeos (RAPER et al., 1965).

Aspergillus são fungos filamentosos encontrados em todas as estações do ano, dispersos no solo, em vegetais ou qualquer matéria em decomposição, o que garante a dispersão dos conídeos, a forma infectante (OLIVEIRA et al., 2002).

Segundo Rapper e Fennell, 1988, há aproximadamente 900 espécies de *Aspergillus*, os quais foram classificados em dezoito grupos respeitando-se os parâmetros morfológicos.

O gênero *Aspergillus* sp. é um fungo cujos conídeos estão presentes no ar, mas normalmente não causam doenças muito sérias. Entretanto, um indivíduo com um status imunológico debilitado pode apresentar reação a este fungo. (Index Fungorum, 2012).

Uma forma de se classificar a maioria dos fungos seria baseando-se nas características morfológicas das hifas, corpos de frutificação e esporos. O gênero *Aspergillus* sp. apresenta anamorfos (fases assexuada ou mitótica) de ascomicetos da ordem Eurotiales, subgênero Circumdati, classe dos hyfomicetes, seção niger. Os gêneros são caracterizados pela produção de fiálides e conídio em cadeia seca. O conidióforo do *Aspergillus* sp. é simples, sem ramificação e termina numa vesícula, onde ficam inseridas as fiálides, Chalfoun e Batista (2003), e sua forma teleomórfica sendo considerado Eumycota, subdivisão Ascomycotina na ordem Eurotiales, reproduzindo através da reprodução sexual os ascóporos, além de um terço das espécies de *Aspergillus* sp. tem os gêneros Emericella como seus teleomorfos.

3.3.1 *Aspergillus niger*

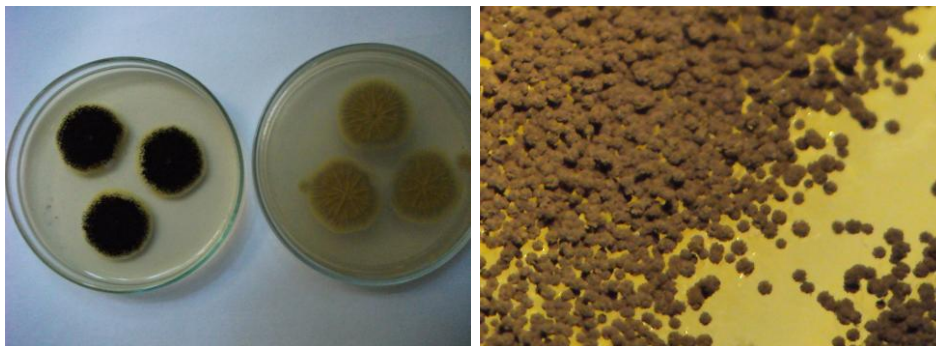
Aspergillus niger (*A. niger*) é um fungo filamentoso haplóide e é um micro-organismo essencial no campo da biologia. Além da produção de enzimas extracelulares e o ácido cítrico, *A. niger* é utilizado para a gestão de resíduos e biotransformações (IZIDORO e KNOB, 2014).

O *A. niger* é uma das espécies mais comuns do gênero *Aspergillus*. É pertencente ao reino: Fungi, divisão: Ascomycota, Classe: Eurotiomycetes, Ordem: Eurotiales, Família: Trichocomaceae, Gênero: *Aspergillus*, Espécie: *Aspergillus niger*. (KWON-CHUNG, 1992; PAUL et al., 2010).

Em 2007 a espécie teve seu genoma sequenciado por Pel e colaboradores. O estudo revelou um genoma de 33,9 Mb com 14.165 genes codificadores de proteína preditos. A análise das ORFs (*Open Reading Frames*) encontradas detectou 171 glicosidases codificadas no genoma de *A. niger*, das quais 131 (77%) são possivelmente secretadas.

A coloração das colônias nos primeiros dias de cultivo é branca depois passar a ser amarela, em seguida, é preta. A textura das colônias é granular, com o reverso incolor ou creme, observados na (Figura 4). (HOOG e GUARRO, 1995; KEIR, 2013).

Figura 4 - Aspectos gerais e morfológicos do *A.niger*



Fonte: Arquivo pessoal, 2013.

Os conidióforos são lisos e hialinos, ou pigmentados medindo de 1,5-3 mm de comprimento e de 15 a 20 mm de diâmetro. A vesícula é globosa com 50-100 mm de diâmetro e produz fiálides em torno dela. As fiálides são bisseriadas, os ramos primários são de 30 mm de comprimento podendo ser fechados, enquanto o secundário é curto e medindo 8 mm de comprimento, os conídios, que são globosos e ásperos, com 4 a 5 mm de diâmetro, cor marrom ou marrom ao preto (SAMSOM et al., 2001).

Uma das formas mais comuns que *A. niger* ganha energia é através de biolixiviação. Biolixiviação é o processo de extração de metais a partir de minérios com a utilização de bactérias. *A. niger* ganha a sua energia pela ruptura dos minerais em seu elemento mais básico, ou seja, é um fungo capaz de quelar metais pesado tais como: cobre, estanho, alumínio, níquel e chumbo, e com esta energia é capaz de produzir o ácido oxálico, ácido glucônico, e ácido cítrico (SANTHIYA e TING, 2005).

A. niger é geralmente encontrado em ambientes comuns mesófilos tais como o solo, as plantas, e ambientes de ar fechado. *A. niger* não é apenas um fungo xerófilo (que não requer água livre para o crescimento, podem crescer em ambientes úmidos), mas também é um organismo termofilo (capacidade para crescer a temperaturas altas). Devido a esta propriedade, os fungos filamentosos exibem uma alta tolerância a temperaturas de baixas (SCHUSTER et al., 2002).

A. niger é considerado de baixa infectividade em comparação com outros fungos filamentosos. Apesar disso, manifestações clínicas que foram contabilizados, como infecções pulmonares ou infecções de ouvido em pacientes que têm um sistema imunitário debilitado, ou um sistema imunológico que tenha sido prejudicado por uma doença ou tratamento médico, têm sido observadas (SCHUSTER et al., 2002).

A. niger é um micro-organismo muito importante usado no campo da biotecnologia, devido a produção de várias enzimas, tais como, amilases, lipases, celulasas, xilanases e proteases (BASU et al., 2007).

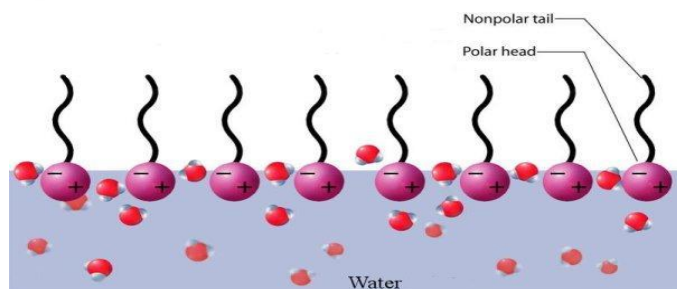
3.4 Biossurfactantes

Surfactantes ou agentes de superfície (surface active agents) são moléculas com propriedades tensoativas que possuem grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. São poderosas moléculas anfipáticas ou anfifílicas, que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas (MORAIS, 2012; RUFINO et al., 2014; SHARMA et al., 2015).

Os surfactantes possuem diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, permitindo a formação de interfaces óleo/água ou ar/água, por serem ativas de superfície, determinando propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro e micro emulsões, lubrificação, ação espumante ou antiespumante, capacidade molhante, solubilização e detergência. Essas moléculas podem ser produzidas por síntese química (surfactantes sintéticos) ou biológica (biossurfactantes) (DAVID et al., 2003).

Os surfactantes são categorizados em catiônicos, aniônicos, não-iônicos e zwitteriônicos, de acordo com a carga exibida pelo grupo hidrofílico da molécula, uma vez que o grupo hidrofóbico pouco varia (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002; SARI et al., 2014). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto que a polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica (SOUZA SOBRINHO et al., 2008). Na (FIG. 5) encontra-se a representação esquemática de uma molécula de surfactante.

Figura 5 – Representação esquemática das moléculas anfipáticas de surfactante



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

O grupo hidrofóbico ou a parte apolar do surfactante é usualmente dominado por um hidrocarboneto (SABATINI et al., 2006), possuindo a cadeia hidrocarbônica de 10 a 20 átomos de carbono, que para Chu (2003) podem ser aromáticos ou alifáticos, em linha reta ou ramificada e carbonos reduzidos. Os surfactantes possuem diversos tipos de aplicações atualmente, como: emulsificação, detergência, solubilização e umidificação. O mercado mundial dos surfactantes corresponde a aproximadamente US\$ 9,4 bilhões por ano, e estima-se que a demanda por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano (CERQUEIRA e COSTA, 2009; VECINO et al., 2015).

Quase todos os surfactantes atualmente utilizados são quimicamente derivados do petróleo. Entretanto, o interesse por surfactantes biológicos tem aumentado nos últimos anos, devido às suas inúmeras características: possibilidade de produção através de fermentações, potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde, indústrias de processamento de alimentos (CASTIGLIONE e CARMAN, 2009).

Novas legislações de proteção ao meio ambiente, bem como a preocupação ambiental entre os consumidores, têm levado à procura por surfactantes naturais como alternativas em substituição aos sintéticos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Nesse contexto, destacam-se os metabólitos produzidos por micro-organismos, os chamados biossurfactantes (HABA et al., 2000).

Os componentes microbianos que exibem alta atividade de superfície e atividade emulsificante são classificados como biossurfactantes. Estes podem ser sintetizados como produtos metabólicos por diferentes micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos utilizando vários substratos de baixo custo incluindo açúcares, óleos, alcanos, resíduos industriais e agrícolas.

Os biossurfactantes são verdadeiros sabões biológicos biodegradáveis e estruturalmente formados de subprodutos, metabólicos secundários, obtidos a partir de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Possuem propriedades tensoativas sendo, por isso, também chamados biotensoativos (REDDY e CHINTHAMREDDY, 2000).

Os biossurfactantes foram descobertos na década de 60, como compostos extracelulares anfipáticos. Todos os biossurfactantes apresentam uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Devido a essa natureza anfipática, os surfactantes se acumulam na interface ar-água e óleo-água e superfície (MUTHUSAMY et al., 2008; JARMAL et al., 2012).

O tipo, a quantidade e qualidade dos biossurfactantes produzidos por um micro-organismo são influenciados por fatores tais como a natureza da fonte de carbono, as concentrações de macronutrientes como N, P, Mg, Fe, S e Mn no meio e as condições de crescimento, tais como pH, temperatura, agitação e concentração de oxigênio disponível (MORAIS, 2012; SILVA et al., 2014).

Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos e podem também ser utilizados em uma grande variedade de aplicações industriais, ainda não são utilizados em larga escala devido aos custos de produção (VAN-HAMME et al., 2003), apesar de serem produzidos a partir de fontes renováveis e possuírem baixa toxicidade (LUNA, 2010; SHARMA et al., 2014).

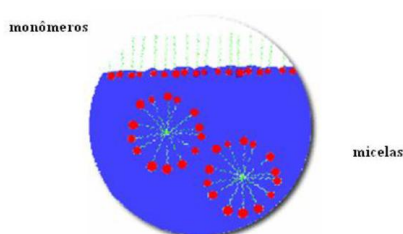
3.4.1 Propriedades dos biossurfactantes

Os biossurfactantes atuam como um produto que facilita a formação de emulsões devido à capacidade de reduzir a tensão superficial entre duas fases distintas, numa etapa posterior, estabiliza a emulsão formada (CRUERGER, 1984).

A tensão superficial é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando concentração de surfactante no meio aumenta, ocorrendo a formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula, enquanto que, as porções hidrofóbicas para a parte interna. A concentração corresponde à mínima Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao

máximo (LUNA, 2010) (Figura 6). Quando a CMC é atingida, a concentração máxima de micelas são formadas (LUNA et al., 2008; TIMMA et al., 2014).

Figura 6- Representação esquemática do comportamento de um surfactante em solução aquosa após a CMC

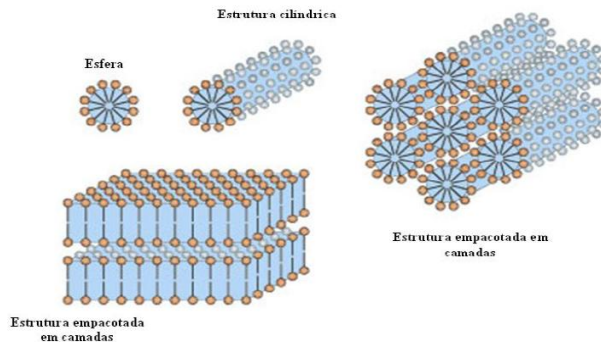


Fonte: MORAIS, 2012.

A CMC é uma propriedade do surfactante que o avalia quanto a sua atividade, ou seja, traduz a solubilidade da substância tensoativa dentro da fase aquosa (RUFINO et al., 2007). Numa micela, em meio polar como a água, a parte lipofílica da molécula se orienta para o interior e a hidrofílica para o exterior da micela, adquirindo formato duplo na formação das suas camadas sendo denominadas admicelas, vesículas ou lipossomos quando formados por fosfolípidos (ZANA, 2005; JARA et al., 2013 SILVA et al., 2014).

As micelas mais simples são esferas, mas à medida que a concentração do surfactante aumenta, elas crescem formando estruturas cilíndricas, como evidencia a (Figura 7). Um aumento adicional da concentração leva as estruturas cilíndricas a se empacotarem em estruturas geralmente hexagonais ou em camadas e, à medida que essas estruturas crescem, por aumento de concentração, mais ordenadas elas se tornam e as maiores podem adquirir propriedades de cristais líquidos (LIMA, 2007; ARORA et al., 2015).

Figura 7 - Tipos de estruturas de surfactantes em solução



Fonte: LIMA, 2007.

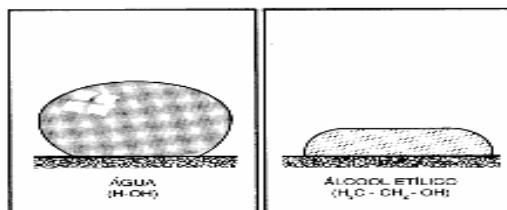
As micelas são termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis, porém não são destruídas pela diluição com água quando a concentração do tensoativo se encontrar abaixo da CMC (MANIASSO, 2001). Ao contrário dos monômeros, as micelas ficam dispersas em toda a solução e não apresentam efeito sobre a tensão superficial da água. Contudo, quando a concentração dos monômeros é alta, define-se, também, CMC (MULLIGAN, 2005). Quanto mais rápida as primeiras micelas se formarem em concentrações baixas de surfactante, muito mais econômico e eficiente será o processo quando comparado à formação da primeira micela em altas concentrações (MORAIS, 2012).

Apesar da diversidade de composição química, algumas características físico-químicas são comuns à maioria dos biossurfactantes. As suas propriedades físicas, como redução da tensão superficial, capacidade espumante, emulsificante e estabilizante, concentrações micelares baixas, solubilidade e poder detergente são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de micro-organismos com potencial desse agente (DELEU e PAQUOT, 2004).

Os biossurfactantes são capazes de reduzir as forças de repulsão entre fases diferentes, interface ou superfície, e permitem que as duas fases se misturem mais facilmente. Assim sendo, quanto menor a força de atração existente entre as moléculas

do líquido menor será a tensão superficial ocorrendo menor viscosidade e maior tendência a espalhar-se. Na (Figura 8), observa-se que o etanol possui menor tensão superficial por possuir maior tendência a espalhar-se no líquido (PINO e NETO, 1996).

Figura 8- Tensões superficiais dos líquidos

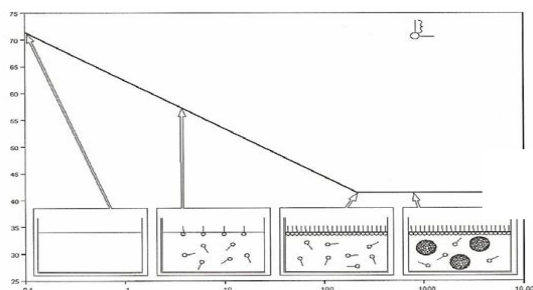


Fonte: PINO e NETO, 1996.

As atividades interfaciais e superficiais dos biossurfactantes são mais eficientes e efetivas do que os surfactantes sintéticos por promoverem uma redução maior da tensão interfacial em menores concentrações de bioprodutos (COOPER et al., 1979).

De acordo com a literatura as tensões nas faixas de 35 mN/m a 40mN/m, indicam que o micro-organismo é promissor na produção de biossurfactantes; abaixo de 35mN/m, indica que o micro-organismo pode ser considerado um eficiente produtor (SILVA, 2002). A intensidade de adsorção do biossurfactante à superfície depende de sua concentração (Figura 9), ocasionado uma variação na ordenação destas moléculas sobre a superfície. Em concentrações muito baixas de biossurfactantes, o mesmo se distribui na superfície e tende a se orientar paralelamente a esta. Quando ocorre um aumento da concentração de biossurfactante, observa-se uma diminuição da área disponível para as moléculas iniciando o processo de ordenação das mesmas à superfície (SANTOS et al., 2007).

Figura 09 - Esquema do comportamento do surfactante entre as fases fluida e superficial, em função da tensão superficial, indicando a CMC.



Fonte: SANTOS et al., 2007.

Os biossurfactantes são utilizados em aplicações industriais, particularmente, como umectantes, surfactantes, na cosmetologia, em preparações terapêuticas, em sistemas de controle de poluição do meio ambiente por derramamento de petróleo e seus derivados (BARDI et al., 2000; CHRISTOFI e IVSHINA, 2002).

A produção microbiológica de surfactantes é limitada devido o alto custo para obtenção destes compostos. Estes compostos, os chamados, biossurfactantes tem despertado interesse em sua produção biotecnológica principalmente, devido sua diversidade estrutural garantindo grande potencial para aplicação. Entretanto, o uso de resíduos industriais ou fontes renováveis e de baixo custo surgem como alternativa promissora para produção deste biopolímero, contribuindo desta forma para redução dos custos e beneficiamento do meio ambiente pela redução da carga de material poluente. A possível comercialização dos biossurfactantes depende do máximo rendimento e produtividade do processo, bem como diminuir os custos relativos à sua produção e recuperação (ALMEIDA, 2001).

3.4.2 Classificação de biossurfactantes

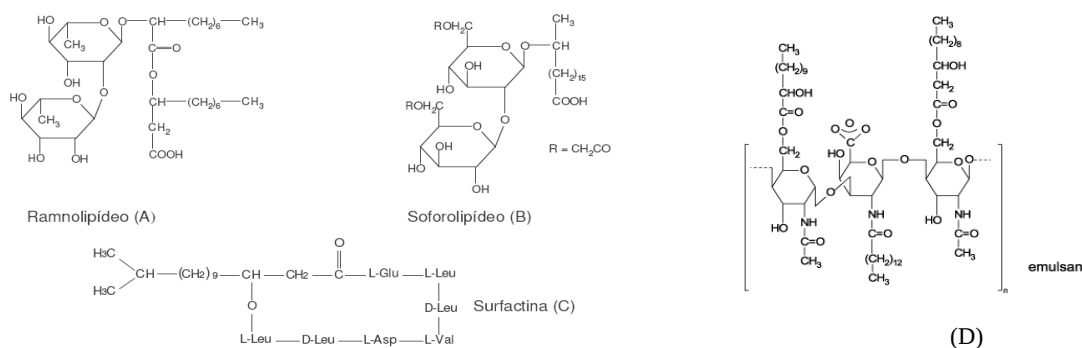
Diferentemente dos surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com a natureza do seu grupamento polar, os biosurfactantes são classificados pela sua composição química e origem microbiana.

Segundo Rosenberg e Ron (1999), os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com seu peso molecular. As principais classes destes metabólitos secundários com baixo peso molecular incluem os glicolipídeos, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos, surfactantes particulados e lipopeptídios (Figura 10).

De forma geral, as bactérias produzem principalmente surfactantes tipo ramnolipídeos, trealolipídeos e lipopeptídeos, enquanto que leveduras produzem soforolipídeos e manosileritritolipídeos. Já os fungos filamentosos produzem ácido ustilágico e manosileritritolipídeos (MUTHUSAMY et al., 2008).

Os biossurfactantes poliméricos são constituídos por diversos grupos químicos diferentes como, por exemplo, o emulsan, no qual ácidos graxos estão ligados a um esqueleto de heteropolissacarídeos, ou o liposan de *C. lipolytica*, constituído por carboidratos e proteínas (NITSCHKE, 2002).

Figura 10 - Estrutura de biossurfactantes do tipo glicolípídeo (A e B), lipopeptídeo (C) e polimérico (D).



Fonte: MUTHUSAMY et al., 2008.

De acordo com Lima (2007), os surfactantes produzidos por micro-organismos são caracterizados como compostos tensoativos devido as suas propriedades. Dentre elas, podemos citar:

- Os surfactantes podem ser iônicos ou não-iônicos. Dentre os surfactantes iônicos utilizados comercialmente destacam-se os ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônicos);
- Apresentam a capacidade de reduzir a tensão superficial devido a formação de um filme molecular;
- Formam macro e micro emulsões estáveis de hidrocarbonetos em água ou água em hidrocarbonetos. Para tanto, a emulsificação consiste na formação de emulsões entre duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade ocorrendo a dispersão de um líquido em outro;
- Proporcionam formação de micelas onde, em solução as moléculas de surfactantes tendem a se agregar umas com as outras, implicando na redução da tensão superficial até atingir a Concentração Micelar Crítica (CMC);
- Alguns biosurfactantes apresentam propriedades antimicrobianas, resultando na destruição de micro-organismos pela lise de suas membranas celulares. No microambiente, esta propriedade é importante para evitar competição com outros micro-organismos por nutrientes.

3.4.3 Micro-organismos Produtores

Nas últimas décadas tem aumentado o interesse em identificar e isolar novos micro-organismos produtores de moléculas tenso-ativas que apresentem boas características surfactantes, como baixa concentração micelar crítica (CMC), baixa

toxicidade, alta atividade de emulsificação, dentre outras (DESAI e BANAT, 1997; ROSENBERG e RON, 1999; FONTES, AMARAL e COELHO, 2008).

Devido ao curto tempo de geração, comparado ao necessário para o crescimento animal e de plantas, a produção dos biossurfactantes por micro-organismos é considerada a mais promissora para fins industriais e ambientais (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999; SOUZA SOBRINHO, 2008; NAING et al., 2015).

Micro-organismos produtores de biossurfactantes podem ser isolados de solos contaminados por hidrocarbonetos e por bactérias de ecossistema marinho (COELHO et al., 2010; JENNINGS e TANNER, 2000). Isolados de materiais não contaminados também podem ser capazes de produzir moléculas com propriedades anfifílicas. Desta forma, é necessário um maior conhecimento da fisiologia, genética e bioquímica dos micro-organismos produtores de biossurfactantes (BUENO, 2008).

Segundo Georgiou; Lin; Sharma (1992), uma grande variedade de micro-organismos produzem biossurfactantes, sendo que o tipo, a quantidade e a qualidade do biossurfactante são influenciados pela natureza do substrato, concentração de íons no meio de cultura, além das condições de cultivo.

Bactérias produtoras de surfactantes incluem: *Pseudomonas aeruginosa* (monodiramnolipídeos), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos glicolipídeos, etc.) *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipídeos sucrose). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem as leveduras *Torulopsis* sp. (soforolipídeos), *Candida* sp. (liposan e fosfolipídeos) e *Aspergillus* sp. (fosfolipídeos) (CHRISTOFI e IVSHINA, 2002). Os biossurfactantes são produzidos por uma vasta variedade de micro-organismos, segregada extracelularmente ou localizada na superfície da célula (CHOOKLIN, et al., 2013).

A produção de biossurfactantes por bactérias, leveduras e fungos filamentosos está associada geralmente à utilização de substratos insolúveis em água. O crescimento do micro-organismo em uma interface de água e óleo favorece o aparecimento de um

biofilme, cuja formação envolve as seguintes etapas: a) os micro-organismos aderem à superfície de grandes gotas de óleo devido à hidrofobicidade das células; b) as células aderidas formam uma camada delgada na interface óleo/água, extraindo os compostos insolúveis em água da fase oleosa e utilizando os sais minerais da fase aquosa; c) como as células revestem as gotas de óleo produzindo biossurfactantes, elas reduzem a tensão interfacial entre o óleo e a água, resultando na emulsificação do óleo e aumentando a área interfacial disponível para o crescimento microbiano; d) quando o composto oleoso contido nas gotas desaparece, os micro-organismos colonizam outras gotas (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998; NITSCHKE e PASTORE, 2002; MESQUITA, 2004). Os biossurfactantes são específicos podendo variar de espécie para espécie Tabela 1 (LANG, 2002; MUTHUSAMY et al., 2008).

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana e sua produção, caracterização, utilização e ou potencial, assim como menções às espécies bacterianas produtoras, são relatados nos inúmeros artigos de revisão bibliográfica sobre o tema. As bactérias produtoras mais relatadas são dos gêneros: *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. (GOUVEIA et al., 2003), porém outras espécies também têm sido isoladas do solo, da água e de sedimentos de mangue, contaminados com resíduos oleosos (FERRAREZO, 1998; BATISTA, 2002; PIRÔLLO, 2006; SAMADI et al., 2007; BUENO, 2008; JACOBUCI, ORIANI e DURRANT, 2009), de poços de petróleo e de reservatórios de combustíveis (TABATABAEE et al., 2005).

Tabela 1 - Biossurfactantes produzidos por micro-organismos

MICRO-ORGANISMOS	CLASSE DE BIOSSURFACTANTES
<i>Candida lipolytica</i>	Liposan
<i>Candida petrophilium</i>	Peptídlipídeo
<i>Candida tropicalis</i>	Complexo ácido graxo-polissacarídeo
<i>Candida glabrata</i>	Soforolipídeo
<i>Trolulopsis petrophilium</i>	Glicolipídeo e/ou proteína
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipoproteína (surfcatin)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Lipoheteropolissacarídeo (emulsan)
<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N	Ácidos graxos, mono e diglicerídeos
<i>Arthobacter</i>	Glicolipídeo
<i>Arthobacter paraffineus</i>	Glicolipídeos sacarose e frutose
<i>Bacillus licheniformes</i>	Lipoproteína (lichenysin)
<i>Corynebacterium hydrocarboclastus</i>	Complexo proteína-polissacarídeo
<i>Corynebacterium lepus</i>	Ácidos corinomicólicos
<i>Corynebacterium salvonicum</i> SFC	Lipídeo neutro
<i>Nocardia erythropolis</i>	Lipídeos neutros
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídeo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeos
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealose dimicolatos
<i>Thiobacillus tioxidans</i>	Fosfolipídeo
<i>Aspergillus sp.</i>	Fosfolipídeo

Fonte: LANG, 2002; MUTHUSAMY et al., 2008.

As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificantes. Entre as leveduras, espécies de *Candida* e *Yarrowia* têm sido amplamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactantes (RODRIGUES, 2011). Uma grande vantagem do uso de leveduras reside no status GRAS (*generally regarded as safe*) que muitas delas apresentam como *Y. lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*. Organismos com status GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (AMARAL e COELHO, 2008; HANEN et al., 2015).

