



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS
DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA**

MICHELE ALVES SANCHES

Linha de pesquisa: 2.1 Bioprospecção e Desenvolvimento de Bioprocessos e Bioprodutos.

**Manaus-AM
2021**

MICHELE ALVES SANCHES

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS
DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO AMAZÔNICA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito final para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Coorientadora: Prof. Dr^a Patrícia Melchionna Albuquerque

**Manaus-AM
JULHO/2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

S211p Sanches, Michele Alves
Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes produzidos por fungos isolados de amostras de solo da região amazônica / Michele Alves Sanches, Manaus : [s.n],
2021
97 f.: color.; 30 cm.
Tese - Programa de pós-graduação em biodiversidade e biotecnologia - Rede Bionorte - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.
Inclui bibliografia
Orientador: Souza, João Vicente Braga de Souza
Coorientador: Albuquerque, Patrícia Melchionna
1. emulsificante. 2. Fungo filamentosos. 3. bioproduto. 4. bioprocesso submerso. I. Souza, João Vicente Braga de Souza (Orient.). II. Albuquerque, Patrícia Melchionna (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes produzidos por fungos isolados de amostras de solo da região amazônica

MICHELE ALVES SANCHES

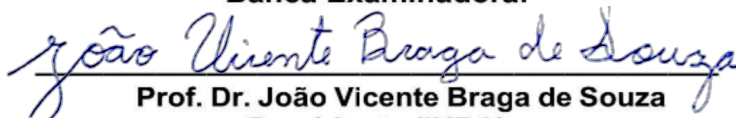
**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTES
PRODUZIDOS POR FUNGOS ISOLADOS DE AMOSTRAS DE SOLO DA REGIÃO
AMAZÔNICA.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de
Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia
Legal, na Universidade do Estado do
Amazonas, como requisito para obtenção do
título de Doutor em Biodiversidade e
Conservação.

Orientador: **Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza**

Coorientadora: **Prof. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque**

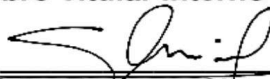
Banca Examinadora:



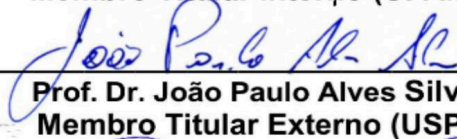
Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Presidente (INPA)



Prof. Dr. Héctor Henrique Ferreira Koolen
Membro Titular Interno (UEA)



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro Titular Interno (UFAM)



Prof. Dr. João Paulo Alves Silva
Membro Titular Externo (USP)



Prof. Dr. Rogério Eiji Hanada
Membro Titular Externo (INPA)

Dedico este trabalho com todo meu amor aos meus avós Nestor Pereira Sanches (*in memorian*) e Maria Paulina Alves Sanches (*in memorian*), minha mãe Sr^a Luiza Alves Sanches e ao meu esposo Rodrigo da Silva Lima.

AGRADECIMENTOS

Louvo a Deus por estes...

Dr. João Vicente Braga de Souza. Seu altruísmo perdura! A admiração que tenho se firmou cada vez mais e para mim é uma honra tê-lo como meu orientador. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos, direcionamentos, oportunidades, profissionalismo, por me forjar nesse doutorado e me fazer compreender que tudo foi necessário.

“Cada correção que você recebe é um enriquecimento para o seu trabalho e oportunidade para ajudar outros” – Dr. João.

Dr^a Patrícia Melchionna Albuquerque, minha coorientadora. Sua elegância, inteligência, empatia e carisma são admiráveis! Obrigada por toda colaboração desde o mestrado e por me dar segurança quando dizia: *“Qualquer coisa estou aqui”*.

A Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia-Rede Bionorte (PPG-BIONORTE) pela oportunidade ao ingresso no doutorado e por todo suporte.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela concessão da bolsa, subsídio a divulgação deste trabalho e pela estrutura para desenvolvimento do presente trabalho, respectivamente.

A Central Analítica IQ-USP e ao Sr. Márcio Nardelli Wandermuren pelo suporte às análises de caracterização química.

Ao Instituto Leônidas & Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ pelas análises de sequenciamento.

A Central analítica do grupo de pesquisa Química aplicada a tecnologia/UEA, em especial a doutoranda Juliana Gisele Rodrigues que me acompanhou gentilmente nas análises de tensiometria.

Ao laboratório de Micobacteriologia gerenciado pelo Dr. Maurício Ogusku por todo suporte quando necessário.

Ao Laboratório de atividades biológicas – BIOPHAR/UFAM pela análise de citotoxicidade.

Aos examinadores deste trabalho: Dr. Hector Koolen, Dr. Rogério Hanada, Dr. João Paulo Silva e Dr. Emerson Lima, por toda colaboração e críticas.

Aos colegas da turma de 2017, em especial a amizade, companheirismo e incentivo da Dra. Luana Lopes Casas, eu sempre terei orgulho e admiração pela dedicação e zelo que você teve na sua tese, você foi exemplar e motivadora para mim. Obrigada por me ajudar principalmente quando estava perdida em meio as angústias e não conseguia raciocinar direito. Superestimo sua pessoa!

Como sou feliz em ter os “micomaníacos” em minha vida, em especial aqueles que foram um refrigerio nesses últimos momentos: Dr^a Erica Simplício, o braço direito, calmaria e auxiliadora do prof. João. Obrigada por todo apoio. Dr^a Ana Cortez, que desde o início me acolheu no laboratório e compartilhou seus conhecimentos valiosos sobre a micologia, a dona Vanuza e Nete que também sempre nos ajudou, às vezes com uma simples alimentação quando não tinha tempo para preparar em meio a correria.

Ao MSc. Kevyn, MSc. Raissa, MSc. Juan, Dr^a Silviane, Dr^a Flávia, Lohayna e em especial aos meus amigos, companheiros e padrinhos Dr^a Luciana Aires e Dr. Walter Segundo, vocês tornaram essa jornada mais leve. Obrigada pelos *brain storms*, pelos lanches, almoços e por todo suporte. É um presente ter a amizade de vocês! Tenho grande carinho por cada um, obrigada por tudo!

À um grupo de amizade especial: Ju, Izabelle, Tamires, Juliana, Cecília, Taty, Débira, Sarah, Tuanny e Tharsila. Ciência também é fé! Obrigada por me cobrir de ânimo e orações durante meus apelos!

À minha família, mãe Luiza, irmãos Wellington, Maickon, William e sobrinha Thamyres. Quero ser o orgulho e inspiração para vocês! A educação tem poder de mudar realidades!

E com amor, o anjo que o Senhor colocou na minha vida desde quando essa tese era apenas um projeto a ser submetido, obrigada por ser minha torre forte, meu suporte, meu ombro amigo nos momentos difíceis, meu amado esposo Rodrigo Lima.

...meu coração se enche de gratidão, porque nunca estive sozinha. Obrigada!

Senhor meu Deus!
Quantas maravilhas tens feito!
Não se pode relatar os planos que
preparaste para nós!
Eu queria proclamá-los e anunciá-los,
mas são por demais numerosos!
Salmos 40:5

SANCHES, Michele Alves. Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes produzidos por fungos isolados de solo amazônico. 2021. 96 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

RESUMO

Os biossurfactantes são considerados as moléculas do século XXI por causa das aplicações nos processos industriais de biorremediação, na elaboração de produtos farmacêuticos e na tecnologia de alimentos por sua capacidade de emulsificação e redução da tensão superficial/interfacial. Entre os organismos vivos, os fungos filamentosos destacam-se como potenciais fontes dessas substâncias. Novos ambientes necessitam ser estudados com a finalidade de se obter novos produtores de biossurfactante, esses isolados produtores de biossurfactantes possuem potencial para a redução dos custos de produção e tornar os bioprocessos economicamente viáveis. O Laboratório de micologia do INPA vem realizando a bioprospecção de fungos produtores de biossurfactantes de amostras de solo amazônico. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes produzidos por fungos isolados de amostras de solo da Região Amazônica. Assim, foi realizada a coleta de solo e serapilheira na reserva da campina, desse isolamento foram selecionados fungos produtores de biossurfactantes e identificados por meio dos aspectos micromorfológico, macromorfológico e sequenciamento do DNA. Os fungos foram submetidos aos ensaios de cinética, influência de fatores nutricionais por meio de experimento univariado e multivariado, precipitação, caracterização química, ensaio do efeito de diferentes concentrações de NaCl, pH e temperatura, e por fim, ensaios de atividade biológica e aplicação em emulsão. 154 fungos foram isolados de solo e serapilheira, sendo os fungos *Clonostachys rosea* 24 e *Fusarium oxysporum* LM 5634 considerados bons produtores de biossurfactante. *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM 5634 foram capazes de produzir os biossurfactantes em diversos substratos de fonte de carbono de nitrogênio. *F. oxysporum* LM 5634 possui atividade antifúngica contra *Candida albicans* e capacidade de emulsionar formulação a base de óleo e creme. Ambos os fungos não possuem atividade citotóxica. A partir das análises de caracterização química, inferiu-se que o biossurfactante é formado por ácidos graxos e pode estar associado a outras biomoléculas.

Palavras-chave: Emulsificante, fungo filamentosos, bioproduto, bioprocessos submersos

SANCHES, Michele Alves. Production, characterization and application of biosurfactants obtained by fungi obtained from Amazonian soil. 2021. 97 p. Thesis (PhD in Biotechnology) - Amazonas State University, Manaus, 2021.

ABSTRACT

Biosurfactants are considered the molecules of the 21st century because of their applications in industrial processes of bioremediation, in the elaboration of pharmaceutical products and in food technology for their capacity to emulsify and reduce surface/interfacial tension. Among living organisms, filamentous fungi stand out as potential sources of these substances. New environments need to be studied in order to obtain new biosurfactant producers, these isolated biosurfactant producers have the potential to reduce production costs and make bioprocesses economically viable. INPA's Mycology Laboratory has been conducting bioprospecting for fungi that produce biosurfactants from Amazonian soil samples. In this context, the objective of this work was to investigate the production, characterization and application of biosurfactants produced by fungi isolated from soil samples from the Amazon region. Soil and litter were collected in the campina reserve, from this isolation fungi producing biosurfactants were selected and identified through micromorphological, macromorphological and DNA sequencing aspects. The fungi were subjected to kinetics tests, influence of nutritional factors through univariate and multivariate experiment, precipitation, chemical characterization, test of the effect of different concentrations of NaCl, pH and temperature, and finally, biological activity tests and application in emulsion. 154 fungi were extended from soil and litter, being the fungi *Clonostachys rosea* 24 and *Fusarium oxysporum* LM 5634 considered good biosurfactant producers. *C. rosea* 24 and *F. oxysporum* LM 5634 were able to produce the biosurfactants on several nitrogen carbon source substrates. *F. oxysporum* LM 5634 has antifungal activity against *Candida albicans* and the ability to emulsify under oil and cream. Both fungi have no cytotoxic activity. From the chemical characterization analyses, it was inferred that the biosurfactant is formed by fatty acids and may be associated with other biomolecules.

Keywords: Emulsifier, filamentous fungus, bioproduct, submerged bioprocess

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
INTRODUÇÃO	16
Tensoativos sintéticos vs. biossurfactantes	17
Produção de Biossurfactante por Ascomicetos	20
Biossíntese de biossurfactantes	23
Influência do bioprocessamento e das condições nutricionais na produção de biossurfactantes	24
Extração, purificação e caracterização química de biossurfactantes.....	27
Aplicações industriais	29
Conclusão	30
Referências bibliográficas	31
3 CAPÍTULO 1	37
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS AMAZÔNICOS ISOLADOS DE SOLO E SERAPILHEIRA	37
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	39
Isolamento e preservação dos fungos.....	39
Identificação taxonômica dos fungos.....	39
Identificação molecular do isolado produtor de biossurfactante.....	40
Seleção da produção de biossurfactantes por fungos isolados de solo e serapilheira	41
Cinética da produção de biossurfactantes	41
Influência das condições de cultivo na produção de biossurfactante.....	42
Ensaio analítico	43
Análise estatística.....	44
RESULTADOS	44
Isolamento e produção de biossurfactante por fungos isolados da serapilheira e do solo	44
Identificação taxonômica e molecular do melhor produtor	46
Cinética dos melhores produtores de biossurfactantes.....	47
Efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactante.....	48
Planejamento fatorial 2 ³ completo para as condições de produção de biossurfactante.....	50
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	58
4 CAPÍTULO 2	61
RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR <i>Fusarium oxysporum</i> LM 5634 E <i>Clonostachys rosea</i> 24 ISOLADOS DE SOLO AMAZÔNICO	61

INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	62
Micro-organismos	62
Produção de biossurfactante.....	62
Avaliação do rendimento do biossurfactante a partir de dois métodos de extração	63
Caracterização do biossurfactante bruto	63
Análise estatística.....	64
RESULTADOS	65
Rendimento da extração do biossurfactante a partir do caldo fúngico	65
Caracterização de biossurfactantes por análise de FTIR e CG/MS	66
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	73
5 CAPÍTULO 3	75
<i>TOXICIDADE, ESTABILIDADE E APLICABILIDADE DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS PELOS FUNGOS <i>Fusarium oxysporum</i> LM 5634 E <i>Clonostachys rosea</i> 24 ISOLADOS DO SOLO AMAZÔNICO</i>	75
INTRODUÇÃO	75
MATERIAL E MÉTODOS	76
Micro-organismos	76
Condições de cultivo para a produção de biossurfactantes	76
Determinação da estabilidade de biossurfactante do caldo livre de células.....	76
Precipitação do biossurfactante do meio de cultivo com etanol 99,5 %	77
Ensaio de citotoxicidade.....	77
Testes para aplicação do biossurfactante	78
RESULTADOS	80
Efeito da temperatura, salinidade e pH na estabilidade do biossurfactante presente no caldo bruto por <i>Clonostachys rosea</i> 24 e <i>Fusarium oxysporum</i> LM5634.	80
Ensaio de citotoxicidade.....	81
Atividade antimicrobiana de extratos de biossurfactantes e caldo livre de células	82
Teste de aplicação	83
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	86
6 CONCLUSÃO	88
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8 ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Agentes de superfícies ativas (surfactantes) são compostos que reduzem a tensão superficial/interfacial entre duas superfícies, pois possuem uma estrutura química com dois grupos funcionais diferentes, conferindo a propriedade anfífilica (NAKAMA, 2017). Os surfactantes são utilizados industrialmente para misturar substâncias imiscíveis com aplicação na formulação de cremes, shampoos e detergentes (LÉMERY et al., 2015). Recentemente, uma classe específica de surfactantes, os biossurfactantes vem destacando-se devido a mobilização mundial frente a bioeconomia e a ecossustentabilidade (MARCHANT; BANAT, 2012).

Os biossurfactantes são surfactantes produzidos por organismos vivos como micro-organismos, plantas e animais. Esses tipos de surfactantes são em geral mais biodegradáveis e apresentam menor toxicidade (SOBRINHO et al., 2013) (KHOPADE et al., 2012) quando comparados aos surfactantes derivados químicos do petróleo. Entre os potenciais micro-organismos produtores de biossurfactantes destacam-se as bactérias e leveduras. No entanto, recentemente, fungos filamentosos estão se destacando como produtores da substância (BHARDWAJ, 2013).

O uso industrial de biossurfactantes não é competitivo frente a produção de surfactantes derivados de petróleo, por isso a busca por novos fungos produtores faz-se necessária, pois fungos de grande produtividade aumentam a viabilidade econômica dos bioprocessos. Na região Amazônica, poucos estudos foram realizados bioprospectando o potencial de fungos filamentosos na produção de biossurfactantes (SENA et al., 2018). Entre os poucos estudos deve-se citar investigações que demonstram o potencial desse grupo de fungos isolados de macrófitas de águas contaminadas (LIMA et al., 2016), solo (SENA et al., 2018) e plantas (DA SILVA et al., 2019) como produtores de biossurfactantes.

O isolado *F. oxysporum* LM 5634 destacou-se em uma investigação de seleção de fungos produtores de biossurfactantes (SENA, 2014). Resíduos regionais puderam ser utilizados por essa espécie como substrato para produção desse bioativo (SANCHES, 2016). No entanto, estudos quanto à caracterização, estabilidade, toxicidade e aplicação dos biossurfactantes produzidos por esse isolados ainda não foram realizados. Em adição a essa lacuna científica, deve-se destacar a necessidade de estudos de novos ambientes da Amazônia para isolamento de fungos para serem prospectados quanto produção de biossurfactante. Entre aos ambientes Amazônicos inexplorados quanto a essa abordagem,

incluem-se as campinas Amazônicas, ecossistemas Amazônicos associados a solos pobres e arenosos (GUIMARÃES E BUENO, 2016).

Diante ao apresentado, a presente tese estudou o isolamento de novos potenciais isolados de fungos filamentosos produtores de biossurfactantes do ambiente amazônico de campina. A abordagem possui potencial de gerar opções de biossurfactantes capazes de serem produzidos de forma controlada em bioprocessos conduzidos em biorreatores industriais. A bioeconomia regional e o uso da diversidade são um caminho adequado para o desenvolvimento da Amazônia e uma abordagem como essa possui grande potencial para desenvolver a economia regional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica está sendo apresentada na forma de artigo de revisão a qual foi aceito para publicação na revista *International Journal of Microbiology* intitulado “*Production of biosurfactants by Ascomycetes*”. No Anexo I encontra-se a versão em inglês.

Artigo de Revisão

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR ASCOMICETOS

Michele Alves Sanches¹, Isabella Galvão Luzeiro², Ana Cláudia Alves Cortez³, Érica Simplício de Souza⁴, Patrícia Melchionna Albuquerque⁴, Harish Kumar Chopra⁵, João Vicente Braga de Souza³

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Bionorte, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Brasil.

²Programa de Iniciação Científica do INPA. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil.

³Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil.

⁴Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil.

⁵Departamento de Química, Instituto de Engenharia e Tecnologia Sant Longowal, Sangrur, Longowal-148106, Pb, Índia.

Resumo: Os surfactantes são utilizados para reduzir a tensão superficial em sistemas aquosos e não aquosos. Atualmente, a maioria dos surfactantes sintéticos são derivados do petróleo. No entanto, esses surfactantes são geralmente tóxicos e pouco degradados por micro-organismos. Para superar esses problemas associados aos surfactantes sintéticos, a produção de surfactantes microbianos (chamados de biossurfactantes) tem sido estudada nos últimos anos. A maioria dos estudos que investigam a produção de biossurfactantes tem sido associada principalmente a bactérias e leveduras; no entanto, há evidências emergentes de que aqueles derivados de fungos são promissores. Os fungos filamentosos Ascomycetos têm sido estudados para a produção de biossurfactantes a partir de substratos renováveis. No entanto, o rendimento de biossurfactantes por Ascomycetos depende de vários fatores, como a espécie, as fontes nutricionais e as condições ambientais. Nesta revisão, exploramos a produção, caracterização química e aplicação de biossurfactantes por Ascomycetos.

Palavras-chave: Biossurfactante, Ascomycetos, Fungos Filamentosos, Bioprocesso

INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos produzidos por plantas e animais, mas em grande parte produzidos por micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A combinação de várias propriedades, incluindo biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídios), reduz a tensão superficial para atuar como um emulsificante [1]. Todos os biossurfactantes são anfífilicos e consistem em partes polares e apolares.

A demanda por biossurfactantes aumentou devido à sua compatibilidade ambiental e versatilidade na emulsificação. Outras vantagens dos biossurfactantes incluem biodegradabilidade, baixa toxicidade e tolerância a diferentes fatores ambientais (pH, temperatura e salinidade). Dadas essas vantagens, o interesse da comunidade científica em estudar o potencial dos biossurfactantes tem aumentado substancialmente [2]. No entanto, questões como altos custos de produção e dificuldades na recuperação dos produtos puros devem ser resolvidas antes que a produção em grande escala em um nível industrial possa começar permitindo que suas contrapartes sintéticas tenham uma vantagem competitiva [3,4]. Além disso, a combinação de micro-organismos e meios de cultura usados para a produção influencia diretamente na recuperação de biossurfactantes durante os processos posteriores.

O custo de produção e recuperação do biossurfactante são os fatores limitantes na produção industrial dessas moléculas, conforme indicado por vários estudos recentes [5-7]. Em contraste, vários estudos têm demonstrado alternativas em escala de laboratório como uma provável solução para o desafio que envolve a produção [2,8].

A diversidade estrutural dos biossurfactantes permite várias aplicações em muitas indústrias, como alimentícia, farmacêutica e cosmética. A produção futura de biossurfactante industrial depende da relação entre os custos de produção e os benefícios da aplicação [9,10]. Portanto, a otimização de parâmetros físico-químicos, nutricionais e características dos biossurfactantes precisa ser estudada para o seu desenvolvimento em escala industrial [3]. Nos últimos anos, os pesquisadores têm se concentrado amplamente na produção de biossurfactantes ramnolipídeos e soforolipídeos a partir de bactérias e leveduras; ao passo que a utilização comercial de fungos para a produção de biossurfactante tem sido muito limitada e, portanto, apenas alguns dados estão disponíveis sobre o assunto [8]. Portanto, o foco principal desta revisão foi discutir ferramentas estratégicas para o aumento da produção de biossurfactante a partir do fungo Ascomycetos, e suas aplicações.

Tensoativos sintéticos vs. biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas versáteis compostas por dois componentes polares e não polares distintos [11]. Eles atuam na interface entre líquidos em diferentes polaridades, reduzindo a tensão superficial e produzindo emulsões [12] (Figura 1).

Os surfactantes sintéticos e químicos são convencionalmente produzidos por reações de transformação de grupos funcionais orgânicos de matérias-primas à base de petróleo [13]. Com base na carga de sua terminação hidrofílica, os surfactantes são classificados como iônicos, (carregados negativamente), catiônicos (carregados positivamente), não aniônicos (sem qualquer carga) ou anfotéricos (carregados positivamente e negativamente); a cauda hidrofóbica do surfactante é caracterizada por uma longa cadeia de ácidos graxos. Os surfactantes comerciais mais comumente usados são o lauril sulfato de sódio (dodecil sulfato de sódio) (Figura 2) e o lauril sulfato de amônio, que são utilizados nas indústrias de limpeza e cosmética [11].

O consumo doméstico e industrial de surfactantes tem aumentado nos últimos anos sem limites e restrições. O acúmulo desses surfactantes no ecossistema pode levar a problemas ambientais [14], além das manifestações de toxicidade do surfactante [10,14-16]. Os surfactantes sintéticos podem atingir níveis tóxicos quando excedem as concentrações prescritas, em termos de hidrofobicidade e características de estrutura química [3,14].

Embora haja um grande número de relatos na literatura sobre os efeitos adversos dos surfactantes no meio ambiente e na saúde humana, a proibição total do uso de surfactantes é impossível devido à falta de alternativas economicamente viáveis. Diante disso, a utilização de biossurfactantes pode diminuir o uso de surfactantes sintético [10,14].

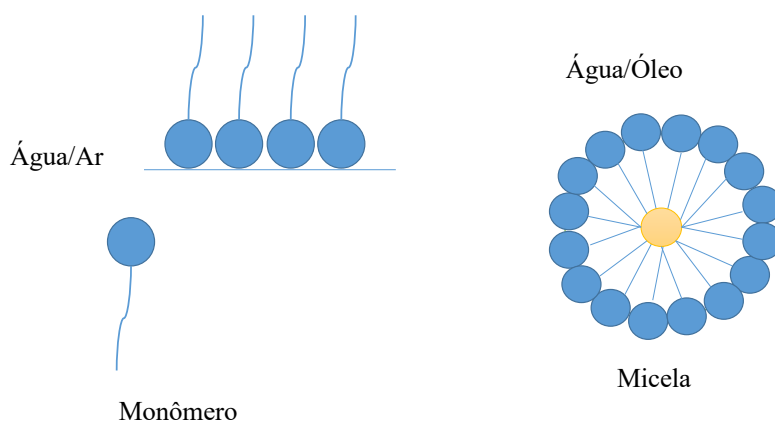


Figura 1: Tensão interfacial e superficial do monômero surfactante (cabeça polar e cauda de hidrocarboneto); Água / óleo de formação de micelas.

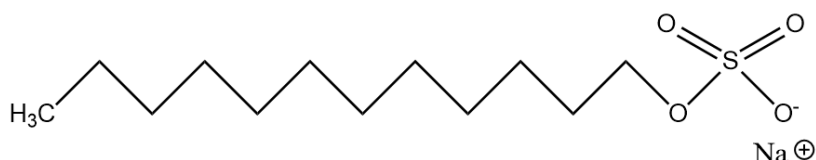


Figura 2: Estrutura química do dodecil sulfato de sódio.
* Estruturas projetadas com o auxílio do programa Chemdraw.

Biossurfactantes são surfactantes naturais sintetizados por plantas (por exemplo, saponina), animais (por exemplo, fosfolipídeos, surfactantes pulmonares, sais biliares) e micro-organismos (por exemplo, glicolipídeos). Biossurfactantes derivados de micro-organismos exibem propriedades surfactantes uma vez que diminuem a tensão superficial e têm uma alta capacidade de emulsificação [11]. No entanto, esses biossurfactantes são estruturalmente mais complexos do que os surfactantes sintéticos, pois são formados a partir de combinações de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídios). Os biossurfactantes de micro-organismos são classificados com base em sua estrutura química: por exemplo, os glicolipídeos são compostos de carboidratos (glicose, ramnose, galactose) combinados com ácidos alifáticos de cadeia longa ou ácidos hidroalifáticos (ácidos graxos contendo grupos hidroxila (OH) e ramos alquil); os lipopeptídeos são formados a partir de biomoléculas nas quais os aminoácidos estão ligados a grupos carboxila e hidroxila de uma cadeia de ácido graxo de 14 carbonos; e os biossurfactantes

poliméricos são complexos de polissacarídeo-proteína [11,17-19] (Figura 3).