A maioria dos trabalhos publicados sobre a síntese de biossurfactantes tem sido realizada com bactérias, sendo poucas as referências quanto ao emprego de fungos filamentosos (LUNA-VELASCO et al., 2007).

Devido à capacidade de crescimento em baixos níveis de água nos sistemas de (FES) fermentação em estado sólido, os fungos filamentosos têm recebido maior atenção nas pesquisas (HESSELTINE, 1972). Mudanças realizadas nos processos de (FES) têm mostrado vantagens quanto ao rendimento e potencial de recuperação de produtos, quando comparados aos processos submersos (PANDEY et al., 1999).

O significativo aumento da produção de biossurfactante no meio de cultivo utilizando resíduos agroindustriais como substrato demonstrou ser uma das alternativas mais práticas e economicamente viáveis para a síntese destes compostos em fermentação semisólida utilizando *Aspergillus fumigatus* (CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009). Linhagens de *Penicillium citrinum* são capazes de produzir uma lipase extracelular (glicolipídeo) com propriedades emulsificantes (CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003).

Culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* são exemplos de alguns fungos utilizados para obtenção de vários bioprodutos por processos de fermentação em estado sólido (BORZANI et al., 2001).

Prata e Barros (2008), visando aperfeiçoar a produção de tensoativos por *Penicillium coryophilum*, utilizaram um meio mineral com a seguinte composição: g.L⁻¹

KH_2PO_4 (5,46); Na_2HPO_4 (4,76); NH_4Cl (2,50); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,8) e NaCl (0,1) e óleo de soja (0,4%). Os frascos de cultivo foram agitados durante 7 dias, a 150 rpm, sob temperatura de 30°C, sendo, a partir de então, acrescidos de óleo de soja, e mantidos sob as mesmas condições por mais 7 dias. O fungo produziu um tensoativo com tensão superficial entre 31,6 e 37,0 mN/m e índice de emulsificação na faixa de 0 a 7,00%, indicando, segundo os autores, tratar-se provavelmente de um composto de baixo peso molecular.

3.4.4 Metabolismo microbiano para produção de biossurfactantes

Vários seres vivos produzem biossurfactantes, tais como os animais, as plantas e os micro-organismos. A produção microbiológica é considerada promissora devido ao curto tempo de geração quando comparados ao crescimento de plantas e animais (LIMA et al., 2007; CASTIGLIONE et al., 2009).

Os biossurfactantes são produzidos por micro-organismos, principalmente, em condições aeróbias. Quando excretados no meio de cultivo, durante o crescimento microbiano, auxiliam no transporte dos substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999; SATPUTE et al., 2010). Em alguns casos, o micro-organismo mantém o biossurfactante produzido aderido à parede celular para facilitar a penetração da fonte de carbono no espaço periplasmático da célula (KOCH et al., 1991; NITSCHKE e PASTORE, 2002; BANAT et al., 2010).

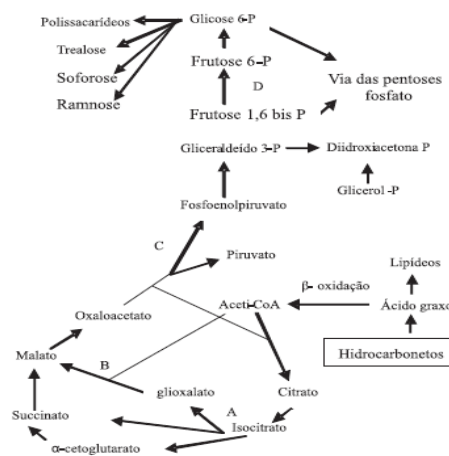
Esses compostos são sintetizados por duas vias metabólicas responsáveis pela síntese dos grupos hidrofóbico e hidrofílico da molécula: a via dos hidrocarbonetos e a via dos carboidratos (DESAI e BANAT, 1997; FONTES et al., 2008). As vias para a síntese dos dois grupos de precursores são diversas e utilizam conjuntos específicos de enzimas (CAMEOTRA et al., 2010). Hidrocarbonetos e carboidratos estão envolvidos diretamente na síntese das porções hidrofóbicas e hidrofílicas dos tensoativos. No entanto, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes por

micro-organismos são obtidas quando se utiliza substratos hidrofóbicos. Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel e um carboidrato, como constituintes do meio de produção (LIMA et al., 2010; XU et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012).

Para a síntese da porção polar do biossurfactante e para o metabolismo celular, os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante. O substrato hidrofílico utilizado como glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante (Figura 11).

Para a produção de lipídeos, presentes na porção hidrofóbica, a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos (FONTES et.al., 2008).

Figura 11 - Metabolismo intermediário relacionado à síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos.



Fonte: Fontes et al., 2008.

3.4.5 Função fisiológica dos biossurfactantes

Do ponto de vista fisiológico, a produção desta quantidade abundante de moléculas tensoativas representaria um alto custo metabólico caso não houvesse uma função específica, e provavelmente os genes responsáveis pela produção não seriam conservados nos genomas destes micro-organismos (ARAÚJO e FREIRE, 2013).

A função exata dos biossurfactantes ainda não foi totalmente esclarecida. No entanto, algumas funções têm sido atribuídas a esses compostos como: emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água facilitando o crescimento de micro-organismos em substratos hidrofóbicos, aderência ou liberação da célula devido a necessidade dos micro-organismos em aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua exigência e disponibilidade nutricional, e a atividade antibiótica demonstrada por vários biossurfactantes principalmente os da classe lipopeptideo e glicopeptideo (ANDRADE, 2010).

Através da excreção destes biossurfactantes no meio, os micro-organismos adquirem maior chance de sobrevivência e maior competitividade na busca por nutrientes (LIN et al., 1994; ROSENBERG e RON, 1999; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

3.4.6 Condições que influenciam a produção de biossurfactantes

As fontes de C e N, bem como condições ambientais: pH, temperatura, agitação e oxigênio disponível constituem importantes fatores na produção de biossurfactantes. A escolha da fonte de carbono tem um importante papel sobre o rendimento dos biossurfactantes. Existem micro-organismos que produzem biossurfactantes apenas quando crescem em hidrocarbonetos e outros que requerem substratos simples, solúveis em água tais como carboidratos e aminoácidos (DUARTE, 2003). Condições ambientais como pH, temperatura e agitação também afetam a produção de biossurfactantes.

Por outro lado, em cultivos com leveduras, a produção de biossurfactante aumenta quando a agitação e a aeração aumentam (DESAI e BANAT, 1997).

Além da fonte de carbono, outros constituintes do meio de cultura afetam a produção de biossurfactante. Compostos nitrogenados como: uréia, nitrato e sais de amônio, bem como aminoácidos, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glicina, podem ser utilizados como fonte de nitrogênio (DESAI e BANAT, 1997). As condições de crescimento (pH, temperatura, carbono, nitrogênio, oxigênio, ou elementos traços essenciais) são fundamentais em relação à produção dos biossurfactantes (SOUZA SOBRINHO, 2008; LUNA et al., 2008; LUNA, SARUBBO e CAMPOS-TAKAKI, 2009; KIM, 2014).

3.4.7 Potencial de aplicação dos biossurfactantes

A participação de produtos oriundos de micro-organismos no mercado global está entre US\$ 50 bilhões e US\$ 100 bilhões por ano. Entretanto, pode-se afirmar que essa exploração da diversidade microbiana ainda é muito pequena (PEIXOTO, 2008). 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 corresponde a 4 bilhões de dólares (CASTIGLIONE et al., 2009).

Até o ano de 2010, os biossurfactantes detinham cerca de 10% do mercado de surfactantes sintéticos, chegando à marca de US\$ 200 milhões em vendas. As aplicações mais promissoras estão relacionadas às preocupações ambientais, tais como a biorremediação de hidrocarbonetos, poluentes orgânicos e de locais contaminados com metais pesados; também com o tratamento de derrames de óleos e com o aumento da recuperação de petróleo nas prospecções (HESTER, 2001; O'CONNOR, 2002).

O potencial de aplicação dos biossurfactantes é baseado nas propriedades de emulsificação, umidificação, solubilização, desemulsificação, separação, inibição de

corrosão, redução de viscosidade de líquidos, entre outros. As aplicações mais promissoras são as de limpeza de óleo em tanques de navios e biorremediação em derramamento de óleos e petróleo Tabela 2 (CASTIGLIONE et al., 2009).

Tabela 2 - Potencial de aplicações dos biossurfactantes

Funções	Campos de Aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos
Agentes espessantes	Mineração
Sequestrantes de metais	Cosmético e sistema de liberação de drogas
Formadores de vesículas	Tratamento de resíduos oleosos
Fator de crescimento microbiano	Transporte em tubulação, oleodutos
Agente de recuperação	Recuperação melhorada do petróleo

Fonte: CASTIGLIONE et al., 2009

Portanto, estes podem ser utilizados em várias atividades industriais que envolvam o uso de surfactantes sintetizados quimicamente como: a indústria de petróleo, farmacêutica, médica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos (textura), tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel, indústria de tinta, emulsões e floculação (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Devido as suas propriedades físico-químicas, os biossurfactantes são mais adequados que a maioria dos surfactantes sintéticos para uso na indústria petroquímica,

o que explica porque a maior parte da produção de biossurfactante (estimada entre 400 a 500 toneladas/ano) é usada em processos relacionados à indústria petroquímica. As lamas e as frações de óleo pesado que se acumule como depósitos sólidos no fundo dos tanques de armazenagem de óleo são altamente viscosos, não sendo possível a retirada pelo método convencional de bombeamento.

Normalmente este tipo de limpeza requer lavagem com solvente ou limpeza manual, sendo ambos perigosos e caros. Uma alternativa para este processo de limpeza é a formação de uma emulsão óleo/água pelo uso de surfactante, promovendo a remoção da lama pelo processo de bombeamento e recuperação do resíduo após a quebra da emulsão. A aplicação de biossurfactantes neste processo foi iniciada na década de 70 e, nos anos 80 foram relatados os primeiros estudos em pequena escala do uso do emulsan (produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus*) na limpeza de vasos contaminados por óleo (BOGNOLO, 1999).

Uma possibilidade de mercado para os biossurfactantes seria na indústria de petróleo para biorremediação/dispersão, tanto no solo quanto no mar, durante os derramamentos de óleo; remoção/mobilização de óleos incrustados em tanques de estocagem, rochas e areia do mar, aumentando assim a sua recuperação (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Um segundo mercado para os biossurfactantes é na formação de emulsões que utilizam polímeros nas indústrias de pinturas, revestimento, asfalto, cimento, têxtil e de fibras. Além do emprego na remoção de metais pesados, no tratamento de água, na mineração, em carvoarias e na proteção de madeira (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

A indústria farmacêutica e de cosméticos utilizam grandes quantidades de surfactantes numa variedade de produtos, tais como: repelentes de insetos, antiácidos, pomadas para acne, produtos anti-caspa, soluções para lentes de contato, tintura para cabelos, desodorantes, esmaltes para unhas, batom, sombra, máscaras, pasta de dentes, produtos de limpeza de dentaduras, anti-transpirantes, lubrificantes de preservativos,

produtos para bebê, cremes para os pés, produtos de depilação e hidratantes (LINHARDT et al., 1989).

Na indústria alimentícia, a emulsificação tem papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fases e na solubilização de aromas. Os biossurfactantes são utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, na panificação e em produtos derivados de carne, onde influenciam as características reológicas da farinha e a emulsificação de gorduras. Alguns produzidos por micro-organismos estão sendo utilizados comercialmente, como por exemplo, o bioemulsificante produzido por *Candida utilis* que tem sido utilizado em molhos prontos para saladas (NITSCHKE e PASTORE, 2002; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Outra aplicação de biossurfactantes é na indústria de laticínios, onde retarda a colonização de *Streptococcus thermophilus*, responsável pelo cheiro ou gosto ruim durante a pasteurização (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

De um modo geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados. Outras aplicações envolvem a melhoria da textura e vida de prateleira de produtos contendo amido pela formação de complexos, modificação das propriedades reológicas da farinha de trigo pela interação com o glúten, melhor consistência e textura de produtos a base de gordura pelo controle do polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras, além de promover a solubilização de aromas (BARROS et al., 2007).

Os biossurfactantes também possuem aplicações terapêuticas, por exemplo, os ramnolipídeos, lipopeptídeos e manosileritrolipídeos os quais apresentam atividade antimicrobiana e são capazes de diminuir a adesão de bactérias patogênicas entéricas nas superfícies. Além disso, os ramnolipídeos possuem atividades pesticida, antibacteriana, antifúngica e antiviral e podem servir como fonte do ramnose

(CHAYABUTRA; JU, 2001, LANG e PHILP, 1998; BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Os lipopeptídeos incluem a surfactina, viscosina e polimixina, as quais possuem efeitos antitumorais, antibióticos imunomoduladores ou inibidores de enzimas e toxinas. Alguns biossurfactantes podem também estimular a adesão de bactérias em superfícies xenobióticas por influenciar a hidrofobicidade da superfície da célula bacteriana ou da superfície do xenobiótico (KUIPER et al., 2004).

Na agricultura os biossurfactantes produzidos por *Bacillus* são utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados miscíveis (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Os biossurfactantes do tipo soforolipídeos (SLPs) apresentam atividade anticancerígena na inibição de tumores e ação desodorante (PEKIN; VARDARSUKAN; KOSARIC, 2005).

3.4.8 Vantagens de utilização dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam características que representam vantagens sobre os surfactantes quimicamente sintetizados, como:

- Maior eficiência na redução da tensão superficial devido à necessidade do uso de pequenas concentrações de biossurfactantes (BOGNOLO, 1999);
- Apresentam maior estabilidade térmica, de pH e força iônica podendo ser utilizado em ambientes distintos (LIMA et al., 2007);
- Os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo, tornando-os adequado para aplicação em processos de biorremediação e tratamento de resíduos (LIMA et al., 2007);
- Apresentam menor toxicidade, representando uma excelente alternativa em substituição aos surfactantes quimicamente sintetizados devido os efeitos alérgicos

causados pelos produtos artificiais. Além disso, a baixa toxicidade dos biossurfactantes permite a sua utilização em cosméticos, produtos farmacêuticos e em alimentos (LIMA et al., 2007). A vantagem mais importante dos biossurfactantes, quando comparados aos sintéticos, é serem ecologicamente mais aceitos, devido à sua baixa toxicidade e biodegradabilidade na natureza (DELEU et al., 2004).

Os biossurfactantes não precipitam ou perdem sua funcionalidade em concentrações de até 10% de sal, enquanto que 2-3% de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais. A produção destes compostos dispensa o uso de substratos de alto valor financeiro, podendo ser utilizados rejeitos industriais, o que economicamente viabiliza o processo, uma vez que o meio de cultivo representa aproximadamente 50% do custo final do produto (RODRIGUES et al., 2006).

3.4.9 Sabão, Detergente e Biodetergente

O sabão é uma substância obtida pela reação de gorduras ou óleos com hidróxido de sódio ou de potássio. O produto desta reação é um sal (reação de um ácido com uma base). Sabe-se que os sais são substâncias que possuem, pelo menos, uma ligação com caráter tipicamente iônico (NETO, 2010). Como a parte hidrofílica do ânion tem tendência a se dissolver em água e a cauda hidrofóbica de se dissolver em gordura, o sabão é muito efetivo na remoção de gordura (ATKINS e JONES, 2006).

Todo sabão é produzido através de uma reação química. Esta reação é denominada de saponificação. A reação ocorre pela mistura de um ácido graxo presente em óleos e gorduras com uma base de forte aquecimento (hidróxido ou carbonato de sódio) na presença de água (ALLINGER, 1976). Embora o sabão seja biodegradável, ou seja, o produto na natureza sofre a ação de decomposição por microrganismos, dependendo do meio a degradabilidade de suas moléculas pode variar (NETO; DEL PINO, 1997).

Os sabões possuem as mais diversas aplicações, que vão desde a limpeza doméstica até industrial. Sua tecnologia, pouco desenvolvida até 1994, evoluiu bastante a partir desta época, tornando sua produção altamente industrializada e o seu consumo cada vez maior, criando assim uma grande diversidade de sabões (ALBERECI e PONTES 2014).

A capacidade de limpeza dos sabões depende da sua capacidade de formar emulsões com materiais solúveis nas gorduras, pois nestas as moléculas do sabão envolvem a sujeira de modo a colocá-la em um envelope solúvel em água, a micela (NETO e DEL PINO, 1996). Os detergentes são misturas complexas de compostos químicos, tais como agentes tensoativos (surfactantes), aditivos, agentes sequestrantes, peptizantes, anti-corrosivos, promotores de espumas, colóides protetores, e alvejantes óticos que promovem melhores condições à ação do surfactante, produzem efeito estético e um produto comercial (DEGENS, 1953).

Detergentes são produtos que promovem a remoção, dispersão e estabilização de materiais de uma superfície. O desempenho destas funções depende da composição da formulação, das condições de uso, da natureza da superfície a ser tratada, da natureza da substância a ser removida e/ou dispersa e da natureza da fase móvel. A formulação de um detergente é um processo complexo e direcionado pela necessidade específica do consumidor final, pela viabilidade econômica, por questões ambientais e disponibilidade de princípios ativos que podem proporcionar a funcionalidade requerida (SHOWELL, 2006).

Os primeiros tensoativos sintéticos de aplicação geral foram desenvolvidos na Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial na tentativa de superar a falta de matérias-primas naturais. No final da década de vinte e início da década de trinta, a sulfatação de álcoois de cadeias longas se tornou comum e os produtos resultantes eram vendidos na forma salina. Ainda no começo dos anos trinta foram desenvolvidos nos Estados Unidos os alquilaryl sulfonatos de cadeias longas. Ambos os álcoois sulfatados

e os alquilbenzeno sulfonatos eram usados como agentes de limpeza, mas causaram pequeno impacto no mercado de detergentes (PENTEADO, 2003).

O desenvolvimento na área de tensoativos acompanhou os desenvolvimentos na indústria química como um todo, impulsionando o surgimento de novos processos e matérias-primas e levando ao desenvolvimento de uma grande variedade de novos compostos tensoativos e processos de fabricação (NETO, 2010).

Os primeiros detergentes produzidos apresentavam problemas com relação à degradação natural no meio ambiente, tornando-se altamente poluidores, pois permaneciam nas águas de rios, lagos, etc. por um período muito grande. Neste caso, devido à permanente agitação das águas, causavam a formação de muita espuma, cobrindo a superfície de rios, estações de tratamento e redes de esgoto (BARBOSA, 2011).

No dia 5 de Janeiro de 1977 o Ministério da Saúde decretou um prazo de quatro anos para que as empresas de produtos de limpeza fabricassem apenas produtos biodegradáveis, ou seja, até o início do ano de 1981. Esse decreto foi amplamente criticado pelas indústrias produtoras de detergentes, em geral multinacionais que, em seus países de origem, produziam detergentes biodegradáveis. No final do ano de 1980, dos detergentes produzidos e consumidos no Brasil, 80% ainda não eram biodegradáveis.

Os detergentes biodegradáveis apresentam componentes enzimáticos que aceleram reações químicas e promovem a remoção de sujidades de superfícies. Esses detergentes apresentam ampla aplicação, devido à sua ação específica e redução da poluição ambiental. Assim sendo, os problemas causados por detergentes não-biodegradáveis estavam relacionados às estruturas de suas moléculas (UNIMONTES, 2004).

Esse tipo de composto possui cadeia carbônica linear similar aos tipos de cadeias encontradas nas moléculas dos sabões. Nesse tipo de detergente não aparecem ramificações, o que facilita a degradação da molécula por micro-organismos. O

detergente, assim como o sabão, está enquadrado na classe dos tensoativos, pois é uma substância que diminui a tensão superficial dos líquidos (COSTABILE, 1993).

Um detergente em qualquer substância que, sozinha ou em mistura reduz o trabalho necessário para um processo de limpeza. O trabalho geralmente é feito mecanicamente, ou através de energia físico-química (PENTEADO, 2003). A limpeza com detergente é talvez, a operação mais importante da higienização, exigindo um conhecimento aprimorado das características dos agentes e das condições de emprego. De uma forma geral podemos afirmar que no processo de limpeza os detergentes:

- Desempenham papel básico nos processos de limpeza nas indústrias de alimentos;
- Devem estar condicionados à natureza da sujidade a ser removida;
- Devem separar as partículas residuais, sem produzir a corrosão dos materiais empregados.

Segundo Neto, (2010) devido à impossibilidade de se ter um detergente ideal, os detergentes devem ser combinados (formulados) de tal forma que os resíduos aderentes possam ser removidos das superfícies por um dos seguintes mecanismos individuais ou combinados:

- Abrandamento – Possibilitam a intervenção ou anulação da dureza da água;
- Dispersão – Produzem a dispersão de aglutinados em flóculos reduzindo-os a partículas primitivas. Atuam de maneira que as películas de minerais não se depositem novamente;
- Dissolução – Transformam os resíduos insolúveis em substâncias solúveis em água;
- Emulsificação – Reduzem as substâncias graxas a inúmeras partículas, possibilitando a formação de emulsão de água e glóbulos graxos.
- Enxaguamento – Remove da superfície dos equipamentos qualquer tipo de

suspensão ou de solução. Estas serão removidas sem dificuldade pela água.

- Molhagem – Atuam por contato sobre as sujidades em toda a superfície do equipamento;
- Penetração – O líquida se introduz através de substâncias porosas, de orifícios, de fissuras ou de pequenas aberturas.
- Peptização – Atuam sobre as proteínas, dispersando-as e produzindo colóides em partes solúveis.
- Saponificação – Por ação química entre o detergente e as gorduras, estas são saponificadas, formando sabões que em seguida são retirados do meio;
- Sequestração – Formação de quelantes que impedem a deposição de sais minerais e com isso a sua remoção das superfícies;
- Suspensão – Mantêm as partículas insolúveis, impedindo a sua deposição sobre as superfícies de contato.

De acordo com Neves (1987) as características de um detergente ideal são:

- 1 – Ter veloz e completa solubilidade em água;
- 2 – Não corroer o material das superfícies de limpeza;
- 3 – Promover o abrandamento da água e remover sua dureza;
- 4 – Ter funções umectantes e de penetração;
- 5 – Ser emulsificante de gorduras;
- 6 – Favorecer a saponificação de gorduras;
- 7 – Dissolver sólidos de origem alimentar;
- 8 – Ter ação desfloculante, dispersante ou de suspensão;
- 9 – Ser de fácil ação enxaguante;
- 10 – Ter propriedades germicidas;
- 11 – Possuir facilidade de ajuste do pH;
- 12 – Ser econômico;

- 13- Ser atóxico e biodegradável;
- 14- Estável durante o armazenamento.

De acordo com a literatura já supracitada, muitos micro-organismos como bactérias e fungos produzem, quando estimulados, certas substâncias que agem como detergentes naturais. No que se refere à definição de biodetergentes esses produtos biológicos conhecidos como biossurfactantes, são considerados por muitos autores como sendo o próprio biodetergente. Na literatura, alguns autores definem também biodetergente como sendo resultado da adição de enzimas produzidas por estes micro-organismos a formulações de detergentes sintéticos (BARBOSA, 2011).

Para Fujii et al., 1999 os biossurfactantes produzidos por micro-organismos têm atraído o interesse de novos e funcionais materiais ecológicos, já que possuem propriedades especiais como uma grande variedade de possíveis estruturas de alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e atividade biológica.

Bund & Singhal (2002) mostraram que o biodetergente produzido contendo células modificadas apresentou estabilidade térmica claramente melhor do que os detergentes comerciais avaliados sem adição das mesmas, além de melhorar as propriedades dos tecidos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York, John Wiley & Sons, Inc, 1996.

ALEXANDER, M. **Introduction to Soil Microbiology**. New York, John Weley, 1977.

ALCALÁ L, MUÑOZ P, PELÁEZ T, BOUZA E. *Aspergillus* e aspergilosis. Servicio de microbiología clínica. Madrid: Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Disponível em: http://www.seimc.org/control/revi_Mico/asperguillus.htm. Acesso 23 de outubro de 2013.

ALMEIDA, K.; E BONASSI, I. A.; ROÇA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia Alimentícia**, Campinas, v. 21, p.187-192, 2001.

ALBERECI, R. M.; PONTES, F. F. Reciclagem de óleo comestível usado através da fabricação de sabão. **Espírito Santo do Pinhal: Engenharia Ambiental** - Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, v.1, n.1, p.073-076, jan./dez., 2014.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**. v.6, p. 769-779, 2004.

ANDERSON, I. C.; PARKIN, P. I. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. **Journal of Microbiological Methods**. v.68, p. 248-253, 2007.

ANDRADE-LIMA, D. D. The caatinga dominium. **Revista Brasileira de Botânica**. v.4, p.149-153, 1981.

ANDRADE, R.F.S. **Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes de *Candida lipolytica* e *C. glabrata* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos**. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP, 2010.

ANDRADE SILVA, N.R.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A.L.C.M.A.; FRANCO, L. O.; SILVA , G. K. B.; SOUZA,P. M.; OKADA, K. ALBUQUERQUE, C. D. C.; ALVES DA SILVA, C.; CAMPOS-TAKAKI, A. G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil, **Int. J. Mol. Sci.**, v.15, p. 15377-15395, 2014.

ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, v.15, p.1-11, 2013.

ARAÚJO, E.L.; SILVA, K.A.; FERRAZ, E.M.N.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SILVA, S.I. Diversidade de herbáceas em microhabitantes rochoso, plano e ciliar em um área de caatinga, Caruaru – PE. **Acta Botanica Brasilica** v.19, p. 285-294, 2005.

ARORA, S.K.; SONY, J.; SHARMA, A.; TANEJA, M. Production and characterization of biosurfactant from *Pseudomonas* spp. **Int.J.Curr.Microbiol.** v. 4, n. 1, p. 245-253, 2015.

AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. **Fungi: Multifacetated Microbes**. New Dehli: Anamaya Publication, p.189-207, 2006.

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.

BARDI, L.; MATTEI A.; STEFFAN, S.; MARZONA, M. Hydrocarbon degradation as surfactant to enhance bioavailability. **Enzyme and microbial Technology**, Washington, v. 27, n 9, p. 709-713, 2000.

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

BASU, B.; BANIK, A.; DAS, M. "Produção e caracterização de protease extracelular do mutante de *Aspergillus niger* AB100 crescido em escama de peixe". **Mundial Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2007.

BATISTA, S.; MOUNTEER, A.; AMORIM F. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier- producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresour Technol.** v.97, p.868-875, 2006.

BOGNOLO, G. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, Amsterdam, v.152, n.1, p. 41-52, 1999.

BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, Edgard Blücher Ltda: São Paulo, v.2, 2001.

BUENO, S. M. **Bactérias Produtoras de Biosurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, SP. p. 89, 2008.

BUENO, S. M. Isolamento e Caracterização de Bactérias Produtoras de Polissacarídeos Obtidas de Amostra de Solo da Estação Ecológica de São José do Rio Preto - SP. **Dissertação de Mestrado**, p.141, 2001.

BHARDWAJ, G.; SINGH, S.; CAMEOTRA; CHOPRA, H.K. **Biosurfactants from Fungi: A Review**. J Pet Environ Biotechnol. p.1-6, 2013.

CAVALCANTI M.A.Q.; OLIVEIRA L.G.; FERNANDES M.J.; LIMA D.M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios na região Xingó, Brasil. **Acta bot.bras.** v.20(4), p.831-837, 2006.

CAMARGO-DE-MORAIS, M.M; RAMOS, S.A.F.; PIMENTEL, M.C.B.; MORAIS Jr., M.A.; LIMA FILHO, J.L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 191-194, 2003.

CANHOS, V.P. & MANFIO, P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**, 2001.

CARRILO, P.G. Isolation and selection of biosurfactant- producing. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 12, p. 82-84, 1996.

CASTELLETTI, C. H. M.; CARDOSO, J. M. S.; TABARELLI, M.; MELO, A. M. S. Quanto ainda resta da Caatinga? Uma estimativa preliminar. In: TABARELLI, M.; CARDOSO, J. M. S. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Recife: MMA, UFPE, p. 91-100, 2004.

CASTELLETTI, C.H.M.; SANTOS, A.M.M.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Quanto ainda resta da caatinga? Uma estimativa preliminar. **Ecologia e conservação da caatinga**. Editora universitária, Recife, p. 719-734, 2003.

CASTIGLIONE, L. G.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A. Produção de biosurfactantes por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n 2, p. 292-295, 2011.

CERQUEIRA, V. S.; COSTA, J. A. V. Biodegradação de tolueno e óleo de pescado em solos impactados utilizando surfactantes químico e biológico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p.394-400, 2009.

COELHO, E. A. L. A. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

COSTA, P.B.A. **Síntese e propriedades de surfactantes di-aniónicos: interação com íons trivalentes**. Dissertação. Mestrado em Química. Universidade de Coimbra, 2011.

COSTA, S.G.V.A; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas , v .28, n 1, p. 34-38, jan, 2008.

COSTA, P. A. Changes in soil pore network in response to twenty-three years of irrigation in a tropical semiarid pasture from northeast Brazil. **Soil & Tillage Research**, v. 137, p. 23–32, 2014.

COSTABILE, J.A. Tensoativos Resolvendo Problemas Ecológicos. Química Nacional QUIMASA - **Cosmetic & Toiletries**,p.89-120 1993.

CHALFOUN S.M.; BATISTA L.R., Fungos associados a frutos e grãos do café, **Aspergillus & Penicillium**, 2003.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* Under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 25-33, 2001.

CHEN, B. Y.; JANES, H. W. **PCR Cloning Protocols**. second edition. New Brunswick, NJ: Humana Press, 2002.

CHOOKLIN, C. S.; PHERTMEAN , S.; CHEIRSILP, B.; MANEERAT, S.; SAIMMAI, A. Utilization of palm oil mill effluent as a novel and promising substrate for biosurfactant production by *Nevskia ramosa* NA3. **J. Sci. Technol.** v.35 (2), p.167-176, 2013.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in fields studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 93, n 6, p. 915-929, 2002.

CLARIDGE, M.F.; DAWAH, H.A.; WILSON, M.R. Practical approaches to species concepts for living organisms. In: *Species: the Units of biodiversity* (CLARIDGE, M.F., DAWAH, H.A. AND WILSON, M.R.), p. 115, 1997.

DAS, N.; VIMALA, R.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals - An Overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 159-169, 2008.

DAVID, H., AKESSON, M. NIELSEN, J. "Reconstrução do metabolismo de carbono central de *Aspergillus niger*". **European Journal of Biochemistry**, v.270, p. 4243-4253, 2003.

DELEU, M. et al. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1-2, p. 3-10, 2004.

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.

DRUMOND, M.A.; KILL, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S. & CAVALCANTE, J. **Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga**. In: *Workshop de avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga*. Petrolina, Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil, 2012.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. **Embrapa Solos**, Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, p.412, 1999.

FERRAREZO, E.M. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de emulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão**. Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos, Campinas: UNICAMP, 1998.

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

FIGUEIRÊDO, L.S. **Influência dos sítios de estabelecimento na forma das plantas de populações simpáticas da caatinga**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2000.

FREITAS, T. C. M.; MELNIKOV, P. O uso e os impactos da reciclagem de cromo em indústrias de curtume em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 305-310, 2004.

GARBEVA, P.; VAN EEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annu. Rev. Phytopathol.** v.42, p.243- 270, 2004.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.;VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeasts species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v. 87, p. 949-956, 1999.

GODET, M.; MUNAUT, F. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. **FEMS Microbiological Letters**. p. 1-12, 2009.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte, MG, 2009.

GOUVEIA, E.R. Bactérias produtoras de biossurfactantes: produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de poços de petróleo. **Revista Biotecnologia e Desenvolvimento**, v. 30, p. 39-45, 2003.

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

GIULIETTI, A.M., BOCAGE NETA, A.L, CASTRO, A.A.J.F, GAMARRA-ROJAS, C.F.L, SAMPAIO, E.V.S.B, VIRGÍNIO, J.F., QUEIROZ, L.P., FIGUEIREDO, M.A., RODAL, M.J.N, BARBOSA, M.R.V., HARLEY, R.M. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. p. 47-90, 2004. In: SILVA, J.M.C, TABARELLI, M., FONSECA, M.T., LINS, L.V. (Orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente.

GUIMARAES, T. M. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.22, p. 119-126. 2006.

GUSMÃO, L.F.P.; L.C. MAIA. **Diversidade e caracterização dos fungos do Semiárido brasileiro**. Recife: Associação das Plantas do Nordeste (Instituto do Milênio do Semi-árido), v.2, p. 219, 2006.

HABA E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**, Northern Ireland, v.88, p.379-387, dec, 2000.

HANEN, B. A.; NAWEL, J.; HANA, M.; AHMED, B.; NOOMEN, H.; MONCEF, N. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.99, p.8-14, 2015.

HAWKSWORTH, D.L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v.87 (9): p.888-891, 1997.

HASSAN M; ESSAM T; YASSIN AS; SALAMA A. Screening of Bio- Surfactant Production Ability among Organic Pollutants Degrading Isolates Collected From Egyptian Environment. **J Microb Biochem Technol**, v. 6, p.195-201, 2014.

HESELDTINE, C. W.; **Biotechnol. Bioeng.** 14, 517, 1972.

HESTER, A. I.B.; Marker Forecast. **Indust Bioprocess**, v. 23, p.3, 2001.

HAUGLAND, R. A.; HECKMAN, J. L.; WYMER, L. J. Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. **Journal of Microbiological Methods**. v.37, p. 165-176. 1999.

HEWALD, S.; JOSEPHS, K.; BOLKER. Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3033–3040, 2005.

HIBBETT, D. S. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research III**. p. 509-547, 2007.

HOOG, G.S, GUARRO, J., FIGUERAS, M.J. AND GENE, J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2a Ed., CBS, Utrecht, Holanda, 2000.

HOOG, G.S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Delft, Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1995.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>>. Acessado em: Novembro, 2012.

JACOBUCCI, D.F.C.; ORIANI, M.R.G.; DURRANT, L.R. Reducing COD level on oily effluent by utilizing biosurfactant-producing bacteria. **Braslian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1037-1042, 2009.

JAITLEY, A. K. pH optima of the fungi isolated from mangroves soils in India. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v. 28, p. 137-143, 1987.

JAMAL, P.; WAN, M. F. WAN, N.; MD ZAHANGIR, A. Optimum Medium Components for Biosurfactant Production by *Klebsiella pneumonia* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil as a Substrate. **Australian J. of Basic and Applied Sciences**, v.6, n. 1, p.100-108, 2012.

JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 24, p. 1-9, 2012.

JENNINGS, E., AND TANNER, R. “Biosurfactant-Producing Bacteria Found in Contaminated and Uncontaminated Soils.” **Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research**, p. 299-306, 2000.

JIMENEZ, R. S.; DAL BOSCO, S. M.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolecita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 734-738, 2004.

JONES, E. B. G.; ALIAS, S. A. Biodiversity of Mangrove Fungi. In: **Biodiversity of Tropical Microfungi**. University Press, Hong Kong, p. 71-92, 1997.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soil and plants. 3rd ed. Boca Raton: **CRC Press**, p.413, 2001.

KARANTH, N. G. K., DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial biosurfactant and their importance. **Current Science**, v.77: 116-126, 1999.

KEIR, G. J.; GARFIELD, B.; HANSELL, D. M.; LOEBINGER, M. R.; WILSON, R.; RENZONI, E. A.; MAHER, T. M. Cyclical caspofungin for chronic pulmonary aspergillosis in sarcoidosis. **Thorax, thoraxjnl**, 2013.

KENNEDY, A.C.; SMITH, K.L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and soil**, v.170, p.75-86, 1995.

KORF, E. P.; MELO, E. F. R. Q.; THOMÉ, A.; ESCOSTEGUY, P. A. V. Retenção de metais em solo da antiga área de disposição de resíduos sólidos urbanos de Passo Fundo – RS. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 43-60, 2008

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, n. 31, p. 249-253, 2000.

KIM, J. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing bacterium *Bacillus pumilus* IJ-1 from contaminated crude oil collected in Taean, **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry** v.57, p. 5-14, 2014.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J. P.; LAMERS, G. E. M.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Characterization of Two *Pseudomonas putida* Lipopeptide Biosurfactants, Putisolvin I and II, Which Inhibit Biofilm Formation and Break Down Existing Biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 97-113, 2004.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. **Micologia Médica**. Lea & Febiger, Filadélfia e Londres, 1992.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LANG, S.; PHILP, J. Surface-active Lipids in Rhodococci. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 59-70, 1998.

LARENA, I. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, v.75, p. 187-194, 1999.

LEMOS, J.L.S.; BARROS, C.A. Produção de tensoativo por *Penicillium coryophilum*. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/publicacao/seanais_XVI_jic_2008.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2012.

LIU, J. H.; CHEN, Y. T.; LI, H.; JIA, Y. P.; XU, R. D.; WANG, J. Optimization of fermentation conditions for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* strains CCTCC M201162 from oilfield wastewater. **Environ. Prog. Sustainable Energy**, 2014.

LIMA, B. F.; AMORIM, H. S.; NASCIMENTO, A. E.; CAMPOS-TAKAKI, G.; M.; SILVA, ALVES, C. A. Seleção de meios de produção de lipase por amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de Pernambuco. **Exacta**, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 147-157, 2014.

LIMA, C. J. B.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. Potencialidade de culturas de *Pseudomonas aeruginosa* para a produção de biossurfactantes. **Ciência e Tecnologia**, v.16, n. 1, p.73-79, 2007.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, L.Q.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* in pineapple broth (*Ananas comosus*) with burned sunflower oil and application in removal of petrol derivative, **Exacta**, São Paulo, v.8, n.2, p.201-210, 2010.

LIMA, R.A.; ANDRADE, R.F.S.; ANTUNES, A.A.; CASULLO, H.A.; JARA, A. M. A. T.; BERGUER, L. R. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactants production by *Candida glabrata* strains using industrial wastes as carbon and nitrogen sources. Microbes In: **Applied Research: Current Advances and Challenges**, Ed. Mendez-Vilas, p. 362-366, 2012.

LIN, S.C; Carswell, K.S;SHARMA, M.M; GEORGIU,G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* LF-2. **Applied Microbial and Biotechnology**, v.41, p. 281-285, 1994.

LINHARDT, R. J.; LOGANATHAN, D. Surfactants and their use in fields studies of soil remediation. in **Biomimetic Polymers**, Plenum Press, New York, p. 135–173, 1989.

LUNA, J.M. **Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biossurfactante de baixo custo lunasan produzido por *Candida sphaerica* UCP**

0995. (Tese de doutorado)- Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, 2010.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 4, v.52, p.785-793, 2009.

LUNA, J.M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, v. 6, n. 2, p. 209-215, 2008.

LUNA-VELASCO, M.A.; ESPARZA-GARCIA, F.; CAÑÍZARES-VILLANUEVA, R.O.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Production and properties of a bioemulsifier produced by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p.310-314, 2007.

LYNCH, J. M.; BRAGG, E. Microorganisms and soil aggregate stability. **Adv. Soil Sci.**, New York, v. 2, p. 133-171, 1986.

MAIA, L.C, GIBERTONI, T.B. Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: Sampaio EVSB, Giulietti AM, Virgínio J, Gamarra-Rojas CFL (eds) **Vegetação e flora da Caatinga**, APNE/CNIP, Recife, p. 163-176, 2002.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology USA: Academic Press**, v. 52, p. 101-121, 2000.

MANIASSO, N. "Ambientes micelares em química analítica". **Química Nova**, v.24 (1), p. 87-93, 2001.

MARÇAL, V.V.M. **Isolamento e caracterização morfofogenética de leveduras com fenótipo killer e seu potencial no antagonismo de fitopatógenos**, Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Londrina, Paraná, p.99, 2005.

MERGULHÃO, A. C.; SILVA, M. V.; LYRA, M. C. C.; FIGUEIREDO, M.B.; SILVA, M. L. R. B.; MAIA, L. C. Caracterização morfológica e molecular de fungos micorrízicos arbusculares isolados de áreas de mineração de gesso, Araripina, PE, Brasil, **e-xacta**, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 147-157, 2014.

MERLINO, L. C. S.; MELO, W. J.; MACEDO, F. G.; GUEDES, A. C. T. P.; RIBEIRO, M. H.; MELO, V. P.; MELO, G. M. P. Bário, Cádmio, Cromo e Chumbo em plantas de milho e em latossolo após onze aplicações anuais de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 2031-2039, 2010.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 107-108, 2004.

MINAMI, Paulo S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses**. Barueri, SP: Manole, 2003.

MORAES, I. O. Produção de microrganismos. In: LIMA U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL. **Biotecnologia industrial. Processos Fermentativos e enzimáticos**. São Paulo. Edgard Blucher. p.593, 2001.

MOREIRA, F.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, p.626, 2002.

MORAIS, R.K.S. **Produção de biossurfactantes a partir de substratos de baixo custo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

MULLIGAN, C.N.; WANG, S. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. **Engineering Geology**, v. 85, p. 75-81, 2006.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. *Environmental Progress*, n. 18, p. 31-35, 2005.

MULLIGAN C, COOPER D, NEUFELD R. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. **J Fermentation Technol.** v.62(4),p. 311-314, 1984.

MUNIZ, M. C.S.; LIMA, B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SILVA, C. A. A. Seleção de amostras de *Aspergillus* sp isoladas da caatinga de pernambuco e produção de ácido cítrico por fermentação submersa, **Exacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 2, p. 55-65, 2014.

MURIEL, J.M.; BRUQUE, J.M.; OLIAS, J.M; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 235-240, 1996.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; KOCHUPAPPY, T.;SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfacts: properties, commercial production and application, **Current science**, Pleasantville, New York, v.94, p. 736-747, 2008.

NAING, K. W., LEE, Y. S., NGUYEN, X. H., JEONG, M. H., ANEES, M., OH, B. S., CHO, J. Y., MOON, J. H. AND KIM, K. Y. Isolation and characterization of an antimicrobial lipopeptide produced by *Paenibacillus ehimensis* MA2012. J. Basic Microbiol, 2015.

NETO, O.; GINO, Z.; PINO, J. C. DEL. Trabalhando a Química dos Sabões e Detergentes. In: Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Citado em 22 de março de 2010. Disponível em:<<http://www.iq.ufrgs.br/aeq/html/publicacoes/matdid/livros/pdf/sabao.pdf>> Acesso 22 NOV2014.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 25, p. 772-776, 2002.

NOVOTNY, C.; SVOBODOVA, K.; ERBANOVA, P.;CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E. & SASEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil biology & biochemistry**, v.36, p.1545-1551, 2004.

O'CONNOR, L. Marker Forecast: **Microbial biosurfactants ind Bioprocess**, v.24, p.10-11, 2002.

OLIVEIRA, M. Main airborne Ascomycota spores: characterization by culture, spore morphology, ribosomal DNA sequences and enzymatic analysis. **Environmental biotechnology**, p. 2010.

OLIVEIRA, G. M.; ANGELOTTI, F.; SANTOS, M. H. L; PINHEIRO, G. S.; Levantamento de Fungos em Plantas Nativas da Caatinga (Survey of Fungi in Native Plants of Caatinga), **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 7, n.3, 2014.

OLIVEIRA JM, NUNES CP, OLIVEIRA PC. Aspergilose. In: Siqueira-Bastista R, Gomes AP, Santos SS, Almeida LC, Figueiredo CES, Pacheco SJB. Manual de infectologia. Rio de Janeiro: **Revinter**, p.461-4, 2002.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; **Curr. Sci.**, v.77, p.149, 1999.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 287-294, 2002.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego, Academic Press, 1989.

PAUL, R.; SINGH, V.; TYAGI, R.; SINGH, A.; DUBEY, D. Micro-Elements work for the growth and total soluble protein production in *Aspergillus niger* at different concentrations. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 4, p. 293-296, 2010.

PEKIN, G.; VARDAR-SUKAN, F.; KOSARIC, N. Production of Sophorolipids from *Candida bombicola* ATCC22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. **Engineering Life Science**, v. 5, n. 4, p. 357-362, 2005.

PIRÔLLO, M.P.S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Rio Claro: UNESP, 2006.

PINO, J. C.; NETO, O. G. Z. **Trabalhando a química dos sabões e detergentes**. Porto Alegre: UFRGS, 1996.

QUEIROZ, L.P. The Brazilian Caatinga: Phytogeographical patterns inferred from distribution data of the Leguminosae, p: 113-149, 2006. In: R.T. PENNINGTON; G.P., LEWIS; J. RATTER (eds.). **Neotropical Savannas and Dry Forests: Plant Diversity, Biogeography, and Conservation**. Oxford, Taylor & Francis C.R.C. Press.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTOAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p.159-168, 2003.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1965.

REDDY, K.R., CHINTHAMREDDY, S. Comparison of extractants for removing heavy metals from contaminated clayey soils. **Soil and Sediment Contamination** , v.9, p. 449-462, 2000.

RIBEIRO, D.L.R.; ANDRADE, R.F.S.; ANTUNES, A.A. SILVA, A.M.; MAX, Y. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant production by *Rhodotorula glutinis* UCP 1555 using industrial wastes. *Microbes In: Applied Research: Current Advances and Challenges*, Ed. Mendez-Vilas p. 55-59, 2012.

RIZZINI, C.A. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos sociológicos e florísticos**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.2, 1976.

RODAL, M.J.N.; NASCIMENTO, L.M.; MELO, A.L. Composição florística de um trecho de vegetação arbustiva caducifólia, no município de Ibimirim, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**,v.13, p.15-28, 2005.

RODRIGUES, M.T.; HERPETOFAUNA DA CAATINGA. IN: I.R. LEAL, M. TABARELLI & J.M.C. SILVA (eds.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, p. 181-236, 2003.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, v.1, p. 186, 1988.

ROSA, R.S.; N.A. MENEZES; H.A. BRITSKI; W.J.E.M. COSTA; F. GROTH. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. 2003. In: I.R. LEAL, M. TABARELLI & J.M.C. SILVA (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. p. 135-180.

ROSA, I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2014.

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

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, Madrid, v. 13, p. 249-252, 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.

ROY, D., KOMMALAPATI, R.R., MANDAVA, S.S. "Soil washing potential of a natural surfactant", **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 670-675, 1997

RUEGGER, M.J.S. & TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. v.7, p.205-211, 2004.

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**, v.6, p.1-5, 2014.

SAMADI, N.; ABADIAN, N.; AKHAVAN, A.; FAZELI, M.R.; TAHZIBI, A.; JAMALIFAR, H. Biosurfactant production by the strain isolated from contaminated soil. **Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 7, p. 1266-1269, 2007.

SABATINI, D.A.; McINERNEY, M.J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T. Evaluation of sub- micellar synthetic surfactants versus biosurfactants for enhance recovery. **Final report**, p.1-57,2006.

SAMPAIO, E.VS.B. Overview of Brazilian caatinga.. In: BULLOCK, S.; MOONEY, H.A.(eds). **Seasonally Dry Tropical Forests**. University Press, Cambridge, p.35-38, 1995.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; SUMMERBELL, R.C.; FLANNIGAN, B.; MILLER, J.D. **Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments**. In: Microorganisms in Home and Indoor Work Environments. [S.l.]: New York: Taylor & Francis. p. 287–292, 2001.

SANTHIYA, D., TING, Y. "Biolixiviação de catalisador gasto refinaria de processamento utilizando *Aspergillus niger* com alto rendimento de ácido oxálico." **Jornal de Biotecnologia**. v.116, p. 171-184, 2005.

SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Genesis, 1999.

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G.;

CHOPADE, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnol**, v. 28, p. 436–450, 2010.

SHARMA, D.; BALJEET, S. S.; CHAUHAN, N.; PROCHA, S. SOHAN, L. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*, **SpringerPlus**, v. 4, p.34-45, 2015.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J., VAN DIJCK, P. "Sobre a segurança do *Aspergillus niger* - uma revisão". **Microbiologia Aplicada e Biotecnologia**, v.59. p. 426-435, 2002.

SILVA, W.O.; TAPIA, Y.I.P. **Produção de biossurfactantes**, Desenvolvimento de bioprocessos, DEB, EQ, UFRJ, 2002.

SILVA, D. C.; TIAGO, P. V.; MATTOS, J. S.; PAIVA, L. M.; MOTTA, C. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasil. Bot.**, v.34, n.4, p.607-610, 2011.

SENA, A.R.; OLIVEIRA L.G. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, n. 35, p. 91-98, 2006.

SIQUEIRA, J.O.; MORREIRA, F.M. de S.; GRISI, B. M.; HUMGRIA, M.; ARAÚJO, R. S.; ed. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectivas ambiental**. Brasília: EMBRAPA, p.142, 1994.

STANBURY, P.; WITAKER, A.; HALL, S. Principles of fermentation. **Techonology**. Segunda Edicion. p. 3-5, 1995.

SOUZA SOBRINHO, B.S.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SALGUEIRO, A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LEITE, L.F.C.; SARUBBO, L.A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of surfatctant by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Process Biochemistry**, v.43, p.912-917, 2008.

SUN, B.; ZHAO, F.J.; LOMBI, E. & McGRATH, S.P. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. **Environ. Pollut.**, v.113, p.111-120, 2001.

SHAFI, R.; KHANNA, S. **Biosurfactants**. Indian Journal of Microbiology, n. 33, p. 163-184, 1995.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3, **International Journal of Microbiology**, p. 1-7, 2014.

TABATABAEE, A; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. **Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 2, n. 1, p. 6-12, 2005.

TIMMA, K; SAMS, S; VALTERE, J; VILGERTS; D. BLUMBERGA. Full Factorial Design of Screening Experiments for Biosurfactant Enhanced Remediation of Hydrophobic Substances in Soil L. **Journal of Clean Energy Technologies**, v. 2, P. 356-365, 2014.

TORRES, L.G., LOPEZ, R.B.; BELTRAN, M. Removal of As, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn from a highly contaminated industrial soil using surfactant enhanced soil washing. **J. Phys. Chem. Earth**, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artemd, p.827, 2006.

TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. & CARDOSO, E.J.B.N. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.360, 1992.

VANCE-HARROP, M.; GUSMÃO, N.B.; CAMPOS-TAKAKI. New bioemulsifiers produced by *Candida lipolytica* using D-glucose and babassu oil as carbon sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 120-123, 2003.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67 (4), p. 503-549, 2003.

VECINO, X.; BARBOSA-PEREIRA, L.; DEVESA-REY,J.M.;MOLDES, A.B. Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier, **J. Sci Food Agric**, v. 95, p. 313–320, 2015.

XINTARAS, C. Analysis paper: Impact of lead contaminated soil on public health. Published by the US Department of Health and Human Services, **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, USA. 1992.

XU, Q.; NAKAJILMA, M.; LIU, Z.; SHINA, T. Biosurfactants for microbubble

preparation and application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 462-475, 2011.

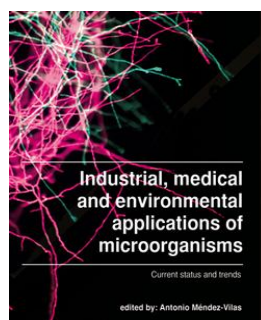
WIEN, K.; MARTHA, S.; MADE, A. Screening for Biosurfactant-producing Yeast: Confirmation of Biosurfactant Production, **Biotechnology**, v. 13, p. 106-111, 2014.

ZANA, R. **Dynamics of surfactant self-assemblies: micelles, microemulsions, vesicles, and lyotropic phases.** (Surfactant science series), New York: CRC Press, v. 125, 2005.

CAPÍTULO 2

Characterization of *Aspergillus niger* isolated from Caatinga soil (Pernambuco, Brazil) with potential of biosurfactant production

Trabalho publicado no livro: Industrial, medical and environmental applications of microorganisms. Current status and trends, ISBN Print version: 978-90-8686-243-6; Pages of the chapter: 65-69p, 2014.



**Characterization of *Aspergillus niger* isolated from Caatinga soil
(Pernambuco, Brazil) with potential of biosurfactant production**

G. K. B. Silva^{1,5}, J. M. N. Lima^{1,5}, N. R. Andrade Silva^{2,5}, T. A. L. Silva^{3,5}, R. N. Barbosa⁴, N. T. Oliveira⁴, K. Okada⁵ and G. M. Campos-Takaki⁵

¹PhD Student in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-420, Recife, Brazil

²Masters Student in Development of Environmental Processes, UNICAP, 50050-590, Recife, Brazil

³National Programme of Postdoctor CAPES/FACEPE, Catholic University of Pernambuco, 50050-590 Recife, Brazil

⁴Department of Mycology/Center for Biological Sciences Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife-Brazil

⁵Nucleus for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Post-Graduation in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco – UNICAP, 50050-590 Recife, Brazil

* Corresponding author: e-mail: grayce_kelli@yahoo.com.br Phone: +55 81 2119-4043

The knowledge of the mycota from soil, can lead to discover new molecules produced by microorganisms using metabolic processes considering the ecological and environmental interactions, and biotechnological applications. Nowadays many tests are used to select microorganisms which produce biosurfactants. In addition, research was employed to identify the biotechnological potential of the strains to produce bioactive substances. The aim of the present work was to characterize *Aspergillus niger* isolated strains from Caatinga soil of Pernambuco, Brazil with potential of biosurfactant production. Strains of filamentous fungi were isolated and 21 was identified as *Aspergillus niger*, and characterized by radial growth at different levels of pH, salinity and temperature, and hemolysis test was used to indicate biosurfactant production. The best condition of biosurfactant production by hemolysis test was characterized by molecular process.

Keywords: *Aspergillus niger*, Caatinga, biosurfactants, soil.

1. Introduction

Knowledge of soil mycota, and fundamental to the taxonomic survey of populations that are there, can lead to the discovery of metabolic processes used by these agencies that may be important for environmental interactions and biotechnological applications [1]. Studies in areas with vegetation in the semiarid Caatinga are being enhanced in view of the need to broaden the knowledge and strategies for conservation and sustainable use of resources [2].