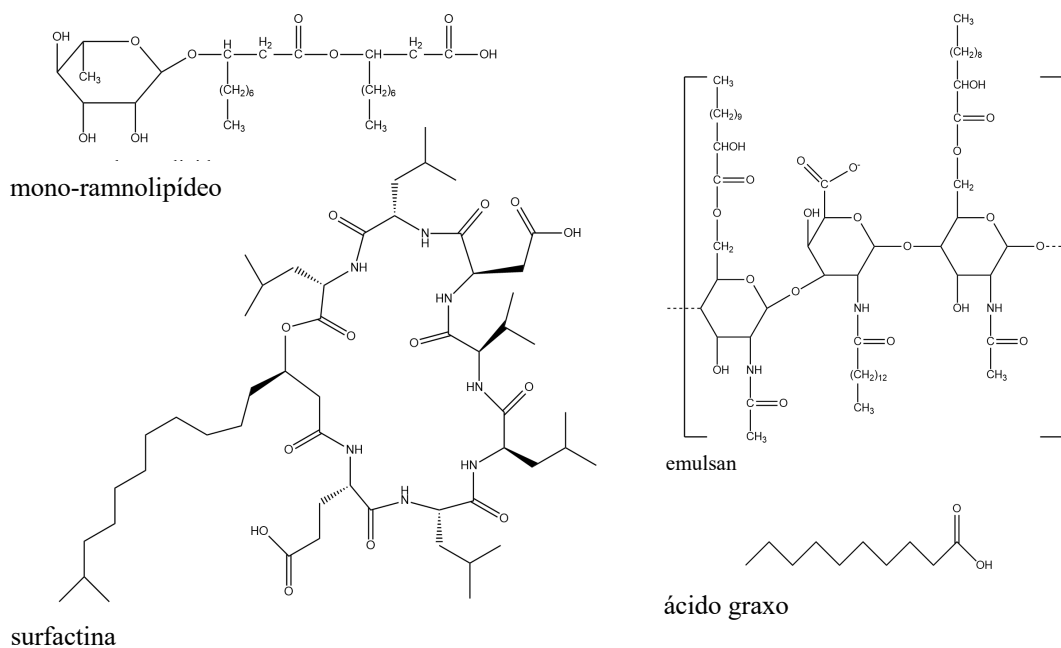


Figura 3: Diversidade estrutural de alguns biossurfactantes comuns.

* Estruturas projetadas com o auxílio do programa Chemdraw

Os biossurfactantes apresentam propriedades melhores do que seus equivalentes sintéticos. Algumas das propriedades importantes observadas na maioria dos biossurfactantes são descritas abaixo:

- Baixa toxicidade:** Dado que os biossurfactantes são usados em produtos de limpeza, alimentos e cosméticos, e na biorremediação, é essencial determinar se os biossurfactantes realmente têm baixa ou nenhuma toxicidade. Estudos recentes têm demonstrado a ausência de efeitos tóxicos dos biossurfactantes sobre micro-organismos ou microcrustáceos, ou na germinação de sementes; o potencial do uso de biossurfactantes na biorremediação de solo e água contaminados também foi demonstrado [20]. Os testes para verificar a aplicação tóxica de surfactantes em detergentes incluem irritação dérmica aguda, toxicidade oral aguda (LD_{50} e LC^{50}), atividade de superfície, eficiência de lavagem e testes de compatibilidade com água dura purificada [21].
- Alta biodegradabilidade:** os biossurfactantes são degradáveis na água e no solo, o que permite que sejam usados no processo de biorremediação, para liberar contaminantes do solo, em formulações de pesticidas e no controle biológico [22-24].
- Tolerância à variação de pH, salinidade e temperatura:** Os biossurfactantes têm ganhado maior atenção em pesquisas para sua aplicação comercial devido aos novos biossurfactantes serem capazes de atuar com eficiência sob temperaturas extremas, pH e salinidade [3,25].

d) Uso de substratos renováveis: O uso de substratos economicamente mais baratos torna o processo de produção de biossurfactante econômico nas indústrias [6].

e) Aplicações generalizadas: Vários tipos de biossurfactantes têm mostrado potencial para aplicação em diversas áreas, devido às suas atividades emulsificante, antimicrobiana, antitumoral, antiadesiva e anticorrosiva. Essas propriedades são de interesse das indústrias alimentícia, têxtil e biomédica. As propriedades de formação de espuma dos biossurfactantes em comparação com os surfactantes sintéticos tornam-os uma alternativa promissora para a produção comercial usando matérias-primas [26,27].

No entanto, existem limitações associadas à produção de biossurfactantes e estratégias devem ser adotadas para garantir que eles possam ser competitivos com os surfactantes sintéticos. Essas estratégias incluem o uso de resíduos de substrato renováveis para reduzir os custos iniciais de produção e o desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultura, melhoria dos processos a jusante e o uso de cepas melhoradas com modificações genéticas ou de potencial produtivo natural [26].

Ramnolipídeos e soforolipídeos têm sido estudados extensivamente e, conseqüentemente, ganharam destaque em suas aplicações no setor industrial global [28]. Os avanços biotecnológicos na produção de biossurfactantes em escala industrial são monitorados de perto pelas indústrias envolvidas. Entre eles, a Evonik Indústria® foi pioneira na produção de componentes-chave para a produção de xampus, géis de banho e produtos de limpeza doméstica [29]; tais biossurfactantes são produzidos principalmente por bactérias e leveduras, embora nenhum biossurfactante produzido por fungos filamentosos esteja disponível comercialmente [30-32]. No entanto, vários estudos têm demonstrado o potencial dos fungos como produtores de moléculas tensoativas [33], e com rendimentos ainda maiores em comparação aos biossurfactantes produzidos a partir de bactérias [34].

Produção de Biossurfactante por Ascomicetos

Ascomicetos são um tipo de fungo assexuado, ou anamorfo, que produz esporos assexuados (como conídios) em estruturas ramificadas chamadas conidióforos. Eles são fungos septados com filamentos divididos por células chamadas septos [35,36]. Os ascomicetos biossintetizam metabólitos secundários por absorção ou troca (heterotrofia). Como eles representam o maior grupo de fungos: 57.000 espécies conhecidas de

aproximadamente 6100 gêneros de ascomicetos existem em uma variedade de formas, incluindo bolores, leveduras ou esporocarpos, e o termo ascoma é geralmente usado para descrever seu corpo de frutificação "carnudo" [37, 38].

Os ascomicetos são abundantes no solo, mas também podem ser encontrados em ambientes aquáticos e em plantas, pois vários deles são fitopatógenos [39,40]. Egidi et al. [40] identificaram padrões e condutores ecológicos de táxons de fungos dominantes do solo que ocorrem no filo Ascomycota. Estudos indicam que os fungos globalmente distribuídos incluem gêneros como *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Acremonium* e *Curvularia*, que são fungos anemófilos que podem ser dispersos pelo ar. A maioria desses fungos dominantes é caracterizada por seu potencial genômico para uso em recursos biotecnológicos, competição entre micro-organismos no ambiente e tolerância ao estresse em comparação com outros fungos; no entanto, estudos sugerem que os ascomicetos podem estar mais bem equipados para resistir a estresses ambientais e podem utilizar um maior número de recursos, levando a estratégias mais generalistas que podem contribuir para seu maior domínio nos solos.

Aspergillus, *Penicillium* e *Fusarium*, entre outros, são ascomicetos que estão sendo estudados como produtores de biossurfactante [41-43]. A Tabela 1 fornece uma visão geral de algumas fontes de isolamento e tipos de biossurfactantes produzidos por esses ascomicetos. Pode-se concluir que *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os gêneros mais estudados para a produção de biossurfactantes. Os ascomicetos filamentosos mostraram vantagens na produção de biossurfactantes [44] e apresentaram potencial para produzir biossurfactantes com rendimentos mais elevados em comparação com os das leveduras [45]. Portanto, os gêneros acima mencionados são produtores promissores de biossurfactantes e emulsificantes com emulsões estáveis e têm uma excelente capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial [48-50, 54-55, 63].

Os ascomicetos que produzem biossurfactantes foram obtidos de diferentes fontes, como plantas, solo e ambientes contaminados, e podem produzir uma variedade de biossurfactantes em meios sintéticos ou em substratos renováveis (Tabela 1). Além disso, eles podem ser isolados de áreas contaminadas com óleo, efluentes ou hidrocarbonetos [46-49], o que aumenta as chances de isolar um fungo que produz o composto. No entanto, vários estudos têm demonstrado o isolamento de áreas como solo, plantas e em ambientes marinhos [42,50-52].

A Tabela 1 fornece uma visão geral dos gêneros mais comumente usados para a produção de biossurfactantes e biossurfactantes comumente isolados contendo glicolipídeos, lipopeptídeos, enamidas, etc. Os principais tipos de biossurfactantes produzidos por ascomicetos são biossurfactantes de baixo peso molecular (como glicolipídeos e lipopeptídeos) [53]. Os glicolipídios são compostos por frações glicosil e lipídica com propriedades anfifílicas, conferindo-lhes propriedades surfactantes. Os glicolipídeos fúngicos são metabólitos intracelulares [54] ou metabólitos secundários que auxiliam na predominância de fungos em competição com outros micro-organismos em um determinado nicho ambiental [55,56].

Lipopeptídeos e glicolipídeos são biossurfactantes excretados por cepas de fungos produzidos durante a fermentação em meio mineral com azeite de oliva como fonte de carbono [54], e têm maior atividade de emulsificação do que o Triton X-100 entre outros surfactantes sintetizados quimicamente [57].

Tabela 1: Diversas classes de biossurfactantes produzidos por fungos isolados de diferentes fontes ambientais.

Fungo	Fonte de isolamento	Tipo de biossurfactante	Referencia
<i>Aspergillus niger</i>	-	Monoglucosiloxioctadecênico (glicolipídeo)	[54]
<i>Cladosporium resinae</i>	Combustível de avião	Cladosan	[46]
<i>Curvularia lunata</i> IM 2901	Coleção	Biossurfactante polimérico	[57]
<i>Penicillium citrinum</i>	-	Glicolipídeo	[58]
<i>Penicillium</i> sp.	Solo	-	[59]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Solo	-	[50]
<i>Aspergillus ustus</i> MSF3	Espunja marinha (<i>Fasciospongia cavernosa</i>)	Glicoproteína	[51]
<i>Exophiala dermatitidis</i> SK80	Solo	Monoglicerídeo	[60]
<i>Aspergillus niger</i>	Solo	Glicolipídeo	[61]
<i>Aspergillus flavus</i>	Solo contaminado com óleo diesel	-	[48]
<i>Fusarium</i> sp.	Planta (<i>Melia azedarach</i>)	Fusaroside (glicolipídeo)	[62]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Planta (<i>Lilium lancifolium</i>)	L9	[63]
<i>Fusarium</i> SP BS-8	Solo	Lipopeptídeo	[64]
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNP5	Solo	Lipopeptídeo	[65]
<i>Fusarium proliferatum</i>	Farelo de arroz	Enamida	[66]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Solo contaminado com hidrocarbonetos	α,β -trealose (glicolipídeo)	[49]
<i>Xylaria regalis</i>	Planta (<i>Thuja plicata</i>)	-	[67]
<i>Fusarium oxysporum</i> LM5634	Solo	-	[52]
<i>Fusarium</i> sp.	Coleção	Glicolipídeo	[68]
<i>Aspergillus niger</i>	Plant (<i>Piper hispidum</i>)	-	[69]

<i>Penicillium chrysogenum</i> MUT 5039	Marinho	Sap-Pc proteína	[70]
<i>Aspergillus terreus</i> MUT 271	Marinho	Cerato-platanina	[71]

Biossíntese de biossurfactantes

Os biossurfactantes foram sintetizados usando uma variedade de substratos. Eles podem ser produzidos espontaneamente ou induzidos pela presença de compostos lipofílicos, variações de pH, velocidade de agitação, tensões e baixas concentrações de nitrogênio [72]. Os primeiros biossurfactantes relatados foram ramnolipídeos - produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, e lipopeptídeos (surfactina) - produzidos por *Bacillus subtilis*. Estudos investigando a produção de biossurfactantes derivados de fungos encontraram o lipídio manosiletritol (MEL) - derivado de *Candida* [73].

A biossíntese de biossurfactantes geralmente envolve caminhos separados para formar frações hidrofílicas e hidrofóbicas, que são subsequentemente combinadas [74]. As principais vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores de biossurfactantes dependem da fonte de carbono; as principais fontes de carbono são carboidratos e lipídios ou hidrocarbonetos. Quando os carboidratos são usados como a única fonte de carbono no meio de cultura para a produção de glicolipídeos, o fluxo de carbono é direcionado para as vias lipogênica (formação de lipídeos) e glicolítica (formação da porção hidrofílica). Em contraste, quando uma fonte de hidrocarboneto é usada, a biossíntese é direcionada para as vias lipolíticas e de gliconeogênese [75]. Um exemplo de biossíntese de biossurfactante é a produção de ramnolipídeos por bactérias em um meio contendo glicerol [30]. A regulação biossintética molecular do ramnolipídeo, um biossurfactante do tipo glicolipídeo produzido por *P. aeruginosa*, foi o primeiro a ser decifrado [76] (Figura 4).

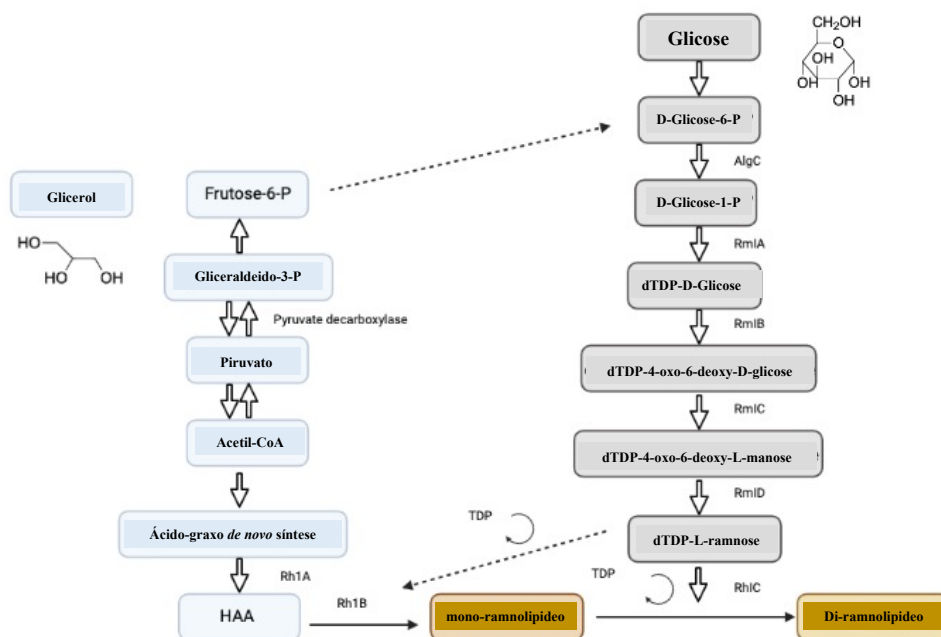


Figura 4: Biossíntese relacionada à produção de biossurfactantes ou bioemulsificantes usando fontes hidrofílicas e hidrofóbicas como substratos [30]. * Imagem criada usando Biorender.

Embora fungos filamentosos possam produzir biossurfactantes e seja possível identificar o tipo de biossurfactante, a biossíntese desses compostos, sua base genética e a rota de produção do biossurfactante ainda não estão totalmente esclarecidas. A biossíntese da maioria dos biossurfactantes é estritamente regulada, e a biossíntese de hidrofobinas por *Trichoderma reesei* depende dos genes *hfb1* e *hfb2* [76].

Uma área de estudo que precisa ser mais explorada é a disponibilidade de métodos e ferramentas de sequenciamento para análises bioinformáticas que possam permitir a dedução de genes biossintéticos a partir do biossurfactante do genoma fúngico.

Influência do bioprocesso e das condições nutricionais na produção de biossurfactantes

Durante o processo de produção dos biossurfactantes, os fatores críticos que influenciam diretamente as condições de cultivo foram avaliados e classificados como fatores externos; estes incluem agitação, aeração e volume do meio. Além disso, os fatores nutricionais estão diretamente relacionados ao micro-organismo utilizado e, portanto, influencia o tipo de biossurfactante produzido [45]. A síntese de biossurfactantes depende muito da disponibilidade de fontes de carbono e do equilíbrio

entre o carbono e outros nutrientes. Cada fungo possui necessidades nutricionais específicas que favorecem a produção de uma classe de biossurfactantes, mas essa correlação de otimização / caracterização ainda não foi explorada, sendo o aumento no rendimento da produção de biossurfactantes o principal objetivo deste campo de pesquisa (Tabela 2).

As fontes de carbono desempenham um papel importante no crescimento e produção de biossurfactantes por vários micro-organismos e variam de espécie para espécie. As principais fontes de carbono usadas para a produção de Ascomycetos são óleo de soja, óleo cru, resíduos agroindustriais, hidrocarbonetos e glicose [51,52,65-67,77].

O nitrogênio é o segundo suplemento mais importante para a produção de biossurfactantes por micro-organismos. Várias fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico têm sido usadas na produção de biossurfactantes como meio mineral, extrato de levedura e peptona [45,52,65-67,78]. A suplementação com glicose como fonte de carbono pode aumentar a produção de biossurfactante, e o extrato de levedura como fonte de nitrogênio também desempenha um papel importante na produção de biossurfactante [51] (Tabela 2).

As características importantes da maioria dos organismos são sua forte dependência do pH para o crescimento celular e para a produção de metabólitos secundários. Eles produzem o maior rendimento de biossurfactantes na faixa de pH 6–7 [51,52,77]. A composição do biossurfactante depende das condições de isolamento do fungo: um fungo isolado do meio marinho requer a adição de sal no meio de cultura. Se o organismo foi isolado de um local contaminado com óleo, o óleo pode ser usado como indutor no bioprocessamento [46,49,51].

A maioria das condições de bioprocessamento ocorre em temperaturas de incubação entre 25–30 °C e agitação entre 100–150 rpm ao longo de cerca de 3-20 dias [49,52,65,66]. Essas condições podem ser otimizadas e personalizadas para cada fungo, por exemplo, alterando o pH apropriado e a composição de nutrientes (Tabela 2).

Análises estatísticas das condições de cultivo juntamente com o planejamento fatorial têm se mostrado ferramentas eficazes para otimizar a produção de biossurfactantes. Tais ferramentas resultam na redução do número de experimentos de laboratório, aquisição de modelos matemáticos que podem ser usados na indústria, demonstrando quais fatores são importantes, e sua interação na produção de biossurfactantes. A Tabela 2 fornece uma visão geral de alguns processos de otimização e condições para o crescimento de certos fungos ascomycetos. A busca pelas melhores

condições (como substrato, pH e temperatura) para a produção de biossurfactante tem sido explorada, especificamente no uso de resíduos agroindustriais [48,51,61].

O uso de ferramentas estatísticas é muito eficiente em aumentar a produção e as propriedades dos biossurfactantes, a maioria dos quais são planejamentos fatoriais e metodologias de superfície de resposta (RSM), com o objetivo de otimizar a resposta, que é influenciada por diversas variáveis independentes [51, 52, 79]. A associação de biossurfactantes produtores de fungos filamentosos tem sido extensivamente estudada usando essas ferramentas estatísticas; nos últimos anos, destaca-se o uso de Plackett-Burman como ferramenta de seleção, visto que os autores testam diversos fungos, condições e variáveis [49].

Vários fatores, como disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio, pH, agitação e incubação, precisam ser otimizados para aumentar o rendimento do biossurfactante. A Tabela 2 resume os dados obtidos em estudos que determinaram alto índice de emulsificação (> 60%) e redução da tensão superficial (<25 mN / m) por meio de otimizações para a produção de biossurfactantes por fungos ascomicetos.

Em geral, o uso de abordagens estatísticas para determinar o efeito sobre os fatores analisados e suas interações resulta no aumento do rendimento do biossurfactante na produção, e a possibilidade de reprodução do modelo matemático fornece informações de interesse para as indústrias.

Tabela 2: Diferentes estratégias estatísticas utilizadas para a otimização da produção de biossurfactantes por ascomicetos.

Fungo	Tipo de biossurfactante	Processo otimizado	Condições otimizadas	E ₂₄ (%) / TS (mN/m)	Referência
<i>Aspergillus ustus</i> (MSF3)	Glicoproteína	pH, temperatura, concentração de sal, fontes de nitrogênio de carbono e metais (metodologia univariada e de superfície de resposta)	pH 7/3% NaCl/Glucose and cheapest raw/ Ratio C:N 3:2	75%	[80]
<i>Penicillium</i> 8CC2	-	Fontes de carbono e nitrogênio, pH e tempo de produção usando planejamento fatorial com repetição no ponto central	Óleo de soja, 20 g/L ⁻¹ ; extrato de levedura, 30 g/L ⁻¹ ; pH6	79.82%	[42]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	α , β -trealose	pH, tempo de incubação, agitação e inóculo (Plackett - Burman + Arranjo de Composto Rotacional Central)	temperatura, agitação, e tempo de incubação Variáveis significantes temperatura 47 °C, 120 rpm em 7 dias de incubação	PB: 24.08 mN/m CCRD: 20.08 mN/m	[49]
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	Substrato agroindustrial, fonte de carbono, nitrogênio, pH, planejamento fatorial de agitação	Resíduo com influência significativa	67.74%	[52]

* E₂₄(%) – Índice de emulsificação

** TS – Tensão superficial

Extração, purificação e caracterização química de biossurfactantes

Após a produção dos biossurfactantes, o próximo passo importante é recuperá-los do meio de fermentação, seguido pela purificação para torná-los prontamente disponíveis para várias aplicações industriais [45]. No bioprocessamento de obtenção do biossurfactante, o extrato ainda é limitado devido ao custo de recuperação, processamento de purificação ou ambos; o custo é de aproximadamente 60% do total da produção [6].

Métodos para reduzir custos de produção têm sido estudados, principalmente utilizando recursos renováveis; entretanto, esses recursos contaminam ou dificultam o processo de extração e purificação e, conseqüentemente, a caracterização dos biossurfactantes. Diversas técnicas são utilizadas para a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como recuperação com solventes miscíveis em água, como acetona e etanol, acidificação e adição de sais à solução. A Tabela 3 mostra os métodos de recuperação para biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos. Os principais métodos utilizados foram acidificação, precipitação com álcool e solventes.

Seguindo o processo de caracterização, o biossurfactante bruto é analisado usando uma combinação de técnicas espectroscópicas, como espectrometria de massa, infravermelho (IR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) para elucidar a estrutura do biossurfactante. Técnicas cromatográficas como cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em combinação com espectrometria de massa (MS) também são usadas para a caracterização e purificação de biossurfactantes. Na investigação do biossurfactante produzido por *Fusarium fujikuroi*, os compostos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a MS e com detector de ionização de chama [49].

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é frequentemente usada para identificar grupos funcionais orgânicos (alquil, carbonil, éter e ligações éster em carboidratos). Em um estudo realizado por Pele et al. (2019), o espectro infravermelho sugeriu a presença de uma ligação éster, e um grupo amida confirmou a presença de glicoproteínas na estrutura de um biossurfactante produzido por *Rhizopus arrhizus* UCP 1607.

A caracterização dos biossurfactantes produzidos por fungos filamentosos ainda é escassa, sendo por vezes necessária a utilização de outras técnicas como a dessorção / ionização-tempo de voo por laser assistido por matriz (MALDI-TOF MS).

Tabela 3: Tipos de extração de biossurfactante e caracterização de fungos filamentosos.

Fungo	Processo/Solvente usado na purificação	Método analítico	Referência
<i>Cladosporium resinae</i>	Cromatografia de fase reversa	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	[46]
<i>Curvularia lunata</i>	Acetona/Liofilizado	Cromatografia em fase gasosa (GC)	[57]
<i>Penicillium</i> sp.	Acetona gelada 4 °C	HPLC	[81]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Água destilada 90 °C e solvente	Atividade emulsificante	[50]
<i>Aspergillus</i> sp. O-4	Tampão fosfato pH 7.0/ 0.2 M/Água destilada 90 °C	Atividade emulsificante e tensão superficial	[82]
<i>Exophiala dermatitidis</i> SK80	Acetato de etila	Cromatografia de camada delgada (TLC)	[60]
<i>Aspergillus</i> sp. MSF1	Solventes	TLC, infravermelho (FT-IR), and HPLC.	[78]
<i>Aspergillus niger</i>	Precipitação ácida HCl/ clorofórmio, metanol	TLC	[61]
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNP5	Etanol -20 °C	TLC and FT-IR	[83]
<i>Aspergillus niger</i> and <i>Aspergillus flavus</i>	Precipitação ácida com 1 M de H ₂ SO ₄ pH 2.0/ clorofórmio e metanol	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS)	[77]
<i>Aspergillus flavus</i>	Acetato de Etila	Infravermelho (IR) e espectrometria de massa (MS)	[84]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Clorofórmio: etanol	FT-IR	[85]
<i>Fusarium proliferatum</i>	Acidificação pH 2.0 HCl 6 N/sistema de solvente	TLC-coluna cromatográfica, FTIR, and Espectrometria de ressonância magnética nuclear (NMR)	[66]
<i>Pleurotus djamor</i>	HCl pH 2.0 acidificação	FT-IR	[86]
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Acidificação por HCl 6 N pH 2.0/Isopropanol	FT-IR	[87]
<i>Ceriporia lacerate</i>	Acetato de etila	LC-MS and GC-MS.	[88]
<i>Fusarium oxysporum</i>	Solventes clorofórmio: metanol	FT-IR, NMR-estudos espectrais e GC	[89]
8CC2 <i>Penicillium</i>	Precipitação com etanol	Estudos de estabilidade	[42]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Acidificação com 6 M HCl pH 4.0/ Solvente acetato:metanol (1:4)	Espectrometria de ressonância magnética nuclear (NMR)	[49]
<i>Xylaria regalis</i>	Acidificação pH 2.0 HCl (1 N)/Acetato de etila	Cromatografia de camada delgada de alta performance (HPTLC)	[67]
<i>Aspergillus terreus</i> MUT 271 and <i>Trichoderma harzianum</i> MUT 290	Concentração por bolhas no ar e por um Ultrafiltração	Q-TOF LC/MS Espectroscopia de Dicroísmo Circular	[71]

De acordo com a Tabela 3, o processo primário de extração de biossurfactantes por fungos filamentosos é a precipitação e a fração de solvente. A precipitação pode ser promovida por acidificação (HCl) ou utilização de sistemas de solventes, como clorofórmio, metanol, acetato de etila e etanol. Além disso, estudos anteriores demonstraram que combinações de metodologias analíticas são necessárias para a caracterização química, e as técnicas para identificar biossurfactantes incluem cromatografia em camada fina (TLC), HPLC, infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e MS.