The fungi in this region are still poorly known and deserve special attention by the potential they represent, justifying studies in search of species or isolates capable of degrading and synthesizing compounds used in biotechnological interest agricultural, industrial and / or environment [3].

Today many studies are being directed to the selection of microorganisms that produce biosurfactants, in addition, research is being directed to the development of technologies seeking to improve strains and production processes of bioactive substances. The biosurfactants are compounds produced by various microorganisms (bacteria, yeasts and molds) and stand out because of its low toxicity, biodegradability and ecological acceptability production capacity from renewable and low cost. Have a wide variety of applications can be used as emulsifiers, solubilizes, detergents and foaming [4].

Microbial surfactants or biosurfactants are surface active amphiphilic molecules produced by a number of microorganisms. They occur in nature as a diverse group of molecules comprising of glycolipids, lipopeptides and lipoproteins, fatty acids, neutral lipids, phospholipids, polymeric and particulate biosurfactants [5].

The biosurfactants can be applied in various industries such as: pharmaceutical, cosmetic and food industries, among others. Since many applications involve the action of detergent solubilization and dispersion phases [6]. The largest market for biosurfactants has been the oil industry, where they can be used in bioremediation and oil spill dispersion, mobilization and removal of waste oil in storage tanks, in enhanced oil recovery formulation or incorporated into lubricating oils, as well as the removal of heavy metals from soils [7].

Additionally, it is noteworthy that studies the productions of biosurfactants by filamentous fungi are scarce in the literature, as well as the approach to establish mycobiota fungi in soils of Caatinga of Pernambuco state, and in Brazil in general. Thus the search for knowledge about the potential biotechnological production of biosurfactants by fungi isolated from Caatinga-PE, represent an alternative not only for the control, prevention and environmental preservation, but mainly to meet the demands of various industries. The present work was isolated strains of *Aspergillus niger* from caatinga soil and investigated the potential of biosurfactant production.

2. Materials and methods

2.1 Soil collected from caatinga

The soil was collected from Caatinga in Serra Talhada and Varginha - Pernambuco, Brazil. Different points of the site were previously marked area and separated into homogeneous plots. Soil samples were collected in zigzag every 10 points of the field at 20 cm depth. The analyses of physico-chemical soil properties pH, macro and micro nutrients, gravimetric moisture and particle size were done.

2.2 Isolation of micro-organisms

Isolation of micro-organisms from the soil was done by serial dilution and plating on selective media. Suspensions were prepared soil/water dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} . For isolation of the fungi was employed culture media Martin (1.0g K_2HPO_4 , 0.5g $MgSO_4$, H_2O , 5.0g of peptone, 10g dextrose, 0.03g of Bengal Rose, and 16 g agar 1000 mL distilled water) with antibiotics (Chloramphenicol 0.008%). And Sabouraud medium (5.0g meat peptone, 20.0g glucose, 5.0g casein peptone, 15.0g agar, 1000 ml distilled water pH 7.0). From the suspension of soil 100 μ L of the dilutions 10^{-3} and 10^{-4} were transferred to Petri dishes containing 5 ml of the isolation means, the plates were incubated at 28 °C, after the growth of the colonies were transferred test tubes and preserved at 5 °C. The entire experiment was done in triplicate.

2.3 Morphological and molecular identification

The macro and micromorphological identification were carried out evaluating the grown on Czapek agar (CZ), Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) incubated at 28 °C (dark), and specific literature was used for identification [8]. The molecular identification was performed using mycelial fragments with three days of growth in liquid Czapek medium, and was transferred to microtubes containing 800 μ L of extraction lysis buffer 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium Bromid). The tubes were taken to FastPrep® and hectic speed of 5.5 m/s for 40 sec, for mechanical lysis of the cells. Subsequently, the microtubes were incubated at a water bath at 65 °C for 40 min and centrifuged at 13.000 rpm for 10 min. The supernatants were transferred to 1.5 mL micro centrifuge tubes and added to an equal volume of chloroform - isoamyl alcohol (24:1 v/v) supernatant recovered, homogenized and centrifuged at 13.000 rpm for 10 min. Again, the supernatants were transferred to microcentrifuge tubes and other equal volume of isopropanol was added to the cold supernatant recovered and stored at -20 °C for 1h. The microtubes were then centrifuged at 13.000 rpm for 10 min. The precipitated DNA was washed with 70% ethanol and added 50 μ L of ultrapure water. The final concentration was determined using Nanodrop spectrophotometer and the

material stored at -20 ° C until use. The PCR reaction for amplification of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA was performed in a total volume of 50 µl containing 1X of PCR buffer Taq polymerase, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each primer ITS1 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3') and ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'), 0.2 mM dNTPs and 0.2U Taq DNA polymerase and 25ng of fungal DNA. The amplification was performed in Thermal Cycler programmed for an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation 95 °C for 30s, annealing at 62 ° C for 1 minute, extension at 72 °C for 2 min, and final extension at 72 °C for 5 min. The PCR product fragment (about 950 bp) was subjected to electrophoresis on 1% agarose gel to 4V.cm⁻¹ in 1X TAE running buffer (pH 8.0), and stained with GelRedTM photodocumentation under UV light. We used the molecular weight marker 1 kb (Fermentas ®). The amplification product was purified with GeneJetTM - PCR Purification Kit - (Fermentas ®) and sequenced at the Central Laboratory of UFPE. The electropherograms were edited using the Staden software package to obtain the manual consensus sequence. After editing, the sequence obtained was used to search the most similar GenBank using the BLASTn tool. The hits that had the highest percentage of similarity with the sequence under study, considering the best combination of "score " and " e- value" were analyzed.

2.4 Characterization (pH, salinity and temperature)

The test conditions of stress were performed from the day of suspension spores, inoculated with 1 mL of the suspension in Petri dishes containing YMA (yeast extract 3.0 g , malt extract 3.0 g , peptone 5.0 g , glucose 10.0 g agar 20.0 g) swab evenly spread around the perimeter of the plate. After incubation for 24 h at 28 °C, the suspension formed a "mat" of growth, was removed disks with 1.0 cm in diameter and in the center of plates inoculated with respective means of stress conditions. The radial growth rate was obtained by measuring the average diameter of mycelia every 24 hours over five days.

2.4.1 pH

To observe the growth of the fungus at different pH (4 , 7 and 9). To pH 4.0 using 20 g/L Gebrite Gelban Gun (GGG) was necessary to solidify the medium. The fungi were inoculated in Petri dishes (triplicate) and observed daily growth within 72 hours and incubated at different temperatures (25, 28, 32 and 37°C).

2.4.2 Salinity

For the analysis of salinity was added sodium chloride (NaCl) in Sabouraud culture medium, in proportions of 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12 and 15% and incubated for 72 hours. The

experiments were performed in triplicate. A control medium without the addition of salt was used as control. Incubated at different temperatures (25, 28, 32 and 37°C) the growth analysis was performed by daily measurement of the diameter of colony growth.

2.4.3 Temperature

The fungi were inoculated on Petri plates containing Sabouraud culture medium and incubated at different temperatures (25, 28, 32 and 37 ° C) for 72 hours. The growth of fungi was observed by measuring the diameter of the colony. The experiments were performed in triplicate.

2.5 Hemolysis Test

The cultures were inoculated on agar plates containing sheep blood and incubated for 72 hours at 37°C. Following the period of growth of the colony was carried out to detect the presence of an enzyme colorless and transparent ring around the colonies indicated lysis of blood cells. All assays were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1 Isolation, morphological identification and characterization (pH, salinity and temperature)

The analysis of the physical characteristics of the soil Caatinga in their composition showed the presence of sand between 33 and 23g⁻¹ Kg among clay and 21 to 23 g kg⁻¹ test according to particle size. To test gravimetry was detected 9.68% moisture, pH around 5.9. 325 samples of filamentous fungi were isolated and 21 identified as *Aspergillus niger*, using serial dilutions of the Caatinga soil. According to the results the 21 strains showed significant growth in pH 4, 7, 9 at 37°C and 10% of salinity (Table 1). The radial growth rate is a key measure of each species of filamentous fungus under certain conditions. Formation occurs in the vegetative mycelium favorable conditions for such development followed by hypha elongation apical characterizing the growth of fungus. This measurement depends on several factors, such as growth temperature, culture medium, water activity of the medium, the microorganism species, and source of nutrients (carbon and nitrogen), pH and others [9]. The different percentages of salinity and temperature variations did not influence the morphology of *A. niger*.

Table 1 The radial (mm) growth of *Aspergillus niger* at different levels of pH, temperature and salinity for 96 hours of growth

Micro-organism	pH			Temperature (°C)			Salinity (%)			
	4	7	9	25	28	37	2.5	5.0	7.5	10
<i>Aspergillus niger</i> (1)	70	70	70	70	45	70	60	60	60	55
<i>A. niger</i> (2)	15	70	70	70	45	70	60	60	30	12
<i>A. niger</i> (3)	70	70	70	60	50	70	35	40	25	25
<i>A. niger</i> (4)	70	50	70	70	55	70	60	40	40	20
<i>A. niger</i> (5)	45	70	50	40	45	50	60	60	60	20
<i>A. niger</i> (6)	70	50	35	45	45	60	60	60	60	20
<i>A. niger</i> (7)	40	70	45	35	55	60	60	60	60	10
<i>A. niger</i> (8)	35	35	40	70	60	40	60	55	55	25
<i>A. niger</i> (9)	25	70	70	70	45	70	60	60	30	12
<i>A. niger</i> (10)	70	70	70	70	55	70	50	40	25	25
<i>A. niger</i> (11)	50	70	40	45	55	65	60	40	40	20
<i>A. niger</i> (12)	70	45	70	50	45	70	60	60	60	20
<i>A. niger</i> (13)	70	70	70	70	60	70	60	60	60	10
<i>A. niger</i> (14)	35	35	35	50	60	55	60	60	60	10
<i>A. niger</i> (15)	70	70	70	70	60	70	60	40	35	25
<i>A. niger</i> (16)	50	70	40	70	55	40	35	35	15	05
<i>A. niger</i> (17)	70	45	70	70	55	70	35	35	25	25
<i>A. niger</i> (18)	70	70	70	70	60	70	60	40	40	20
<i>A. niger</i> (19)	35	35	35	45	60	60	60	60	60	20
<i>A. niger</i> (20)	70	70	70	50	60	70	60	45	35	10
<i>A. niger</i> (21)	70	70	70	70	55	70	60	55	45	10

3.2 Hemolysis test for indication of biosurfactant production and characterization and analysis of the region ITS (rDNA)

The most significant result of the hemolysis test was a halo of 65mm, showing great potential in the production of biosurfactants (Table 2). From the best result of the hemolysis test, we performed a PCR for molecular characterization.

Table 2 Hemolytic activity of *Aspergillus niger* samples isolated from soil of Caatinga – PE, Brazil

Micro-organism	Hemolytic activity / Halo (mm)
<i>Aspergillus niger</i> (1)	65
<i>A. niger</i> (2)	50
<i>A. niger</i> (3)	35
<i>A. niger</i> (4)	0
<i>A. niger</i> (5)	0
<i>A. niger</i> (6)	45
<i>A. niger</i> (7)	45
<i>A.niger</i> (8)	0
<i>A. niger</i> (9)	40
<i>A. niger</i> (10)	35
<i>A. niger</i> (11)	0
<i>A.niger</i> (12)	0
<i>A. niger</i> (13)	0
<i>A. niger</i> (14)	0
<i>A. niger</i> (15)	0
<i>A. niger</i> (16)	0
<i>A. niger</i> (17)	0
<i>A. niger</i> (18)	0
<i>A. niger</i> (19)	45
<i>A. niger</i> (20)	40
<i>A.niger</i> (21)	30

Analysis of the hemolytic halo formation on agar blood has been used for selecting micro-organisms producing ramnolipid, and the size of the hemolysis halo associated with the production capacity of these substances [9, 10]. The characterization and analysis of the region ITS (rDNA) from the isolated was put in sequence and analyzed by PCR. After use of the BLASTn (NCBI), was verified 99% similarity with strain *A. niger* (GenBank: FJ629338.1/CBS 120.49) and others reference sequence, allowing the confirmation of taxonomic status of the isolated sample that was analyzed.

Conclusions

The strains of *Aspergillus niger* suggest positive response to hemolysis test for biosurfactant production indicating 47,6% of positivity. It is possible to suggest the use of this strain in different environmental conditions considering the high biotechnological potential to produce surface-active molecules.

Acknowledgements

The authors are gratefully to support of FACEPE, SISBIOTA-CNPq, CAPES, UFPE-LABCEN/CCB and UNICAP

References

- [1] Silva D, Mattos S, Paiva M, Motta M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agrofloretais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. *Revista Brasil. Bot.*, 2011, v.34, n.4, 607-610.
- [2] Silva N, Lins C. Fungos filamentosos em solo de caatinga: diversidade e atividade enzimática. *XVI CONIC, UFPE*, Recife, 2008.
- [3] Maia C, Gibertoni B. Fungos registrados no semi-árido nordestino. In: Sampaio EVSB, Giuliatti A, Virgínio J, Gamarra-Rojas C. (eds) *Vegetação e flora da Caatinga, APNE/CNIP*, Recife, 2002, 163-176.
- [4] Jennings M, Tanner S. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous. *Waste Research*, Denver, 2000.
- [5] Banat I, Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53, 495.
- [6] Rahman K, Rahman T, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat I. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 2003, v. 90, 159-168.
- [7] Mulligan C, Yong R, Gibbs B. On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. *Environmental Progress*, 2005, n.18, 31-35.
- [8] Klick M, Pitt J. A Laboratory Guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *CSIRO Division of Food Processing*, Australia, 1988, 116.
- [9] Dantigny P, Guilmar A, Bensoussan M. Basis of predictive mycology. *International Journal Food Microbiology*. 2005, 100, 187–196.
- [10] Banat I, Makkar R, Cameotra S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, v. 53, n.5, 495-508.
- [11] Carrilo P. Isolation and selection of biosurfactant- producing. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, v.12, 82-84.

CAPÍTULO 3

Production and characterization of biosurfactant by a novel strain of *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1355 for potential use in oil dispersant

Trabalho submetido para revista
Frontiers in Microbiology, section Microbiotechnology, Ecotoxicology and
Bioremediation.

**frontiers in
MICROBIOLOGY**

Microbiotechnology, Ecotoxicology and Bioremediation



Production and characterization of biosurfactant by a novel strain of *Aspergillus niger* UCP 1355 for potential use in oil dispersant

Grayce K.B. Silva^{1,4}, Roberto A. Lima^{1,4}, Nadielly R. Andrade Silva^{2,4}, Neiva Tinti Oliveira³, Thayse A. Lima Silva⁴, Carlos A. Alves da Silva⁴, Kaoru Okada⁴, Galba M. Campos-Takaki^{4*}

¹Post-graduate Program of Biological Sciences,UFPE Recife,PE,Brazil,

²Master's Course in Development in Environmental Processes, UNICAP, Recife, PE, Brazil.

³Micology Department,UFPE,Recife,PE,Brazil

⁴Nucleus for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, UNICAP, Recife, PE, Brazil.

Running title: Production and characterization of biosurfactant by a novel strain of *Aspergillus niger*

* Correspondence: Galba Maria de Campos-Takaki, Nucleus for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife-PE, Brazil, E-mail : galba_takaki@yahoo.com.br

ABSTRACT

Biosurfactant producing by a novel strain of *Aspergillus niger* isolated from Caatinga soil of Pernambuco (Brazil) by preliminary results showed a clearing zone with a diameter < 1 cm in the blood agar hemolysis. The full factorial design 2^3 for biosurfactant production in the base medium - inorganic salt (IS), supplemented with waste frying soybean oil (WSO), yeast extract (YE), sodium chloride (SC); and wheat bran (WB) in constant concentration (10%w/v) were used. The biosurfactant was produced by *A. niger* at 96h, assay 3 [WSO (5% v/v), YE (3.5% w/v), SC (2% w/v), and WB (10% w/v)], at pH 7.0 reduced the water surface tension of 70 mN/m to 29.3 mN/m. The emulsification index and surface tension of the biosurfactant produced were stable at temperatures ranging (0-100°C), pH (2-12) values and NaCl concentrations (2-12% w/v). The yield of the biosurfactant was estimated at 3.2 g/L. The polymeric biosurfactant consisted of lipids (31.5%), carbohydrates (10.8%) and protein (14.8%), with anionic charge, CMC of 1.5 (% w/v), and a 21.03cm² oil displacement area (ODA). These results suggest the biosurfactant may be useful as detergent in the petroleum industry and may help in the bioremediation processes.

Keywords: Tensioactive agent, *Aspergillus niger*, Caatinga soil, bioremediation

INTRODUCTION

With the globalization of the industry and the need for environmental sustainability, which seeks ways to find other uses for or dispose safely of virtually all waste generated by large industrial complexes, especially the petrochemical industry, bioremediation processes have increasingly been seen as innovative technologies and have presented satisfactory results in the removal of petroleum pollutants (Luna et al., 2013). The search for natural surfactants to substitute those of synthetic petroleum has been the subject of great interest in biotechnology, due to the need to preserve the environment. In this connection, attention is drawn to the surfactants produced by microorganisms, termed biosurfactants (Haba et al., 2000).

Biosurfactants are amphiphilic surface active compounds produced by a variety of microorganisms, which have attractive and environmentally acceptable peculiar properties that gain ready acceptance in the industrial market (Chandankere et al., 2013). They are considered superior to chemically synthetic products due to their origin, structural diversity, greater substrate selectivity, low critical micelle concentration, biodegradability and low toxicity.

The potential application of surface active compounds produced from microorganisms is based on their having properties and effects such as: emulsification, separation, wetting and solubilization, inhibiting corrosion, and reducing viscosity and the surface tension of liquids. These properties have potential applications in the food, agricultural, construction, beverage, paper, metal, textile, pharmaceutical and cosmetics industries (Nitschke, 2002).

In recent years, these advantageous features and the exploitation of biomolecules have gained prominence in the therapeutic and biomedical sector, have been used in

agriculture and the food industry, in the manufacture of pharmacological and dermatological products and in the cosmetic industry (Gudiña et al., 2013; Donio et al., 2013).

Biosurfactants have advantages over their chemical counterparts because they are biodegradable, have low toxicity, are effective at extreme temperatures or pH values and show better environmental compatibility (Rufino et al., 2014).

Nevertheless, from an economic standpoint, biosurfactants are not yet competitive with their synthetic equivalents. Biosurfactants can only replace synthetic surfactants if the cost of the raw material from which they will be produced and of the production process itself is minimal (Rufino et al., 2011; Luna et al., 2011). However, a few filamentous fungi produce biosurfactants and an overview of biosurfactants produced by fungi amongst which are *Candida bombicola* (Bhardwaj et al., 2013; Felse et al., 2007; Deshpande et al., 1995; Casas et al., 1997; Williams, 2009), *Candida lipolytica* (Arora et al., 2015; Hanen et al., 2015; Hassan, 2014), *Candida sphaerica* (Kim, 2014; Silva et al., 2014), *Candida ishiwadae* (Thanomsub et al., 2004), *Candida batistae* (Konishi et al., 2008), *Aspergillus ustus* (Kiran et al., 2009), *Ustilago maydis* (Alejandro et al., 2011), and *Trichosporon ashii* (Chandran, 2010). Many of these are known to produce biosurfactant from low cost raw materials. The four main classes of biosurfactant are: (a) glycolipids, (b) phospholipids, (c) lipoproteins or lipopeptides, and (d) polymer biosurfactants. The best known glycolipids are rhamnolipids, sophorolipids and trehalolipids.

Moreover, it is noteworthy that studies on the production of biosurfactants by filamentous fungi are scarce in the literature. Similarly there are few articles in the literature that deal with approaches to the topic of exploring the potential of biotechnology to produce biosurfactants that can be used for the bioremediation of soil

contaminated with oils used in industry and effluents. This seems to be an oversight since exploiting biotechnology is an alternative approach not only to controlling and preventing pollution and to preserving the environment but also and, in particular, to meetg the demands of various industrial sectors to find cheaper and more efficient means of doing so. This article sets out how a biosurfactant derived from *Aspergillus niger* isolated from the soil of the Caatinga (PE-Brazil) was isolated, identified and produced.

MATERIAL AND METHODS

Soil collected from the Caatinga

The soil was collected from Caatinga in Serra Talhada-Pernambuco, Brazil. Different points of the site were previously marked area and separated into homogeneous plots. Soil samples were collected in zigzag every 10 points of the field at 20 cm depth.

Isolation of microorganism

Microorganisms from the soil were isolated by serial dilution and plating on selective media. Suspensions were prepared in soil/water dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} . To isolate the fungi, Martin culture media (1.0g K_2HPO_4 , 0.5g $MgSO_4$, H_2O , 5.0g of peptone, 10g dextrose, 0.03g of Bengal Rose, and 16 g agar 1000 mL distilled water) was used with antibiotics. And so was Sabouraud medium (5.0g meat peptone, 20.0g glucose, 5.0g casein peptone, 15.0g agar, 1000 ml distilled water pH 7.0). From the suspension of soil, 100 μ L of the dilutions 10^{-3} and 10^{-4} were transferred to Petri dishes containing 5 ml of the isolation medium. The plates were incubated at 28°C. After growth, the colonies were transferred to test tubes and preserved at 5°C. The entire experiment was done in triplicate.

Morphological and molecular identification

The macro and micromorphological identification were carried out evaluating the growth on Czapek agar (CZ), Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) incubated at 28°C, specific literature was used for the identification (Klick e Pitt, 1988). Molecular identification was performed using mycelial fragments with three days of growth in liquid Czapek medium, and was transferred to microtubes containing 800µL of extraction lysis buffer 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium Bromid). Tubes were placed in a FastPrep® Cell Disrupter at a unit speed of 5.5 m/s for 40 sec, for the mechanical lysis of the cells. Subsequently, the microtubes were incubated in a water bath at 65°C for 40 min and centrifuged at 13.000 rpm for 10 min. The supernatants were transferred to 1.5 mL micro centrifuge tubes and added to an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1 v/v) supernatant recovered, homogenized and centrifuged at 13.000 rpm for 10 min. Again, the supernatants were transferred to microcentrifuge tubes and another equal volume of isopropanol was added to the cold supernatant recovered and stored at -20°C for 1h. The microtubes were then centrifuged at 13.000 rpm for 10 min. The precipitated DNA was washed with 70% ethanol and to which 50µL of ultrapure water was added. The final concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer and the material stored at -20°C until use. The PCR reaction for amplifying ITS1-5.8S-ITS2 rDNA was performed in a total volume of 50 µl containing 1X of Taq DNA polymerase PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each primer ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 0.2 mM dNTPs and 0.2U Taq DNA polymerase and 25ng of fungal DNA. The amplification was performed in a Thermal Cycler programmed for an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 30s, annealing at 62°C for 1 minute, extension at 72°C for 2 min, and final extension at 72°C for 5 min. The PCR product fragment (about 950 bp) was subjected to electrophoresis on 1% agarose gel to 4V.cm⁻¹ in 1X TAE running

buffer (pH 8.0), and stained with GelRed™ photodocumentation under UV light. We used the molecular weight marker 1 kb (Fermentas®). The amplification product was purified with GeneJet™ - PCR Purification Kit - (Fermentas®) and sequenced. The electropherograms were edited using the Staden software package to obtain the confidence of the consensus sequence. After editing, the sequence obtained was used to search the most similar GenBank using the BLASTn tool. The hits that had the highest percentage of similarity with the sequence under study, considering the best combination of "score " and " e- value" were analyzed.

Biosurfactant production

Blood haemolysis test

The fresh single colonies from the isolated cultures were taken and streaked on Blood agar plates and incubated for 48 h at 37°C. The fungus colonies were then observed for the presence of clear zone around the colonies. This clear zone the culture showed the β-haemolytic activity and indicates the presence of biosurfactant producing organism.

Cultural conditions and biosurfactant production

The isolated fungus was inoculated in Petri dishes containing Potato dextrose agar medium and incubated at 28°C for 96h until sporulation. After this period, the conidia were counted (10^7 mL), and aliquots of 5% suspension were inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of the medium for biosurfactant production using inorganic salt medium (ISM), (KH_2PO_4 2.0g, MgSO_4 1.0g] to which was added 1 mL/L elements trace solution [$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.63 mg, MnSO_4 0.01 mg, ZnSO_4 0.62 mg/L, pH 7.0). A constant of 10% wheat bran (WB) was maintained. Variables with yeast extract (YE), Sodium Chloride (SC), soybean oil after frying (WSO), in accordance with factorial design 2^3 were used. The flasks were incubated in an orbital shaker at 150 rpm,

at 28°C, (Colla et al., 2012). The metabolic cell-free liquid was obtained from centrifugation at 10.000g for 15 min. and was then filtered. Table 1.

Table 1 - Levels of the four 2³ full factorial designs

Variables	Level				
	- 1.68	-1	0	+1	+ 1.68
Sodium chloride (w/v %)	0.64	2.0	4.0	6.0	7.38
Yeast extract (w/v %)	0.15	1.0	2.25	3.5	4.35
Soybean post frying oil (v/v %)	3.3	5.0	7.5	10.0	11.7

Kinetic growth and biosurfactant production

The growth of strains of *A. niger* was accompanied by a biomass and results were expressed in (g/L). Aliquots were collected at defined intervals of time and submitted to analysis to determine the biomass, pH and surface tension. All experiments were performed in triplicate.

pH Determination

Aliquots of the cell-free metabolic liquid were connected to an Orion potentiometer (Model 310) to determine the pH.

Surface tension

The surface tension of the biosurfactant produced from the cell-free metabolic liquid was monitored using a Tensiometer model Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Finland) together with the Du Nouy ring method at room temperature ($\pm 28^\circ\text{C}$). Measurements of surface tension from distilled water and from the conventional medium were used as controls.

Emulsification index

To determine the emulsification, the samples removed after 96 hours of fermentation were centrifuged at 10.000g for 15 minutes and then analyzed as per the methodology as described by Yemm e Willis, 1954.

1 mL of hydrophobic substrates and 2 mL of metabolic cell-free liquid containing the biosurfactant were added to a graduated tube and the mixture was vortexed for 2 minutes. Hydrophobic substrates of engine oil and engine oil burning were tested. The percentage of emulsification was calculated by the following formula: $IE (E_{24}) = \frac{TH}{EH} \times 100$, where IE= emulsification index, TH= total height, EH=emulsion height.

Isolation of the biosurfactant

After 96 hours of culture, condition 3 was selected for the experimental design. Due to its lower surface tension, the metabolic liquid was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes to remove the cells and subjected to the extraction process. The pH was adjusted to 2 with HCl 6.0 M and precipitated with 2 volumes of absolute ethanol (2:1 v/v), maintained at rest for 24 hours at 4°C. After this period, the liquid was centrifuged at 4000rpm for 30min. Subsequently, the supernatant was discarded and the biosurfactant extracted was subjected to dialysis with deionized water for 24 hours, and changed every 4 hours to remove the salt that had adhered to the sample. The precipitate was collected and lyophilized, and the yield of the isolated product, calculated in g/L.

Preliminary Chemical Composition of the Biosurfactant

After isolation, the biosurfactant was subjected to the determination of its carbohydrate, lipid and protein content. The carbohydrate content was determined by the anthrone method (Manocha et al., 1980); the lipids as per (Diab e Din, 2013); and the Protein index by means of the Labtest (Brazil) kit.

Ionic charge

The ionic charge of the biosurfactant was determined by measuring the zeta potential in Zeta Meter 3.0 + system, model ZM3 - dg, Zeta Meter, Inc., USA with direct imaging. The top row of the pit was filled with the pure compound of known ionic charge.

Evaluation of the stability of the biosurfactant

Stability studies were undertaken using the cell-free broth obtained by centrifuging the cultures at 10,000*g* for 15 min. Four milliliters of this broth were heated at 0, 5, 70, 100 and 120°C for 1h, and cooled to room temperature, after which the surface tension and emulsification activity were measured. To study the pH stability of the cell-free broth, its pH was adjusted to different pH values (2–12) and the surface tension and emulsification activity were measured. The pH of the liquid was adjusted with 1 M NaOH. The effect of NaCl concentrations (2–12%) on reducing the surface tension and on the emulsification capacity of the cell-free broth were also determined. The tests were performed in triplicate.

Determination of the critical micelle concentration (CMC)

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

Oil spreading test (oil displacement area-ODA)

The oil scattering assay was performed using the method described by Felse et al., 2007 in order to evaluate the effect of biosurfactant in the oil displacement test. The test consisted of adding 20 mL of distilled water to each Petri dish (diameter 9 mm), the center of which was then spread with a 0.5 ml film of engine burnt oil and synthetic surfactant Triton X-100 as control, and 0.5 mL of 1.5% purified biosurfactant produced by *A. niger*. The diameter of the clear zone formed was measured, this area being calculated as the oil displacement area (ODA) using the following equation: $ODA = 3.14 \times r^2$

Oil viscosity determination

In order to investigate the effects of the biosurfactant produced on the viscosity tests were carried out the test was fixed to volume of 6 mL. These viscosities were measured using a standard viscometer (Brookfield - TC 500) to 25°C. The hydrophobic substrates Engine oil, Engine burned oil, Diesel, Biodiesel, Corn oil, Coconut oil, Mineral oil, Soybean oil, Soybean post-frying oil and water as control were tested. In the same sequence of the hydrophobic substrates we added 2 mL of solution of biosurfactant at 1.0%(w/v). Vortexes to 1min and the viscosity was measured again. The viscosity results were expressed in cP and %. The use of biosurfactants promotes viscosity reduction. Formation of oil / water emulsions facilitates pumping of the waste oil recovery after breaking of the emulsion. The resulting solids carry a limited amount of waste oil due to detergent action of biosurfactants making the disposal of these residues less problematic.

Statistical analysis

In order to check the effect of the independent variables (yeast extract, sodium chloride and soybean oil after frying) on biosurfactant production, a 2^3 complete factorial design

with three core values, was used (Table 1). The results were then examined to determine the main effects of all factors and which of them are statistically significant. Data analysis and graphics, and all calculations were performed using the Statistical 7.0 software package, and the significance of the results was tested ($p \leq 0.05$).

RESULTS

Aspergillus niger morphological and molecular characterization

The isolated colonies of the fungus *A. niger* from Caatinga soil showed rapid and luxuriant growth, initially white, yellow, then becoming black. This comprised an aerial mycelium with erect conidiophores, densely distributed and abundant production of conidia on the surface of the medium Czapek agar at 28°C for 7 days. *A.niger* colonies quickly at temperatures of 28°C to 37°C, developing well at pH 4, 7 and 9, and salinity level of up to 10%. These data are confirmed by the literature (Klick & Pitt, 1988). The characterization and analysis of the ITS (rDNA) region of the isolate was put in sequence and analyzed by PCR. After using BLASTn (NCBI), 99% similarity with strain *A. niger* (GenBank: FJ629338.1/CBS 120.49) and other reference sequences was verified, thus confirming the taxonomic status of the isolated sample that was analyzed. Deposited in your following GenBank: KP765525.

Biosurfactant production by *A. niger*

In order to search for species or isolates capable of degrading and synthesizing compounds used in biotechnological processes of agricultural, industrial and/or environmental interest, biosurfactant production by *Aspergillus niger* was investigated. We observed the occurrence of biosurfactant production with a significant reduction of water surface tension 46,3 mN/m to 29.3 mN/m in condition 3 of the experimental DCCR design, corresponding to WSO (5 % v/v) , YE (3,5 % w/v) , SC (2 % w/v) , a constant concentration of WB (10 % w/ v), and a pH of 7.0. Thus, the production of

surfactant molecules becomes feasible with the possibility of using low cost substrates that enable a biotechnological process. The Pareto chart shows the significance of results with 95 % confidence represented by the dashed red line and corresponds to $p = 0.05$, confirming the results obtained in Figure 1. The heights of the bars provide the results of the effects of variables and are arranged in descending order. The calculation of linear and quadratic effects indicates how the effect should be large to be meaningful statistically. Variables that showed positive values indicate that the increased levels lead to a greater increase in surface tension, and negative values a decrease. In the graph of Figure 1, it is clear from the linear (L) and quadratic (Q) models that the variables WSO (5 % v/v), YE (3.5 % w/v) exceeded $p = 0.05$ at 95% confidence level, confirming that they are statistically significant. Notice that YE (Q) and SC (Q) were the most affected in the process of reducing the surface tension. However, this influence is negative: if this interaction increases, the reduction in surface tension decreases. The interactions of the variables influenced the reduction, but were not statistically significant.

Growth, pH and biosurfactant production by *A. niger*

The study of the kinetics of producing the biosurfactant was carried out in the best condition i.e. WSO 5% (v/v) and YE (3.5% w/v), SC (2% w/v) with a constant concentration WB (10% w/v). All analyzes were conducted to investigate the production of biosurfactants. The sources of carbon and nitrogen, besides the association with the basic solution of salts and trace elements, influence the type and the properties of biosurfactants, such as biomass accumulation. The results for the surface tensions of the fermented medium in the presence or absence of microorganism cells and cell growth are shown in Figure 2. The pH remained constant during 96 h incubation reaching a maximum value of approximately 7.2 and was followed by minor changes. The surface tension decreased throughout cultivation time with values less than 47 mN/m which reached 29 mN/m at the end of cultivation.

Emulsifying property of biosurfactant

After 24 hours, we observed the stabilization of emulsions in selected conditions, with values of around 88%, using engine motor oil as the hydrophobic substrate.

These results demonstrate that the biosurfactant produced has significant emulsifying properties. Several authors have considered significant amounts above 50% emulsification. In addition to reducing surface and interfacial tensions, biosurfactants usually exhibit an emulsifying capacity. Figure 3 shows the average behavior of emulsifying activity over 96 hours of cultivation. The best results concerning the emulsification activity were obtained using burnt motor oil in condition 3 of the experimental design.

Stability of the biosurfactant

The selected biosurfactant was stable in high concentrations of NaCl tested, indicating its possible application in aquatic environments and independently of the NaCl concentration used, the biosurfactant remains effective in reducing the surface tension. With respect to thermal stability and stability against acid and based on the surface tension of the metabolic cell-free liquid containing the pH of the biosurfactant, it was also observed that there was a variation in the stability of the biosurfactant produced by *A. niger* thus demonstrating effective stability – see Figure 4 (A-B-C).

Yield, Ionic charge, Preliminary Chemical Composition of biosurfactant and CMC

The yield of the biosurfactant was estimated at 3.2 g/L. Chemical characterization of the isolated molecule showed the presence of lipids (31.5% w/w), carbohydrates (10.8% w/w) and protein (14.8% w/w). An anion profile Zeta-meter ZP -14.54 mV, specific conductance 650uS/cm, temperature 26.1°C, complete Scale was used. The zeta potential determines the function of the surface charge of the particle, which serves to provide and verify the stability of the colloidal suspensions, and emulsions, and

confirmed the higher values that indicate good stability. These were obtained as a result of the repulsion between the hydrophilic particles. The ability to reduce the surface tension depends on the specific concentration of the surface-active compound. The relationship between the surface tension and concentration of the isolated surfactant solution was determined in an automatic tensiometer (Figure 5). The biosurfactant of *A. niger* exhibited an excellent ability to reduce the surface tension of water from 70 to 29 mN/m by increasing the concentration of the biosurfactant to 1.5%. From this point, the increase in biosurfactant solution did not cause greater reductions in the surface tension of water, indicating that the CMC had been reached.

Oil displacement area-ODA

Spreading oil tests were performed to confirm the presence of the surfactant through its ability as a dispersant using control Triton-X 1,5% and the biosurfactant 1,5% produced by *A. niger*. Triton-X 1.5% promoted the dispersion of burnt engine oil resulting in the formation of a halo of 22.04 cm² in diameter. For the biosurfactant using the concentration of 1.5% formed a halo of 21.03cm² was measured (Figure 6). Important findings were obtained with oil displacement area (ODA) by biosurfactants produced by *A. niger*.

Effect of the Biosurfactant on Viscosity

The reduction of viscosity parameter were established in Engine oil, Burnt Engine oil, Diesel, Biodiesel, Canola oil, Corn oil, Soybean oil, Soybean waste oil, Sunflower oil, Palm oil, Rice oil, Mineral oil and Water (Control) isolate and after adding biosurfactant isolate from *A. niger*. The centipoise (cP) and percentage (%) of the hydrophobic substrates was determined before and post solubilisation by using biosurfactant at 1% solution for 30 min. The best results were achieved when biosurfactant was used. Viscosity decreased as follows: Engine oil from 736.6 cP to 159.6 cP; Diesel from 159.1 to 43.8 cP; Canola oil from 374.0 cP to 110.9 cP, and Castor oil from 187.9 cP to 185.4cP (Table 2).

Table 2 - Proprieties of reduction and increase the viscosity substrates by the biosurfactant

Hydrophobic substrates	Viscosity without biosurfactant		Viscosity with biosurfactant	
	(cP)	(%)	(cP)	(%)
Engine oil	736.6	59.9	179.0	72.5
Engine burning oil	148.9	48.3	159.6	87.9
Diesel	159.1	25.1	43.8	4.9
Biodiesel	36.0	29.3	19.4	59.4
Canola oil	374.0	60.8	110.9	18.2
Corn oil	47.6	38.8	6.44	19.7
Soybean oil	472.8	38.2	5.98	18.3
Soybean waste oil	380.1	61.9	29.4	89.9
Castor oil	187.9	75.1	185.4	71.2
Sunflower oil	355.5	57.6	2.03	6.2
Babaçu oil	403.0	67.7	14.8	45.4
Rice oil	459.9	74.8	30.8	40.7
Mineral oil	27.0	22.0	2.84	8.7
Oliva oil	5.46	16.7	24.6	75.2
Pequí oil	5.30	16.2	13.3	40.7
Water(Control)	0.96	0.9	2.88	8.8

Discussion

According to the literature, strains with 35 mN/m ranges indicate that the micro-organism is promising for the production of biosurfactants; below 35mN/m indicates that the microorganism can be considered an efficient producer (Dantigny, 2005). According to (Banat et al., 2000), biosurfactants are able to reduce the surface and interfacial tension and have the ability to mix two immiscible solutions. These properties give biosurfactants important characteristics such as emulsification, wetting, detergency, phase separation and lower viscosity. According to the literature there are few fungi that can be effective in reducing the surface tension in relation to bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, which have the most significant results regarding the reduction of tension.

However, yeasts demonstrate consistent tension-active values. The best biosurfactant production achieved by *Fusarium* sp was BS-8 and this reduced the water surface tension from 72 to 32 mN/m under the condition of pH 7.0, and a temperature of 30°C (Silva et al., 2014).

In this study it was demonstrated that pH changes slightly according to each condition, and presented some values up to 7.0 at the end. pH is a factor that also determines the production of biomolecules of *Candida species* in scales which ranged from 5.0 5.7; 6.0; to 7.8. However, *Pichia anamola* and *Aspergillus ustus* MFS3 showed maximum production with values of 7.0 and 5.5, respectively (Jamal et al., 2012; Quasi et al., 2013).

According to the literature, there are few fungi that can be effective in reducing the surface tension in relation to bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, which have most significant results regarding the reduction tension. However, yeasts demonstrate consistent tension-active values according to Liu et al., 2014.

The production of the biosurfactant is also influenced by the length of incubation, and various microorganisms are able to produce different time intervals as observed for *Aspergillus ustus* after 5 days, *Fusarium* sp. BS-8 for 15 days of incubation, while production by *Candida bombicola* was over 7, 8 and 11 days (Dantigny et al.,; Liu et al., 2014). Most biosurfactants are excreted into the culture medium either during the exponential phase or in the stationary phase.

The fungus is able to report vegetable oil, a source of carbon, providing additional effect of biomass and the process of inducing biosurfactant production through activation of genes responsible for their biosynthesis and also provides fatty acids that length the lipid chain in the hydrophobic domain (Dantigny et al., 2005).

Bioemulsifiers are surfactants that have the ability to form and stabilize emulsions (Kiran et al., 2009). The biosurfactants show low irritability and maintain their properties even in extreme conditions, e.g. at high temperatures; and show specificity in their actions due to the presence of their functional groups (Bhardwaj et al., 2013). The pH, temperature and salinity are factors that influence the activity and stability of the biosurfactant, and the study of these parameters is relevant to the potential application of these specific compounds (Morita et al., 2009).

The CMC which is defined as the minimum concentration of biosurfactant required to reduce the surface tension of water by the maximum amount and initiate micelle formation (Ron e Rosenberg, 2002; Mulligan et al., 2005).

Similar results were described to *Bacillus* spp (SH 20 and SH 26) grown in ISM medium supplemented with vegetable oils. However, the biosurfactant produced in the presence of molasses was able to produce 51.2 ± 3.5 and 32.1 ± 2.7 cm² ODA, respectively. The same authors reported when *Pseudomonas aeruginosa* was grown in ISM medium supplemented with waste oil, and was able to produce biosurfactant and ODA corresponding to 45.3 ± 2.8 cm² (Cavalero et al., 2003).

CONCLUSION

The new polymeric biosurfactant produced by *A. niger* shown thermo stable surface tension and emulsions, as well as to different pH and higher saline conditions. At present, considering the efficient results of biosurfactant with oil displacement area can be uses are mainly in the oil and petroleum industries. The biosurfactant suggest the application in primarily for polluted-sites, consideing their emulsification capacity and reduction of the viscosity, and can be used in remediation, as weel as oil storage tank clean-up and enhanced oil-recovery.

ACKNOWLEDGMENTS

The research was supported by CAPES (G.K.B.S. fellowship) and CNPq (308245/2010-5 G.M.C.T.), and FACEPE (APQ N^o.0086.2.12/10) to whom the authors are grateful as they are to the Catholic University of Pernambuco for the use of laboratories.

REFERENCES

- Ali, D., Din, E.S.G. (2013) Application of the biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (SH 20 and SH 26) and *Pseudomonas aeruginosa* SH 29 isolated from the rhizosphere soil of an Egyptian salt marsh plant for the cleaning of oil-contaminated vessels and enhancing the biodegradation of oily sludge. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 7, 671-679.
- Alejandro, C.S., Humberto, H.S., Maria, J.F. (2011) Production of glycolipids with antimicrobial activity by *Ustilago maydis* FBD12 in submerged culture. *African J. Microbiol.*, 5, 2512-2523.
- Arora, S.K., Sony, J., Sharma, A., Taneja, M. (2015). Production and characterization of biosurfactant from *Pseudomonas* spp. *Int.J.Curr.Microbiol.* 4, 245-253.
- Banat, I., Makkar, R., Cameotra, S. (2000) Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 5: 495-508.
- Bhardwaj, G., Cameotra, S.S., Chopra, H.K. (2013) Biosurfactants from Fungi: A Review. *J. Pet. Environ. Biotechnol.* 4, 160-166.
- Casas, J.A., Garcia, de L.S., Garcia-Ochoa, F. (1997) Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb.* 2, 221-229.

- Cavalero, D.A., Cooper, D.G. (2003) The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.*, 103, 31-41.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2), 224-229.
- Colla, L.M., Hemkemeier, M., Gil, A.S.L (2012) Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Revista CIATEC*, 4,1-10.
- Chandankere, R., Yao, J., Choi, M.M.F., Masakorala, K., Chan, Y. (2013) An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochem. Engine. J.* 74, 46-53.
- Chandran, P., Das, N. (2010) Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Inter. J. Engine. Sci. Technol.*, 2, 6942-6953.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M. (2005) Basis of predictive mycology. *Inter. J. Food Microbiol.* 100, 187-196.
- Deshpande, M., Daniels, L. (1995) Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Biores. Technol.* 54, 143-150.
- Donio, M.B.S., Ronica, S.F.A., Thanga, V.V., Velmurugan, S., Adlin, J.J., Michaelbabu, M., Citarasu, T. (2013) Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. *Asian Pacific. J. Tropical Med*, 111, 873-886.

- Felse, P.A., Shah, V., Chan, J., Rao, K.J., Gross, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues (2007). *Enzyme Microbiol. Tech.* 40, 316-323.
- Gudiña, R., Rangarajan, V., Sem, R., Rodrigues, L.R. (2013) Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol.* 34, 6-12.
- Haba, E., Espuny, M.J, Busquets, M. Manresa, A. (2000) Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379-387.
- Hassan M.; Essam T.; Yassin, A.S., Salama, A. Screening of Bio- Surfactant Production Ability among Organic Pollutants Degrading Isolates Collected From Egyptian Environment. *J Microb Biochem Technol*, 6, 195-201, 2014.
- Hanen, B. A.; Nawel, J.; Hana, M.; Ahmed, B.; Noomen, H.; Moncef, N. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 8-14, 2015.
- Jamal, P., Nawawi, W.M.F.W, Alam, M.D.Z. (2012), Optimum medium components for biosurfactant production by *Klebsiella pneumonia* WMF 02 utilizing sludge palm oil as a substrate. *Australian J. Basic Appl.* 6, 100-108.
- Kim, J. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing bacterium *Bacillus pumilus* IJ-1 from contaminated crude oil collected. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 57, 5-14, 2014.
- Kiran, G.S., Hema, T.A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T.A. (2009) Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 73, 250-256.

- Konishi, M., Fukuoka, T., Morita, T., Imura, T., Kitamoto, D. (2008) Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J Oleo Sci.*, 57, 359-369.
- Klick, M., Pitt, J. A Laboratory Guide to common (1988) *Aspergillus* species and their teleomorphs. *Division of Food Processing*, Australia, 116, 86-94.
- Liu, J. H.; Chen, Y. T.; Li, H.; Jia, Y. P.; Xu, R. D.; Wang, J. Optimization of fermentation conditions for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* strains CCTCC M201162 from oilfield wastewater. *Environ. Prog. Sustainable Energy*, 2014.
- Luna, J.M, Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M. (2013) Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surf B Biointerfaces* 102, 202-209.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Albuquerque, C.D.C., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M. (2011) 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.* 12, 2463-2476.
- Manocha, M.S., San-Blas, G., Centeno, S. (1980) Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J. Gen. Microbiol.* 117, 147-154.
- Morita, T., Ishibashi, Y., Fukuoka, T., Imura, T., Sakai, T., Abe, M., Kitamoto, D. (2009) Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 788-92.
- Mulligan, C.N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollution*, 133, 183-98.

Nitschke, M., Pastore, G.M. (2002) Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova*. 25, 772-776.

Silva, R.C.F.S., Almeida, D.G., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A. (2014) Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil. *Spills Int J Mol* 15(7), 12523–12542.

Qazi, M.A., Subhan, M., Nighat, F., Ali, M.I., Ahmed, S. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp. BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column (2013). *Inter. J. Biosci., Biochem. Bioinformatics*, 3, 6-10.

Ron, E.Z., Rosenberg, E. (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol*, 13, 249-52.

Rufino, R.D., Luna, J.M., Campos-Takaki, G.M., Sarubbo, L.A. (2014) Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electron. J. Biotechnol.*, 17, 34-38.

Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., Rodrigues, L.R.M., Texeira, J.A.C., Campos-Takaki, G.M. (2011) Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 84,1-5.

Thanomsub, B., Watcharachaipong, T., Chotelersak, K., Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T. (2004). Monoacylglycerols: glycolipid biosurfactants produced by a thermotolerant yeast, *Candida ishiwadae*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 588-592.

Yemm, E.W., Willis, A.J. (1954) The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. *Biochemical J* , 57, 508-514.

Williams, K. (2009) Biosurfactants for cosmetic applications: Overcoming production challenges. *Basic Biotechnol.* 5, 78-83.

Willumsen, P.A., Karlson, U. (1997) Screening of bacteria, isolated from PAH contaminated soils, for production of biosurfactant and bioemulsifiers, *Biodegradation* 7, 415- 423.

Figure 1- Pareto chart for the reduction of surface tension (mN/m), the estimates of effects that were statistically significant ($p = 0.05$) are indicated by the dashed line.

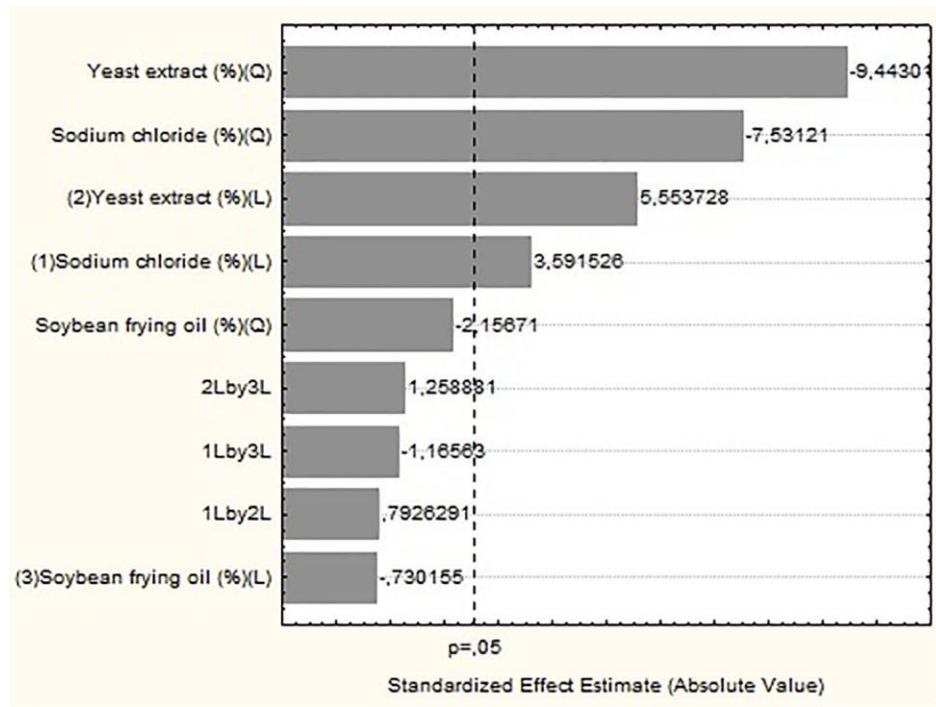


Figure 2- Growth kinetics, surface tension and pH corresponding to the best condition in the course of 96 hours of fermentation in WFO (5% v/v), YE (3.5% w/v), SC (2% w/v), in a constant concentration of WB (10% w/v) as substrates.

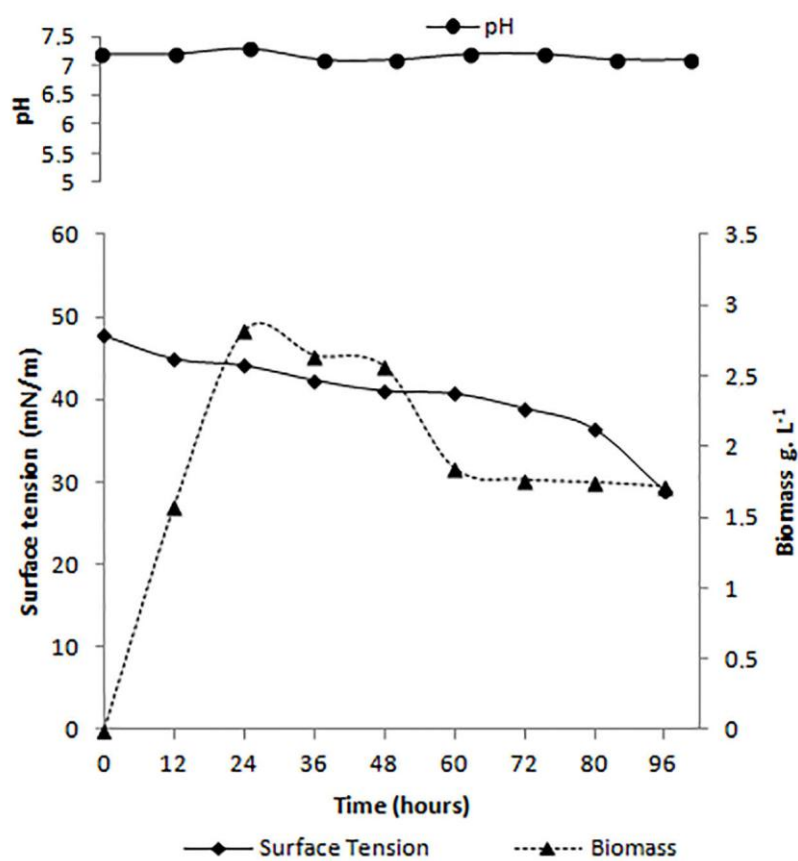


Figure 3- Emulsification index (E_{24}) in different hydrophobic substrates.

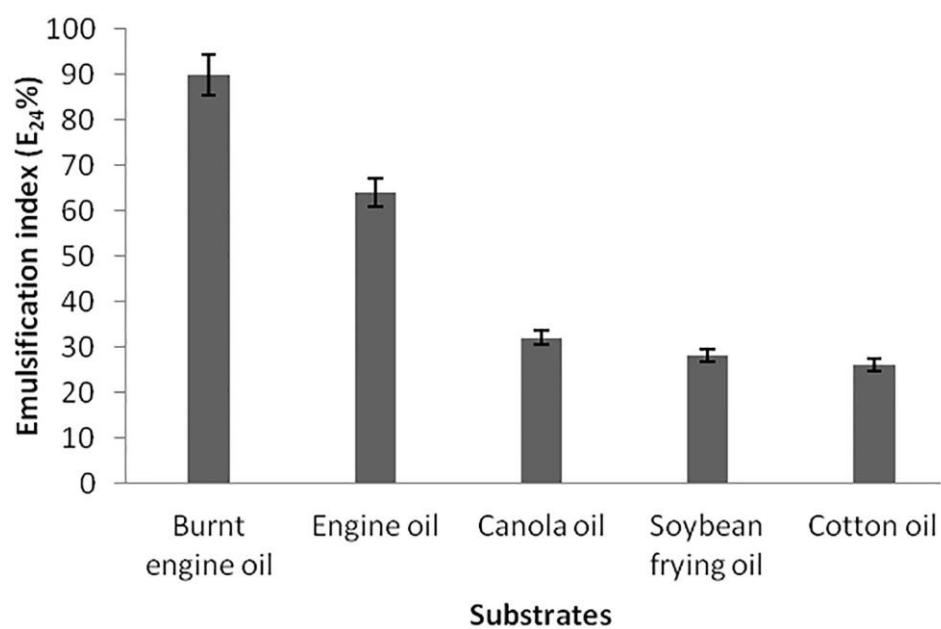


Figure 4- Influence of pH (A), temperature (B) and NaCl (C) on Stability of the biosurfactant produced by *A. niger* grown in WFO (5% v/v), YE (3.5% w/v), SC (2% w/v), in a constant concentration of WB (10% w/v) as substrates.