Aplicações industriais

A exploração de recursos naturais na era biotecnológica tem promovido avanços científicos e tecnológicos ao agregar valor aos produtos naturais. Os biossurfactantes têm potencial para o desenvolvimento de processos biotecnológicos significativos no século 21 devido às suas propriedades únicas de emulsificação [7].

Os biossurfactantes podem ser usados como agentes terapêuticos devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais [90,91]. Essas moléculas têm propriedades ideais para incorporação em formulações de alimentos e cosméticos, e seu potencial antimicrobiano e antibiofilme são de grande interesse para as indústrias de processamento de alimentos [92]. Estudos investigaram e estabeleceram as aplicações potenciais promissoras de biossurfactantes (alguns fungos também foram depositados no banco de patentes; Tabela 4) como alternativa aos surfactantes sintéticos na indústria. O mercado de aplicação de biossurfactantes é segmentado nas indústrias de alimentos, cosméticos, saúde e têxteis, sendo os detergentes domésticos e produtos de higiene pessoal as principais aplicações dos biossurfactantes.

A maioria das indústrias de biossurfactantes está localizada na América do Norte, Ásia e Europa; consequentemente, eles são os principais consumidores. A Europa dominou o mercado de biossurfactantes com uma participação global de 52,5% em 2019. Isso se deve à crescente conscientização dos consumidores sobre os riscos à saúde associados aos surfactantes químicos [93]. No entanto, a América Latina possui um imenso potencial devido à sua enorme biodiversidade e aos diversos resíduos agroindustriais produzidos que podem ser utilizados como substratos para a produção de biossurfactantes; assim, o desenvolvimento de biossurfactantes na América do Sul, especificamente no Brasil, permanece um desafio, embora o Brasil seja líder entre os países latino-americanos na pesquisa de biossurfactantes, com um elevado número de artigos e patentes [94].

Tabela 4: Fungos filamentosos produtores de biossurfactantes depositados no banco de patentes

Micro-organismo	Título	Inventor e data	Patente
<i>Cladosporium resinae</i>	Preparação de um novo biossurfactante	Jimenez & Morales (1993)	ES 2039187B1
Fungo	Método para preparar ramnolipídeo	Yang (2007)	CN 1891831
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Novo biossurfactantes produzido por <i>Aureobasidium pullulans</i>	Kim et al., (2013)	KR 101225110
<i>Trichoderma</i>	Produção de hidrofobina por <i>Trichoderma</i>	Quay (2002)	US7863245B2

A produção de biossurfactantes por fungos filamentosos Ascomicetos tem aumentado nos últimos anos. Entre os Ascomicetos, alguns fungos se destacam no setor industrial por terem demonstrado potencial de produção quando cultivados em diferentes meios de cultura sintéticos e substratos renováveis, além de suas atividades biológicas. Os biossurfactantes obtidos de fungos possuem uma variedade de classes químicas, que favorecem diversas aplicações nos setores industrial, alimentício, biomédico e ambiental. Resta a necessidade de mais estudos sobre as patentes, caracterização e aplicação dessas substâncias. Desafios relativos à compreensão das vias de produção metabólica, genes de interesse e técnicas para a recuperação de biossurfactantes permanecem e devem ser abordados em estudos futuros.

Conclusão

- (i) Ascomicetos isolados de vários ambientes têm potencial para produzir biossurfactantes usando substratos renováveis.
- (ii) Os principais gêneros de Ascomicetos que são capazes de produzir biossurfactantes incluem espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, que produzem principalmente glicolipídeos e lipopeptídeos.
- (iii) A produção de biossurfactantes de Ascomicetos é amplamente afetada por várias diferenças nas condições do meio de cultivo, pH, temperatura e fontes de carbono e nitrogênio. A influência dos fatores de produção tem sido estudada, principalmente através de metodologias de fatorial de projeto e superfície de resposta.
- (iv) Os principais métodos de extração para obter biossurfactantes de meios de cultura incluem acidificação ou o uso de um sistema de solvente, e a caracterização e elucidação da estrutura dos biossurfactantes foram alcançados usando uma combinação de técnicas analíticas, cromatográficas e espectroscópicas.

O uso de biossurfactantes obtidos por Ascomicetos deve ser incentivado, dadas as vantagens em relação aos seus homólogos sintéticos, dados de vários estudos e seu potencial para produzir produtos ecologicamente seguros e sustentáveis.

Referências bibliográficas

- [1] Henkel M, Müller MM, Kügler JH, Lovaglio RB, Contiero J, Syldatk C, et al. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochem* 2012;47:1207–19. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.018>.
- [2] Grand View Research Inc. Biosurfactants Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Rhamnolipids, MES, APG, Sorbitan Esters, Sucrose Esters), By Application (Household Detergents, Personal Care, Industrial Cleaners) And Segment Forecasts, 2014 - 2020 2015:195.
- [3] Helmy Q, Kardena E, Funamizu N, Wisjnuprpto. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. *Int J Biotechnol* 2011;12:66–86. <https://doi.org/10.1504/IJBT.2011.042682>.
- [4] Marchant R, Banat IM. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends Biotechnol* 2012;30:558–65. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003>.
- [5] Saha P, Rao KVB. Biosurfactants- a current perspective on production and applications. *Nat Environ Pollut Technol* 2017;16:181–8.
- [6] Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit N V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. *Front Microbiol* 2014;5:697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>.
- [7] Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos V a, Sarubbo L a. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *Int J Mol Sci* 2016;17:401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>.
- [8] Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express* 2011;1:5. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5>.
- [9] Brycki B, Waligórska M, Szulc A. The biodegradation of monomeric and dimeric alkylammonium surfactants. *J Hazard Mater* 2014;280:797–815. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.021>.
- [10] Lémery E, Briançon S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A, et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2015;469:166–79. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.019>.
- [11] Nitschke M, Pastore M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Quim Nova* 2002;25:772–6.
- [12] McNaught A., Wilkinson A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology 1997:611. <https://goldbook.iupac.org/terms/view/S06194> (accessed October 1, 2020).
- [13] Vaz DA, Gudiña EJ, Alameda EJ, Teixeira J a, Rodrigues LR. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;89:167–74. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.009>.
- [14] Rebello S, Asok AK, Mundayoor S, Jisha MS. Surfactants: Chemistry, Toxicity and Remediation. 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-319-02387-8_5.
- [15] Swisher R. Surfactant effects on humans and other mammals. In: Hodge HC, editor. *soap Deterg. Assoc. Sci. Tech. Rep.* 4th ed., New York: 1966, p. 1–20.

- [16] Lechuga M, Fernández-Serrano M, Jurado E, Núñez-Olea J, Ríos F. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 2016;125:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.027>.
- [17] Shah N, Nikam R, Gaikwad S, Sapre V, Kaur J. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. *Indian J Microbiol Res* 2016;3:5. <https://doi.org/10.5958/2394-5478.2016.00002.9>.
- [18] Shoeb E, Akhlaq F, Badar U, Akhter J, Imtiaz S. Classification and industrial applications of biosurfactants. *Acad Res Int* 2013;4:243–52.
- [19] Banat IM, Desai DJ. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:47–64.
- [20] Sobrinho HBS, Luna JM, Rufino RD, Porto ALF, Sarubbo LA. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electron J Biotechnol* 2013;16. <https://doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-4>.
- [21] Fei D, Zhou G-W, Yu Z-Q, Gang H-Z, Liu J-F, Yang S-Z, et al. Low-Toxic and Nonirritant Biosurfactant Surfactin and its Performances in Detergent Formulations. *J Surfactants Deterg* 2019;23.
- [22] Ward OP. Microbial biosurfactants and biodegradation. In: Media LB and SS, editor. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, p. 65–74.
- [23] Rodriguez-Lopez L, Rincon-Fontan M, Vecino X, Moldes AB, Cruz JM. Biodegradability Study of the Biosurfactant Contained in a Crude Extract from Corn Steep Water. *J Surfactants Deterg* 2019;23.
- [24] Mulligan CN. Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* 2005;133:183–98. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
- [25] Roy A. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *J Fundam Renew Energy Appl* 2018;08. <https://doi.org/10.4172/2090-4541.1000248>.
- [26] Mukherjee AK, Das K. Microbial surfactants and their potential applications: an overview. In: Sen R, editor. *Biosurfactants - Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 672. 672nd ed., New York: Springer science; 2010, p. 54–60.
- [27] Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:47–64.
- [28] Randhawa K, Rahman P. Rhamnolipid biosurfactants — past , present , and future scenario of global market. *Front Microbiol* 2014;5:1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>.
- [29] Evonik. Evonik commercializes biosurfactants 2020. <https://corporate.evonik.com/en/evonik-commercializes-biosurfactants-101537.html> (accessed June 22, 2020).
- [30] Gogoi D, Bhagowati P, Gogoi P, Bordoloi NK, Rafay A, Dolui SK, et al. Structural and physico-chemical characterization of a dirhamnolipid biosurfactant purified from: *Pseudomonas aeruginosa*: Application of crude biosurfactant in enhanced oil recovery. *RSC Adv* 2016;6:70669–81. <https://doi.org/10.1039/c6ra11979d>.
- [31] Lovaglio RB, dos Santos FJ, Jafelicci M, Contiero J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;85:301–5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.001>.
- [32] Bogaert V, Zhang J, Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem* 2011;46:821–33. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.010>.
- [33] Varadavenkatesan T, Murty VR. Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus* sp. and its applicability to enhanced oil recovery. *ISRN Microbiol* 2013;2013:621519. <https://doi.org/10.1155/2013/621519>.

- [34] Kim H, Yoon B, Choung D, Oh H, Katsugari T, Tani Y. Characterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;5:713–21.
- [35] McConnaughey M. Physical chemical properties of fungi. *Biomed. Sci.*, East Carolina: Elsevier; 2014, p. 13.
- [36] Money NP. *Fungal Diversity. The fungi*. 3rd ed., Miami: Academic press; 2016, p. 1–36.
- [37] Wijayawardene N. Notes for genera: Ascomycota. *Fungal Divers* 2017;86:1–594.
- [38] Jaklitsch W, Baral O, Lücking R, Lumbsch T. *Ascomycota. Syllabus Plant Fam.* 23rd ed., Borntraeger Science Publishers; 2016.
- [39] Vera J, Gutierrez MH, Palfner G, Pantoja S. Diversity of culturable filamentous Ascomycetes in the eastern South Pacific Ocean off Chile. *World J Microbiol Biotechnol* 2017;33:157.
- [40] Egidi E, Delgado-Baquerizo M, Plett JM, Wang J, Eldridge DJ, Bardgett RD, et al. A few Ascomycota taxa dominate soil fungal communities worldwide. *Nat Commun* 2019;10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10373-z>.
- [41] Gmoser R, Ferreira JA, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biol Biotechnol* 2017;4:1–25. <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0033-2>.
- [42] Sena HH, Sanches MA, Fernando D, Rocha S, Oliva W, Filho P, et al. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. *Int J Microbiol* 2018;2018:8.
- [43] Ferreira JA, Mahboubi A, Lennartsson PR, Taherzadeh MJ. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresour Technol* 2016;215:334–45. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>.
- [44] Ron EZ, Rosenberg E. Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.*, vol. 3. Blackwell, 2001, p. 229–36.
- [45] Bhardwaj G. Biosurfactants from Fungi: A Review. *J Pet Environ Biotechnol* 2013;04. <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000160>.
- [46] Muriel JM, Bruquez JM, Olfas JM, Jiménez-Sánchez A. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. *Biotechnol Lett* 1996;18:235–40.
- [47] Colla LM, Hemkemeier M, Gil ASL. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. *Rev CIATEC-UPF* 2012;4:1–10.
- [48] Rodrigues EF, Reinehr CO, Bertolin TE, Colla LM. Produção de compostos com propriedades emulsificantes por *Aspergillus flavus* utilizando resíduos agroindustriais. *Rev Ciências Exatas e Nat* 2014;16:75–93.
- [49] Reis CBL dos, Morandini LMB, Bevilacqua CB, Bublitz F, Ugalde G, Mazutti MA, et al. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian J Microbiol* 2018;49:185–92. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.004>.
- [50] Castiglioni GL, Elita T, Alberto J, Costa V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Quim Nova* 2009;32:292–5.
- [51] Kiran GS, Hema T a, Gandhimathi R, Selvin J, Thomas TA, Rajeetha Ravji T, et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;73:250–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.025>.

- [52] Sanches M, Santos R, Cortez A, Mariner R, Souza J. Biosurfactant Production by *Fusarium oxysporum* LM 5634 Using Peels from the fruit of *Bactris gasipaes* (Kunth) as Substrate. *Biotechnol J Int* 2018;21:1–9. <https://doi.org/10.9734/bji/2018/39405>.
- [53] Paulino BN, Pessôa MG, Mano MCR, Molina G, Neri-Numa IA, Pastore GM. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:10265–93. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7980-z>.
- [54] Laine RA, Griffin PF., Sweeley CC, Brennan PJ. Monoglucosyloxyoctadecenoic Acid - a glycolipid from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 1972;11:2267.
- [55] Abdel-Mawgoud AM, Stephanopoulos G. Simple glycolipids of microbes: Chemistry, biological activity and metabolic engineering. *Synth Syst Biotechnol* 2018;3:3–19. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.12.001>.
- [56] Kates M. Glycolipids of higher plants, algae, yeasts, and fungi. *Glycolipids, Phosphoglycolipids, and Sulfoglycolipids*, vol. 3, 1990, p. 235–320.
- [57] Paraszkievicz K, Kanwal A, Długónski J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *J Biotechnol* 2002;92:287–94.
- [58] Camargo-de-Morais MM, Ramos SA., Pimentel MC., Morais J. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World J Microbiol Biotechnol* 2003;19:191–4.
- [59] Luna-Velasco MA, Esparza-García F, Canízares-Villanueva RO, Rodríguez-Vásquez R. Production and Properties of a Bioemulsifier Synthesized by Phenanthrene-Degrading *Penicillium* sp. *Process Biochem* 2007;42:310–4. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.08.015>.
- [60] Chiewpattanakul P, Phonnok S, Durand A, Marie E, Thanomsub BW. Bioproduction and anticancer activity of biosurfactant produced by the dematiaceous fungus *Exophiala dermatitidis* SK80. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20:1664–71. <https://doi.org/10.4014/jmb.1007.07052>.
- [61] Kannahi M, Sherley M. Biosurfactant production by *Pseudomonas putida* and *Aspergillus niger* from oil contaminated site. *Int J Chem Pharm Sci* 2012;3:37–42.
- [62] Yang SX, Wang HP, Gao JM, Zhang Q, Laatsch H, Kuang Y. Fusaroside, a unique glycolipid from *Fusarium* sp., an endophytic fungus isolated from *Melia azedarach*. *Org Biomol Chem* 2012;10:819–24. <https://doi.org/10.1039/c1ob06426f>.
- [63] Kim JS, Park NH, Kim CG. Biosurfactant produced by *Aureobasidium pullulans*. US 8,642, 793 B1, 2014.
- [64] Qazi MA, Kanwal T, Jadoon M, Ahmed S. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. In: Domach MM, editor. *Biotechnol. Prog.*, 2014, p. 1065–1075.
- [65] Gautam G, Mishra V, Verma P, Pandey AK, Negi S. A cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. *J Bioprocess Biotech* 2014;04. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000177>.
- [66] Bhardwaj G, Cameotra SS, Chopra HK. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Adv* 2015;5:54783–92. <https://doi.org/10.1039/c5ra08017g>.
- [67] Adnan M, Alshammari E, Ashraf SA, Patel K, Lad K, Patel M. Physiological and Molecular Characterization of Biosurfactant Producing Endophytic Fungi *Xylaria regalis* from the Cones of *Thuja plicata* as a Potent Plant Growth Promoter with Its Potential Application. *Biomed Res Int* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7362148>.
- [68] Al-Kashef A, Shaban S, Nooman M, Rashad M. Effect of fungal glycolipids produced by a mixture of sunflower oil cake and pineapple waste as green corrosion

- inhibitors. *J Environ Sci Technol* 2018;11:119–31. <https://doi.org/10.3923/jest.2018.119.131>.
- [69] da Silva M, Duvoisin SJ, Oliveira R, Dos Banhos E, de Souza A, Albuquerque P. Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. *Appl Microbiol* 2019;0–1. <https://doi.org/10.1111/jam.14398>.
- [70] Cicatiello P, Stanzione I, Dardano P, De Stefano L, Birolo L, De Chiaro A, et al. Characterization of a surface-active protein extracted from a marine strain of *Penicillium chrysogenum*. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133242>.
- [71] Pitocchi R, Cicatiello P, Birolo L, Piscitelli A, Bovio E, Cristina Varese G, et al. Cerato-platanins from marine fungi as effective protein biosurfactants and bioemulsifiers. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/ijms21082913>.
- [72] Silva ACS, Santos PN dos, Silva TAL e, Andrade RFS, Campos-Takaki GM. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Agric Microbiol Rev Artic* 2018;85:1–12. <https://doi.org/10.1590/1808>.
- [73] Kitamoto D, Yanagishita H, Shinbo T, Nakane T, Kamisawa C, Nakahara T. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J Biotechnol* 1993;29:91–6. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90042-L](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90042-L).
- [74] Kuo TM, Gardner H. *Lipid Biotechnology*. 1st ed. Peoria, Illinois: Marcel Dekker, Inc; 2002.
- [75] Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. Produção de Biossurfactantes por Levedura. *Química Novamica Nov* 2008;31:2091–9.
- [76] Das P, Mukherjee S, Sen R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: An overview. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2008;25:165–86. <https://doi.org/10.5661/bger-25-165>.
- [77] Adekunle AT, Ester BB, Peter AO, Bankole OS, Joshua IUJ, Alfa S. Characterization of new glycosophorolipid-surfactant produced by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *Eur J Biotechnol Biosci* 2015;3:34–9.
- [78] Kiran GS, Thajuddin N, Hema T., Idhayadhulla A, Kumar RS, Selvin J. Optimization and characterization of rhamnolipid biosurfactant from sponge associated marine fungi *Aspergillus* sp. MSF1. *Desalin Water Treat* 2012:257–65.
- [79] Bertrand B, Martínez-Morales F, Rosas-Galván N, Morales-Guzmán D, Trejo-Hernández M. Statistical Design, a Powerful Tool for Optimizing Biosurfactant Production: A Review. *Colloids and Interfaces* 2018;2:36. <https://doi.org/10.3390/colloids2030036>.
- [80] Seghal Kiran G, Anto Thomas T, Selvin J, Sabarathnam B, Lipton a P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour Technol* 2010;101:2389–96. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.023>.
- [81] Luna-Velasco MA, Esparza-García F, Cañizares-Villanueva RO, Rodríguez-Vázquez R. Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. *Process Biochem* 2007;42:310–4. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.08.015>.
- [82] Colla LM, Rizzardi J, Pinto MH, Reinehr CO, Bertolin TE, Costa JAV. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol* 2010;101:8308–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>.
- [83] Gautam G. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *J Bioprocess Biotech* 2014;04. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000177>.

- [84] Ishaq U, Akram MS, Iqbal Z, Rafiq M, Akrem A, Nadeem M, et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. J Appl Microbiol 2015;119:1035–45. <https://doi.org/10.1111/jam.12929>.
- [85] Velioglu Z, Öztürk Ürek R. Biosurfactant production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation systems. Turkish J Biol 2015;39:160–6. <https://doi.org/10.3906/biy-1406-44>.
- [86] Velioglu Z, Ozturk Urek R. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. J Biosci Bioeng 2015;120:526–31. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.007>.
- [87] Alves EP, Tavares LBB, Gern RMM, Silva DAK, Furlan SA, Wisbeck E. Production and characterization of biosurfactants metabolized by *Pleurotus sajor-caju* from soybean oil | Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por pleurotus sajor-caju a partir de óleo de soja. Rev Mater 2017;22. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620170003.0201>.
- [88] Niu Y, Linlin F, Di G, Qihe W. Characterization, enhancement and modelling of mannosylerythritol lipid production by fungal endophyte *Ceriporia lacerate* CHZJU. Food Chem 2017;228:610–7.
- [89] Santhappan R, Pandian MR. Characterization of Novel Biosurfactants Produced by the Strain *Fusarium oxysporum*. J Bioremediation Biodegrad 2017;08:6–11. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000416>.
- [90] Rufino RD, Luna JM, Sarubbo L a, Rodrigues LRM, Teixeira J a C, Campos-Takaki GM. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. Colloids Surf B Biointerfaces 2011;84:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.045>.
- [91] Gudiña EJ, Rangarajan V, Sen R, Rodrigues LR. Potential therapeutic applications of biosurfactants. Trends Pharmacol Sci 2013;34:667–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.10.002>.
- [92] Saharan BS, Sahu RK, Sharma D. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Current Developments and Perspectives. Genet Eng Biotechnol J 2012;2011:1–14.
- [93] Grand View Research Inc. Biosurfactants Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Rhamnolipids, MES, APG, Sorbitan Esters, Sucrose Esters), By Application (Household Detergents, Personal Care, Industrial Cleaners) And Segment Forecasts, 2014 - 2020 2020.
- [94] Brumano LP, Soler MF, Da Silva SS. Recent Advances in Sustainable Production and Application of Biosurfactants in Brazil and Latin America. Ind Biotechnol 2016;12:31–9. <https://doi.org/10.1089/ind.2015.0027>.

3 CAPÍTULO 1

Artigo a ser submetido para publicação na Revista *The Scientific World Journal*

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR FUNGOS AMAZÔNICOS ISOLADOS DE SOLO E SERAPILHEIRA

Michele Alves Sanches¹, Juliana Gisele Correa Rodrigues², Ana Cláudia Alves Cortez³,
Érica Simplício de Souza², Patrícia Melchionna Albuquerque², João Vicente Braga de
Souza³

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Bionorte, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Brasil.

²Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil.

³Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil.

INTRODUÇÃO

Os surfactantes são usados industrialmente para misturar substâncias imiscíveis com aplicação na formulação de cremes, xampus e detergentes. São compostos conhecidos por reduzirem a tensão superficial/interfacial entre duas superfícies e possuírem uma estrutura química com dois grupos funcionais distintos, conferindo a propriedade anfifílica (BANAT et al., 2014; NITSCHKE; PASTORE, 2002; SILVA et al., 2018). Alguns desses agentes tensoativos disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo e o uso dessa matéria-prima contraria a tendência para o uso de produtos biodegradáveis e com baixa toxicidade (LÉMERY et al., 2015; REBELLO et al., 2013).

Recentemente, uma classe específica de tensoativos, os biossurfactantes vem se destacando pela mobilização mundial em direção à bioeconomia e eco-sustentabilidade. Constituem-se por um grupo de compostos que podem ser sintetizados por organismos vivos, como plantas, a partir da extração do óleo; produtos metabólicos de microorganismos como fungos e bactérias; e animais; como na composição da célula, surfactante pulmonar e sais biliares (DRAKONTIS; AMIN, 2020; RON; ROSENBERG, 2001; SANTOS et al., 2016).

Os biossurfactantes possuem estruturas diversificadas dependendo da composição química e origem microbiana, sendo formado de simples ácidos graxos a biossurfactantes

poliméricos. Essa conformação confere características eficientes e vantajosas frente aos surfactantes sintéticos como a diversidade de aplicação na biorremediação, agricultura, limpeza e cosmética (SANCHES et al., 2021; SANTOS et al., 2016; SHAH et al., 2016). Apesar das vantagens do biossurfactante como a biodegradabilidade, menor toxicidade e estabilidade para condições reacionais extremas, a produção para comercialização ainda é limitada, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias, como a busca por novos produtores, melhorias na produção e obtenção da substância (HELMY et al., 2011).

Estratégias de bioprospecção de produtores de biossurfactantes são realizadas para bactérias e leveduras (AMARAL et al., 2008; SPELLBERG, 2008), no entanto, nos últimos anos observou-se um destaque para biossurfactantes provenientes de fungos filamentosos. Estes micro-organismos apresentam potencial produtivo, variedade de técnicas de produção e melhoramento que consequentemente aumenta a viabilidade econômica dos bioprocessos (BHARDWAJ, 2013; CASTIGLIONI et al., 2009; PEREIRA; JÚNIOR; ALBUQUERQUE, 2017; SANCHES et al., 2021).

Na região amazônica, poucos estudos têm sido realizados para investigar o potencial de fungos filamentosos na produção de biossurfactantes (LIMA et al., 2016; SENA et al., 2018). Pode-se destacar as pesquisas com fungos isolados de macrófitas aquáticas contaminadas (LIMA et al., 2016), de solo (SENA et al., 2018) e de plantas (DA SILVA et al., 2019) como produtores de biossurfactantes. Especificamente, o solo é considerado um dos principais habitats para a população de micro-organismos e dentre estes, encontram-se os fungos, pois eles têm a capacidade de crescer em condições adversas (TAYLOR; SINSABAUGH, 2015).

Dentre a variedade de biomas amazônicos, a campina amazônica ainda é pouco explorada com relação a esta abordagem, principalmente por estes ecossistemas estarem associados a solos pobres em nutrientes, com características arenosas e com baixa fertilidade (GUIMARÃES, 2016). Entretanto, este ambiente pode abrigar espécies de fungos capazes de sintetizar novos agentes biossurfactantes com grande potencial biotecnológico.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar fungos de amostras de solo e serapilheira de um ambiente de campina amazônica com potencial para a produção de biossurfactantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e preservação dos fungos

As amostras foram coletadas de solo (5 cm a partir da serapilheira) e serapilheira (superfície) da Reserva Biológica da Campina (2°35'19,19 "S, 60°1'59,91"O), localizada no km 45 da rodovia BR-174, Manaus –AM no período de setembro de 2018. Três pontos aleatórios foram selecionados: I (-2,5891030, -60,0319530), II (-2,589249, -60,031893) e III (-2,589368, -60,031712), em triplicata. A coleta de 5g de solo foi realizada com auxílio de pá de jardim esterilizada e acondicionada em sacos plásticos, identificados com etiqueta e transportados ao Laboratório de Micologia do INPA, para posterior manipulação.

O isolamento foi realizado utilizando-se a técnica do espalhamento em superfície em placa (CLARK, 1965) adaptado por Nonaka et al., (2014). Foi realizado pelo método de diluições sucessivas solo/água (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). O isolamento dos fungos foi realizado em meio ágar batata dextrose (ABD). As placas foram incubadas a 28 °C até o aparecimento das colônias e posteriormente foram contadas para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC). As colônias purificadas foram transferidas para novas placas de Petri contendo ABD e incubadas a 25 ± 2 °C, por 7 dias. Após esse período, a cultura foi transferida para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose e conservada a 5 °C. Cada experimento foi realizado em triplicata. Os fungos isolados e identificados foram preservados pelos métodos de liofilização, conservação em óleo mineral e água destilada (CASTELLANI, 1939).

Identificação taxonômica dos fungos

A identificação das colônias dos fungos isolados foi feita por meio da observação dos aspectos macroscópicos das colônias descrito por Lacaz; Porto; Martins (2001). Para a observação microscópica das estruturas fúngicas, foi realizada a técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Em uma lâmina esterilizada contida em uma placa de Petri esterilizada, foi acrescentado um cubo de ABD. A cultura a ser identificada foi semeada a partir de repique recente, inoculada em 4 cantos do cubo e recoberta com uma lamínula esterilizada. Dentro da placa também foi deixado um chumaço de algodão umedecido

com água destilada. A placa foi armazenada à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que se observasse desenvolvimento das colônias. Após esse período, a esporulação foi inativada, adicionando 1 mL de formol a 20% ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24h-48h. Com auxílio de uma pinça a lamínula foi retirada, e adicionada sobre estas uma gota de corante azul de lactofenol. A lamínula foi montada sobre uma lâmina que foi visualizada em microscópio óptico com objetiva de 40x para posterior identificação utilizando bibliografias de taxonomia fúngica: *Illustrated Genera of Imperfect Fungi 4th Edition* (BARNETT; HUNTER, 1998); *Microbiologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico* (LACAZ; PORTO; MARTINS, 2001).

Identificação molecular do isolado produtor de biossurfactante

Os isolados selecionados foram submetidos a identificação por sequenciamento da região espaço interno transcrito (ITS) do DNAr pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para tanto foram realizadas as seguintes etapas:

a) O DNA fúngico foi extraído do micélio de acordo com a metodologia descrita por Ferrer et al. 2001. Em seguida amplificadas as regiões do DNAr ITS.

b) Para a PCR dos fungos foi utilizada a mistura das seguintes soluções: 22,5 µL água Milli Q, 5,0 µL de tampão para PCR, 2,0 µL MgCl₂, 5,0 µL dNTPs, 5,0 µL *Primer ITS 1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), 5,0 µL *Primer ITS 4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE *et al.*, 1990) 0,5 µL Taq Polimerase (Platinum, Invitrogen) e 5,0µL DNA fúngico, na qual cada reação teve o volume final de 50 µL.

c) As reações foram realizadas em termociclador (Modelo Super Cycler™ SC-200, Kyratec) programado para efetuar uma desnaturação inicial (5 minutos a 94 °C), seguido de 40 ciclos, sendo que cada ciclo é composto de uma etapa de desnaturação (30 segundos a 94 °C), uma etapa de pareamento (30 segundos a 53 °C) e uma etapa de alongamento (60 segundos a 72 °C) e por fim uma etapa de extensão final (10 minutos a 72 °C) (WHITE *et al.*, 1990). Uma alíquota de 8µL dos *amplicons* foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1x. O gel foi corado com *Syber Green SYBR® Safe* (Invitrogen) para visualização de um fragmento de entre 500 a 700 pb.

d) Os produtos de PCR foram purificados utilizando o polietilenoglicol (PEG) a 20% de acordo com as instruções do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Big Dye® (Applied Biosystem), usando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). As sequências obtidas foram analisadas no software BioEdit Sequence Alignment e comparada com o auxílio do programa BLASTn contra outras sequências de nucleotídeos presentes no banco de dados do GenBank em National Center for Biotechnology Information website (NCBI). A relação genética e evolutiva entre os grupos foi conduzida no Software MEGA X através da construção de uma árvore filogenética usando o método de Máxima Verossimilhança ("bootstrap" - 1000 réplicas) e o modelo de Tamura. As sequências foram alinhadas usando o algoritmo "Muscle" (TAMURA et al., 2013).

Seleção da produção de biossurfactantes por fungos isolados de solo e serapilheira

Os isolados foram semeados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 25 mL de meio de cultivo. O caldo era composto por óleo de soja (Soya®, 40 g/L) e extrato de levedura (Bacto Yeast Extract® BD, 10 g/L) em pH 6 ± 2 . O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Foi preparada uma suspensão de esporos para contagem em câmara de Neubauer (Improved L. Optik) a fim de obter um inóculo na concentração de 1×10^4 cél/mL. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente 25 ± 2 °C durante 7 dias sob agitação de 100 rpm (SENA et al. 2018). Os parâmetros índice de emulsificação, tensão superficial e teste de dispersão de óleo foram os métodos analíticos utilizados para verificar a produção de biossurfactantes. Os fungos produtores de biossurfactantes foram conduzidos para o ensaio de cinética de produção. *Fusarium oxysporum* LM 5634, mantido em ABD, foi utilizado no estudo como um controle, considerando que se mostrou um bom produtor de biossurfactante, como previamente descrito por Sanches et al., (2018). O acesso a este isolado foi autorizado pelo CGEN - n ° 010344 / 2013-6.

Cinética da produção de biossurfactantes

Os isolados selecionados como potenciais produtores de biossurfactantes foram semeados no meio de cultivo como descrito no tópico anterior. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente 25 ± 2 °C durante 15 dias sob agitação de 100 rpm (SENA et al., 2018). Os parâmetros índice de emulsificação, produção de biomassa e tensão superficial

foram avaliados a cada 24 h nos 3 primeiros dias e depois a cada 72h nos dias seguintes, a fim de descrever o perfil cinético de produção de biossurfactante.

Influência das condições de cultivo na produção de biossurfactante

Influência das fontes de carbono e nitrogênio

Para avaliar a produção de biossurfactante em diferentes fontes de carbono, o óleo de soja (40 g/L) foi substituído por glicose, frutose, galactose, lactose, ramnose e xilose, mantendo o extrato de levedura. Em outra etapa, a fonte de nitrogênio (extrato de levedura, 10 g/L) foi substituída por peptona de carne, peptona de soja, ureia, malte, sulfato de amônio e glutamato, mantendo constante o óleo de soja como fonte de carbono. O bioprocessamento foi realizado em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL do meio de cultivo estéril acrescido do volume de inóculo baseado na concentração de 1×10^4 cél/mL. Os frascos foram mantidos em temperatura ambiente de 25 ± 2 °C por 3 dias, agitando em mesa agitadora (TE - 140) a 100 rpm (SENA et al., 2018). A análise da produção de biossurfactantes foi medida através do índice de emulsificação.

Influência de fatores de bioprocessamento por planejamento fatorial

Por meio de um experimento multivariado, foi avaliada a influência dos fatores: [pH], [agitação] e [inóculo] na produção de biossurfactante mantendo as fontes de carbono e nitrogênio do experimento anterior. As influências destas variáveis foram estudadas de acordo com um planejamento experimental 2^3 completo para *Clonostachys rosea* 24 e para *Fusarium oxysporum* LM5634 (Tabela 1) com o objetivo de identificar os fatores com influência estatística ($p < 0,05$) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Tabela 1- Níveis utilizados para concentração do inóculo, pH e agitação no planejamento experimental 2^3 para a produção de biossurfactante por *Fusarium oxysporum* LM5634 e *Clonostachys rosea* 24.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Inóculo (cél/mL)	2979	1000	17021
pH	5	6	7
Agitação (rpm)	50	75	100

Ensaio analítico

Índice de emulsificação E₂₄ (%)

Em um tubo de ensaio com rosca (16 cm x 150 mm) foi adicionado o hidrocarboneto Tolueno (Toluol puro – SYNTH®) e a mesma quantidade de caldo livre de célula na proporção 1:1 (v/v). Inicialmente foi medida a altura total das fases imiscíveis com auxílio de régua milimétrica. Em seguida a solução foi homogeneizada em agitador de soluções tipo *vórtex* (Phoenix® - AP 56) por 2 min e o tubo foi mantido em repouso por 24h. Após esse tempo, foi medida apenas a altura da emulsão formada (COOPER; GOLDENBERG, 1987). O índice foi calculado pela seguinte equação:

$$E_{24} = (\text{Altura da emulsão} / \text{Altura total}) \times 100$$

Tensão superficial

A tensão superficial foi medida com um tensiômetro (K20, Krüss®) a 20 °C pelo método de Du Nöuy usando anel de platina. Para esse teste foi utilizado água ultrapura tipo I (Água Milli-Q®) como padrão para calibrar o equipamento. Foram utilizados os caldos livres de células no volume de 20 mL obtidos por meio da centrifugação para a determinação da tensão superficial (JAQUICHE-MATSUURA, 2014).

Produção de biomassa (g/L)

O valor do crescimento micelial foi monitorado a cada 72 horas, durante 21 dias conforme descrito no item cinética. Para estimar a biomassa utilizou-se a técnica de peso seco. A massa micelial foi filtrada em papel filtro quantitativo 12,5 cm Ø com poros de 28 µm (Quanty®) previamente secado e anotado o peso inicial, em seguida ambos foram secados na estufa a 100 °C por 24 h, sendo a biomassa estabelecida pela diferença do peso final (f) pelo peso inicial (i) (MINAMI, 2002).

$$\text{Biomassa} = \text{peso (f)} - \text{peso (i)}$$

Teste de dispersão do óleo

O teste foi adaptado para uma análise qualitativa de dispersão de óleo em uma interface óleo-água. Para este ensaio foi adicionado 50 mL de água destilada em uma placa de Petri com diâmetro de 15 cm. Em seguida foi incorporado 40 µL de óleo de motor usado na superfície da água e posteriormente foi adicionado 40 µL do caldo metabólico livre de células sobre a camada de óleo. Os resultados foram considerados positivos quando o biossurfactante ao entrar em contato com óleo foi disperso formando um halo claro. Para o controle positivo utilizou-se dodecilsulfato de sódio (SDS 1%) e para controle negativo utilizou-se água destilada (ELAZZAZY; ABDELMONEIM; ALMAGHRABI, 2015).

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e calculada a média e desvio padrão. Quando necessário realizou-se ensaios de análise de variância e teste t de Student para determinar a diferença estatística entre os experimentos. Especificamente os experimentos de planejamento fatorial foram desenvolvidos utilizando o programa STAGRAPHICS Centurion® e analisados com auxílio dos softwares STATGRAPHICS versão 6.0 e também no STATISTICA versão 5.0.

RESULTADOS

Isolamento e produção de biossurfactante por fungos isolados da serapilheira e do solo

As amostras de solo e serapilheira da reserva biológica de Campina foram utilizadas para isolar fungos produtores de biossurfactantes. Com base nas diferenças morfológica das colônias, 154 isolados fúngicos foram obtidos. Os isolados foram submetidos à identificação micromorfológica sendo observados diversos gêneros como *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Acremonium*. Todos pertencentes ao filo Ascomycota. Entretanto, os fungos que não puderam ser identificados devido a não produzirem corpos de frutificação foram classificados como *Mycelia sterilia* (Tabela 2).

Tabela 2 – Isolados e gêneros fúngicos de solo e serapilheira para bioprospecção da produção de biossurfactantes.

Local do isolamento	UFC/g	Número de isolados totais	Gênero dos isolados	Número de isolados por gênero (%)
Serapilheira	$1,4 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	54	<i>Penicillium</i>	1 (1,85 %)
			<i>Paecilomyces</i>	1 (1,85 %)
			<i>Trichoderma</i>	4 (7,41 %)
			<i>Aspergillus</i>	9 (16,67 %)
			<i>Acremonium</i>	14 (25,93 %)
			<i>Mycelia sterilia</i>	29 (46,2 %)
Solo	$6,0 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$	100	<i>Clonostachys</i>	1 (1 %)
			<i>Trichoderma</i>	1 (1 %)
			<i>Aspergillus</i>	3 (3%)
			Demáceo	3 (3%)
			<i>Penicillium</i>	5 (5%)
			<i>Mycelia sterilia</i>	87 (87%)

Para a investigação primária da produção de biossurfactantes, os fungos filamentosos isolados de amostras de solo e serapilheira foram submetidos ao bioprocessamento e quantificação de E_{24} (%). Inicialmente, dos 154 fungos testados, 126 foram capazes de produzir biossurfactante, sendo distribuídos em categorias, onde aqueles produtores acima de 50 % são considerados bons produtores. (Figura 1).

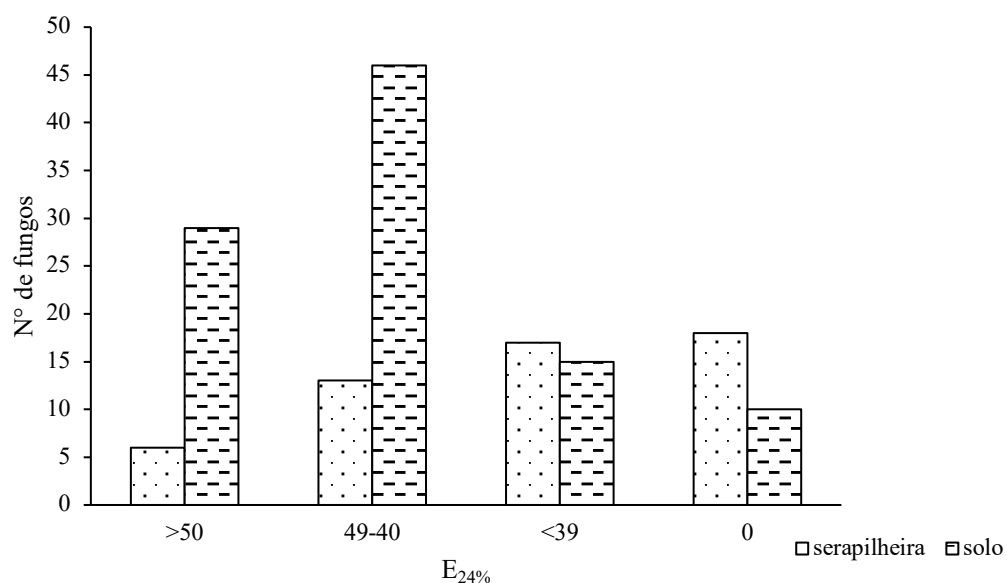


Figura 1 – Índice de emulsificação E_{24} (%) dos caldos fermentados dos 154 fungos filamentosos isolados de solo e de serapilheira isolados de solo amazônico.

Dentre estes, trinta e cinco fungos apresentaram E_{24} (%) acima de 50, foram selecionados e submetidos a uma triagem secundária, com outros testes de detecção da produção de biossurfactantes, como a redução da tensão superficial e o teste de dispersão

de óleo (Tabela 3). O isolado *Clonostachys* 24 e o *F. oxysporum* LM 5634, apresentaram índice de emulsificação de 58%, atividade positiva de dispersão de óleo e redução da tensão superficial do meio de cultivo de 36 para $29 \pm 2,4$ mN/m (*Clonostachys* 24) e para $29 \pm 0,08$ mN/m (*F. oxysporum* LM5634), o que representa uma redução de tensão superficial de aproximadamente 19,4 % após 7 dias de cultivo. Assim, os dois fungos *Clonostachys* 24 e *F. oxysporum* LM5634 foram selecionados para as demais etapas do estudo.

Tabela 3 – Seleção de fungos isolados de solo e serapilheira para produção de biossurfactantes com base no índice de emulsificação, teste de espalhamento de óleo e tensão superficial.

Local do isolamento	Fungo	E ₂₄ (%)	TDO	TS (mN/m)
Solo	<i>Clonostachys</i> 24	58 ± 3,2	+	29 ± 2,4
Solo	<i>Fusarium oxysporum</i> LM 5634	58 ± 3,0	+	29 ± 0,08
Serapilheira	<i>Mycelia sterilia</i> 6	54 ± 2,3	+	30 ± 0,53
Solo	<i>Mycelia sterilia</i> 93	52 ± 1,0	-	33 ± 0,05
Solo	<i>Aspergillus</i> sp. 29	51 ± 8,5	-	36 ± 3,5
Solo	<i>Mycelia sterilia</i> 12	51 ± 2,2	+	27 ± 1,57

TDO – Teste de dispersão de óleo

TS – Tensão superficial do meio de cultivo: 36 mN/m

Identificação taxonômica e molecular do melhor produtor

Para a identificação do novo isolado produtor de biossurfactante, foram analisadas as características macroscópicas e microscópicas. A cultura apresentou crescimento médio de 7 dias com colônia de 50 mm, de aspecto algodinoso com uma coloração *rose gold*. Na microscopia apresentou hifas hialinas septadas como formação de conidióforos com uma massa de conídios dispostos na parte superior. Os conídios possuíam tamanho variável com formato ovoide. A partir das análises, o fungo 24, foi previamente identificado como *Clonostachys* sp. Associação entre a macromorfologia, micromorfologia e das informações do sequenciamento da região ITS1-4, 2S-ITS2 *Clonostachys rosea* (sin. *Gliocadium rosea*) (Figura 2), o isolado apresentou índice de similaridade de 100% com o acesso MT447494.1 (*Clonostachys rosea* GFRS26) do NCBI.

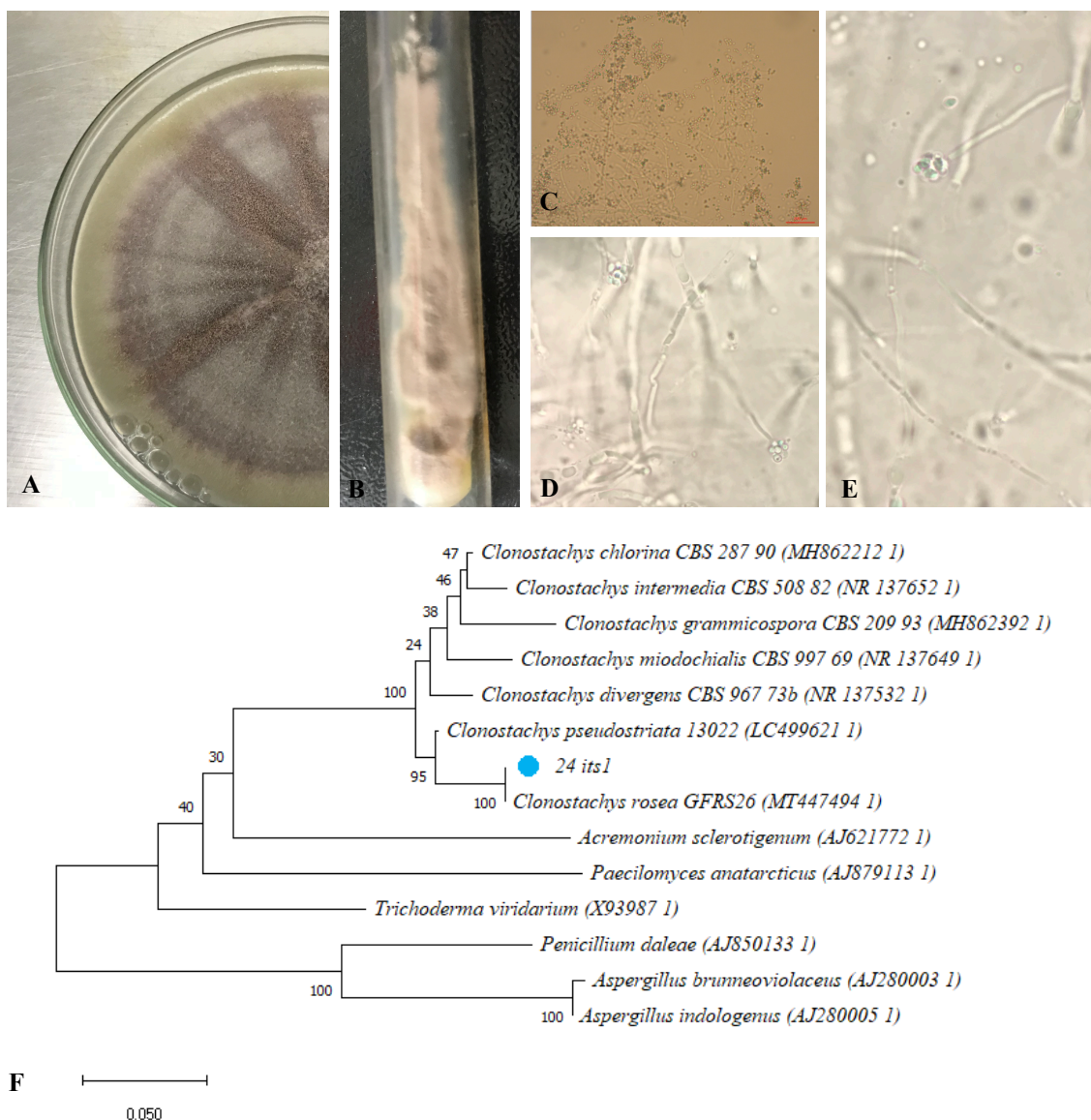
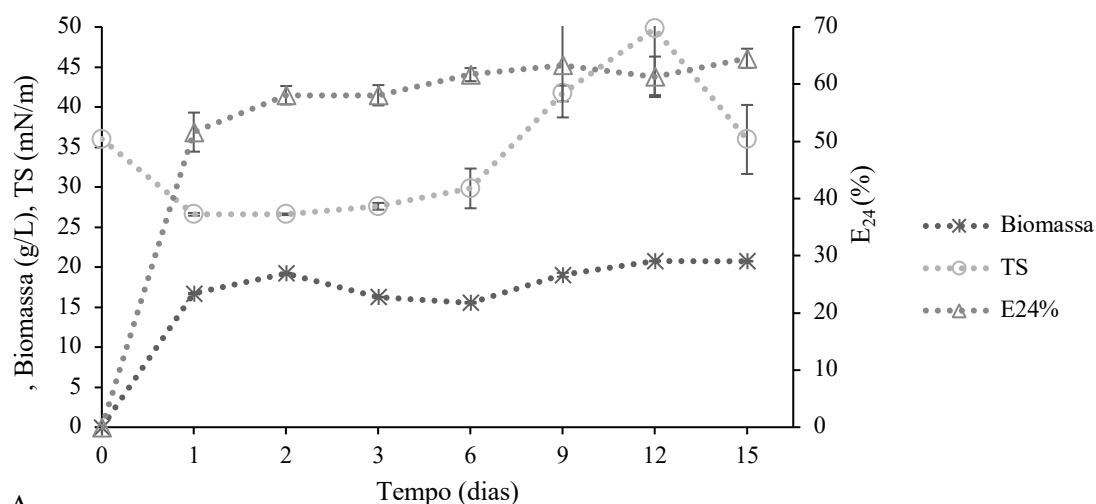


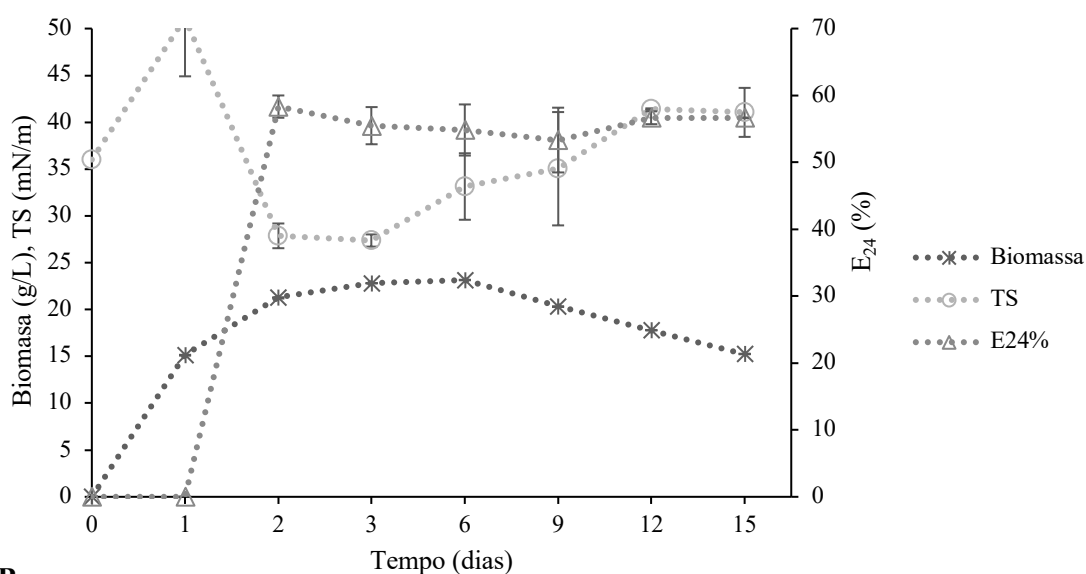
Figura 2 – Imagens relacionadas a identificação taxonômica do isolado de solo amazônico. *Clonostachys* 24. A. Detalhe da colônia no ABD na placa de Petri. B. Cultura em ABD em tubo de ensaio. C. Conídios. D-E. Conídios, conidióforos e hifas F. Árvore filogenética construída em MEGA por análise de Máxima-verossimilhança com base em um alinhamento de dados de sequência ITS1-5.8S-rDNA ITS2 para mostrar a relação do isolado estudado.