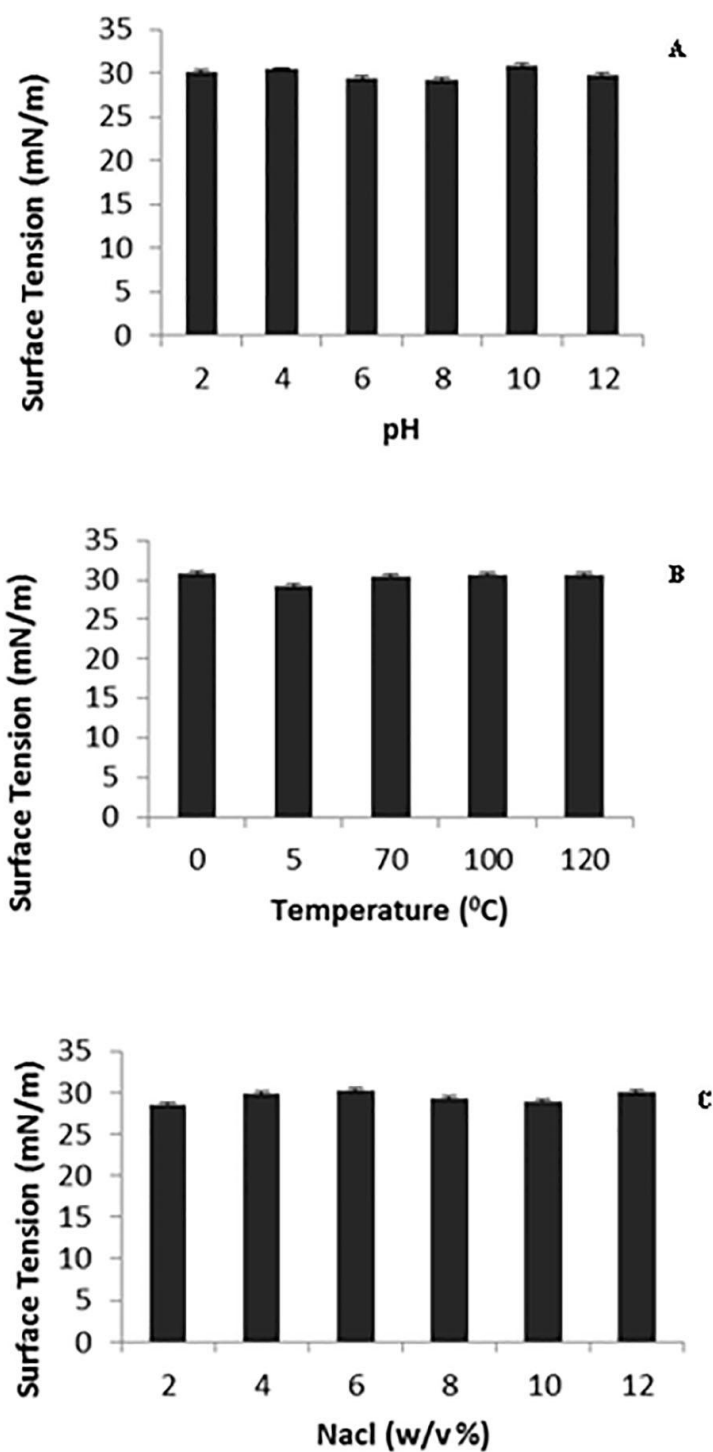


Figure 5- Critical Micelle Concentration of biosurfactant produced by *A. niger*.

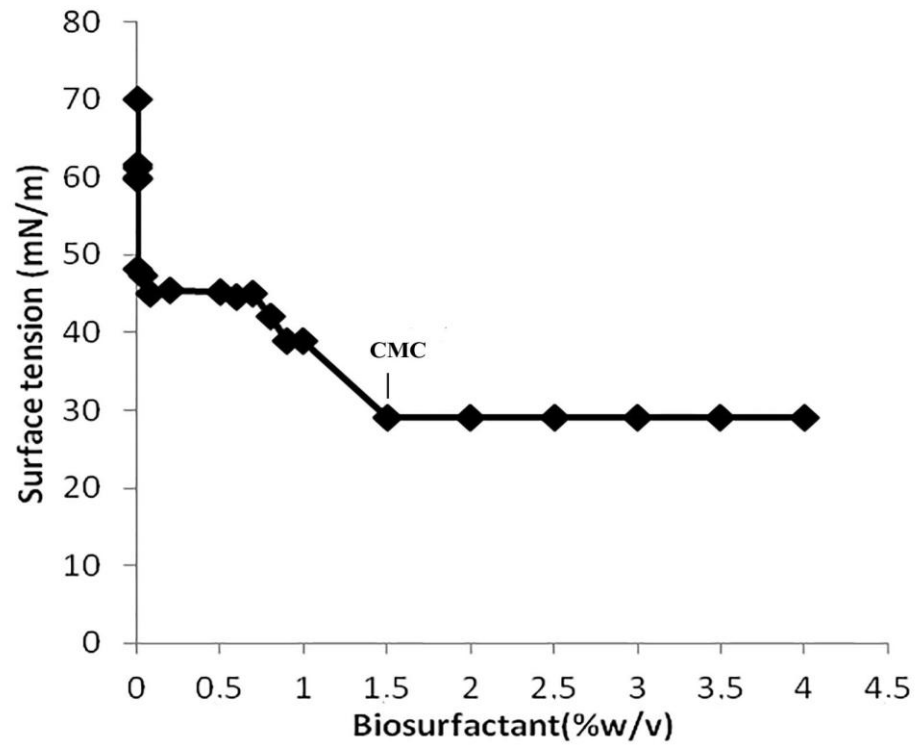
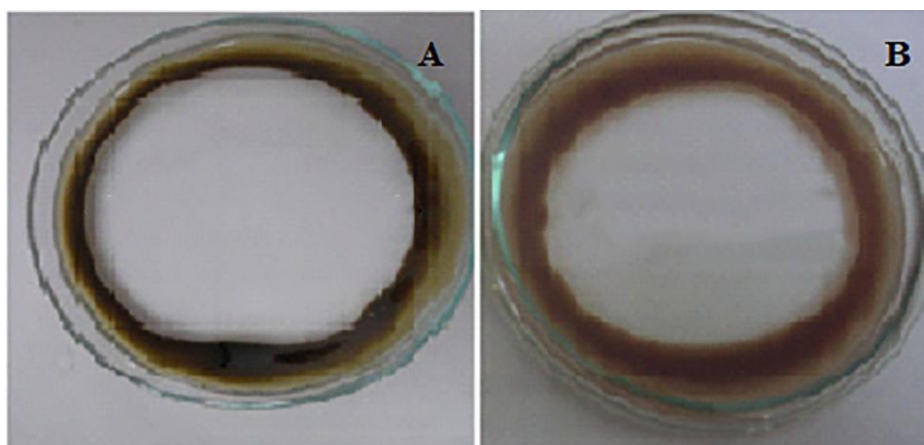


Figure 6- Dispersants activities to engine oil observed as: (A) engine oil with Triton-X and (B) engine oil with biosurfactant isolated from *A. niger*.



CAPÍTULO 4

**Evaluation of a new Polimeric Biosurfactant from *Aspergillus niger*
UCP/WFCC 1355 as Potential Source of Anti-Adhesive Activity and
Cell hydrophobicity**



Trabalho a ser submetido para revista:

Colloids and Surfaces A

Fator de impacto: 2.494

Evaluation of a new Polimeric Biosurfactant from *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1355 as Potential Source of Anti-Adhesive Activity and Cell hydrophobicity

G. K.B Silva, K. Okada, G. M. Campos-Takaki

Post-graduate Program in Biological Sciences, Recife, PE, Brazil

Nucleus for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, General Coordination Unit of Research, Recife, PE, Brazil

*Corresponding Author: Galba Maria de Campos-Takaki, Nucleus Research in Environmental, Catholic University of, Bloco J, Térreo, Boa Vista, Recife-Pernambuco, Brasil, Cep: 50050-590, Tel: +51-81-21194044, Fax: +55-81-21194043, E-mail : galba_takaki@yahoo.com.br

Abstract

In this study, the biosurfactant produced by *Aspergillus niger* was isolated, characterized and subjected to anti-adhesive activity and toxicity tests. The biosurfactant was produced in a medium composed of a basis of salts with trace elements and supplemented with 10% wheat bran and variables such as sodium chloride, yeast extract and post-frying soybeans oil, according to factorial design 2³. Chemical structure of purified biosurfactant was identified by infrared spectroscopy (FTIR) and Thin Layer Chromatography (TLC) protein content, carbohydrates and lipids were determined. Fatty acids of biosurfactant hydrophobic portion were identified by Gas Chromatography (GC) and charge of hydrophilic moiety by Zeta potential. Yield of isolated biosurfactant was 3.2 g /L, a critical 1.5% micelle concentration. Biosurfactant was characterized as anionic polymer, compound of lipids (31.5%), carbohydrates (10.8%) and proteins (14.8%). Biosurfactant was anti-adhesive for microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*). Regarding to its toxicity, using a vegetable microcrustacean, the results indicated the biosurfactant showed no inhibitory effect on seed germination and root elongation or larvae (*Artemia salina*) mortality. The biosurfactant tested showed no cytotoxicity for tested cancer lines and normal cell.

Key words: Biosurfactant, *Aspergillus niger*, anti-adhesive, cytotoxic.

1. Introduction

Surfactants are amphipathic molecules with different polarity degrees, which make them able to reduce surface and interfacial tension in addition to forming emulsions, where the hydrocarbon can be solubilized in water to reduce viscosity of liquids, among others. These characteristics provide excellent detergency, emulsifying action and important dispersant in industrial applications [1-2]. Among other properties, good surfactants have the ability to promote micelle formation at low concentrations, reduced viscosity and fat emulsification [3-4]. The search for natural surfactants to replace synthetic to synthetic petroleum products has been the subject of great interest in biotechnology, due to the need for environmental preservation. In this context, we highlight the surfactants produced by microorganisms, known as biosurfactants [5-6].

Chemical surfactants are the most commercially used in industrial products. However, some biosurfactants are less toxic and less hazardous, biodegradable and do not cause adverse impacts to the environment [7-8]. Biosurfactants are molecules produced by microorganisms, have amphiphilic molecular structure and potential commercial applications of oil, pharmaceuticals, food and cosmetics industries [9,10,11]. The microorganisms employ a survival mechanism for the accession process to surfaces and biofilm formation. In addition to antifungal, antibacterial and antiviral activities of biosurfactants, these compounds have also proven to be large microbial adhesion inhibitors of biofilm formation [12]. Toxicology tests are one part of broader research on applicational functions. One of the methods used to evaluate the biocompatibility of novel compounds or existing ones are unknown action in vitro cytotoxicity assays [13].

In addition, we emphasize that studies with the production of biosurfactants by a novel filamentous fungi *Aspergillus niger* isolated from Caatinga, PE, Brazil soil. In this work we investigated the biological properties related to anti-adhesive activity, cell hydrophobicity and toxicity tests (cytotoxicity, phytotoxicity, *Artemia salina* tests) as well as the characterization of biosurfactant produced by *Aspergillus niger* soil isolated from the Caatinga, PE -Brazil.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganism

Aspergillus niger was used as a microorganism producer of biosurfactant, isolated from the soil of caatinga- PE, Brazil, and deposited at the Research Center of Culture Bank in Environmental Sciences and Biotechnology at the Catholic University of Pernambuco.

2.2 Hydrophobicity Cell

Cell surface hydrophobicity was measured by cell adherence to hydrocarbons. Cells were washed twice with sterile deionized water and re-suspended in saline buffer (16.9 g/L K_2HPO_4 , 7.3 g/L KH_2PO_4).

To a cell suspension of 4.0 mL, containing 10^{-7} spores/mL was added 1.0 mL of n-hexadecane in test tubes (10x100mm) and the contents were stirred by vortexing for 3 minutes. After stirring, the contents were allowed to stand for 30 minutes to allow the phases to completely separate. The optical density (OD) aqueous phase was, then, measured at 600 nm. Hydrophobicity is expressed as percentage of adherence to n-hexadecane, calculated as follows: $100 \times (1 - OD \text{ of the aqueous phase} / OD \text{ of the original cell suspension})$. Three determinations were performed for each sample. The cells were considered to be more hydrophobic if the result is greater than 60% and less hydrophobic when results are less than 10% [14].

2.3 Cultural conditions and biosurfactant production

Aspergillus niger was inoculated in Petri dishes containing potato dextrose agar medium and incubated at 28°C for 72h until sporulation. After this period, the conidia were counted (10^{-7} mL), and the aliquots of 5% suspension were inoculated into 250 mL Erlenmeyer flasks, containing 100mL of the medium for biosurfactant production, using inorganic salt medium (ISM), (KH_2PO_4 2.0g, $MgSO_4$ 1.0g to which was added 1.0 mL/L trace element solution $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.63 mg, $MnSO_4$ 0.01 mg, $ZnSO_4$ 0.62 mg/L, pH 7.0). A constant of 10% wheat bran (WB) was maintained. Variables with yeast extract (YE), Sodium Chloride (SC), post-frying soybeans oil (WSO), in accordance with factorial design 2^3 were used. The flasks were incubated in an orbital shaker at 150 rpm, at 28°C. Metabolic cell-free liquid was obtained from centrifugation at 10.000g for 15 minutes, and was, then, filtered.

The metabolic cell-free liquid obtained after cultivation was subjected to extraction, isolated in 70% ethanol and performed to determine the critical micelle concentration (CMC).

2.4 Chemical composition of biosurfactant

2.4.1 Thin layer chromatography (TLC)

Biosurfactant was dissolved in chloroform/methanol (1:1 v/v) and subjected to thin layer chromatography (TLC). The sample (100 μ L) was applied to a silica gel plate (20x20) and developed in a solvent system as proposed by [15], containing chloroform/methanol/acetic acid (65: 15: 2 v/v/v). Detection of the biosurfactant of the constituents was carried out after spraying the TLC plate ninhydrin reagent, rhodamine

and anthrone. The ninhydrin reagent 0,05% (methanol and water 1: 1 v / v) heated at 100 °C for 4 minutes were used for detection of amino acids and rhodamine 0, 25% (in 70% ethanol) to detect lipid presence [16]. Anthrone reagent (1 g in 5 mL of sulfuric acid mixed with 95 mL of ethanol) was used to detect glycolipid biosurfactants by the presence of yellow bands [17]. Visualization of bands corresponding to constituents of biosurfactants was detected under UV light and Rf values were calculated.

2.4.2 Fatty acids of biosurfactant hydrophobic portion

The sample (100 µL) was applied to a silica gel plate (20x20) and developed in a solvent system as proposed by [15]. Biosurfactant lyophilized (100 mg) was placed in a threaded lid tube, mixed with 2 mL of a boron trifluoride solution to 14% methanol and 2 mL of benzene, incubated "overnight" at 60 °C. Following incubation, 2 mL of distilled water was added to the mixture and the tubes were vortexed for 5 minutes. The mixture was centrifuged at 1700 rpm for 10 minutes at 40 °C. After centrifugation, benzene was removed and evaporated with nitrogen, while the methyl esters of fatty acids were re-suspended in 0,5 mL n-hexane and analyzed by gas chromatography. Analysis was performed on the model Varian CP-3380 gas chromatography coupled with CP-8200 autosampler capillary column CP SIL 8CB (30m x 0.25 mm), using helium as drag. Temperature of the injector and detector (FID) was maintained at 250 °C; the temperature of the "OVER" was initially set at 130 °C, then increased to 170 °C at a rate of 1-3 °C/min and finally maintained isothermally at 180 °C for 10 minutes. Fatty acids were identified by comparison of retention times of the sample peaks with standards and relative amounts of the methyl ester made by cellular fatty acid composition (CFA) were estimated by integration of peak areas. A variety of patterns of fatty acids were obtained from Sigma.

2.4.3 Load of biosurfactant hydrophilic portion

The charge of surfactant hydrophilic portion was investigated. First analysis was conducted by double diffusion technique in agar with low viscosity (1% solution) [18] and confirmation was given by zeta potential analysis in equipment model ZM3-DG + 3.0 Zeta Meter system, direct video Zeta Meter, Inc., USA image.

2.5 Biosurfactant anti-adhesive activity

Anti-adhesive activity was tested against various microorganisms: *Bacillus subtilis*; *Salmonella enterica*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Serratia*; *Serratia aureu*. The isolated biosurfactant was dissolved in PBS to concentrations of 3-50 g/L range. Biosurfactant solutions of 200 µL were placed in wells of a sterile 96 well plate for 4 h at 4 °C. The attached microorganisms were fixed with 200µL of 99% methanol

and after 15 min, the contents of the wells were removed. After drying the plates, 200µL of crystal violet was added to each well 2%, for 5 min, then, the excess was removed with water. After this step, 200µL of 33% glacial acetic acid (v / v) was added to each well and read the optical density at 595 nm. Microbial inhibition percentages at different biosurfactant concentrations for each microorganism were calculated as:

$$\% \text{ microbial inhibition} = [1 - (AC/A0)] \times 100$$

2.6 Cytotoxic evaluation

The cytotoxic activity was evaluated by the MTT method 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium [19-20]. Human tumor cell lines used were NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HEp-2 (human larynx carcinoma), J774.A1 (murine macrophage) and HT-29 (human colon cancer) maintained in medium DMEM culture MCF-7 (human breast adenocarcinoma) and HL-60 maintained in RPMI culture. Media were supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin). The cells were maintained at 37 °C in a humid atmosphere enriched with 5% CO₂. NCI-H292 cells, HT-29, MCF-7 and Hep-2 (10⁵ cells / mL), LH-60 (0.3 x 10⁶ cells / mL) and J774.A1 (17.5 x 10⁴ cells / mL) were plated in 96-well plates and incubated for 24h. Then, the samples dissolved in DMSO (0, 5%) were added to the wells at final concentration of 25 µg/mL. Drug doxorubicin (5 mg / mL) was used as standard. After 72 h of incubation, 25 µL of MTT (5 mg /mL) was added to the products and after 3 h of incubation, the medium with MTT was aspirated and 100 µL of DMSO was added to each well. Absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 560 nm. The experiments were performed in quadruplicate and the percent inhibition was calculated, using GraphPad Prism 5.0 software.

An intensity scale was used to assess the cytotoxic potential of the samples tested. Samples with high activity (95 to 100% inhibition) with moderate activity (cell growth inhibition ranging from 70 to 90%) and without activity (growth inhibition lower than 50%) [21].

2.7 Phytotoxicity Test

Phytotoxicity was evaluated in the biosurfactant by seed germination static test and root growth cabbage *Brassica oleracea* var. *capitata* according to methodology [22]. Test solutions were prepared for biosurfactant isolated in sterile distilled water at concentrations of 3.75, 7.5, 11.3, 15 g/L. Toxicity was determined in sterile Petri dishes containing filter paper discs. Seeds were previously treated with NaClO, 10 seeds per plate symmetrically added, inoculated with 5 mL of test solution at 28 °C. Water was

used as control. After five days of incubation in the dark, seed germination, root growth ($\geq 5\text{mm}$), and germination index (GI) were calculated:

Relative seed germination (%) = (seed number germinated in the extract / number of germinated seeds in control) x 100

Relative root length (%) = (root length of the average in the extract / root length of the average in the control) x 100

$$\text{IG} = [(\% \text{ seed germination}) \times (\% \text{ root growth})] / 100\%$$

2.8 *Artemia salina* test

Biosurfactant toxicity test was conducted on *Artemia salina* based on microcrustacean death percentage in relation to the total number (10 larvae), in the presence of different concentrations of biosurfactant solution (v/v 3.75, 7.5, 11.3, 15 g/L diluted in 5 ml of an aqueous solution of synthetic sea salt (33,3g L), incubated for 24 hours. Maximum volume of test sample (biosurfactant solution) was 1.5 mL. It was, then, the counting of surviving organisms, thereby determining whether to limit dose (LC50) of biosurfactant calculated by probit analysis by method of least squares StatPlus program 2009. The tests were performed in triplicate.

3. Results and discussion

3.1 Cell hydrophobicity of *Aspergillus niger*

To assess cell hydrophobicity of *Aspergillus niger*, we have detected a high percentage of hydrophobicity of 78.43%; percentage of cell surface hydrophobicity is a method for assessing degradation of hydrophobic contaminants, since the higher the hydrophobicity cell, the greater the possibility the cell produce biosurfactant and be connected to your wall, interacting with the contaminant and/or adhere to hydrophobic surfaces, forming biofilms in order to start a biodegradation. The mechanisms involved in the input of hydrophobic substrates in the microbial cell have been extensively discussed in recent decades. Effective production of biosurfactants is usually seen as an obvious existence criterion of a necessary mediator for transfer of a hydrocarbon, the cell could only encompass the insoluble substrate by the action of a biosurfactant [23], although numerous studies have described the production of biosurfactant microorganisms grown on soluble substrates [24]. Some microbial cells have high surface hydrophobicity and regarded themselves as biosurfactants.

3.2 Production of biosurfactant by *Aspergillus niger* and Critical Micelle Concentration (CMC)

We observed the occurrence of biosurfactant production with a significant reduction of water surface tension 70 mN/m to 29.3 mN/m in condition 3 of the experimental design, corresponding to WSO (5 % v/v) , YE (3,5 % w/v) , SC (2 % w/v), a constant concentration of WB (4,5 % w/ v), and a pH of 7.0. According to literature, strains with 35 mN/m ranges indicate that the microorganism is promising for production of biosurfactants; below 35mN/m indicates the microorganism can be considered an efficient producer [25].

The production of biosurfactant is also influenced by time of incubation, and different time intervals as observed to *Aspergillus ustus* after 5 days, for 15 of incubation, while production by *Candida bombicola* was the period of 7 to 11 days [26-27-28].

The relationship between the surface tension and concentration of the isolated surfactant solution was determined in an automatic tensiometer Biosurfactant of *A. niger* exhibited an excellent ability to reduce surface tension of water from 70 to 29 mN/m by increasing concentration of the biosurfactant to 1.5%. From this point, the increase in biosurfactant solution did not cause greater reductions in the surface tension of water, indicating that CMC had been reached. Critical Micelle Concentration (CMC) is a property that assesses the effectiveness of surfactant activity [29]. Once most important properties of a surfactant is their spontaneous aggregation in water and the formation of well-known structures such as spherical micelles, cylinders, etc., surface tension decreases gradually with increasing surfactant micelle concentration (CMC), this decrease stops. Above the CMC, surface tension remains almost constant [30].

The yield of the biosurfactant was estimated at 3.2 g/L. An anion profile Zeta-meter ZP -14.54 mV, specific conductance 650uS/cm, temperature 26.1°C, complete scale was used. Zeta potential determines the function of surface charge of the particle, which serves to provide and verify the stability of colloidal suspensions, and emulsions, and confirmed the higher values that indicate good stability. These were obtained as a result of the repulsion between hydrophilic particles. The ability to reduce the surface tension depends on specific concentration of the surface-active compound.

3.3 Chemical composition of biosurfactant

Table 1 shows the results of physico-chemical characterization of the biosurfactant produced by *Aspergillus niger*. Chemically, partially purified biosurfactant has 31.5% lipids, 10.8% carbohydrate and 14.8% protein. Extracted biosurfactant was thin layer chromatography subjected to and visualized with specific reagents, producing dots with different R_f values (retention factor). Points with different R_f values were visualized and shown positive reaction to iodine vapors for identification of lipid constituents R_f = 1,80cm, ultraviolet light, carbohydrate identification R_f = 1,78cm and ninhydrin, for viewing nitrogen compounds R_f = 2.0 cm.

The FT-IR spectrum exhibited absorption bands at 3417cm⁻¹, band corresponding to the existing OH bond in monosaccharide structures, which is characteristic of carbon-

containing compounds with amino group. Spectral region between 3100 and 2800 cm^{-1} correspond to CH stretching vibration of functional groups = CH₂ and CH₃, usually fatty acids and lipids. Very intense band at 1400 cm^{-1} is attributed to the symmetric stretching vibration of -COO- group of the side chain amino acids and fatty acids. Regions 1700 and 1600 cm^{-1} corresponding to the stretching of C = O groups of peptide (amide I). Spectral region between 1800 and 1500 cm^{-1} amide I and II band which are the most intense bands [31-32].

To quantify the predominance of α or β protein secondary structures, fatty acid composition of the biosurfactant was isolated and analyzed by gas chromatography and revealed the presence of C8:0 (0.37%), C14:0 (0.28%), C16:0 (14.38%), C18:2 (41.51%), C18:1 (30.54%), C18:3 (2.47%), C18:0 (6.05%), C20:1 (12.53%), C20:0 (2.50%), C22:1 (0.33%) and C22:0 (0.99%).

Table 1 - Chemical characterization of biosurfactant produced by *Aspergillus niger*

Composition Chemistry (%)	Peaks FTIR (cm^{-1})	Chromatography thin layer (GC) CCD (cm^{-1})	Gas chromatography(GC)	
			Fatty acids	Content (%)
31.5 Lipids	3100-2800 Long Alkyl chains	Rf 1.80	C18:2 C18:1 C16:0 C20:0	41.51 30.54 14.38 2.50
10.8 Carbohydrates	1700-1600 Carbohydrates	Rf 1.78		
14.8 Proteins	1800-1500 Peptides	Rf 2.00		

3.4 Phytotoxicity Test and *Artemia salina*

The biosurfactant was tested for toxicity, using a vegetable and microcrustacean. The tests showed that the brine shrimp of biosurfactant caused 70% lethality when tested at a concentration of 15 g/L. And the limit dose is LC₅₀ 11.89 g/L.

Germination index (GI), which combines the measurements on root germination and growth was used to evaluate the toxicity of biosurfactant against the cabbage. The results indicated that concentrations from 3.75 to 15 g/L tested showed no inhibitory effects on germination and elongation of cabbage roots. IG, whereas, above 50% shows no toxic effects. Germination test was used in phytotoxicity tests due to its low cost of implementation. According to [34], tests involving plants are based in seed germination, root growth and seedling growth and plants that are sensitive to toxic substances can be used as bio-indicators. Germination test advantages are due to its low cost and its

simplification, helping them to be widely used in phytotoxicity tests. Some surfactants have inhibitory effect on the growth of plants [33].

According to [34], lethality assays allow the assessment of general toxicity and should therefore be considered essential to preliminary tests involving the study of compounds with potential biological activity.

3.5 Anti-adhesive activity

The isolated biosurfactant showed great potential against anti-adhesive microorganisms *Salmonella enterica* (74.27%), *Serratia marcescens* (66.97%), *Staphylococcus aureus* (59.03%) at the highest concentration tested (Table 2). Tested biosurfactant showed anti-adhesive activity against all microorganisms used, although, depending on the microorganism, the biosurfactant present different effective concentration.