Cinética dos melhores produtores de biossurfactantes

F. oxysporum LM5634 e *C. rosea* 24 destacaram-se na produção de biossurfactantes a partir de 72h de cultivo. Observa-se para esses dois fungos redução da tensão superficial e aumento do E₂₄ (%) no início da fase exponencial. Na fase estacionária de crescimento, as propriedades tensoativas e emulsificantes dos biossurfactantes produzidos podem ser observadas (Figura 3).



A



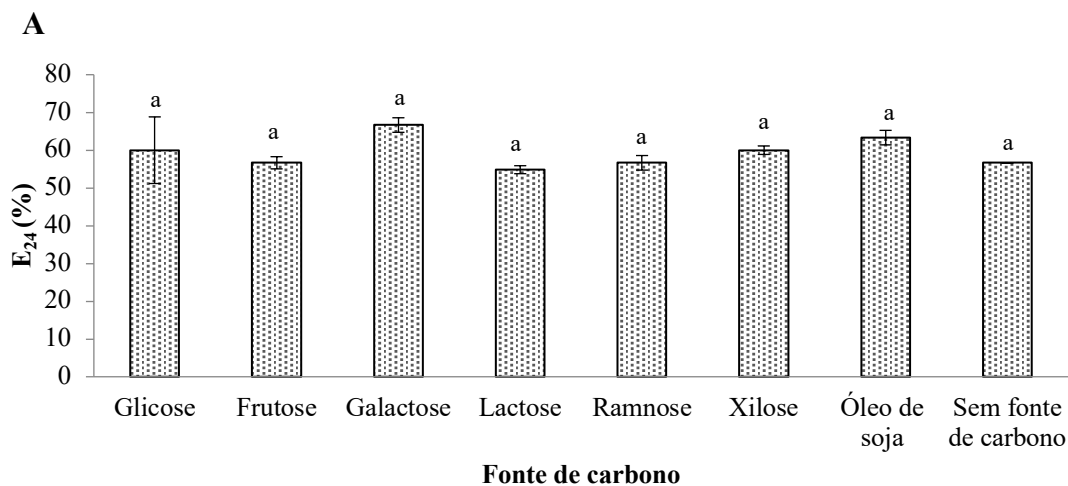
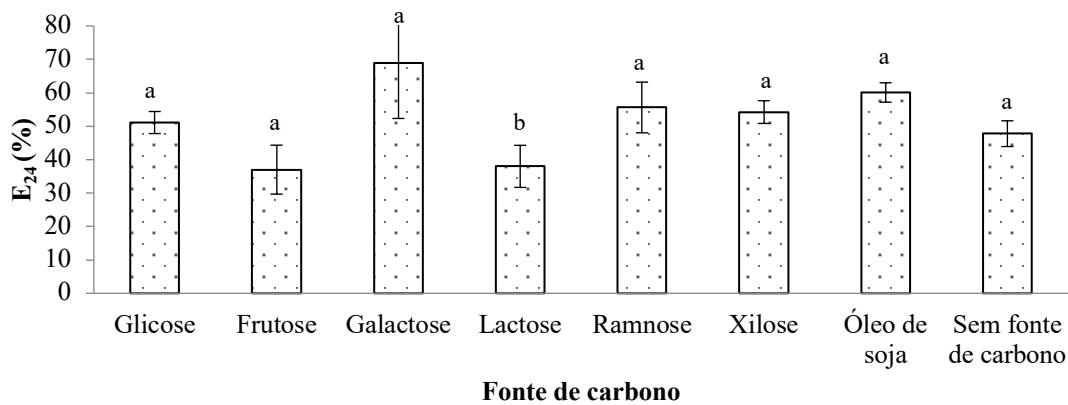
B

Figura 3- Cinética da produção de biossurfactantes pelo fungo *C. rosea* 24 (A) e *F. oxysporum* LM5634 (B), durante 15 dias, sendo avaliados os parâmetros cinéticos (Biomassa-g/L, E₂₄ (%)) e tensão superficial (TS)-mN/m).

Efeitos das fontes de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactante

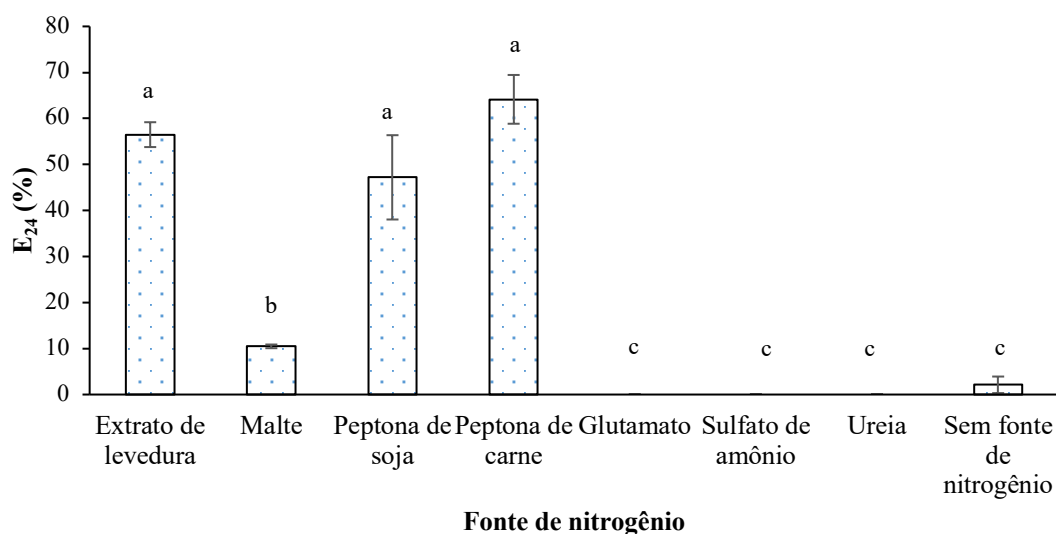
Fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas quanto a influência na produção de biossurfactante pelos fungos *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24 por meio de um experimento univariado. Observou-se que para todas as fontes de carbono, bem como no experimento sem adição de fonte de carbono, os valores E₂₄ (%) foram estatisticamente semelhantes (> 50%) para *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24 (Figura 4A e 4B). Com relação às fontes de nitrogênio para, *F. oxysporum* LM5634, o efeito do extrato de levedura foi estatisticamente o mesmo ao da peptona de soja e peptona de carne promovendo os maiores índice emulsificação >50% (Figura 5A). Para o fungo *C. rosea*

24 o extrato de levedura foi estatisticamente igual ao malte, favorecendo a maior produção de biossurfactante para este fungo (Figura 5B).

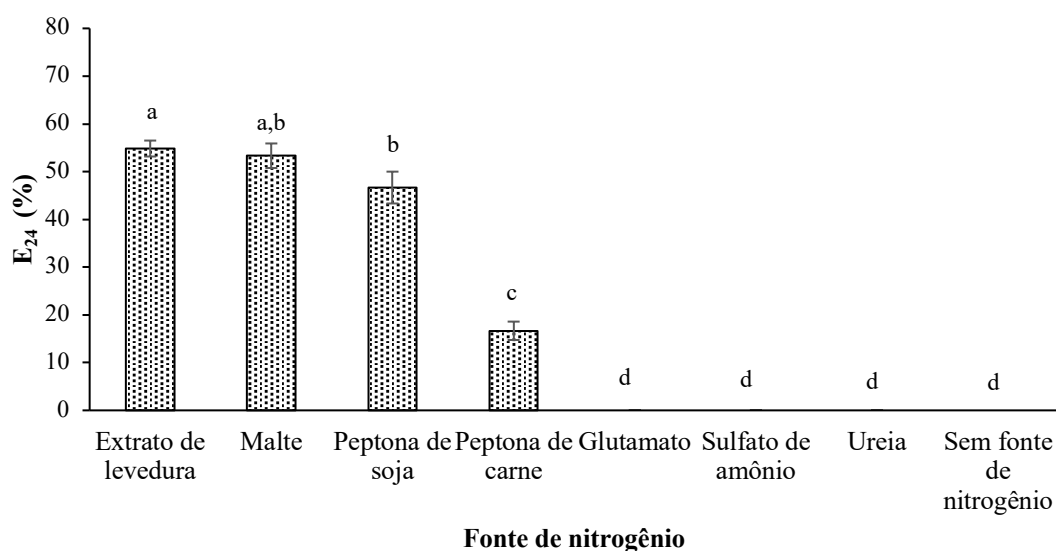


B

Figura 4- Influência das fontes de carbono na produção de biossurfactantes pelos fungos (A) *F. oxysporum* LM5634 e (B) *C. rosea* 24. Letras iguais não existe diferença estatística entre as médias pelo teste t de Student $p < 0,05$.



A



B

Figura 5 - Influência das fontes de nitrogênio na produção de biossurfactantes pelos fungos (A) *F. oxysporum* LM5634 e (B) *C. rosea* 24. Letras iguais não existe diferença estatística entre as médias pelo teste t de Student $p < 0,05$.

Planejamento fatorial 2^3 completo para as condições de produção de biossurfactante

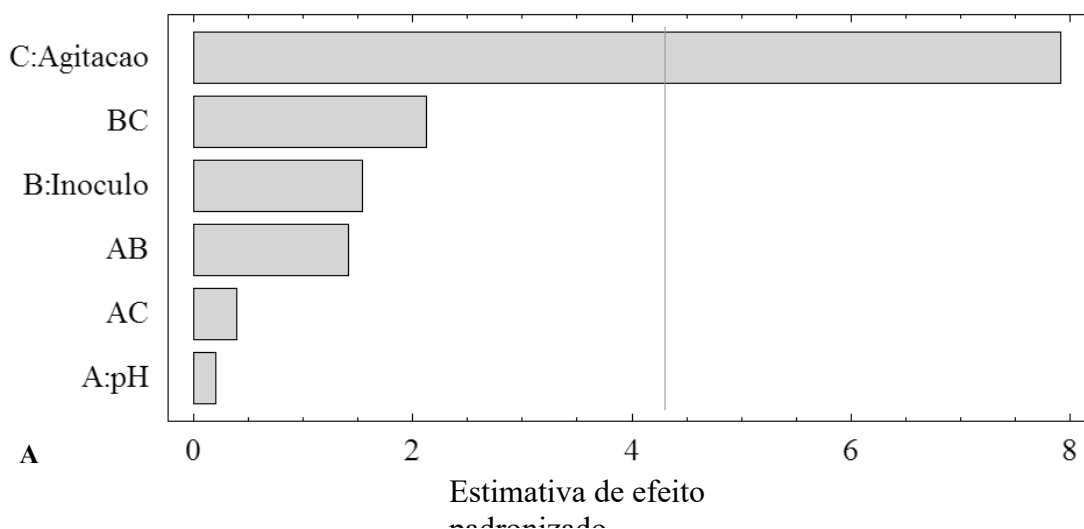
Foi investigada a influência de três fatores independentes (pH, inóculo e agitação sobre o índice de emulsificação do biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24, por meio do planejamento fatorial 2^3 sendo 8 pontos fatoriais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos. A matriz de experimentos e os resultados

da variável de resposta E_{24} (%) são apresentados na Tabela 4. Para *F. oxysporum* LM 5634 a resposta de variação foi de 38,2 a 57% e para *C. rosea* 24 houve variação de 0 a 58,8%, o que demonstra que a variação dos fatores apresenta influência significativa sobre a variável de resposta.

Tabela 4 – Matriz do planejamento fatorial experimental 2^3 e resposta do índice de emulsificação do caldo fermentado por *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24.

Ensaio	pH	Inóculo (cél/mL)	Agitação (rpm)	<i>F. oxysporum</i>	<i>C. rosea</i> 24
				LM5634	
				E_{24} (%)	
1	6,0	10000	75	50,8	57,1
2	7,0	17021	100	55,6	56,6
3	7,0	17021	50	44,4	46,6
4	5,0	2979	50	38,2	0
5	7,0	2979	50	43,3	47,7
6	6,0	10000	75	55,2	58,8
7	6,0	10000	75	54	58,7
8	5,0	17021	50	48,9	0
9	5,0	2979	100	57,5	42
10	7,0	2979	100	56,3	51,6
11	5,0	17021	100	56,3	56,6

Os efeitos dos fatores pH, agitação e inóculo foram calculados. A Figura 6 apresenta o teste de Pareto para a avaliação do valor estatístico dos efeitos frente ao erro padrão. Somente o fator agitação teve efeito na produção de E_{24} (%) de *F. oxysporum* LM5634. Todos os fatores, exceto AB, foram fatores com valor significantes na produção de E_{24} (%) para *C. rosea* 24.



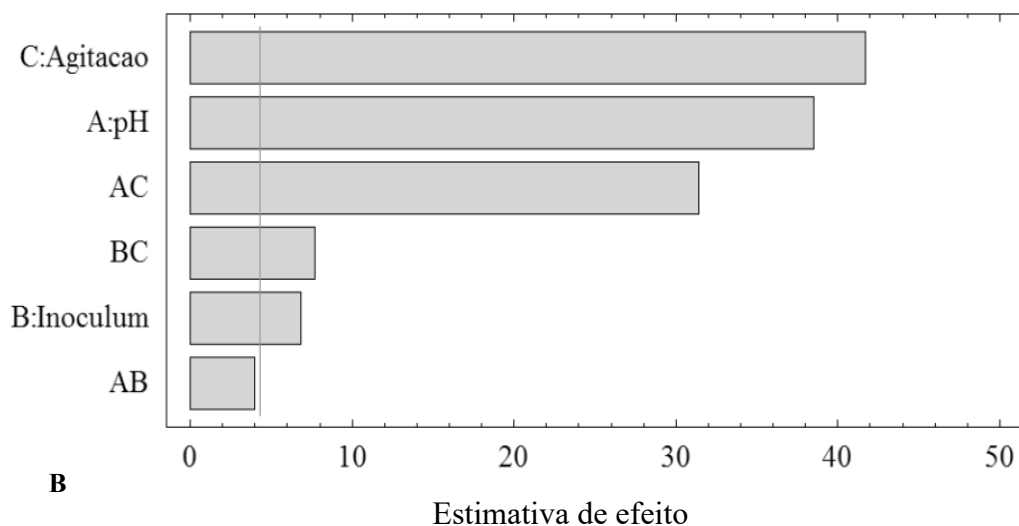
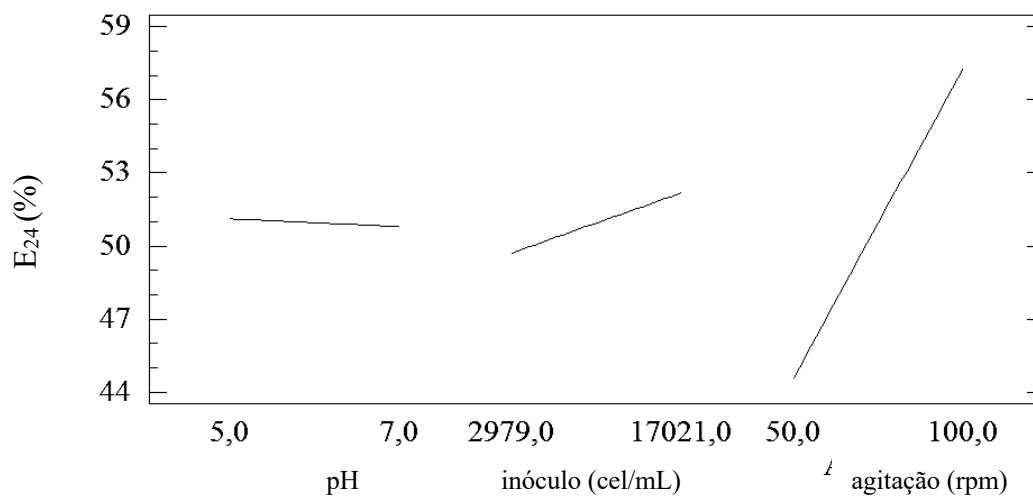


Figure 6 – Gráfico de Pareto de efeitos padronizados para agitação, pH e concentração de inóculo usando o índice de emulsificação como variável de resposta para o cultivo de (A) *F. oxysporum* LM5634 e (B) *C. rosea* 24. O ponto em que as estimativas de efeito foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) é indicado pela linha vertical.

Os efeitos principais dos fatores pH, inóculo e agitação sobre a variável de resposta índice de emulsificação calculados a partir dos dados da Tabela 4 estão representados graficamente na Figura 7A para *F. oxysporum* LM5634 e 7B para *C. rosea* 24.



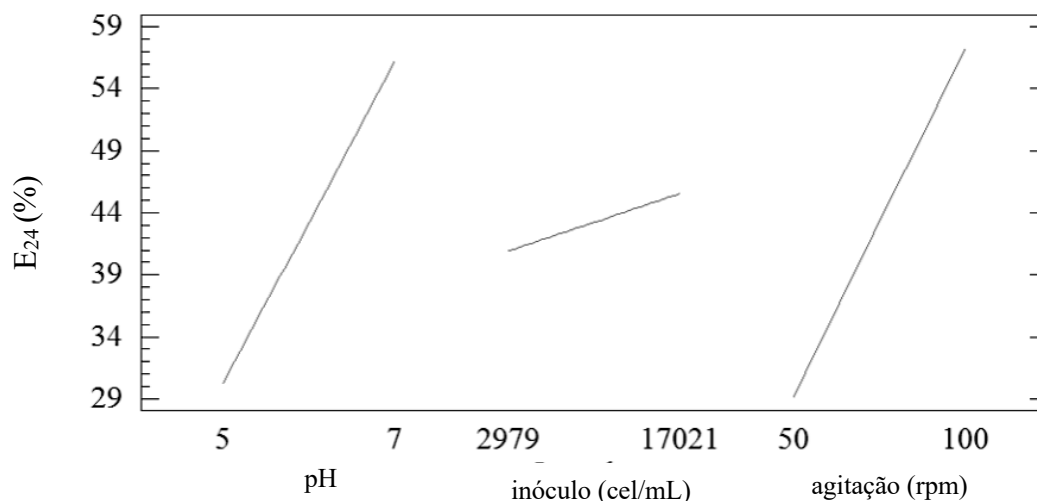


Figura 7 - Efeitos principais dos fatores pH, concentração de inóculo e agitação sobre a variável de resposta índice de emulsificação (E_{24} (%)) para o cultivo de (A) *F. oxysporum* LM5634 e (B) *C. rosea* 24.

Utilizando os fatores que foram significativos sobre os valores E_{24} (%) de *C. rosea* 24 foi elaborado um modelo matemático (Equação 1). Para validar esse modelo fizemos uma análise de ANOVA. Entretanto, somente o fator agitação teve efeito significativo para o fungo *F. oxysporum* LM 5634 não sendo possível desenvolvimento de modelo matemático para esse isolado.

$$E_{24} (\%) = -259,68 + 44,75 \cdot \text{pH} - 0,000776243 \cdot \text{Inóculo} + 2,95609 \cdot \text{Agitação} - 0,4235 \cdot \text{pH} \cdot \text{Agitação} + 0,0000147415 \cdot \text{Inóculo} \cdot \text{Agitação} \text{ (Equação 1)}$$

A análise de variância ANOVA (Tabela 5) foi realizada para validação do modelo matemático de *C. rosea* 24 (Equação 1). O modelo apresentou regressão significativa de 80, 54 %.

Tabela 5 – Modelo de análise de variância (ANOVA) que melhor se ajusta aos dados experimentais com nível de confiança de 95% para os ensaios com *C. rosea* 24.

Fatores	Soma dos quadrados	GL	Média da soma dos quadrados	F-valor	P-valor
A: pH	1349,4	1	1349,4	1482,86	0,0007
B: inóculo	42,7813	1	42,7813	42,01	0,0206
C: agitação	1582,03	1	1582,03	1738,50	0,0006
AC	896,761	1	896,761	985,45	0,0010
BC	53,5613	1	53,5613	58,86	0,0166
Falta de ajuste	945,851	3	315,284	346,47	0,0029
Erro puro	1,82	2	0,91		
Total	4872,21	10			

$$R^2 = 80,5495 \%$$

Para representar a resposta estimada (E_{24}) as superfícies foram preparadas (Figura 8) com base nos dados gerados pelo modelo. As superfícies construídas com base nas respostas do modelo mostraram que as melhores condições de cultivo para a produção de biossurfactante foram as seguintes: pH 7; inóculo, 1×10^4 e agitação de 100 rpm.

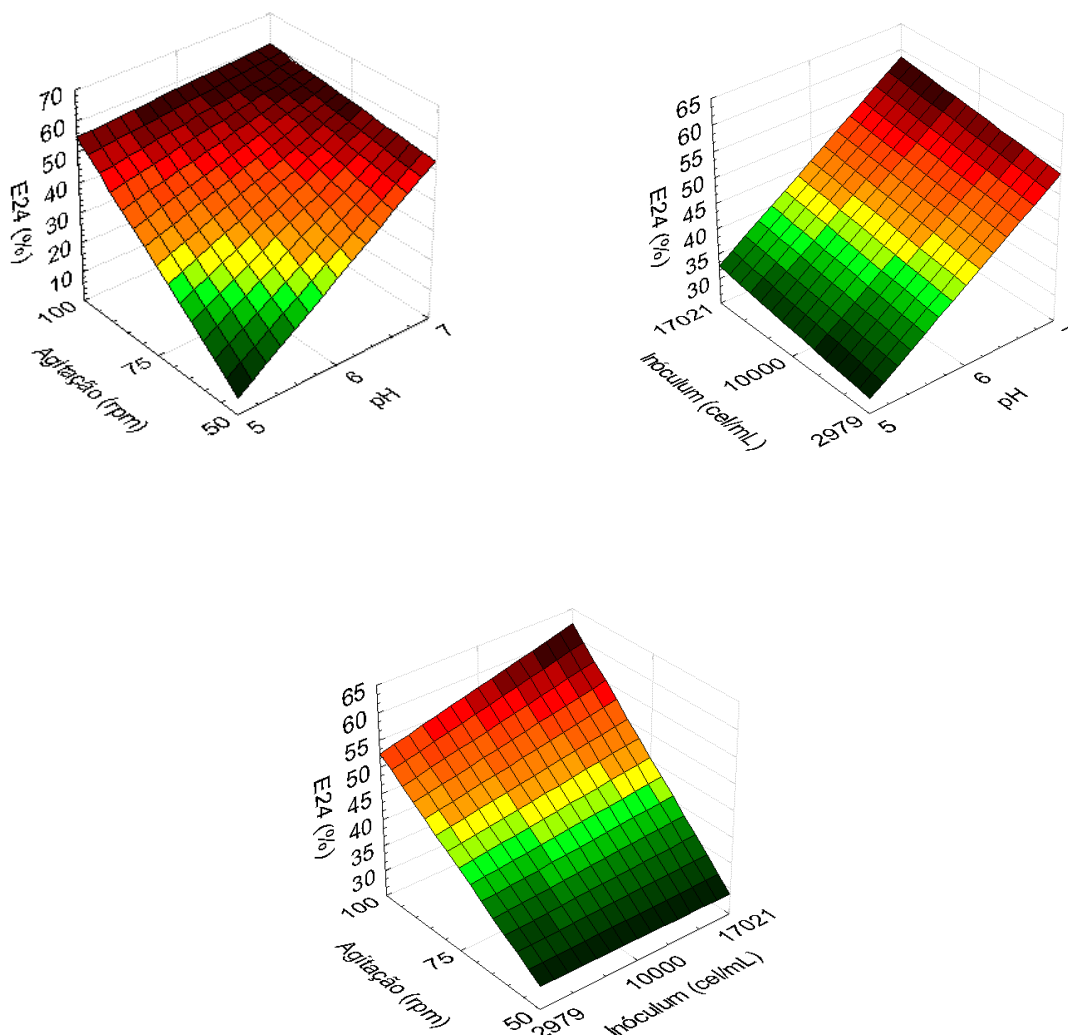


Figura 8 - Superfície de resposta para produção de biossurfactante (E_{24} %) por *C. rosea* 24, para os fatores pH, concentração de inóculo e agitação.

DISCUSSÃO

Foram descritos os resultados da produção de biossurfactante por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24 isolados de solo e serapilheira. Cinco fungos do solo e 1 da serapilheira obtiveram E_{24} (%) >50 %, atividade tensoativa na dispersão de óleo e redução da tensão superficial, indicando que os microrganismos podem ser considerados bons

produtores de biossurfactante. O presente trabalho foi o primeiro a selecionar fungos isolados de solo e serapilheira de um ambiente de campina amazônica que foram capazes de produzir biossurfactantes com potencial em aplicação industrial.