All surfactants alter the physicochemical properties of surfaces, reinforcing the hypothesis that adhesion / biofilm formation is closely related to surface physicochemical characteristics, to which microorganisms will join. The adsorption of biosurfactant to the surface alters hydrophobicity and might cause interference with microbial adhesion in desorption processes [35].

Table 2- Fees and microbial inhibition obtained from anti-adhesive activity assay of biosurfactant produced by *Aspergillus niger* in microplates. Phosphate buffer (PBS) is taken as control and set to 0%, since there is microbial inhibition.

Micro-organisms	Antiadhesive Activity (%)					
	Biosurfactant (g/L)					
	3	5	15	25	50	Control (PBS)
<i>Bacillus subtilis</i>	11,33 ± 0,1	21,54 ± 0,2	60,91 ± 0,1	59,78 ± 0,3	45,45 ± 0,2	0
<i>Salmonella enterica</i>	42,04 ± 0,3	43,86 ± 0,3	68,89 ± 0,1	76,26 ± 0,3	74,28 ± 0,2	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,22 ± 0,1	3,4 ± 0,2	2,16 ± 0,2	58,78 ± 0,2	53,29 ± 0,3	0
<i>Escherichia coli</i>	8,47 ± 0,2	28,91 ± 0,1	46,55 ± 0,3	60,73 ± 0,1	56,12 ± 0,1	0
<i>Serratia marcescens</i>	22,44 ± 0,1	44,54 ± 0,1	30,86 ± 0,2	44,23 ± 0,1	66,97 ± 0,1	0
<i>Stafilococcus aureus</i>	0,58 ± 0,2	28,62 ± 0,2	40,32 ± 0,1	39,63 ± 0,2	59,03 ± 0,2	0

Standard deviation (±), determined in triplicate

3.6 Cytotoxic evaluation

The anionic surfactant SDS showed no cytotoxic activity (inhibition of cell growth 3.9%) in macrophage cells confirming their biocompatibility for use in industrial products. The biosurfactant *A. niger* did not show cytotoxic activity (inhibition of cell growth of 18.75%). Figure 2 shows the cytotoxic activity results of biosurfactant from *Aspergillus niger*.

Doxorubicin, a drug widely used in cancer chemotherapy, showed high cytotoxic action (inhibition of cell growth of 95.25%). An intensity scale was used to assess the cytotoxic potential of the samples. Samples with high activity (95 to 100% inhibition) with moderate activity (cell growth inhibition ranging from 70 to 90%) and without activity (growth inhibition lower than 50%).

Toxicology tests are one part of broader research on applicational functions. One of the methods used to evaluate the biocompatibility of the novel compounds or existing ones are unknown action *in vitro* cytotoxicity assays [36]. The potential toxicity of new surfactants can be assessed by preliminary tests *in vitro* [37].

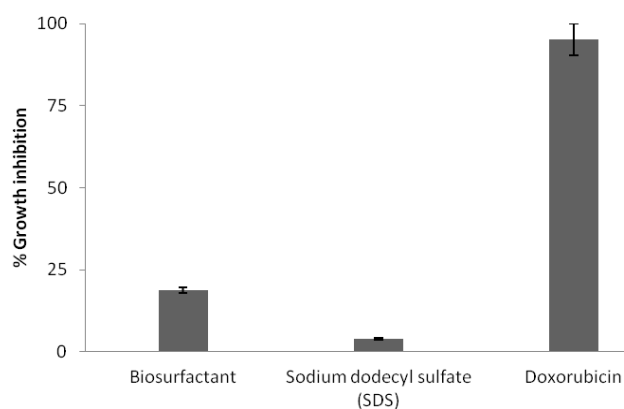


Fig. 2 - Inhibition of cell growth by the macrophage cells purified the biosurfactant 1.5% produced by *Aspergillus niger*.

4. Conclusions

The results obtained in this study indicate the possibility of using the biosurfactant produced by *Aspergillus niger* characterized as an anionic polymer without toxic activity in medical applications, untapped area for biosurfactants obtained from filamentous fungi. However, toxicity studies are needed to ensure the reliability of this study.

References

- [1] T. Janek, M. Lukaszewicz, A. Krasowska, Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *Microbiology* 12 (2012) 1-9.
- [2] R.D. Rufino, J.M. Luna, G.M. Campos Takaki, L.A. Sarubbo, Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic Journal of Biotechnology* 6 (2014) 1-5.
- [3] K. Muthusamy, S. Gopalakrishnan, T. Kochupappy, P. Sivachidambaram, Biosurfs: properties, commercial production and application, *Current science*, Challenges, Ed. Mendez-Vilas (2012) 55-59.
- [4] R.A. Lima, R.F.S. Andrade, L.Q. Santos, G.M. Campos-Takaki, Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* in pineapple broth (*Ananas comosus*) with burned sunflower oil and application in removal of petrol derivative, *Exacta*, São Paulo 8 (2010) 201-210.
- [5] F.R. Accorsini, M.J.R. Mutton, E.G.M. Lemos, M. Benincasa, Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (2012) 116-125.
- [6] A.M.A.T. Jara, R.F.S. Andrade, G.M. Campos-Takaki, Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101 (2013) 315-318.
- [7] P. Jamal, M. F. Wan, N. Wan, A.M.D. Zahangir, Optimum Medium Components for Biosurfactant Production by *Klebsiella pneumonia* WMF02 Utilizing Sludge Palm Oil as a Substrate. *Australian J. of Basic and Applied Sciences* 6, (2012) 100-108.
- [8] M. Pacwa-plociniczak, G.A. Plaza, Z. Piotrowska-seget, S.S. Cameotra, Environmental Applications of Biosurfactantes: Recent Advances. *Molecular Sciences* 12 (2011) 633-654.
- [9] R.S. Makkar, S.S. Cameotra, I.M. Banat, Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 1 (2011) 2-19.
- [10] O.H. Jukyoung, H. Jeong, Characterization of optimal growth conditions and carotenoid production of strain *Rhodotorula mucilaginosa* HP isolated from larvae of *Pieris rapae*. *Entomol. Res* 36 (2009) 380-387.
- [11] A. Khopade, R. Biao, L. Xiang-yang, M. Kakasaheb, Z. Lixin, K. Chandrakant, Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. *Journal of Colloid and Interface Science* 367 (2012) 311-318.

- [12] D. Sharma, B.S. Saharan, Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3, *International Journal of Microbiology* (2014) 1-7.
- [13] E. Haba, M.J. Espuny, M. Busquets, A. Manresa, Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology, Northern Ireland* 88 (2000) 379-387.
- [14] R. D. Rufino, J. M. Luna, L. Sarubbo, L.R. Rodriques, J.A. Teixeira, G. M. Campos- Takaki, Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 1-5.
- [15] J.M. Luna, R.D. Rufino, C.D.C. Albuquerque, L.A. Sarubbo, G.M. Campos-Takaki, 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.* 12 (2011) 2463.
- [16] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods* 65 (1983) 55–63.
- [17] M. Bouchez–Naitali, H. Rakatozafy, R. Marchals, JV. Leveau, JP. Van Beilendecastele. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol* 86 (1999) 421-428.
- [18] T. Meylheuc, C.J. Van O.S.S, M.M. Bellon-fontaine, Adsorption of biosurfactants on soil surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology* 91 (2001) 822-832.
- [19] M. C. Alley, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48 (1988) 589-601.
- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods* 65 (1983) 55–63.
- [21] MS. Manocha, G. San-Blas, S. Centeno, Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *J Gen Microbiol* 117 (1980) 147-154.
- [22] S. M. Tiquia, I. J. Hodgkiss, Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution* 93 (1996) 249-256.
- [23] R. Dunlapk, J. Perry, Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon substituted utilizing microorganisms. *J. Bacteriol* 94 (1967) 1919-1923.
- [24] I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M.G. Martinotti, L. Fracchia, T.J. Smyth, R. Marchant, Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2010) 427-444.

- [25] J. L. M.C Laughlin, T.C. Saizarbitoria, J.E. Anderson, Tres biosensayos simples para químicos de productos naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Química 18 (1985) 13-18.
- [26] C.A.B. Gusmão, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP 1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26 (2010) 1683-1692.
- [27] S.M. Bueno, A.N. Silva, H.C. García-cruz, Study on the production of biosurfactant fermentation broth. Química Nova 33 (2010) 1572-1577.
- [28] D.S. Francy, J.M. Thomas, R.L. Raymond, C.H. WARD, Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. Journal of Industry Microbiology (1991) 237-246.
- [29] D.A. Cavaleiro, D.G. Cooper, The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. J. Biotechnol 103 (2003) 31-41.
- [30] N.R. Andrade Silva, M. A. C. Luna, A.L.C.M.A. Santiago, L. O. Franco, G. K. B. Silva, P. M. de Souza, K. Okada, C. D. C. Albuquerque, C. A. Alves da Silva, G. M. Campos-Takaki, Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil Int. J. Mol. Sci., 15, (2014)15377-15395.
- [31] M.A. Qazi, M. Subhan, F Nighat, M.I. Ali, S. Ahmed, Role of biosurfactant produced by *Fusarium* sp. BS-8 in enhanced oil recovery (EOR) through sand Pack column. Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform 3 (2013) 6-10.
- [32] H.S. El-Sheshtawy, , M.M. Doheim, Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity, Egyptian Journal of Petroleum Volume 23, Issue 1, March (2014) 1-6.
- [33] R. Chandankere, J.Yao, M.M.F. Choi, K. Masakorala, Y. Chan, An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. Biochem. Eng. J 74 (2013) 46-53.
- [34] D. Sharma, B. S. Saharan, N. Chauhan, S. Procha and Sohan, Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*, Lal SpringerPlus, 4:4 (2015).
- [35] H.B. S. Sobrinho, J. M. Luna, R. D. Rufino, A. L. F. Porto, L. A. Sarubbo, Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor Electronic Journal of Biotechnology . 4, 15, (2013).
- [36] A. Youn-joo, Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. Chemosphere 62 (2006) 1359-1365.
- [37] F. A. R. RODRIGUES, Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. Chem Biol Drug Des 83 (2014) 126-131.

CAPÍTULO 5

**Avaliação das Propriedades Tensoativa e Emulsificante do Biossurfactante
Polimérico Isolado de *Aspergillus niger* UCP 1355 e Aplicação na Formulação de
Biodetergente**

Solicitação de direitos autorais

Trabalho a ser submetido a patente

**Avaliação das Propriedades Tensoativa e Emulsificante do
Biossurfactante Polimérico Isolado de *Aspergillus niger* UCP/WFCC
1355 e Aplicação na Formulação de Biodetergente**

G. K.B Silva, K. Okada, G. M. Campos-Takaki

Post-graduate Program in Biological Sciences, Recife, PE, Brazil
Nucleus for Research in Environmental Sciences and Biotechnology, General
Coordination Unit of Research, Recife, PE, Brazil

Resumo

Biossurfactantes são grupos de moléculas de superfície ativa no qual são produzidos por uma variedade de micro-organismos. Nesta pesquisa, a aplicação do biossurfactante produzido por *Aspergillus niger* numa concentração de 1,5% (CMC) na formulação de um biodetergente foi realizada, tendo como base a concentração de detergentes sintéticos vendidos comercialmente. A eficácia na remoção de sujidades de óleo de motor queimado, manchas de achocolatado, extrato de tomate e vinho tinto foram avaliadas. Os resultados mostraram que a formulação apresentada neste estudo foi eficaz na remoção de óleo e manchas quando comparado a detergentes comerciais sintéticos, além de ter alto poder espumante, emulsificante e redutor de viscosidade em vários substratos hidrofóbicos, demonstrando o potencial biotecnológico do biossurfactante produzido por *A. niger* sugerindo ser substituto para surfactantes sintéticos.

Palavras-chaves: Biodetergente, *Aspergillus niger*, espuma, detergência

1. Introdução

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. Esses compostos são as mais importantes ingredientes de detergentes para a roupa, são formados por estruturas moleculares

contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água) (JARA et al., 2013; RUFINO et al., 2014), promovendo a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência e remoção de manchas a partir de tecidos, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (BAFGHI & FAZAEIPOOR, 2012; SHARMA et al., 2015).

Surfactantes microbianos ou biossurfactantes são metabólitos produzidos principalmente por bactérias e leveduras, embora alguns fungos filamentosos também os produzam (LUNA et al., 2009). Os biossurfactantes apresentam inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade, estabilidade frente à ampla faixa de pH e sob temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (COIMBRA et al. 2009).

Os biossurfactantes são considerados superiores aos produtos químicos sintéticos devido a sua origem, diversidade estrutural, maior seletividade do substrato, baixa concentração micelar crítica, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Nos últimos anos, estas características vantajosas das biomoléculas têm ganho destaque no setor terapêutico e biomédico, como uso na agricultura, produtos farmacológicos, dermatologia, na indústria de alimentos e cosméticos (GUDIÑA et al., 2013; DONIO et al., 2013).

Os biossurfactantes podem ser aplicados em áreas como agricultura, para a formulação de pesticidas e herbicidas, na indústria alimentícia, bem como aditivos em condimento, nas indústrias farmacêuticas, têxtil, cosmética, e petrolífera, onde são amplamente utilizados para a recuperação secundária do petróleo, como na remoção de resíduos de óleo e biorremediação (RON & ROSENBERG, 2002).

Detergentes são produtos que promovem a remoção, dispersão e estabilização de materiais de uma superfície. O desempenho destas funções depende da composição da formulação, das condições de uso, da natureza da superfície a ser tratada, da natureza da substância a ser removida e/ou dispersa e da natureza da fase móvel. A formulação de um detergente é um processo complexo e direcionado pela necessidade específica do consumidor final, pela viabilidade econômica, por questões ambientais disponibilidade de princípios ativos que podem proporcionar a funcionalidade requerida (SHOWELL, 2006).

Muitos micro-organismos como bactérias e fungos produzem, quando estimulados, certas substâncias que agem como detergentes naturais. No que se refere à definição de biodetergentes esses produtos biológicos conhecidos como biossurfactantes, são considerados por muitos autores como sendo o próprio biodetergente. Na literatura, alguns autores definem também biodetergente como sendo resultado da adição de enzimas produzidas por estes micro-organismos a formulações de detergentes sintéticos (BARBOSA, 2013).

Neste trabalho foi aplicado o biossurfactante produzido por *Aspergillus niger* isolado de solo da Caatinga, Pernambuco, Brasil, na formulação de um biodetergente e a sua eficácia na remoção de óleo de motor usado, manchas de achocolatado, extrato de tomate e vinho tinto.

2. Material e métodos

2.1 Micro-organismo

Aspergillus niger foi utilizado como micro-organismo produtor de biossurfactante, isolado de solo da caatinga- PE, Brasil, mantido em meio BDA (Batata dextrose Agar) e depositado no banco de culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco.

2.2 Produção de biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio de produção sendo composta por KH_2PO_4 – 2 g/L; MgSO_4 – 1g/L e solução traço – 10 mL/L, sendo a solução traço composta por $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,63 mg; MnSO_4 – 0,01 mg; ZnSO_4 – 0,62 mg e água destilada até o volume de 1 L e suplementado com 10% farelo de trigo e variáveis cloreto de sódio, extrato de levedura e óleo de soja pos-fritura, de acordo com um planejamento fatorial composto 2^3 . O pH do meio foi ajustado para 7,0. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 150rpm, incubados por 96 horas, à temperatura de 28°C. Após esse período a cultura foi centrifugada a 4000 rpm, seguida de filtração, a fim de separar as células do líquido metabólico (COLLA, 2012). O isolamento do biossurfactante foi a partir do sobrenadante livre de células com o solvente orgânico etanol a 70% numa

proporção de 1:2 (BUENO *et al.*, 2010). O rendimento foi calculado subtraindo o rendimento inicial do biossurfactante bruto pelo rendimento final do surfactante purificado e o resultado foi expresso em g/L. Após o processo de purificação, a tensão superficial foi medida novamente para determinar a manutenção da atividade surfactante e confirmada pela concentração micelar crítica (CMC).

2.3 Formulação e produção do Biodetergente

A formulação do biodetergente foi realizada utilizando uma concentração do biossurfactante a 1,5% CMC como princípio ativo, ou seja, 1,0 mL da solução de biossurfactante foram usados na reação e adicionados água e agentes coadjuvantes tendo como volume final de 50 mL do biodetergente, pH 7,0. A base de concentração da formulação foi de detergente tradicional vendido comercialmente (BARBOSA *et al.*, 2013) adaptado. Adotando um procedimento semelhante ao que acontece na reação de saponificação resultando na neutralização do biossurfactante formando-se um sal orgânico e água.

2.4 Análises do Biodetergente

A caracterização do biodetergente produzido foi feita através da determinação do poder emulsificante e espumante, ação de detergência, sempre comparando com um detergente sintético comercial.

2.4.1 Efeito do Biodetergente na viscosidade

O efeito causado pelo biodetergente na viscosidade de óleos vegetais (óleo de canola, algodão e soja), biocombustíveis e derivados de petróleo foram medidos após adição em tubos graduados de 3 mL dos óleos e 1 mL do biodetergente. As misturas foram agitadas durante 2 minutos e depois de 20 minutos de repouso as emulsões foram lidas em viscosímetro Modelo Brookfield TC-500 a 25 °C utilizando o spindel nº41 a 100 rpm de acordo com a metodologia de JARA *et al.*, (2013).

2.4.2 Determinação poder emulsificante do Biodetergente

A determinação do índice de emulsificação a partir da condição selecionada do planejamento fatorial composto 2^3 . Foi adicionado 1,0 mL do líquido metabólico livre de células a 1,0 mL de óleo queimado de motor e demais óleos como soja e milho, em tubos graduados, e a mistura foi agitada em vórtex por um minuto. Após 24 horas de repouso, as emulsões foram formadas e calculou-se a altura da emulsão pela altura total da mistura multiplicado por 100, sendo o resultado expresso em porcentagem.

2.4.3 Determinação poder espumante do Biodetergente

Para avaliação do poder espumante foi realizada de duas atividades a primeira foi comparando a produção de espuma em uma esponja contendo uma quantidade de 0,5 mL do biodetergente em 50 mL de água destilada. E em outra esponja para ter um parâmetro, fez-se o mesmo teste com o detergente comercial sintético, ou seja, 0,5mL do detergente comercial em 50 mL de água. Ao final, avaliou-se em qual situação houve maior produção de espuma medindo-se a altura da mesma em uma proveta. A segunda foi comparando a altura da espuma formada em erlenmeyers de 125 mL de capacidade após agitação de 150 rpm, contendo os seguintes produtos: 25 mL de água destilada, 0,5mL de corante e 1mL do biodetergente; 25 mL de água destilada, 0,5mL de corante e 1mL do biodetergente. Ao fim de 30 minutos foi verificado qual erlenmeyer apresentou uma maior altura de espuma.

2.4.4 Determinação da ação de Detergência

A ação da detergência foi avaliada pela simulação de lavagem de tecidos de algodão branco cortados com medidas 15 x 15 cm, dobrado duas vezes e impregnados com as seguintes sujidades: três tecidos com 1,0 mL iogurte achocolatado, três tecidos com 1,0 mL de molho de tomate, três tecidos com suco de uva, três tecidos com óleo de motor queimado. Após a impregnação com as sujidades, os tecidos foram dobrados mais uma vez e colocados dentro de erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo os seguintes produtos: 25 mL de água destilada e 2,0 mL do biodetergente; 25 mL de água destilada e 2,0 mL do detergente comercial; 25 mL de água destilada e 2,0 mL de água como controle. Os erlenmeyers foram colocados agitação de 150 rpm, durante 90

minutos e após a lavagem, as peças foram secadas à temperatura ambiente, para um peso constante. A percentagem de remoção de cada mancha foi calculada usando os pesos precisos das peças antes e depois da lavagem. Outro procedimento foi utilizado para remoção das manchas de óleo, que foi removido com uma mistura 2: 1 (v / v) de uma mistura de metanol-clorofórmio e os extratos combinados foi evaporado até à secura. A quantidade de óleo recuperado foi determinada por gravimetria. (MUKHERJEE, 2007; ABIDI et al., 2008; BAFGHI & FAZAELIPOOR, 2012).

3. Resultados e Discussão

3.1 Produção, Isolamento e Purificação do biossurfactante

No sentido de busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e /ou ambiental foi investigada a produção de biossurfactante por *Aspergillus niger*. Observou-se a ocorrência da produção de biossurfactante havendo uma significativa redução da tensão superficial da água 70 mN/m para 29,3 mN/m e tensão interfacial com n-hexadecano de 40 mN/m para valores ao torno de 13,5 mN/m.

De acordo com a literatura as tensões nas faixas de 35 mN/m a 40mN/m, indicam que o micro-organismo é promissor na produção de biossurfactantes; abaixo de 35mN/m, indica que o micro-organismo pode ser considerado um eficiente produtor (SILVA, 2002). Segundo Jamal et al., 2012, os biossurfatantes são capazes de reduzir a superfície e tensão interfacial e têm a capacidade de misturar duas soluções imiscíveis. Estas propriedades dão aos biosurfactantes características importantes, tais como emulsificação, molhagem, detergência, separação de fases e diminuição da viscosidade. O rendimento do biossurfactante isolado foi de 3,2 g/L, e uma concentração micelar crítica (CMC) de 1,5%. O biosurfatctante foi caracterizado como polimérico aniônico.

3.2 Análises do Biodetergente

3.2.1 Efeito do Biodetergente na viscosidade

Foi determinada a viscosidade vários substratos hidrofóbicos e a água (controle). A determinação foi realizada em (cP) e porcentagem (%) dos substratos hidrofóbicos,

antes e após a solubilização pela utilização de biodetergente durante 30 min. A viscosidade de todos os óleos foi diminuída, apenas a água (controle) foi aumentada após a adição do biodetergente. Por conseguinte, os resultados do biodetergente é indicado para limpeza das placas de óleo contaminado, tal como descrito. Os resultados indicam dois mecanismos de aumentar e diminuir a viscosidade usando substratos hidrofóbicos através da utilização do novo biodetergente, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades de redução da viscosidade dos substratos hidrofóbicos pelo biodetergente

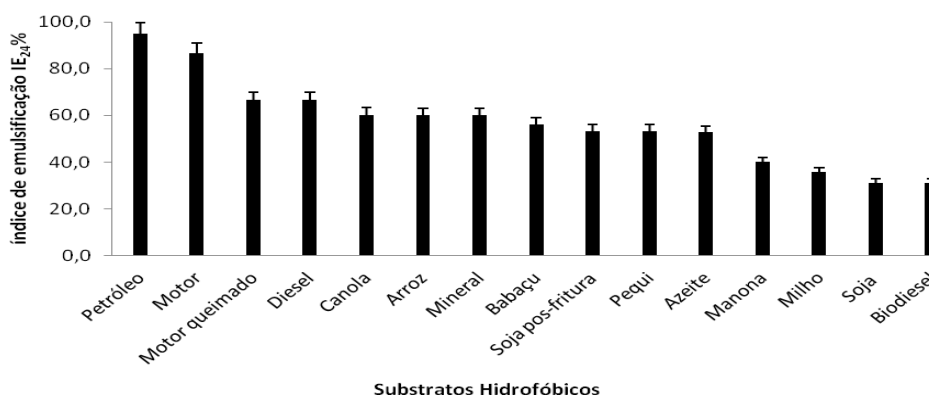
Substratos hidrofóbicos	Viscosidade sem o biodetergente (cP)	Viscosidade com o biodetergente (cP)
Óleo de motor	736.6	98.49
Óleo de motor queimado	148.9	68.67
Petróleo	754.1	0.56
Diesel	36.0	18.48
Biodiesel	374	3.57
Óleo de canola	47.6	2.13
Óleo de milho	472.8	8.98
Óleo de soja	380.1	17.9
Óleo de soja pós-fritura	187.9	21.7
Óleo de girassol	355.5	3.98
Óleo de arroz	459.9	24.73
Óleo mineral	27.0	12.44
Óleo de oliva	5.46	5.67
Óleo de babaçu	403.0	12.83
Água (controle)	0.96	5.89

O efeito na redução da viscosidade de óleos e ao seu elevado potencial em formar emulsões indica sua aplicação na área de cosméticos, em especial para a formulação de xampus, considerando os valores de viscosidade. O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzida a partir de micro-organismos é baseado em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, de-mulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos (MULLIGAN et al., 2001; BOGNOLO, 1999).

3.2.2 Determinação poder emulsificante do Biodetergente

No presente estudo, uma emulsão consistente foi formada em ambos os substratos hidrofóbicos o do petróleo e óleo motor com valores acima de 80%. No entanto, os óleos vegetais mostraram valores próximos de 60% (Figura 1). Os resultados com biodetergente confirmam ele foi capaz de causar a emulsificação de sistemas bifásicos (água e óleo). Estes valores obtidos foram compatíveis com a produção bioemulsificante fúngica e bacteriana descritas na literatura.

Figura 1. Índice de Emulsificação (E_{24}) do biodetergente utilizando vários substratos hidrofóbicos.



Devido as suas propriedades, como biodegradabilidade, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade, alta seletividade e atividade específica em temperaturas extremas, pH e salinidade terem conquistado uma maior importância em aplicações industriais e ambientais, tais como biorremediação, lavagem do solo, recuperação avançada de petróleo e outros processamentos de óleo relacionados às indústrias em geral (LUNA et al., 2010).

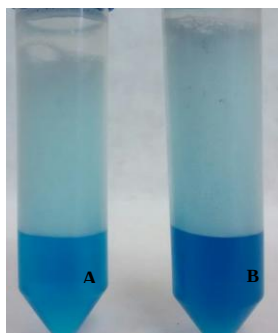
Surfactantes de origem microbiana são agentes tensoativos com capacidade de detergência, emulsificação, dispersão de fases, que podem ser aplicados em processos de descontaminação de ambientes poluídos com lipídios. Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (NITSCHKE, 2002). A maioria dos surfactantes em uso é derivada de petróleo, porém o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado devido a sua diversidade, características ambientais favoráveis, possibilidade de produção através de fermentação e potencial aplicação em diversas áreas do setor industrial (PINTO, 2009).

Os resultados sugerem que o biodetergente é um candidato a ser utilizado na limpeza mediada de ambientes contaminados com esses substratos, seja eles na área ambiental, doméstico e industrial. O uso de detergentes promove redução de viscosidade, formação de emulsões de óleo/água facilita o bombeamento do aproveitamento dos óleos usados, depois de quebrar da emulsão. Os sólidos resultantes transportar uma quantidade limitada de resíduos de óleo devido à ação detergente de biossurfactantes fazendo o descarte desses resíduos menos problemática (BOGNOLO, 1999).