No presente trabalho o solo apresentou $1,4 \times 10^4$ UFC/g e serapilheira 6×10^3 UFC/g fungos isolados. Resultado similar foi relatado por Ismael e Ramadan (2011) que isolaram fungos de serapilheira em diversas estações, especificamente entre os isolados as maiores taxas foram de 5 a 56×10^3 UFC/mg. Por outro lado, maiores valores de UFC no solo e serapilheira foram observadas em um estudo de comparação de área impactadas e não impactadas, sendo 90×10^3 para solo e 54×10^3 para serapilheira (FRAGA; PEREIRA, 2012). De acordo com o estudo de Voriskova e Baldrian (2013) ocorre uma sucessão de fungos durante a decomposição da serapilheira provavelmente ocasionada pelas mudanças de disponibilidade de nutrientes como os polissacarídeos, ligninas e nitrogênio, além de mudança nas interações fúngicas inespecíficas, o que corrobora com as variações de UFC relatada nesse estudo quando comparada a literatura.

Neste estudo, os fungos isolados foram do gênero *Aspergillus*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Acremonium* e os demais isolados foram categorizados como *Mycelia sterilia*, ou seja, sem estruturas reprodutivas assexuadas. Gêneros similares, como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Penicillium* foram isolados de serapilheira. Sabe-se que esses gêneros tem participação significativa na decomposição de matéria orgânica, principalmente devido a sua capacidade de produzir substâncias com propriedades bioativas nessa camada do solo (LAKSHMI SRI; NARASIMHA, 2012; PEDNEKAR et al., 2016; PINOTTI et al., 2011). Isolamento similar foi realizado por Fraga et al., (2021) que isolaram 87 fungos, dentre esses somente 22 fungos foram identificados conforme os principais gêneros relatados no presente estudo. Os fungos isolados de solo e serapilheira podem ser considerados fungos promotores de crescimento ou antagonistas a fungos fitopatogênicos, como os gêneros *Clonostachys* e *Trichoderma* (PINOTTI et al., 2011), especificamente, *Clonostachys* é um agente de biocontrole contra patógenos de plantas, atuando contra parasitas e podem induzir a resistência das plantas aos fitopatógenos (DE ANDRADE CARVALHO et al., 2018).

Para a seleção de fungos produtores de biossurfactante, foram utilizados os parâmetros índice de emulsificação, tensão superficial e teste de dispersão de óleo. Dentre os isolados, 6 fungos apresentaram E_{24} (%) acima de 50% e também possuíam propriedades tensoativas. *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM 5634 apresentaram capacidade

emulsificante e tensoativa mais promissora. Sena et al., (2018) investigaram a produção de biossurfactantes por fungos isolados do solo amazônico e, entre os fungos obtidos, os gêneros que apresentaram alta capacidade de emulsificar o tolueno foram *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium*. O gênero de fungo *Fusarium* está bem estabelecido como produtor de biossurfactante (BHARDWAJ; CAMEOTRA; CHOPRA, 2015; QAZI et al., 2013; REIS et al., 2018; SANCHES et al., 2018; SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017), por outro lado, observa-se no presente estudo o primeiro relato de biossurfactante produzido pelo fungo filamentosso *C. rosea*.

A produção de biossurfactante começou na fase estacionária inicial (3 dias) de crescimento celular e atingiu níveis máximos aos 15 dias de cultivo. Cinética semelhante de produção de biossurfactante por *Fusarium* BS-8 foi de 63% de índice de emulsificação (QAZI et al., 2013). A secreção de biossurfactante na fase estacionária tardia é característica dos fungos (PARASZKIEWICZ; KANWAL; DŁUGÓNSKI, 2002). Segundo Kiran et al. (2009) a produção de biossurfactante atinge um pico no final da fase exponencial e continua na fase estacionária, característica observada na produção de biossurfactante por *Aspergillus ustus* MSF3. Porém, é interessante produzir o composto em menos tempo, a fim de favorecer a competição com os biossurfactantes produzidos por leveduras e bactérias, que tem um tempo de produção mais rápido (AMARAL et al., 2008).

Em nosso estudo, as fontes de carbono foram estatisticamente semelhantes na influência da produção de biossurfactante demonstrando a versatilidade do fungo no uso de diferentes fontes de carbono de diferentes açúcares assim como na ausência da fonte de óleo. Segundo Silva et al., (2018) e Bhardwaj et al., (2013) a principal fonte de síntese do biossurfactante é o carboidrato no meio de cultura que atua na formação da porção hidrofílica e a porção lipídica. Vários estudos têm investigado a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactante obtido a partir de óleo vegetal, hidrocarbonetos e resíduos agroindustriais (BHARDWAJ; CAMEOTRA; CHOPRA, 2015; SANCHES et al., 2018; SENA et al., 2018). Extrato de levedura e peptona foram as melhores fontes de nitrogênio para *F.oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24, respectivamente. Estudo semelhante mostrou que *Penicillium* produziu biossurfactante quando foi usado extrato de levedura na composição do meio do cultura, mas não foi capaz de produzir na presença de nitrogênio inorgânico (SENA et al., 2018).

Os resultados deste estudo demonstram que entre os fatores estudados (pH, inóculo e agitação) a agitação teve efeito significativo na variável de resposta (índice de

emulsificação) do biossurfactante tanto para *F. oxysporum* LM5634 quanto para *C. rosea* 24. O modelo matemático validado demonstrou que um E₂₄ de 60 % poderia ser obtido utilizando pH 6,0; concentração de inóculo 1x10⁴ e agitação de 100 rpm do bioprocesso. A produção máxima de biossurfactante ocorreu em condições ideais para crescimento de produção de biossurfactante por fungos, sendo a agitação um fator significativo no estudo. A agitação afetou a redução da tensão superficial do biossurfactante produzido pelo *Fusarium fujikuroi* UFSM-BAS-01 (REIS et al., 2018). Isso provavelmente ocorreu porque a agitação é necessária para fornecer quantidades de oxigênio aos fungos. O aumento da velocidade de agitação influencia outros bioprocessos, tais como na produção de enzimas e outros metabólitos fúngicos (BAKRI; MEKAEEL; KOREIH, 2011).

Na literatura são descritos biossurfactantes produzidos pelo gênero *Fusarium*, como α,β -trehalose por *Fusarium fujikuroi* (REIS et al., 2018), lipopeptideo por *Fusarium* BS-8(QAZI et al., 2013), enamida por *Fusarium proliferatum* (BHARDWAJ; CAMEOTRA; CHOPRA, 2015) e ácidos graxos por *Fusarium oxysporum* (SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017). Porém, ainda não se tem relato de classes de biossurfactantes produzidos por *C. rosea*.

Este estudo abordou especificamente os parâmetros da produção de biossurfactantes apenas por um novo isolado de solo juntamente com um fungo previamente descrito como produtor de biossurfactante. Entretanto, a possível potencialidade de outros isolados foi inexplorada, incluindo alguns fungos com altos níveis de emulsificação na seleção primária, que poderiam ser melhorados após possíveis tratamentos de condições de cultivo, assim como estudos comparativos entre as duas camadas de coleta (solo e serapilheira). Portanto, os resultados obtidos são promissores e demonstram que outras abordagens biotecnológicas podem ser utilizadas para melhorar a produção de biossurfactantes pelos fungos estudados.

O presente estudo investigou potencialidade do biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24 isolados de solo de campina da região amazônica do Brasil. O estudo descreveu uma abordagem simples e fácil de realizar para a triagem do biossurfactante que não requer nutrientes mais caros para a produção sendo utilizado metodologias de quantificação direta do caldo filtrado da cultura para atividade de emulsificação e tensoativas.

CONCLUSÃO

- O solo de campina amazônico abriga potenciais fungos produtores de biossurfactantes, entre estes uma nova espécie *C. rosea* produtora de biossurfactante.
- *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM5634 apresentam atividade emulsificante e tensoativa, possuindo capacidade de produzir a substância ainda na fase exponencial de crescimento.
- Os fungos estudados possuem versatilidade no uso de fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biossurfactante.
- A agitação é um fator significativo na produção de biossurfactante.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. F. F. et al. Biosurfactants from Yeasts. *Biosurfactants*, p. 1–14, 2008.
- BAKRI, Y.; MEKAEEL, A.; KOREIH, A. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Influence of Agitation Speeds and Aeration Rates on the Xylanase Activity of *Aspergillus niger* SS7. *Archives Biology Technology*. vol. 54, n. August, p. 659–664, 2011.
- BANAT, I. M. et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. *Frontiers in microbiology*, v. 5, n. December, p. 697, jan. 2014.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4. ed. USA: Burgess Publishing Co, 1998.
- BARROS NETO, B. ; SCARMINIO, I. S. ; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas, 1995.
- BHARDWAJ, G. Biosurfactants from Fungi: A Review. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, v. 04, n. 06, p. 1–6, 2013.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Advances*, v. 5, n. 67, p. 54783–54792, 2015.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal J Trop Hyg*, v. 24, p. 270–6, 1939.
- CASTIGLIONI, G. L. et al. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 292–295, 2009.
- CLARK, F. E. Agar-Plate Method for Total Microbial Count. In: *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9.2. [s.l: s.n.]. p. 1460–1466.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.

- DA SILVA, M. et al. Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. Applied Microbiology. p. 0–1, 2019.
- DE ANDRADE CARVALHO, A. L. et al. Optimizing the mass production of *Clonostachys rosea* by liquid-state fermentation. Biological Control, v. 118, n. 2017, p. 16–25, 2018.
- DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. Current Opinion in Colloid and Interface Science, v. 48, p. 77–90, 2020.
- ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T. S.; ALMAGHRABI, O. A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 22, n. 4, p. 466–475, 2015.
- FRAGA, M. E.; PEREIRA, M. G. Diversidade de Trichocomaceae Isolada de Solo e Serrapilheira de Floresta Atlântica. Floresta e Ambiente, v. 19, n. 4, p. 405–413, 2012.
- GUIMARÃES, F. S. As campinas e campinaranas amazônicas. Caderno de Geografia, v. 26, n. 45, p. 113–133, 2016.
- HELMY, Q. et al. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts. International Journal of Biotechnology, v. 12, n. 1–2, p. 66–86, 2011.
- ISMAEL, H. M.; RAMADAN, N. Isolation of Fungi Seasonally from Soil, Air and Water in Villages in “ Binary Isolation of Fungi Seasonally from Soil, Air and Water in Villages in “ Binary Safeen ”. The 4th International Scientific Conference of Salahaddin University-Erbil, n. October, 2011.
- LACAZ, C.; PORTO, E.; MARTINS, J. Microbiologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 2001.
- LAKSHMI SRI, A.; NARASIMHA, G. Production of cellulases by fungal cultures isolated from forest litter soil. Annals of Forest Research, v. 55, n. 1, p. 85–92, 2012.
- LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.
- LIMA, J. M. S. et al. Potential biosurfactant producing endophytic and epiphytic fungi, isolated from macrophytes in the Negro River in Manaus, Amazonas, Brazil. African Journal of Biotechnology, v. 15, n. 24, p. 1217–1223, 15 jun. 2016.
- MINAMI, P. S. Micologia: Métodos laboratoriais de diagnóstico das micoses. 1. ed. [s.l.] Editora Manole, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- NONAKA, K. et al. Combination cellulose plate (non-agar solid support) and agar plate method improves isolation of fungi from soil. Journal of Antibiotics, v. 67, n. 11, p. 755–761, 2014.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DŁUGÓŃSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. Journal of Biotechnology, v. 92, p. 287–294, 2002.
- PEDNEKAR, A. S. et al. RESEARCH ARTICLE ISOLATION, IDENTIFICATION AND ECOLOGICAL SIGNIFICANCE OF LITTER FUNGI * Amisha Shirodker Pednekar, Akshata Kudcherkar, Deepika Shet Verenkar, Nidhi R. R Tallur and Rutuja Lotliker Department of Botany, Parvatibai Chowgule College of. International journal of current research, v. 8, n. 10, p. 40350–40353, 2016.
- PEREIRA, D. D. F.; JÚNIOR, S. D.; ALBUQUERQUE, P. M. O Estudo Da Produção De Biossurfactantes Por Fungos Amazônicos. The Journal of Engineering and Exact Sciences, v. 3, n. 4, p. 688–695, 2017.

- PINOTTI, M. et al. Isolamento de fungos de solo associados a culturas de amora, framboesa e mirtilo no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 6, n. 1, p. 67–80, 2011.
- QAZI, M. A. et al. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp . BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, v. 3, n. 6, 2013.
- REBELLO, S. et al. Surfactants: Chemistry, Toxicity and Remediation. [s.l: s.n.].
- REIS, C. B. L. DOS et al. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 185–192, 2018.
- RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, v. 42, n. 2, p. 265, 1950.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. In: *Environmental microbiology*. Blackwell ed. [s.l: s.n.]. v. 3p. 229–236.
- SANCHES, M. et al. Biosurfactant Production by *Fusarium oxysporum* LM 5634 Using Peels from the fruit of *Bactris gasipaes* (Kunth) as Substrate. *Biotechnology Journal International*, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2018.
- SANCHES, M. A. et al. Production of Biosurfactants by Ascomycetes. *International Journal of Microbiology*, v. 2021, p. 6669263, 2021.
- SANTHAPPAN, R.; PANDIAN, M. R. Characterization of Novel Biosurfactants Produced by the Strain *Fusarium oxysporum*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v. 08, n. 06, p. 6–11, 2017.
- SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, jan. 2016.
- SENA, H. H. et al. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest *International Journal of Microbiology*, 2018.
- SHAH, N. et al. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. *Indian Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 1, p. 5, 2016.
- SILVA, A. C. S. DA et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 85, n. 0, p. 1–12, 2018.
- SPELLBERG, B. Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS pathogens*, v. 4, n. 2, p. e38, 8 fev. 2008.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 12, p. 2725–9, dez. 2013.
- VORISKOVA, J.; BALDRIAN, P. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME Journal*, v. 7, n. 3, p. 477–486, 2013.
- WHITE, T. . et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. [s.l: s.n.]. p. 315–322.

4 CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido para publicação na Revista *Brazilian Journal of Microbiology*

**RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Fusarium oxysporum* LM 5634 E
Clonostachys rosea 24 ISOLADOS DE SOLO AMAZÔNICO**

Michele Alves Sanches¹, Márcio Nardelli Wandermuren², Ana Cláudia Alves Cortez³,
Érica Simplicio de Souza², Patrícia Melchionna Albuquerque⁴, João Vicente Braga de
Souza³

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Bionorte, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Brasil.

²Universidade de São Paulo – USP, São Paulo – Brasil.

³Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil.

⁴Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil.

INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são compostos de estrutura anfifílica com porções polares e não polares, produzidos por micro-organismos ou presentes em plantas e animais (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Nos últimos anos o aumento de pesquisas associadas a esse composto biossurfactante se deve a possibilidade de substituição dos surfactantes sintéticos, pois estes são derivados do petróleo e apresentam desvantagens como baixa degradabilidade e citotoxicidade (LÉMERY et al., 2015). Somado a essas características, o biossurfactantes podem ser aplicados em diversos setores que envolvem processos de emulsificação, detergência, umectação, lubrificação, dispersão, assim como em aplicações mais específicas como no setor cosmético e biomédico (SAHA; RAO, 2017; SANTOS et al., 2016).

Estudos com micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido investigados como produtores de biossurfactantes com potencial para aplicação industrial. Especificamente, os fungos filamentosos destacam-se com produtores de metabólitos secundários, pela capacidade de crescer em substratos e fácil manutenção no bioprocessamento (SILVA et al., 2018).

As moléculas de biossurfactantes produzidas por micro-organismo são mais complexas que a dos surfactantes sintéticos, pois possuem combinações de diferentes estruturas como proteínas, glicolípídeos, ácidos graxos, fosfolípídios, entre outras

(SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017). Estratégias de precipitação, purificação e caracterização têm sido investigadas para se determinar os tipos de biossurfactantes produzidos por fungos (BHARDWAJ, 2013; SATPUTE et al., 2010).

Biossurfactantes produzidos pelo gênero *Fusarium* foram descritos das classes dos trealolídeos (α , β trealose) (REIS et al., 2018), lipopetideo (QAZI et al., 2014), ácidos graxos (SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017) e enamida ((BHARDWAJ; CAMEOTRA; CHOPRA, 2015). Entretanto, ainda não se tem relato de biossurfactantes identificados para *Clonostachys rosea*.

Diante do exposto, foi avaliado o estudo de precipitação e caracterização estrutural envolvendo técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e análise de infravermelho para os biossurfactantes produzidos por *Fusarium oxysporum* LM5634 e *Clonostachys rosea* 24.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

O fungo *Fusarium oxysporum* LM5634 foi utilizado no presente estudo concomitantemente ao isolado *Clonostachys rosea* 24 isolados de solo da floresta amazônica. Esses isolados pertencem à coleção de micro-organismos de interesse médico do Instituto Nacional em Pesquisas na Amazônia – INPA e já haviam sido testados quanto a produção de biossurfactantes (Sanches et al, 2021). Os fungos foram mantidos em cultura no meio ágar batata dextrose (ABD).

Produção de biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada utilizando o meio previamente descrito por Sena et al. (2018). O meio de produção tinha 10 g/L de extrato de levedura (Kasvi®) e 40 g/L de óleo de soja (Soya®). O bioprocesso foi realizado durante 3 dias em agitação orbital a 100 rpm à temperatura ambiente. Após o bioprocesso, o caldo foi previamente filtrado com papel filtro N° 1 (Quanty®) e o sobrenadante livre de células foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min. O caldo obtido foi utilizado nas etapas posteriores.

Índice de emulsificação (E24%)

A atividade emulsificante foi mensurada pelo cálculo do índice de emulsificação (COOPER; GOLDENBERG, 1987). O hidrocarboneto Tolueno (Toluol puro – SYNTH®) foi adicionado ao caldo livre de célula (1:1 v/v) em um tubo de rosca (16 cm x150 mm) onde foi medida inicialmente a altura total das fases imiscíveis, seguida pela agitação em agitador de tubo tipo *vórtex* (Phoenix® - AP 56) por 2 min, e posteriormente mantida em repouso por 24 h. Após esse tempo, foi medido apenas a altura da emulsão formada. O índice foi calculado pela seguinte equação:

$$E_{24} = (\text{altura da emulsão/altura total}) \times 100$$

Avaliação do rendimento do biossurfactante a partir de dois métodos de extração

Após detectar a produção de biossurfactantes pelos fungos por meio do índice de emulsificação, dois métodos de extração foram testados para extrair o biossurfactante do caldo livre de células após os cultivos: (1) precipitação ácida com ácido clorídrico (HCl) e (2) extração com etanol a baixa temperatura (-4 °C) 98,8%.

Para extração ácida, o pH do sobrenadante remanescente foi ajustado para pH 2,0 com HCl 1 N para precipitar o biossurfactante. O sobrenadante acidificado foi mantido a 4 °C por 12 h. O caldo acidificado foi centrifugado a 5500 rpm por 20 minutos para a recuperação do biossurfactante precipitado (ANTUNES et al. 2010).

Para a extração com etanol gelado, foi utilizada a proporção 3:1 (etanol:sobrenadante) o preparado foi deixado em repouso por 48h a 4 °C. Posteriormente o precipitado foi recolhido por centrifugação a 5500 rpm, por 20 min a -4 °C (SENA et al., 2018).

O ensaio de precipitação com maior rendimento em g/L foi selecionado para as etapas posteriores, sendo o precipitado deixado em temperatura ambiente para evaporar o etanol, pesado e preparado para os testes de caracterização.

Caracterização do biossurfactante bruto

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foram realizadas no

laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/MS)

As amostras extraídas foram dissolvidas em água e metanol 1:1 para serem analisadas por CG/MS utilizando o equipamento QP2020-Shimadzu. Os parâmetros operacionais do equipamento foram estabelecidos para a identificação do biossurfactante em estudo sendo que para a cromatografia gasosa utilizou-se: coluna RTX 5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de diâmetro interno, temperatura inicial da coluna 50 °C, temperatura de injeção 280 °C, pressão 107.4 kpa, fluxo da coluna 1.82 mL/min, fluxo de purga 3.0 mL/min e *Split ratio* 5.0. Os parâmetros operacionais para a espectrometria de massa foram: temperatura da fonte de íon 280 °C, temperatura da interface 280 °C e tempo de corte do solvente 2.50 min. Os dados foram tratados no software Labsolutions da Shimadzu e os espectros de massas produzidos foram comparados com os da biblioteca digital da NIST (National Institute of Standards and Technology) database versão 14 (NIST 14).

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram maceradas junto com 30 mg de brometo de potássio (KBr) seco a 100 °C. Após ser maceradas em pistilo, foram colocadas em pastilhador de 32 mm e prensadas a 7 toneladas formando uma pastilha. A pastilha foi colocada em suporte próprio e inserida no equipamento de FTIR (Perkin Elmer-Frontier), sendo coletado o espectro em 32 scans na faixa de 4000 a 400 nm. A análise dos espectros de infravermelho (IV) foi realizada usando o software OPUS 3.1 (Bruker Optics).

Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas para cálculos de média e desvio padrão quando necessário.

RESULTADOS

Rendimento da extração do biossurfactante a partir do caldo fúngico

Os precipitados obtidos apresentaram-se diferentes macroscopicamente, sendo o precipitado de *F. oxysporum* LM 5634 com uma coloração marrom escuro e o precipitado de *C. rosea* 24 uma coloração bege (Figura 1). O maior rendimento obtido foi com o biossurfactante produzido pelo fungo *C. rosea* 24 nos dois métodos de extração em comparação com o fungo *F. oxysporum* LM 5634 (Tabela 1). A propriedade tensoativa dos biossurfactantes recuperados foi avaliada pelo índice de emulsificação, obtendo-se $E_{24} = 60\%$ (precipitação ácida) e 30% (precipitação com etanol) para *C. rosea* 24 e $E_{24} = 56\%$ (precipitação ácida) e 45% (precipitação com etanol) para *F. oxysporum* LM 5634 (Figura 2).

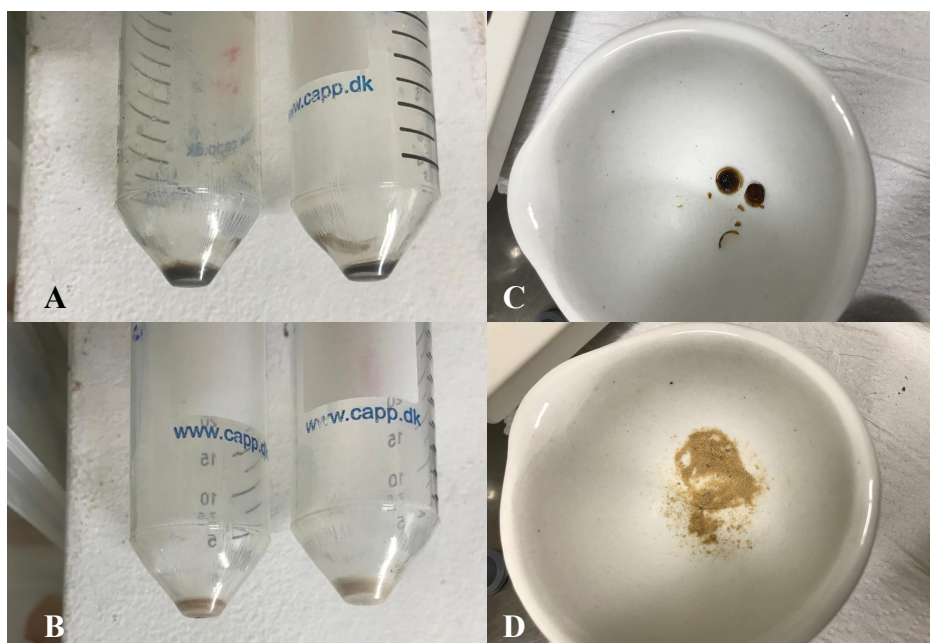


Figura 1 – Aspecto do biossurfactante após precipitação e maceração. A) Precipitado de *F. oxysporum* LM 5634. B) Precipitado de *C. rosea* 24. C-Precipitado. D-Precipitado macerado.

Tabela 1 Comparação do rendimento por dois métodos de extração de biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24.

Fungo	Rendimento (g/L)	
	Precipitação ácida	Precipitação alcoólica
<i>Fusarium oxysporum</i> LM 5634	0,15 ± 0,01	0,28 ± 0,02
<i>Clonostachys rosea</i> 24	0,5 ± 0,03	0,76 ± 0,04

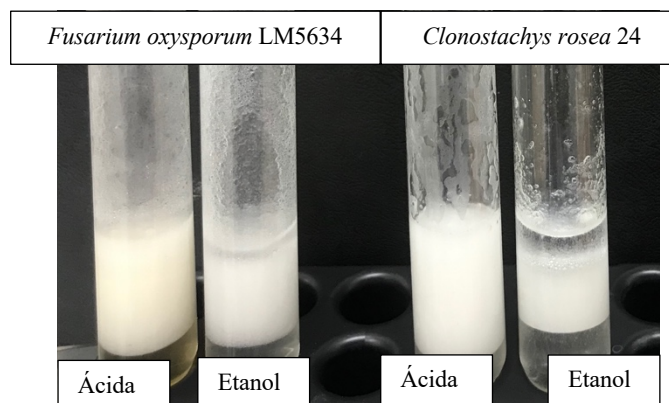


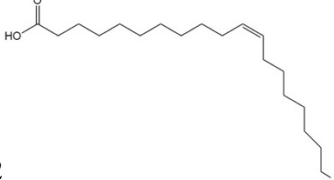

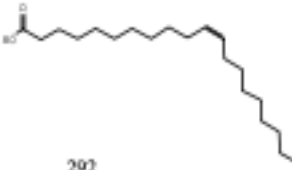
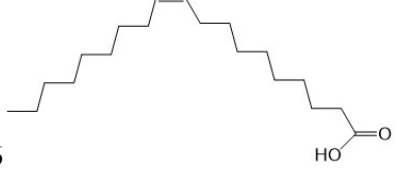
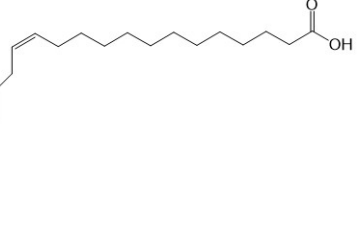
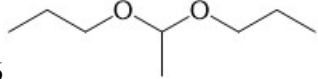
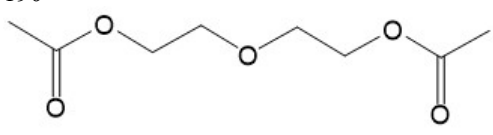
Figura 2 – Emulsificação de hidrocarboneto (tolueno) a partir dos biossurfactantes produzidos pelos fungos *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24, após precipitação por acidificação e com etanol após 24 h.

Caracterização de biossurfactantes por análise de FTIR e CG/MS

Com a finalidade de identificar a composição, o precipitado foi submetido a ensaios de GC-MS e FTIR.

Os diferentes compostos detectados através da análise de CG-MS para os precipitados obtidos com etanol com índice de similaridade > 93% estão apresentados na Tabela 2. Os cromatogramas estão disponíveis na Figura 3, onde o principal composto detectado por CG-MS no biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM5634 foi o cis-ácido vacênico e para o biossurfactante precipitado obtido de *C. rosea* 24 foi o 2,2-dimetoxibutano.

Tabela 2 Lista de componentes associados ao pico majoritário de massa 95 e massa 8 a partir da análise de CG/MS com índice de similaridade > 93 % dos biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24, respectivamente.

	Índice de Retenção (min)	Nome do componente	Fórmula molecular	Estrutura química e massa molecular
<i>F. oxysporum</i> LM 5634 (Tempo de Retenção 51.855) massa 95	2175	cis-ácido vacênico	$C_{18}H_{34}O_2$	 282
	1976	9-ácido hexadecenoico	$C_{16}H_{30}O_2$	 254
	2374	11-ácido eicosenoico	$C_{20}H_{38}O_2$	 310
	2274	10-ácido nonadecenoico	$C_{19}H_{36}O_2$	 296
	2572	Ácido erúcido	$C_{22}H_{42}O_2$	 338
	<i>C. rosea</i> 24 (Tempo de retenção de 2.950) massa 8	685	2,2-dimetoxibutano	$C_6H_{14}O_2$
904		1,1-Dipropoxietano	$C_8H_{18}O_2$	 146
1227		Dietilenoglicol	$C_8H_{14}O_5$	 190

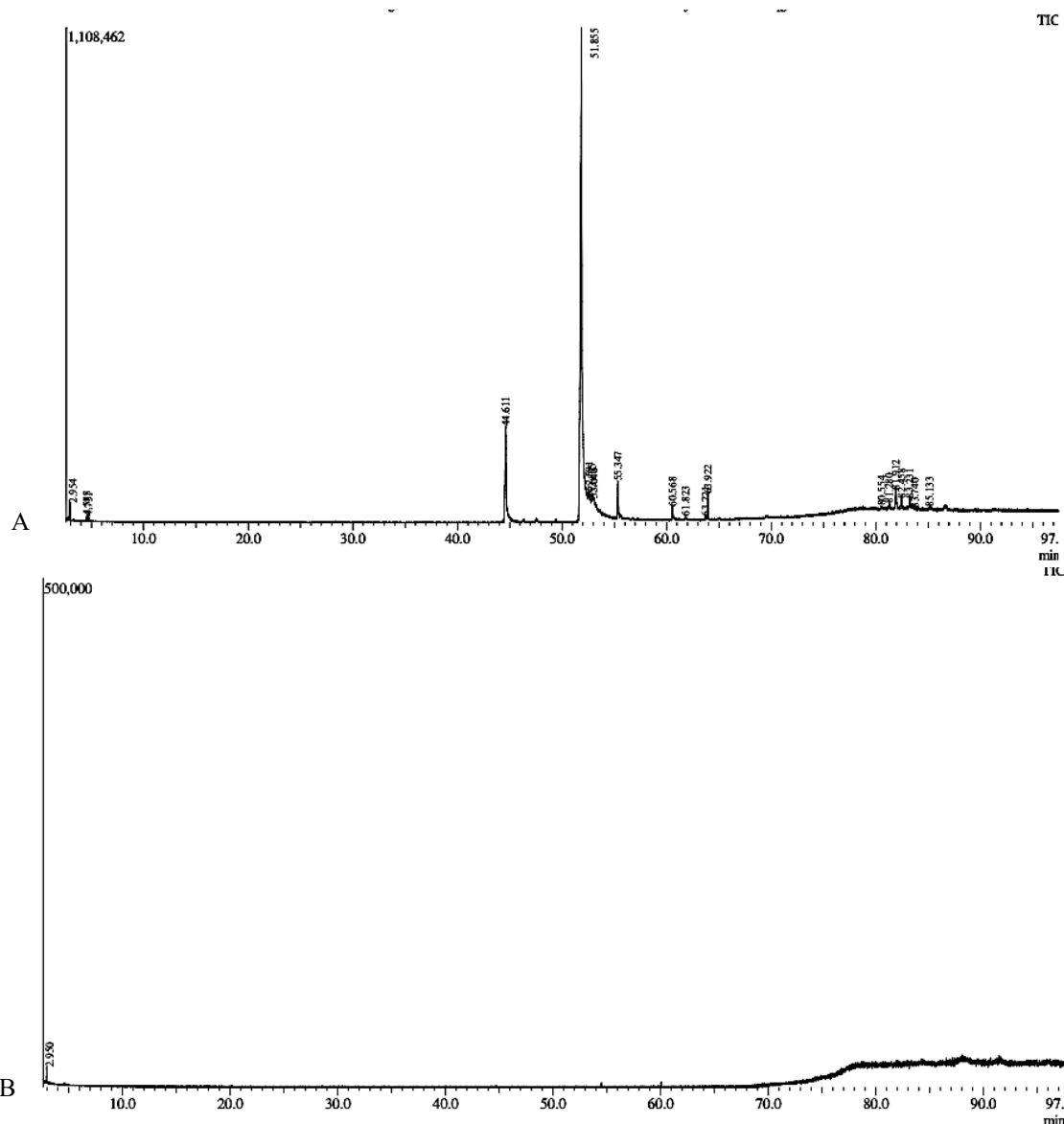
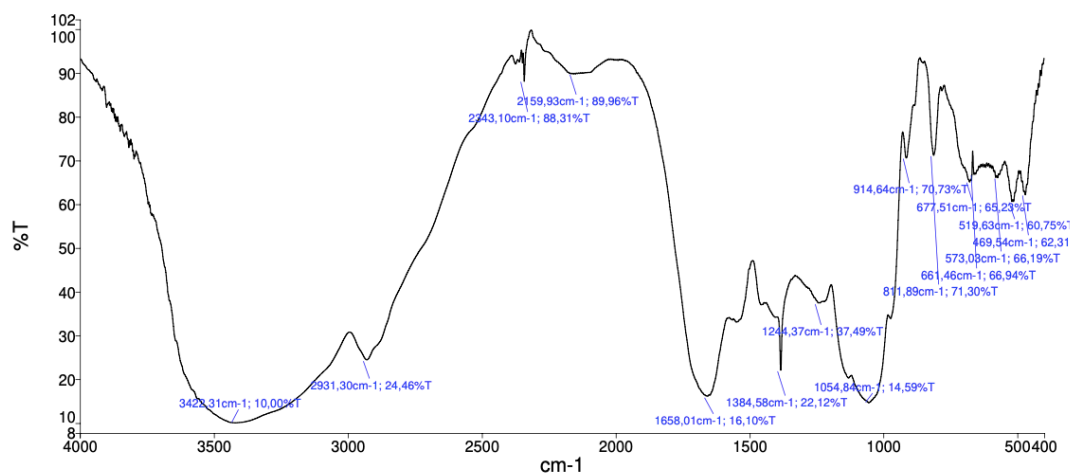


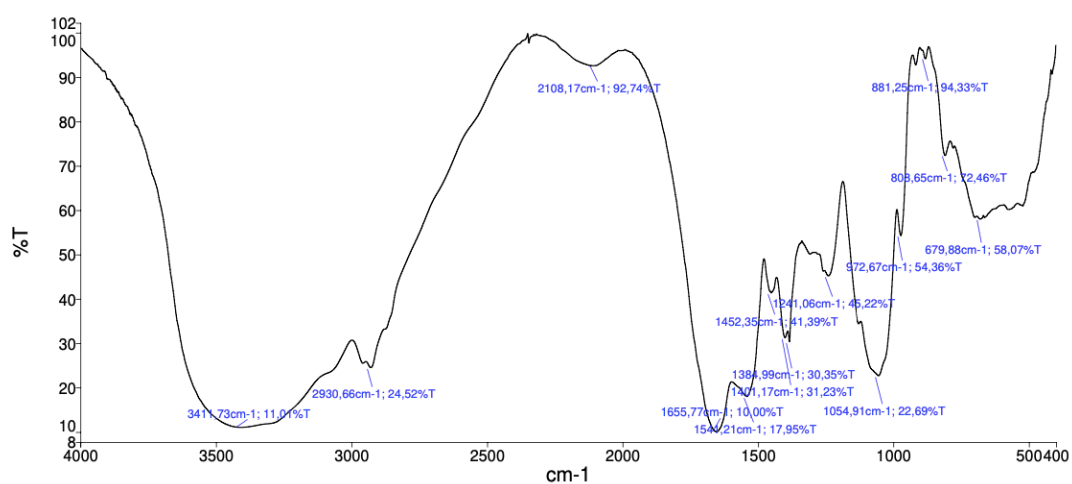
Figura 3 – Picos principais detectados na cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas para os biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* LM5634 (A) e *C. rosea* 24 (B).

A análise por FTIR do biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM 5634 revelou que os estiramentos nos comprimentos de onda 3422 e 2931 cm^{-1} resultantes do modo de alongamento C – H, sugerem a presença de cadeia de ácido graxo. A presença de amida foi indicada pelo estiramento no comprimento de onda 1658 cm^{-1} , enquanto polissacarídeos são indicados pelo estiramento no comprimento de onda 1054 cm^{-1} (Figura 4A). A presença de ligações C-H e OH foi indicada pelos estiramentos de comprimento de onda 2930 e 3411 cm^{-1} , respectivamente, no espectro do biossurfactante de *C. rosea* 24. Bandas em 1655 e 1541 cm^{-1} correspondendo a C = O de amida e grupos carboxilatos podem ser observados. Bandas características de polissacarídeos foram observadas em 1054 cm^{-1} (Figura 4B). A partir dessa análise verificam-se comprimentos

de ondas que se inferem com biossurfactantes poliméricos do tipo carboidrato-proteína-lipídio.



A



B

Figura 4 – Espectro FTIR de biossurfactante produzido pelos fungos *F. oxysporum* LM 5634 (A) e *C. rosea* 24 (B).

DISCUSSÃO

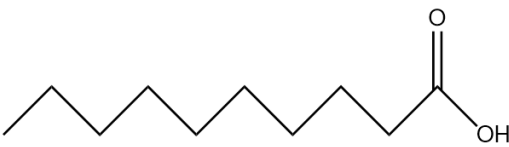
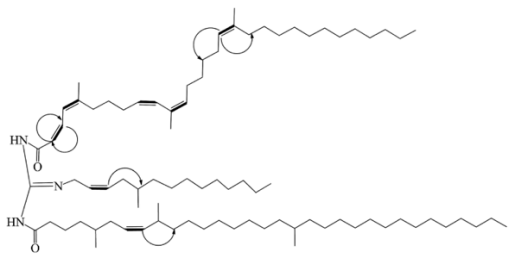
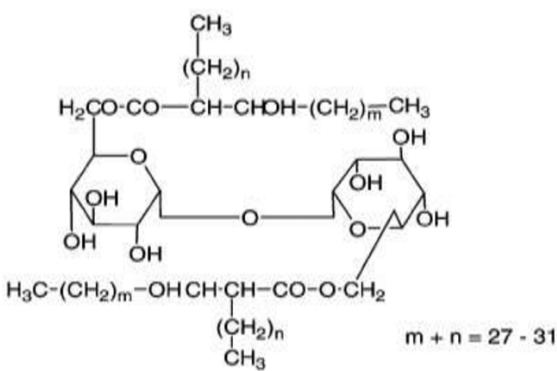
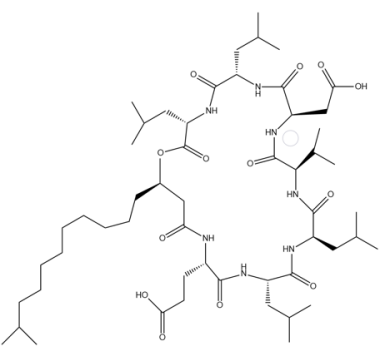
Neste estudo foi abordado a caracterização dos biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24 em relação a caracterização química da molécula. Para isso, foi realizado inicialmente um estudo de comparação de métodos de recuperação do biossurfactante por precipitação ácida e alcoólica.

A precipitação por etanol 98% gelado teve um maior rendimento para os dois fungos estudados, no entanto observou-se um maior índice de emulsificação com a precipitação

ácida. Nos estudos de recuperação de biossurfactantes é frequente o uso de sistema de solventes, como clorofórmio:metanol e precipitação ácida, porém deve-se considerar que cada tipo de técnica pode favorecer a precipitação de um determinado tipo de biossurfactante produzido. Ainda assim, esse processo de *downstream* é responsável por aproximadamente 60% do custo total de produção (HELMY et al., 2011; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; SANTOS et al., 2016).

O espectro FTIR do biossurfactante revelou bandas importantes nos comprimentos de onda 3422, 1658, e 1054 cm^{-1} para o de *F. oxysporum* LM5634 e comprimentos de onda 3411, 1655, 1054 cm^{-1} para o de *C. rosea* 24. Essas bandas de absorção indicam a presença de ácidos graxos, proteínas e polissacarídeos. Os espectros de FTIR de biossurfactante produzido por *Fusarium oxysporum* descrito por Santhappan e Pandian (2017) indicaram a presença de grupos funcionais -COO e CH₂, esses grupos podem ser integrante de ácidos orgânicos ou ésteres presentes no biossurfactante produzido por essa espécie. O espectro de FTIR do biossurfactante de *F. oxysporum* LM 5634 é comparável ao obtido para o biossurfactante produzido por *Fusarium* sp. BS-8 com uma banda ampla na faixa de comprimento de onda 3200 cm^{-1} e bandas agudas na faixa de comprimento de onda 1100–1040 cm^{-1} , indicando a presença de grupo amina em frações contendo peptídeos (QAZI et al., 2014). A presença de grupo funcional na região espectral de 3409 cm^{-1} (grupo N-H) e banda em 3077 cm^{-1} correspondente à presença do grupo C-H foi relatada por Bhardwaj et al., (2015) no biossurfactante enamida produzido por *Fusarium proliferatum*. Os principais biossurfactantes produzidos pelo gênero *Fusarium* descritos na literatura são de baixo peso molecular (Quadro 1).

Quadro 1 – Principais tipos de biossurfactantes caracterizados produzidos pelo gênero *Fusarium*

Gênero <i>Fusarium</i>	Tipo de biossurfactante	Estrutura química/Composição química	Autor
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ácido graxo		(SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017)
<i>Fusarium proliferatum</i>	Enamida		(BHARDWAJ; CAMEOTRA; CHOPRA, 2015)
<i>Fusarium fujikuroi</i>	trealolipídeo		(REIS et al., 2018)
<i>Fusarium</i> BS-8	Lipopeptídeo		(QAZI et al., 2014)

A partir da CG-MS, os compostos identificados foram principalmente ácidos graxos, como ácido cis-vacênico e ácido palmítico no biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM5634. Outros compostos contendo nitrogênio, compostos aromáticos, bromoalcanos, alcenos e ácidos carboxílicos também corroboram com os espectros de infravermelho obtidos. Componentes semelhantes foram evidenciados na análise por CG-MS para o biossurfactante produzido por *Fusarium oxysporum* (SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017). De acordo com o estudo os principais componentes presentes foram ésteres dos ácidos heptacosanoico e hexadecanoico com massas moleculares de 284 e 438, sendo portanto, identificados como ésteres metílicos de ácido 25-metiheptacosanoico e ácido 9-metilhexadenoico (SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017). Outro estudo descreveu a presença do composto lipofílico 9-octadecenamida a partir da análise por CG-MS de extratos metanólicos produzidos por *Fusarium fujikuroi* (REIS et al., 2018). Compostos semelhantes foram descritos para o biossurfactante de *Trichoderma* sp. MK116252 depois de ser analisado por CG-MS, sendo a maioria dos compostos do tipo ácidos graxos, como ácido hexadecenoico, éster metílico e ácido 9-hexadecenoico (MATUSSIN; SHIVANAND; LIM, 2020). Nas análises de CG-MS do biossurfactante de *C. rosea* 24 foram identificados poucos compostos que correspondam as bandas observadas no espectro de FTIR, no entanto, análises adicionais são necessárias para confirmar mais detalhes sobre a estrutura do biossurfactante.

Nesse estudo, não foi realizada a etapa de purificação da substância, sendo um fator limitante das análises de caracterização. Essa etapa poderia conduzir de forma mais precisa a elucidação da molécula do biossurfactante. Ainda, poderia ser realizado análises de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS).

De acordo com as análises e comparação, infere-se a presença de ácidos graxos na composição do biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM 5634, porém foram detectados grupamentos correspondentes a proteínas e carboidratos, inferindo que podem estar associados na composição da molécula.

CONCLUSÃO

- A precipitação com etanol fornece o maior rendimento de biossurfactante produzido por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24.
- O principal composto detectado por CG-MS no biossurfactante produzidos por *F. oxysporum* LM5634 foi o cis-ácido vacênico e no biossurfactante produzido por *C. rosea* 24 foi o 2,2-dimetoxibutano.
- Na análise de FTIR foram observadas bandas correspondentes às moléculas de ácidos graxos, proteínas e polissacarídeos nos biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24.

REFERÊNCIAS

- BHARDWAJ, G. Biosurfactants from Fungi: A Review. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, v. 04, n. 06, p. 1–6, 2013.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Isolation and purification of a new enamide biosurfactant from *Fusarium proliferatum* using rice-bran. *RSC Advances*, v. 5, n. 67, p. 54783–54792, 2015.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.
- HELMY, Q. et al. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts. *International Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 1–2, p. 66–86, 2011.
- LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.
- MATUSSIN, N. B. A.; SHIVANAND, P.; LIM, L. H. Biosurfactant production by *Trichoderma* sp. MK116452 and its possible application in oil recovery. *Research square*, p. 1–22, 2020.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 509–15, dez. 2006.
- QAZI, M. A. et al. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. In: DOMACH, M. M. (Ed.). *Biotechnology Progress*. [s.l: s.n.]. p. 1065–1075.
- REIS, C. B. L. DOS et al. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 185–192, 2018.
- SAHA, P.; RAO, K. V. B. Biosurfactants- a current perspective on production and applications. *Nature Environment and Pollution Technology*, v. 16, n. 1, p. 181–188, 2017.
- SANTHAPPAN, R.; PANDIAN, M. R. Characterization of Novel Biosurfactants Produced by the Strain *Fusarium oxysporum*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v. 08, n. 06, p. 6–11, 2017.

- SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, jan. 2016.
- SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, v. 30, n. 2, p. 127–44, jun. 2010.
- SENA, H. H. et al. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest *International Journal of Microbiology*, 2018.
- SILVA, A. C. S. et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Agricultural Microbiology/ Review article*, v. 85, p. 1–12, 2018.

5 CAPÍTULO 3

Artigo será submetido na revista *International journal of microbiology*

**TOXICIDADE, ESTABILIDADE E APLICABILIDADE DE
BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS PELOS FUNGOS *Fusarium oxysporum*
LM 5634 E *Clonostachys rosea* 24 ISOLADOS DO SOLO AMAZÔNICO**

Michele Alves Sanches¹, Ana Cláudia Alves Cortez², Érica Simplício de Souza³,
Patrícia Melchionna Albuquerque³, Emerson Silva Lima⁴, João Vicente Braga de
Souza²

¹Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Bionorte, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Brasil.

²Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil.

³Escola Superior de Tecnologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil.

⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil.

INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são moléculas capazes de interagir nas interfaces ar/água e formar micelas água/óleo, assim reduzindo a tensão superficial e formação de emulsão, respectivamente (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O aumento das pesquisas nos últimos anos por essa substância foi em razão da substituição dos surfactantes sintéticos, pois são derivados do petróleo e apresentam desvantagens como baixa degradabilidade e citotoxicidade (LÉMERY et al., 2015).

Micro-organismos como bactérias leveduras e fungos filamentosos têm sido investigados como produtores de biossurfactantes de potencial para aplicação industrial (MARCHANT; BANAT, 2012; RON; ROSENBERG, 2001). Especificamente, os fungos filamentosos destacam-se com produtores de metabólitos secundários, capacidade de crescer em substratos e fácil manutenção no bioprocesso (SILVA et al., 2018).

As indústrias que mais utilizam surfactantes são as de petróleo, produtos de limpeza, higiene corporal e cosmética (SANTOS et al., 2016). Essas possuem interesse em substituir seus surfactantes convencionais por substâncias menos irritantes, menos tóxicas e mais biodegradáveis. Além dessa demanda, a indústria também tem procurado surfactantes que apresentem atividades biológicas adicionais como antioxidante e antimicrobiana (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; RODRIGUES et al., 2006).

Mediante o exposto, o presente estudo investigou as possíveis atividades biológicas e aplicação dos biossurfactantes produzidos por *Fusarium oxysporum* LM 5634 e *Clonostachys rosea* 24 isolados de solo da região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos

Os fungos *Fusarium oxysporum* LM5634 e *Clonostachys rosea* 24 isolados de solo amazônico foram utilizados no presente estudo. Esses isolados possuem a capacidade de produzir biossurfactante e pertencem à coleção de microrganismos de interesse médico do Instituto Nacional em Pesquisas na Amazônia – INPA. Os fungos foram mantidos em cultura no meio ágar batata dextrose (ABD).

Condições de cultivo para a produção de biossurfactantes

A produção do biossurfactante foi realizada utilizando *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM 5634. O meio previamente descrito por Sena et al., (2018) foi usado como meio de produção. O meio de produção continha 10g/L de extrato de levedura (KASVI®) e 40 g/L de óleo de soja (Soya®). A fermentação foi realizada durante 3 dias para *F. oxysporum* e *C. rosea* em agitação orbital a 100 rpm a temperatura de 25 ± 2 . Após a fermentação, o sobrenadante livre de células após filtração com papel filtro N°1 (Quanty®) foi centrifugado a 5000 rpm por 10 min e submetido às etapas posteriores (SANTHAPPAN; PANDIAN, 2017) para a recuperação de extratos ricos em biossurfactantes.

Determinação da estabilidade de biossurfactante do caldo livre de células

Os estudos de estabilidade foram realizados usando o caldo livre de células obtido após centrifugação das culturas a 5000 rpm por 15 min. Quatro mililitros desse caldo foram aquecidos a 0, 5, 70 e 100 ° C por 1 h, e resfriados à temperatura ambiente e logo após, foi medida a atividade de emulsificação. Para estudar a estabilidade do pH do caldo livre

de células, seu pH foi ajustado para diferentes valores de pH (2–12) e a atividade de emulsificação foi medida. O pH da cultura líquida foi ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) 1M e ácido clorídrico (HCl) 1N. O efeito das concentrações do cloreto de sódio NaCl (2% -12%) na capacidade de emulsificação do caldo de cultura livre de células também foi determinado. Os testes foram realizados em triplicata (SILVA et al. 2014).

Índice de emulsificação (E24%)

A atividade emulsificante foi mensurada pelo cálculo do índice de emulsificação (COOPER; GOLDENBERG, 1987). O hidrocarboneto (Tolueno P.A -Synth®) foi adicionado ao caldo livre de célula (1:1 v/v) em um tubo de vidro com rosca (16 cm x 150 mm) onde foi medida inicialmente a altura total das fases imiscíveis, seguida pela agitação em agitador de tubo tipo *vórtex* (PHOENIX® - AP 56) por 2 min, e posteriormente mantida em repouso por 24 h. Após esse tempo, foi medido apenas a altura da emulsão formada. O índice foi calculado pela seguinte equação:

$$E_{24} = (\text{altura da emulsão/altura total}) \times 100$$

Precipitação do biossurfactante do meio de cultivo com etanol 99,5 %

Foi realizada as misturas das proporções de etanol gelado a 99,5 % (Synth®) e caldo bruto livre de células (3:1 v/v). Em seguida, ficaram de repouso por 48h à 4 °C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi exposto em temperatura ambiente para evaporação do etanol, posteriormente macerado com grau e pistilo e preparado para as demais etapas do trabalho. Adaptado de Silva et al., (2019) e Sena et al., (2018).