3.2.3 Determinação poder espumante do Biodetergente

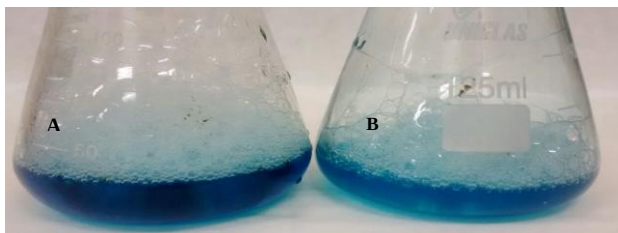
Na avaliação de um detergente para lavagem manual de louças o consumidor, na maioria das vezes, iguala a eficiência da limpeza com a capacidade espumante da formação e então julga a qualidade do produto pela quantidade de espuma gerada, pela sua textura e pela sua persistência durante o processo de lavagem de louças (BARBOSA et al., 2013). Neste sentido realizou-se uma avaliação do poder espumante do biodetergente, comparando a produção de espuma entre o biodetergente produzido e o detergente sintético comercial, após esses ensaios observou-se que não houve diferença significativa na produção de espuma entre os tipos de condições submetidas, mostrando que o biodetergente, assim como o detergente comercial, não perde facilmente o poder espumante como acontece com os sabões, conforme figura 1. Em relação ao tamanho da espuma e ao tempo de formação o biodetergente obteve 5,2 cm, com duração de duas horas e quinze minutos enquanto que o detergente sintético obteve 6,5cm tamanho da espuma, porém apenas trinta minutos de duração.

Figura 1. Resultado da produção de espuma formada comparando o biodetergente produzido (A) e o detergente sintético comercial (B).



O uso do corante foi para facilitar a visualização da espuma formada. Conforme mostrado na figura 2 demonstra que o biodetergente produzido (B) possui potencial para competir com o comercial (A) e assim substituir produtos de limpeza não degradáveis por biodegradáveis. A estabilização de espuma ocorre por um efeito semelhante ao da estabilização de emulsões pela migração do tensoativo da estrutura das micelas para novas superfícies criadas. Quando uma solução de tensoativo, que se encontra em sua concentração micelar crítica, é agitada, pequenas bolhas de ar podem entrar na solução. Essas bolhas de ar formam novas superfícies água-ar, em um processo muito semelhante ao de formação de uma emulsão, quando se utiliza um óleo em água (ROSEN, 2004; SALAGER, 1999).

Figura 2. Avaliação visual do poder espumante do biodetergente (B) e um detergente sintético (A).



Os processos de lavagem e de preparação de emulsões necessitam de agitação da solução ou mistura aquosa para que ocorram a solubilização dos tensoativos utilizados, a redução do tamanho das gotículas de óleo, a retirada da sujeira e a distribuição das micelas por todas as parcelas do líquido, garantido que os processos de detergência e emulsão sejam eficientes, uma vez que esses dois processos ocorrem sempre em presença de micelas (SCAMEHORN et al., 2004).

3.2.4 Determinação da ação de Detergência

Na avaliação de detergência em tecidos de algodão branco que simulou uma lavagem por agitação com quatro tipos de sujidades, após o tempo de lavagem comparou-se a eficiência da remoção das sujidades e foi verificado que os tecidos lavados com o biodetergente apresentou capacidade na remoção das sujidades igual ou mesmo superior ao detergente comercial sintético, mostrando assim um excelente poder detergência, conforme Figura 3.

Sabões e detergentes pode ser descrito como possuindo características semelhantes como agentes tensoativos. Um papel amplamente aceito aos biossurfactantes é aumentar a absorção de substratos insolúveis (MUKHERJEE, 2006; ARORA et al., 2015).

O efeito de detergência acontece pelo mesmo mecanismo em qualquer superfície suja durante o processo de lavagem com um tensoativo, seja um tecido, um prato, ou outro qualquer. Essa sujidade oleosa está situada sobre substrato e quando é imerso em solução aquosa de contendo o tensoativo aniônico que esteja em concentração micelar crítica, as moléculas do tensoativo em micelas rapidamente ocupam as superfícies do óleo com a água e do substrato com a água, a sujidade vai se deformando e sendo expulsa da superfície do substrato, aumentando a superfície de estabilização de moléculas do tensoativo disponíveis (MILLER, 2002). Os detergentes apresentam a propriedade de baixar a tensão superficial da água, facilitando-lhe a penetração nos tecidos e auxiliando a remover e manter em suspensão as sujeiras (LUNA et al., 2009; SHOWELL, 2006; RUFINO et al., 2014).

Concentração de tensoativo aniônico nas superfícies garante que haverá repulsão entre as gotículas de sujidade e a superfície limpa de forma que, quando uma gotícula se aproximar novamente da superfície, será repelida (MAIER, 2003; MUKHERJEE & DAS 2005).

A Figura 4 mostra o efeito da remoção em percentual e indica claramente a eficácia do biodetergente em relação ao detergente comercial, chegando a índices de 90% de remoção de todas as sujidades testadas, enquanto para o comercial que não passou de 70% na sujidade molho de tomate, também pode ser observado que a remoção das manchas é insignificante quando não existe nenhum detergente.

Figura 3. Avaliação visual da capacidade de remoção das sujidades após a lavagem por agitação e secagem a temperatura ambiente dos tecidos de algodão: A) tecido limpo; B) tecido sujo antes da lavagem; C) lavagem com água (controle); D) lavagem com detergente sintético comercial; E) lavagem biodetergente. Sujidades: 1) suco de uva; 2) iogurte achocolatado; 3) óleo de motor queimado; 4) molho de tomate.

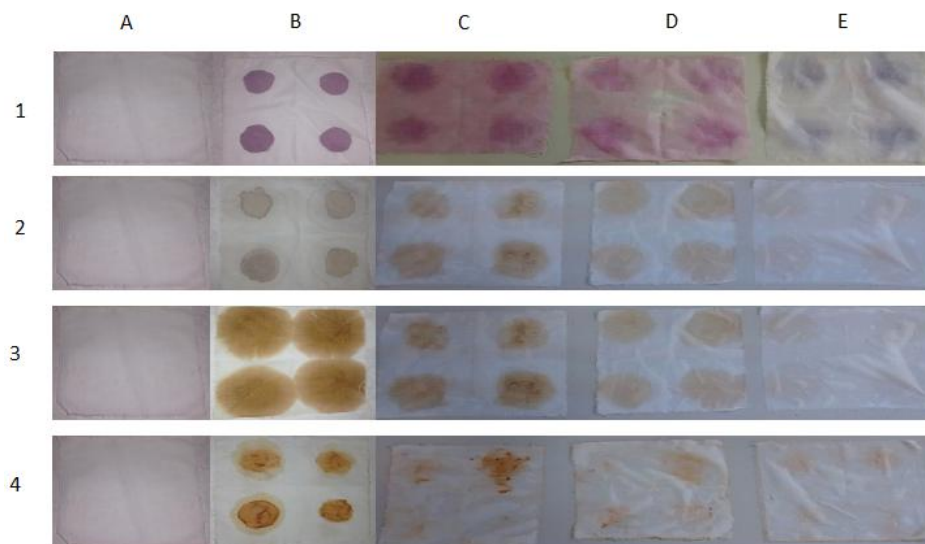
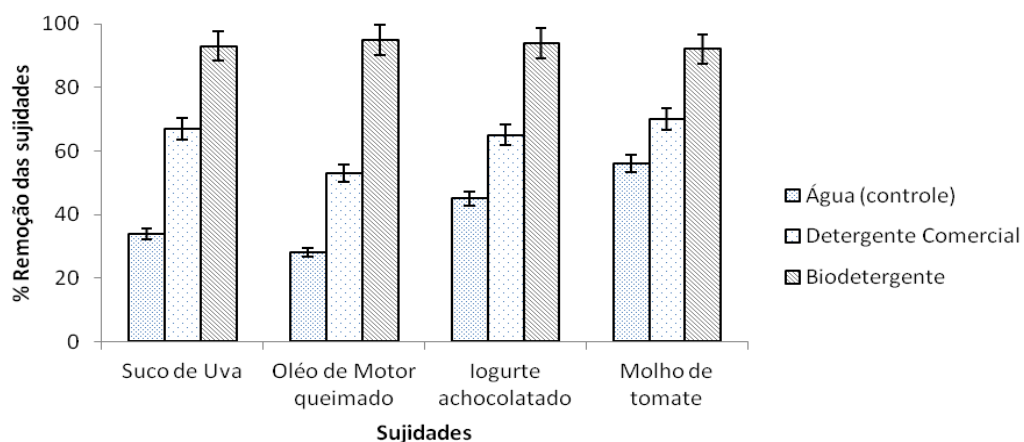


Figura 4. Percentual de remoção de sujidades após lavagem de tecidos com água (controle), Detergente comercial e Biodetergente formulado utilizando como matéria prima o biossurfactante produzido por *Aspergillus niger*



4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o biossurfactante produzido por *Aspergillus niger* pode ser um surfactante eficaz em formulações de detergentes e que seu desempenho é comparável com detergentes comerciais especialmente para a remoção de manchas hidrofílicas, sendo seu uso altamente promissor em vários setores industriais.

5. Referências Bibliográficas

ABIDI, F., LIMAM, F., MARZOUKI, M.N. Purification and characterization of an alkaline protease Prot 1 from *Botrytis cinerea*. Assay as biodegreaser catalyst. Appl Biochem Biotechnol. v.141, p.361–76, 2008.

BAFGHI, M. K.; FAZAELIPOOR, M. H. Application of Rhamnolipid in the Formulation of a Detergent. **J Surfact Deterg.** v. 15, p.679–684, 2012.

BARBOSA, S. A., COELHO, D.F., SILVEIRA, E., TAMBOURGI, E. B., SOUZA, R. R. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* and *Yarrowia lipolytica* and Its Use for Detergent Formulations. **J. Chem. Chem. Eng.** v.7, p.767-773, 2013.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces**, n. 152, p. 41-52, 1999.

BUENO, S. M.; SILVA, A. N.; CRUZ, C. H. G. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. Instituto de Biociências, Letras e Ciências exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil, 2010.

COIMBRA, C.D., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology** v. 58, p.245-249, 2009.

DONIO MBS, RONICA FA, VIJI VT, VELMURUGAN S, JENIFER JS C A, MICHAELBABU M, DHAR P, CITARASU T. *Halomonas* sp. BS4, A biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. **Springer Plus.** v.2, p.149-159, 2013.

GUDIÑA, E.J., J.F. PEREIRA, L.R. RODRIGUES, J.A. COUTINHO, J.A. TEIXEIRA, 2013. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in

Microbial Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.68, p. 56-64.

JARA, A.M.A.T.; ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.101, p.315-318, 2013.

LUNA, J. M.; SARUBBO, L.; TAKAKI, G. M. C. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 52, n.4, p. 785-793, 2009.

MAIER, R.M. Biosurfactant: evolution and diversity in bacteria. **Adv Appl Microbiol** v.52, p.101–121, 2003.

MILLER, C. A. Detergency for engineering applications of surfactant solutions. **Encyclopedia of surface and colloid science**, p. 1379-1384, 2002.

MUKHERJEE, A.K. Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. **Letters in Applied Microbiology**. v. 45, p.330–335, 2007.

MUKHERJEE, A.K., DAS, K. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. **FEMS Microbiol Ecol** , v.54, p.479–489, 2005.

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

NETO, O., G., PINO, J. C. D. **Trabalhando a Química dos Sabões e Detergentes**. In: Universidade Federal do Rio Grande Do Sul. Citado em 22 de novembro de 2014. Disponível em: <<http://www.iq.ufrgs.br/aeq/html/publicacoes/matdid/livros/pdf/sabao.pdf>> Acesso 22 novembro de 2014.

PINTO, M. H.; MARTINS, R.G; COSTA, J.A.V. Avaliação cinética da produção de biosurfactantes bacterianos. **Química nova**, v.32, n.8, p. 2104-2108, 2009.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, p. 249-252, 2002.

ROSEN, M. J. Surfactants and interfacial phenomena. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004.

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**, v.6, p.1-5, 2014.

SALAGER, J. L. Formulaci3n, composici3n y fabricaci3n de emulsiones para obtener las propiedades deseadas: estado del arte. **Cuaderno FIRP S747 M3rida: Escuela de Ingenieria Quimica de la Universidad de los Andes**, 1999. p. B33-B42.

SCAMEHORN, J. F; SABATINI, D. A.; HARWELL. J. H. Surfactants, Part I: Fundamentals. **Encyclopedia of supramolecular chemistry**. p. 1458-1477, 2004.

SHOWELL, M.S. Hand Book of Detergents: part D: formulation. **Boca Raton: CRC Press**, p.530, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

- *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1355 isolado do solo da Caatinga, Pernambuco, Brasil, demonstrou sua habilidade para utilizar resíduos agro-industriais (farelo de trigo e óleos vegetais pós-fritura) como substratos para a produção de biossurfactante;
- O biossurfactante produzido possui excelentes propriedades na redução da tensão superficial da água e na emulsificação de compostos hidrofóbicos;
- O biossurfactante produzido apresentou excelentes propriedades na dispersão de óleo motor queimado em água;
- O biossurfactante produzido apresentou atividade antiadesiva para os micro-organismos (*Bacillus subtilis*, *Salmonella entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Echerichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*);
- O biossurfactante produzido não apresentou efeito inibitório sobre a germinação das sementes e sobre o alongamento das raízes e nem sobre a letalidade em larvas de *Artemia salina*;
- O Biossurfactante isolado apresentou ausência de citotoxicidade para as células cancerígenas testadas;
- O biossurfactante produzido por *Aspergillus niger* UCP/WFCC 1355 pode ser um surfactante eficaz em formulações de detergentes e que seu desempenho é comparável com detergentes comerciais especialmente para a remoção de sujidades.

Email de submissão do artigo 2

Em Domingo, 25 de Janeiro de 2015 22:15, Frontiers Microbiology
<microbiology.editorial.office@frontiersin.org> escreveu:

Dear Dr Campos-Takaki,

We are pleased to inform you that we have received the manuscript below, which will be considered for publication in Frontiers in Microbiology, section Microbiotechnology, Ecotoxicology and Bioremediation.

Title: "Production and characterization of biosurfactant by a novel strain of *Aspergillus niger* UCP/WFCC1355 for potential use in oil dispersant"

Article type: Original Research

Submitted By: Galba Maria De Campos-Takaki

Submitted On: 26 Jan 2015

You can access the review forum and track the progress of your manuscript by

clicking here:

<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Best regards,

Your Frontiers in Microbiology team

Frontiers | Microbiology Editorial Office
www.frontiersin.org | twitter.com/FrontiersIn
EPFL - Innovation Square, building I
Lausanne, Switzerland | T 41(0)21 510 17 11

For technical issues, please contact our IT Helpdesk - support@frontiersin.org

What do I need to do now?

At this moment: not much. You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you will then be able to read the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript, if necessary. In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

http://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=679&name=microbiotechnology,_ecotoxicology_and_bioremediation

Optional: if you wish to specify the contributions of each co-author to this manuscript, please add a statement describing the tasks of individual authors at the end of the revised manuscript. You will be able to submit your revised manuscript after receiving the reviewers' comments. Here are some examples of such statements: http://blogs.nature.com/nautilus/2007/11/post_12.html
<http://www.frontiersin.org/Mail/IbarMail.aspx?op=4&msgid=7449637&msg=In>

Trabalhos publicados durante o doutorado

ANDRADE SILVA, NADIELLY, LUNA, MARCOS, SANTIAGO, ANDRÉ, FRANCO, LUCIANA, **SILVA, GRAYCE**, DE SOUZA, PATRÍCIA, OKADA, KAORU, ALBUQUERQUE, CLARISSA, SILVA, CARLOS, CAMPOS-TAKAKI, GALBA. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. International Journal of Molecular Sciences (Online). Fator de Impacto (2013 JCR): 2,3390, v.15, p.15377 - 15395, 2014.

SILVA, G. K. B., NEGREIROS, J. M., THUMS, N., KENJI, R., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Cinética de Crescimento e lipídeos totais de *Bacillus licheniformis* cultivado com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. CIENTEC: Revista de ciência, tecnologia e humanidades do IFPE. , v.4, p.147 - 151, 2012.

NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, THUMS, N., KENJI, R., CAMPOS-TAKAKI, G. M, OKADA, K. Produção de astaxantina por *Mucor circinelloides* a partir de meio de cultura de baixo custo (milhocina e quirera de milho). CIENTEC: Revista de ciência, tecnologia e humanidades do IFPE., v.3, p.124 - 131, 2011.

SILVA, G. K. B., NEGREIROS, J. M., SILVA, N. R. A., SILVA, T. A. L. E., BARBOSA, R. N., OLIVEIRA, N. T., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. 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.1 ed.Madrid : hardback, 2014, p. 65-69.

NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, CORDEIRO, C. C. S., LINS, M. C. M., FRANCO, L. O., SILVA, C. A. A., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Isolation, identification and phenotypic characterisation of *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil in Pernambuco, Brazil In: Industrial, medical and environmental applications of microorganisms Current status and trends.1 ed.Madrid : hardback, 2014, v.1, p. 119-123.

SILVA, G. K. B., BRANDAO, R. M. O., LINS, M. C. M., CAMPELO, B., SILVEIRA, A. A. B., SANTOS, G. K. N., NAVARRO, D. M. A. F., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biomass and Lipid production by *Cunninghamella elegans* UCP 542 using glycerin as carbon source In: Microbes in applied Research.1 ed.Madrid : World Scientific, 2011, v.1, p. 339-343.

ACIOLY, L. M., SILVEIRA, A. A. B., ANJOS, M. N. V., **SILVA, G. K. B.**, LEITE, M. V., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel as an alternative medium In: Microbes in applied Research.2 ed.Madrid : World Scientific, 2011, v.1, p. 344-347.

LIMA, R. A., FONTENELE, R. A., RODRIGUEZ, D. M., **SILVA, G. K. B.**, ARAUJO, H. W. C., JARA, A. A. T., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Agroindustrial wastes as unconventional substrates for a new lipopeptide biosurfactant production by *Candida glabrata* and producing a lipopeptide biosurfactant, 2014.

SILVA, G. K. B., SILVA, N. R. A., SILVA, T. A. L. E., OKADA, K., SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production of Biosurfactant from renewable resources by *Aspergillus niger*, 2014.

SILVA, N. R. A., SILVA, **G. K. B.**, SILVA, T. A. L. E., SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production using media containing agro-industrial residue by *Cunninghamella* sp. isolated Caatinga soil of Pernambuco, Brazil through factorial design, 2013.

SILVA, G. K. B., NEGREIROS, J. M., SILVA, T. A. L. E., BARBOSA, R. N., OLIVEIRA, N. T., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization of *Aspergillus niger* isolated from soil of Caatinga (Pernambuco, Brazil) with potential to produce biosurfactants, 2013.

LUNA, M. A. C., MARQUES, N. S., SILVA, **G. K. B.**, SILVA, M. C. F., TAKAKI, G.M.C. DESCOLORAÇÃO DO VERDE MALAQUITA POR *Cunninghamella elegans* UCP 542, 2013.

GOMES, M. D. P., NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, OLIVEIRA, R. P., CORDEIRO, C. C. S., LIMA, R. A., SOUZA, P. M., SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Effect of different concentrations of banana flour and corn steep liquor on growth radial *Cunninghamella echinulata* using design factorial, 2013.

NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, CORDEIRO, C. C. S., LINS, M. C. M., SILVA, C. A. A., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Isolation, Identification and Phenotypic Characterization of *Rhizopus microspores* var. *chinensis*, *Rhizopus microspores* var. *microspores* and *Rhizopus stolonifer* isolated from soil of the Caatinga in Pernambuco, Brazil, 2013.

MARQUES, N. S., SOUZA, P. M., SILVA, M. C. F., **SILVA, G. K. B.**, CAMPOS-TAKAKI, G. M, OKADA, K. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Mucor ramosissimus* NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, 2013.

CAMPOS-TAKAKI, G. M, SILVA, A. M., RIBEIRO, D. L. R., **SILVA, G. K. B.**, NEGREIROS, J. M., SANTOS, Y. M. F., ALBUQUERQUE, C. D. C. Production of biomass and chitosan by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial waste, 2013.

SANTOS, R. D. L., RIBEIRO, M. A., SANTOS, B. W., **SILVA, G. K. B.**, SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. SIMULTANEOUS PRODUCTION OF LIPIDS AND BIOSURFACTANT BY *Aspergillus niger* UCP ISOLATED FROM CAATINGA SOIL OF PERNAMBUCO, BRAZIL, 2013.

MOURANT, K., LEITE, M. V., NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, SILVA, C. A. A., FRANCO, L. O., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Aspergillus e Penicillium* ISOLADOS DE SOLO DA CAATINGA EM PERNAMBUCO, BRASIL: IDENTIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE TANASE, 2012.

NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, ROSA, N., FRANCO, L. O., LIMA, M. A. B., GUSMAO, N., MESSIAS, A. S., CAMPOS-TAKAKI, G. M., SILVA, C. A. A. Filamentous Fungi Isolation related to caatinga soil composition from Pernambuco, Brasil, 2012.

SILVA, H. L., LEITE, M. V., **SILVA, G. K. B.**, NEGREIROS, J. M., SILVA, A. M., LUNA, M. A. C., NASCIMENTO, A. E., CAMPOS-TAKAKI, G. M. FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO DA CAATINGA-PE: IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E DETECÇÃO DE POLIFENOLOXIDASE, 2012.

ROSA, N., LUNA, M. A. C., LIMA, M. A. B., NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS DE SOLOS DA CAATINGA (PE, BRASIL) E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ENZIMAS, 2012.

GOMES, M. D. P., NEGREIROS, J. M., **SILVA, G. K. B.**, LIMA, R. A., OLIVEIRA, R. P., SOUZA, P. M., SILVA, C. A. A., CAMPOS-TAKAKI, G. M. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Cunninghamella echinulata* EM MEIOS DE CULTURA CONVENCIONAL E ALTERNATIVO, 2012.

NEGREIROS, J. M., ROSA, N., **SILVA, G. K. B.**, FRANCO, L. O., NASCIMENTO, A. E., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E DETECÇÃO DE LIPASE E PROTEASE EM AMOSTRAS DE *Fusarium* ISOLADOS DE SOLO DA CAATINGA EM PERNAMBUCO-BRASIL, 2012.

SILVA, G. K. B., GALINDO, H., CAMPELO, B., SILVA, A. M., NASCIMENTO, A. C. C., CAMPOS-TAKAKI, G. M., SILVA, C. A. A. Lipase activiteies from *Aspergillus* strains isolated from Caatinga soil, Brasil, 2012.

SILVA, G. K. B., NEGREIROS, J. M., FONTENELE, R. A., OKADA, K., CAMPOS-TAKAKI, G. M. SCREENING DE LINHAGENS *Aspergillus* SPP PRODUTORAS DE BIOSSURFACTANTES, 2012.

BRANDAO, R. M. O., SILVA, N. R. A., MOURA, P. A., **SILVA, G. K. B.**, ANJOS, M. N. V., NAVARRO, D. M. A. F., OKADA, K. Perfil de ácidos graxos por *Mucor circinelloides* utilizando glicerina como substrato, 2011.

Marcos Antônio Cavalcanti Luna, Amanda de Araujo Alencar, Deborah de Souza Pereira Silva, Ladiel Luiz Pedroza Tavares, **Grayce Kelli Barbosa da Silva**, Jaceline Maria de Negreiros Lima, Adriana Ferreira de Souza, Nadielly Regina Andrade Silva, Paulo Henrique da Silva, Galba Maria de Campos Takaki. Seleção de fungos anamórficos isolados de solo da Caatinga- PE, Brasil com potencial na produção de lipídeos. Congresso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Fabiola Carolina Gomes de Almeida, **Grayce Kelli Barbosa da Silva**, Patrícia Mendes de Souza, Thayse Alves de Lima e Silva, Elias Basile Tambourgi, Galba Maria de Campos Takaki . STUDIES OF THE EMULSIFYING PROPERTIES OF THE BIOSURFACTANT PRODUCED BY *Pantoea* sp. Congresso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Nairane Rosa, Jaceline Lima, Roberta Reis, Adriana Souza, **Grayce Silva**, Paulo Silva, Galba Takaki, Kaoru Okada. Comparison of different methods for extraction of lipids from *Aspergillus* spp. Congresso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Dayana Montero Rodríguez, Rosileide Fontenele da Silva Andrade, Roberto Albuquerque Lima, **Grayce Kelli Barbosa da Silva**, Daylin Rubio Ribeaux, Paulo Henrique da Silva, Hélvia Waleska Casullo de Araújo, Galba Maria de Campos-Takaki. Microbial lipids produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549: a promising potential feedstock for biodiesel production. Congresso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Grayce Kelli Barbosa da Silva, Dayana Montero Rodriguez, Fabíola Carolina Gomes Almeida, Thayse Alves Lima e Silva, Daniele Gilvanise de Sousa , Paulo Henrique da Silva, Galba Maria Campos Takaki. **Characterization and biological activity of a biosurfactant produced by *Aspergillus niger* isolated from the soil of Caatinga, PE, Brazil.** Congresso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Grayce Kelli Barbosa da Silva, Jaceline Maria Negreiros Lima, Adriana Ferreira de Souza, Manuela Cristina Mota Lins, Davi de Lima Calvacanti, Marcos Antonio Calvacanti Luna, Paulo Henrique da Silva, Galba Maria Campos Takaki. Effect of salinity on the radial growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* isolated from the soil Caatinga- PE, Brazil. Congresso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Manuela Cristina Mota Lins, Adriana Ferreira de Souza, Jaceline Maria de Negreiros Lima, **Grayce Kelli Barbosa da Silva**, Roberta Sampaio Pinho, Wolfgang Harand; Paulo Henrique da Silva, Daniele Gilvanise de Souza, Norma Buarque de Gusmão and Galba Maria Campos-Takaki . Optimization of culture medium for biodiesel production by *Mortierella isabellina* using glycerin and corn steep liquor residues. Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Adriana Ferreira de Souza, Manuela Cristina Mota Lins, Marcos Antônio Cavalcante Luna, Roberta Sampaio Pinho, Wolfgang Harand , Jaceline Maria de Negreiros Lima, Daniele Gilvanise de Souza, **Grayce Kelli Barbosa da Silva**, Nairane da Silva Rosa , Paulo Henrique da Silva, Galba Maria de Campos-Takaki. Evaluation of the profile of fatty acids produced by *Cunninghamella echinulata* cultivated on agroindustrial wastes, aiming to the production of biodiesel. Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Daniele Gilvanise de Souza; Yuri Max de França Santos; Davi de Lima Cavalcanti; Manuela Cristina Mota Lins; **Grayce Kelli Barbosa da Silva**; Adriana Ferreira de Souza; Paulo Henrique da Silva and Galba Maria de Campos Takaki. Biosurfactant production by filamentous fungi *Cunninghamella elegans* UCP 0596 in medium supplemented with agroindustrial wastes. Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2014.

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

Rodrigo Duarte de Lima Santos.

Simultaneous production of lipids and biosurfactant by *Aspergillus niger* UCP 1263 isolated from caatinga soil of Pernambuco, Brazil. 2013. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Católica de Pernambuco

Hismone Laisa Silva.

Isolamento e Seleção de fungos filamentosos da caatinga nordestina com potencial biotecnológico de produção de tanase. 2012. Iniciação científica - Universidade Católica de Pernambuco

Rejane Maria de Oliveira Brandão.

Perfil de ácidos Graxos por *Mucor circinelloides* utilizando glicerina como substrato. 2010. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Católica de Pernambuco.