Ensaio de citotoxicidade

Nesse trabalho o ensaio de citotoxicidade dos biossurfactantes foi realizado em colaboração com o Laboratório de Atividades biológicas (BIOPHAR) da faculdade de ciências farmacêuticas – Universidade federal do Amazonas (UFAM). O ensaio foi avaliado pelo método Alamar blue (NAKAYAMA et al., 1997) frente a fibroblastos de pulmão humano (Cell culture MRC-5 - cells human lung fibroblast) para determinar as concentrações não tóxicas dos precipitados de biossurfactantes. As células MRC5 foram

plaqueadas em uma serie de concentrações ($0,5 \times 10^4$ cél/poços) com um volume final de 100 μL . Após 24 h de incubação e verificação de aderência celular, foi feito um tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma®) 10 mg/mL, em seguida testada as concentrações do biossurfactante em MRC5 por um tempo de 24 h de tratamento incubados em estufa de CO_2 . Neste ensaio foi utilizado doxorubicina (Sigma®) e controle negativo foi o DMSO 0,5%. Após o tempo de incubação, foi adicionado 10 μL de uma solução contendo (950 μL de meio de cultura + 50 μL resarzurina 0,4% - Alamar blue®) por um tempo de 2 h, em seguida foi feita a leitura de fluorescência em aparelho de microplaca (DTX-800 Beckman Coulter) na faixa de 540 nm excitação e 585 nm de emissão. A porcentagem de viabilidade foi determinada conforme equação a seguir, sendo a viabilidade acima de 90% considerada aceitável para biossurfactantes não tóxicos.

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Fluorescência da célula + meio + bios. + resarzurina}}{\text{Fluorescência da célula + meio + resarzurina}}$$

Testes para aplicação do biossurfactante

Atividade antimicrobiana por difusão em ágar modificado

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em ágar modificado (ULLAH et al., 2015) frente aos micro-organismos patogênicos *Candida albicans* ATCC 60193, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Cryptococcus neoformans* CFP 59/*Cryptococcus gattii* CFP 55, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 13706. Inicialmente foi realizado o preparo do inóculo dos micro-organismos alvos, sendo os fungos leveduriformes cultivados em caldo Sabouraud e as bactérias em caldo Müller-Hinton. As colônias foram ressuspendidas em solução salina a 0,85% e a turvação foi ajustada para 0,5 na escala McFarland. Cada suspensão microbiana foi semeada com auxílio de *swab* nos seus respectivos meios de cultura em ágar. Em seguida, foi feito poços com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro no meio de cultura para colocar 100 μL do caldo bruto contendo biossurfactante e 100 μL do biossurfactante precipitado (2 mg/mL) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Para o controle positivo bacteriano foi utilizado Amoxicilina e para controle positivo fúngico foi utilizado Fluconazol, no controle negativo foi utilizado DMSO 10% também no mesmo volume dos componentes a serem

testados. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e por 48h para as leveduras. No final do tempo de incubação, foi avaliado a atividade antimicrobiana de acordo com a formação de um halo, se positivo, o diâmetro halo de inibição do crescimento microbiano foi medido em milímetros usando uma régua (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI), 2008).

Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços conforme a metodologia descrita pela norma M7-A6 se para testes de atividade microbiana contra bactérias ou a norma M27-A7 se para atividade microbiana contra leveduras conforme o *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e adaptada com o protocolo de ensaios de antimicrobianos do laboratório de micologia do INPA. Os precipitados foram preparados para uma concentração de 3,2 mg/mL com 1 mL de solução de DMSO a 10%. Neste ensaio foi utilizado como controle da atividade antimicrobiana a Anfotericina B a 64 µg/mL. O resultado foi interpretado após o tempo de incubação de 48 h, sendo estabelecido a CIM correspondente ao poço onde não há crescimento microbiano.

Teste de aplicação

Foi testado o biossurfactante obtido de *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24 em uma formulação com óleo de Copaíba comparando com os surfactantes sintéticos.

A emulsão foi formulada adaptada de Reis et al. (2017) e modificações de Ferreira et al. (2017). Foi feito o ensaio na proporção entre a fase hidrofóbica (O), que foi óleo essencial e a fase hidrofílica (A), à base de uma solução aquosa contendo o biossurfactante bruto (BS), sendo: 200g de base de creme (nipazol, propilenoglicol, nipagin, silicone, vaselina e água), 1L de água destilada, 10 g ureia, 10 mL de óleo vegetal de copaíba e 10 mL essência de flor de cerejeira, as quantidades foram reduzidas para poderem ser utilizadas as concentrações de biossurfactante precipitado disponível. Nesse ensaio o SDS a 1% foi utilizado como padrão.

Os biossurfactantes precipitados na concentração de 1 mg/mL foram testados para a comparação com os surfactantes SDS (1 mg/mL), Tween 80 (0,1 %) e Lauril (1 mg/mL) na emulsão do óleo de copaíba. As emulsões foram preparadas na proporção 1:1 (v/v). O óleo essencial foi misturado com a fase aquosa, utilizando um agitador de

soluções tipo *vórtex* (Phoenix® - AP 56) por 2 min. O índice de emulsificação foi a parâmetro analítico nesse ensaio no tempo de 24, 48 e 72 horas.

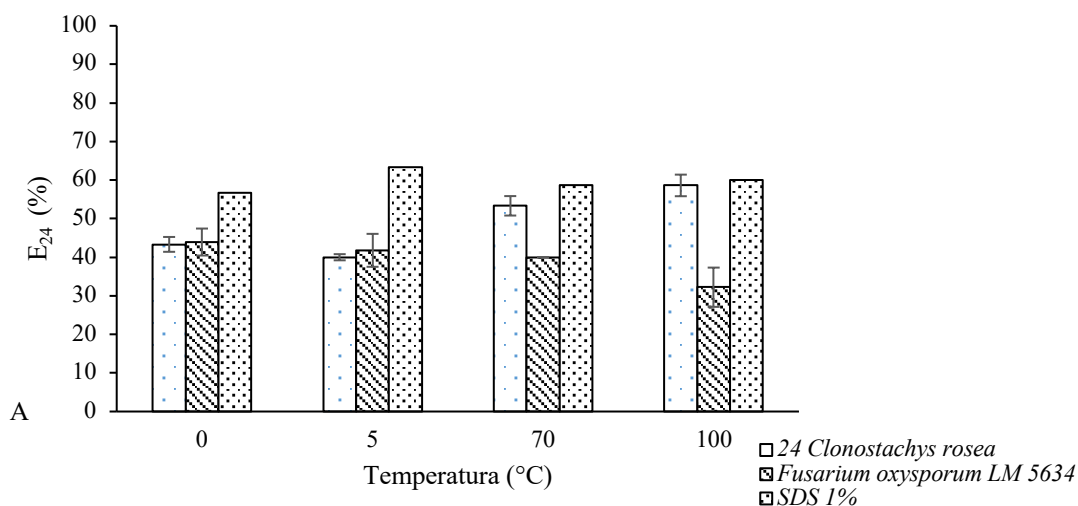
RESULTADOS

Efeito da temperatura, salinidade e pH na estabilidade do biossurfactante presente no caldo bruto por *Clonostachys rosea* 24 e *Fusarium oxysporum* LM5634.

Avaliou-se a estabilidade do biossurfactante em uma ampla faixa de temperatura. (Figura 1A). O biossurfactante produzido por *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM5634 mostrou-se termoestável. O aquecimento do biossurfactante a 100 °C não causou nenhum efeito no desempenho do biossurfactante.

A estabilidade do biossurfactante quanto a variação de salinidade foi avaliada sob o efeito da adição de cloreto de sódio no caldo bruto produzido a partir de dois fungos. A estabilidade ótima do biossurfactante foi observada na concentração de NaCl de 14% e 10% por *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM5634, respectivamente (Figura 1B).

O índice de emulsificação permaneceu relativamente estável às mudanças de pH 4 e 8, maior estabilidade em condições alcalinas do que ácidas por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24 permaneceu estável às mudanças de pH (Figura 1C).



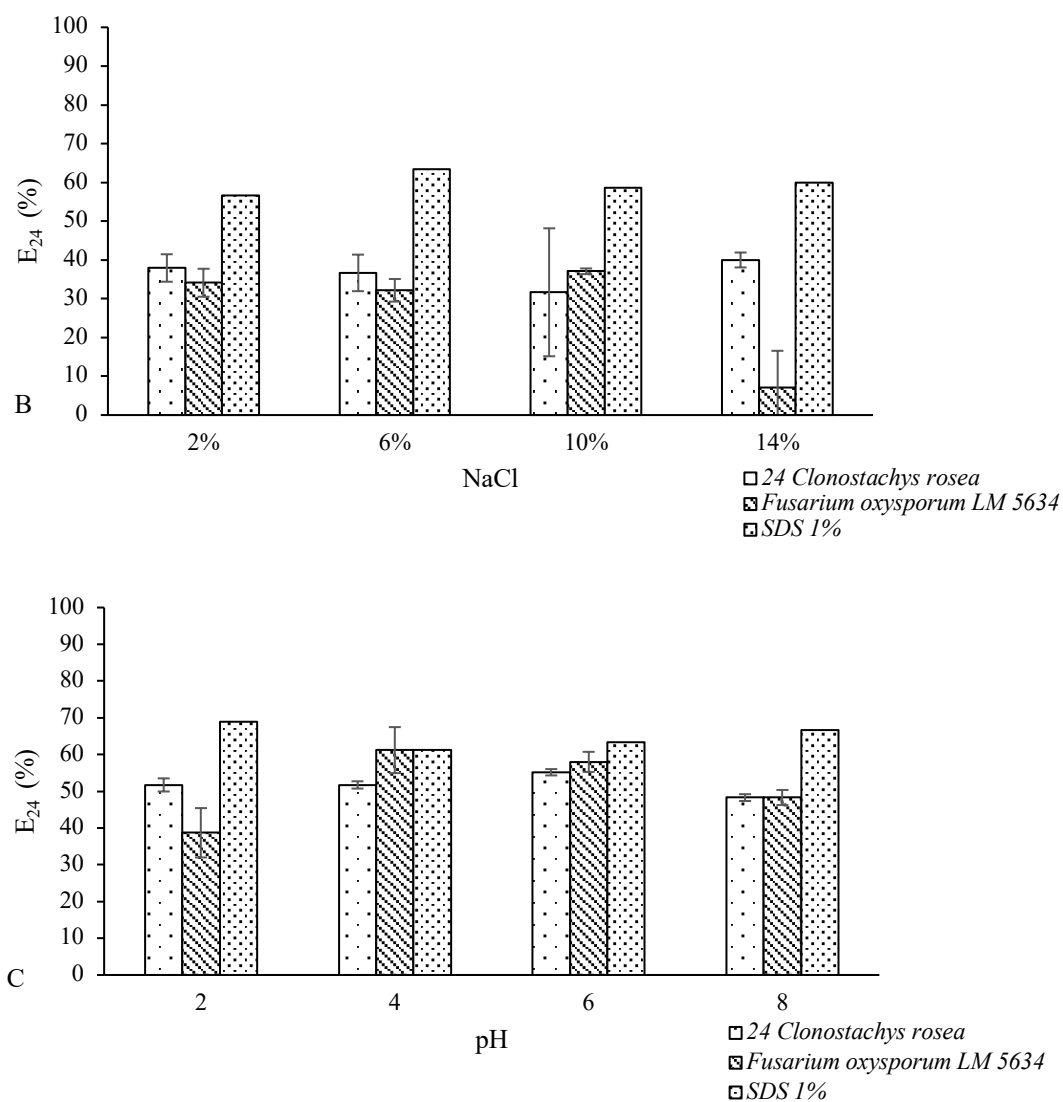


Figura 1 - Índice de emulsificação do biossurfactante presente no caldo fúngico de *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM 5634 sob as variações de Temperatura (A), NaCl (B) e pH (C). SDS 1% foi utilizado como padrão nos testes.

Ensaio de citotoxicidade

Os biossurfactantes precipitados não apresentaram citotoxicidade, por outro lado, demonstram indução de proliferação celular (Figura 2).

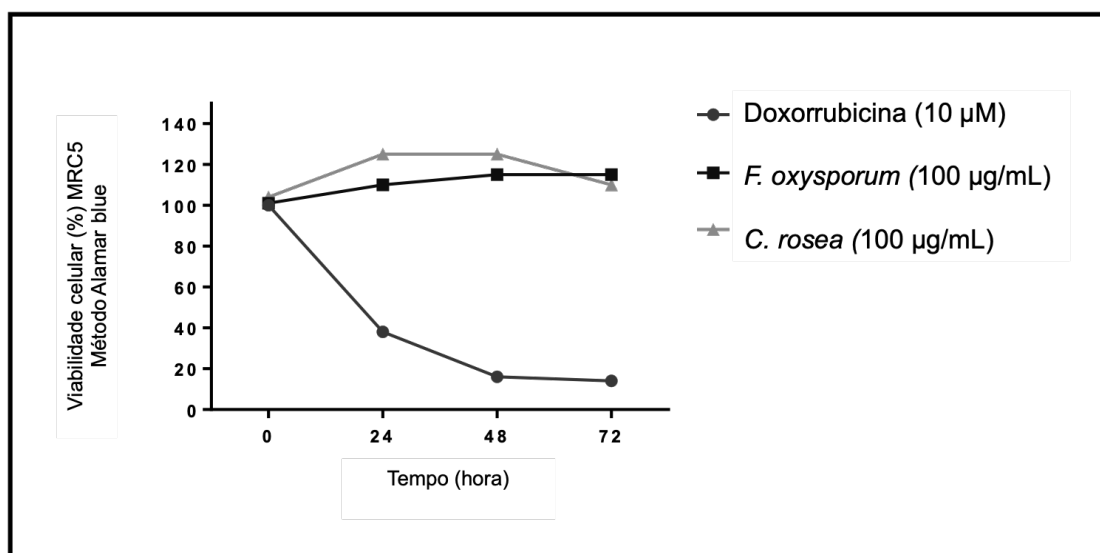


Figura 2 - Ensaio de citotoxicidade frente a linhagem a fibroblastos humanos

Atividade antimicrobiana de extratos de biossurfactantes e caldo livre de células

A atividade antimicrobiana do biossurfactante precipitado e do biossurfactante de caldo bruto produzido por *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24 foram analisadas contra várias cepas de referências (ATCC). Foi realizado utilizando um método modificado de suscetibilidade em placa de ágar. A atividade foi observada apenas contra *Candida albicans* ATCC60193 pelo biossurfactante precipitado de *F. oxysporum* LM 5634 com a formação de um halo de inibição de $14,5 \pm 0,07$ mm (Tabela 1). Esse precipitado com atividade antifúngico foi testado para avaliar a concentração inibitória mínima, onde foi verificada a inibição do crescimento da *C. albicans* ATCC60193 na concentração de 0,2 mg/mL (200 µg/mL) (Figura 3).

Tabela 1- Atividade antimicrobiana *in vitro* dos precipitados de biossurfactante contra um painel de cepas fúngicas e bacterianas.

Microrganismo	<i>F. oxysporum</i> LM 5634	<i>C. rosea</i> 24
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC13706	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC60193	$14,5 \pm 0,07$ mm	-
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	-	-
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC22019	-	-
<i>Cryptococcus gattii</i> CFP 55	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> CFP 59	-	-

Nota: - significa nenhuma atividade antimicrobiana
 Controle positivo: Fluconazol

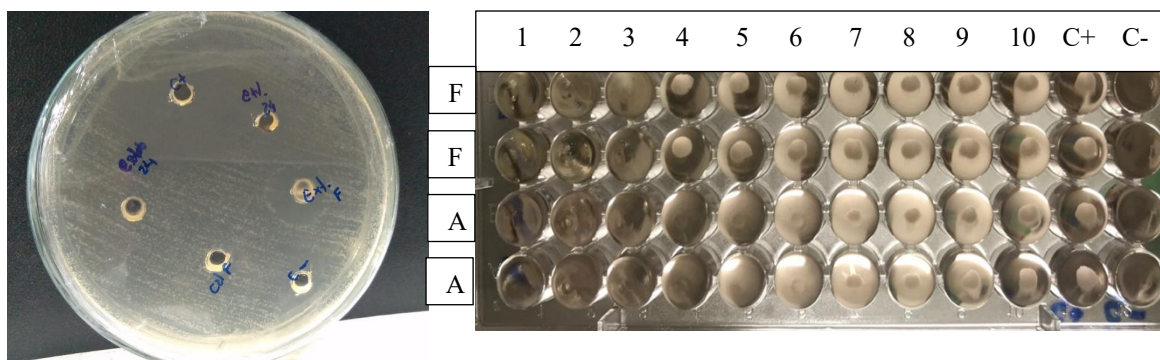


Figura 3 – Atividade antifúngica de *F. oxysporum* LM5634 em duas técnicas (A) Método de difusão em ágar modificado (B) Teste de concentração inibitória mínima (CIM). A-Anfotericina, F – biossurfactante de *F. oxysporum* LM 5634, C- controle do meio, C+ controle de inóculo.

Teste de aplicação

Foi realizado o teste de emulsão do biossurfactante com óleo de copaíba comparando com surfactantes sintéticos usados em formulações cosméticas em três tempos. A emulsão com o biossurfactante de *F. oxysporum* LM 5634 apresentou um $E_{24} = 6,5 \pm 4,2 \%$, $E_{48} = 6,5 \pm 0,12 \%$, e $E_{72} = 5,5 \pm 1,9 \%$. *C. rosea* 24 apresentou $E_{24} = 12,2 \pm 1,9 \%$, permanecendo estável em 48h e $E_{72} = 11,1 \pm 1,9 \%$ (Tabela 2). Os biossurfactantes precipitados foram testados na estabilidade da base de creme capilar com óleo de copaíba sendo incorporado juntamente com 20 mg biossurfactante dissolvido em 1 mL de água destilada. Foi observado no período inicial de 5 dias a permanência da emulsão testada sem a separação das fases (Figura 4).

Tabela 2- Teste de emulsão do óleo de copaíba com os biossurfactantes fúngicos comparando com os surfactantes sintéticos (1,0 mg/mL).

Biossurfactante	E_{24} (%)	E_{48} (%)	E_{72} (%)
<i>Fusarium oxysporum</i> LM 5634*	$6,5 \pm 4,2$	$6,5 \pm 0,12$	$5,5 \pm 1,9$
<i>Clonostachys rosea</i> 24	$12,2 \pm 1,9$	$12,2 \pm 1,9$	$11,1 \pm 1,9$
Surfactante			
Dodecil sulfato de sódio	$29,7 \pm 3,7$	$26,3 \pm 0,49$	$15,3 \pm 1,7$
Lauril sulfato de sódio	$27,4 \pm 2,2$	$23,0 \pm 0,4$	$23 \pm 0,43$
Tween 80	$15,5 \pm 1,9$	$14,4 \pm 3,8$	$13,3 \pm 0$

*concentração de 2,0 mg/mL

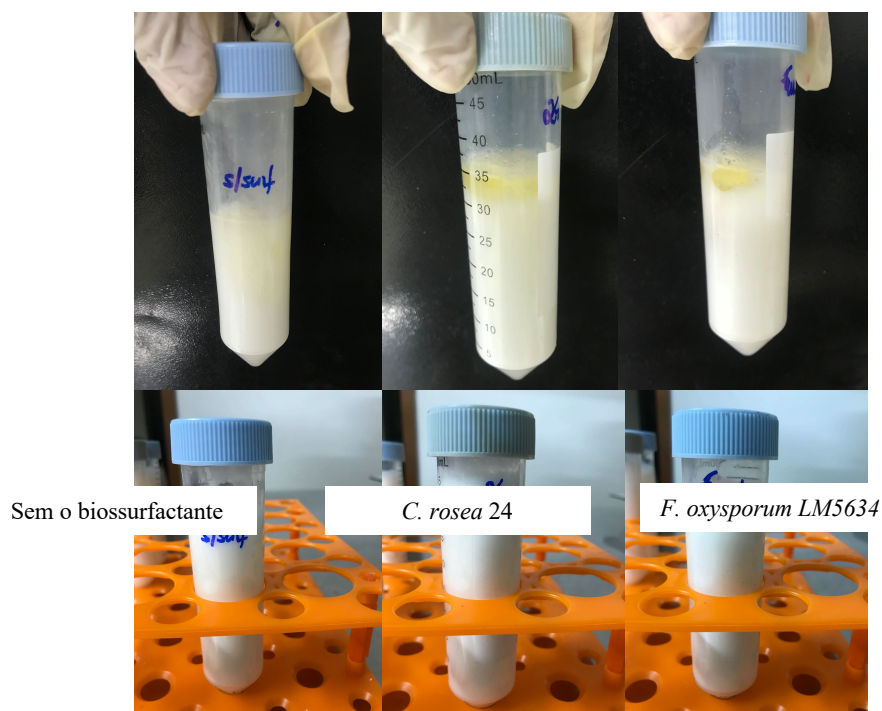


Figura 4 – (A) Incorporação de óleo de copaíba (fase O) a uma base de creme (fase A) comparando com os biossurfactantes (20 mg/mL) dos fungos *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM 5634. (B) Emulsão após adição dos biossurfactantes.

DISCUSSÃO

No presente estudo, os biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* LM 5634 e *C. rosea* 24 possuem capacidade emulsificar formulação a base de creme e óleo de copaíba. O biossurfactante de *F. oxysporum* LM 5634 apresenta atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

A estabilidade do biossurfactante do caldo bruto foi analisada em uma ampla faixa de temperatura (0, 5, 70 e 100), salinidade (2, 4, 6 e 8%) e pH (2, 4, 6 e 8). O biossurfactante de *F. oxysporum* LM5634 apresentou termotolerância em temperatura média, estabilidade em pH, porém não apresentou estabilidade em alta salinidade. A alta temperatura não influenciou o índice de emulsificação para *C. rosea* 24. Além disso, o biossurfactante de *C. rosea* 24 é estável a variação de salinidade e pH. Nossos estudos corroboram aos estudos sobre *Fusarium* sp. BS-8, o biossurfactante desse fungo apresentou atividade máxima a 40-80 °C com $E_{24} = 66\%$. A variação da concentração de sal teve uma influência significativa e a produção de biossurfactante com pH mais baixo se deve à precipitação do biossurfactante (QAZI et al., 2013). Os dados obtidos no trabalho são promissores uma vez que apresentam essas estabilidades que são vantajosas em relação aos surfactantes sintéticos, ainda biossurfactantes termotolerantes e halo-

tolerantes podem ser usados para melhorar a recuperação de óleo no reservatório (GAUTAM, 2014).

Neste estudo, o produto biossurfactante foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana. O biossurfactante apresentou atividade inibitória contra *Candida albicans*. A atividade antimicrobiana de vários biossurfactantes foi relatada na literatura por bactérias e leveduras. Poucos estudos de atividade antimicrobiana de biossurfactantes fúngicos foram relatados, sendo relatado antifúngico contra *Aspergillus niger* apenas (ISHAQ et al., 2015) e biossurfactante de *Penicillium chrysogenum* SNP5 com atividade antimicrobiana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (GAUTAM et al., 2014). Os efeitos antimicrobianos dos biossurfactantes podem ser explicados pelas estruturas dos biossurfactantes que se assemelham à membrana celular, causando mudanças estruturais (EMINE; AYSUN, 2009).

A incorporação de óleo de copaíba com os biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* e *C. rosea* foram testadas frente a uma base de creme e ainda foi realizada a comparação com outros surfactantes sintéticos comumente usados nessas formulações. Estudo similar foi realizado para avaliar a capacidade de emulsão do biossurfactante na concentração de 0,7 % (p/v) obtido de *Candida utilis* para a formulação de uma maionese, sendo portanto um potencial aditivo alimentar (CAMPOS et al., 2015). Em outro estudo, foram testadas emulsões avaliadas no intervalo de tempo de 24h, 1 semana e 3 semanas a fim de verificar a melhor capacidade de estabilizar emulsões (RAMOS, 2017). Em geral, os biossurfactantes fúngicos possuem versatilidade na estrutura química e suas propriedades permitem uma diversidade de aplicação em setores de cosmética, alimentícia, farmacêutica entre outras (DA SILVA et al., 2021).

O presente estudo teve como fator limitante algumas análises específicas para avaliar a estabilidade das emulsões em função do tempo, além de poder testar diversas concentrações de biossurfactantes. Entretanto, os biossurfactantes obtidos de *F. oxysporum* e *C. rosea* são promissores nos setores de aplicação que necessitem de emulsão.

Produtos que agregam valores ambientais ganham destaque no cenário atual. Um biossurfactante de origem amazônica pode contribuir para a bioeconomia regional, tendo em vista a possibilidade de diversas aplicações em vários setores. A possibilidade de se obter um biossurfactante com capacidade de emulsificação de óleos regionais trazem expectativas para estudos mais detalhados sobre a possibilidade de disponibilizar um emulsificador que agregará mais valor aos produtos regionalmente desenvolvidos.

CONCLUSÃO

- Os biossurfactantes tem potencial estabilidade frente as variações de temperatura, pH e salinidade.
- O biossurfactante de *F. oxysporum* LM5634 possui atividade antifúngica contra *Candida albicans*
- Os biossurfactantes produzidos por *F. oxysporum* e *C. rosea* 24 apresentam potencial capacidade emulsificante para incorporação de óleo em formulação a base de creme.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS, J. M. et al. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicology Reports*, v. 2, p. 1164–1170, 2015.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts -Third Edition. CLSI document M27-A3. [s.l: s.n.].
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.
- DA SILVA, A. F. et al. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2021.
- DA SILVA, M. et al. Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. *Appl Microbiol*, p. 0–1, 2019.
- EMINE, Y.; AYSUN, E. Screening the Antimicrobial Activity of Biosurfactants Produced by Microorganisms Isolated from Refinery Wastewaters. *Journal of Applied Biological Sciences*, v. 3, n. 2, 2009.
- GAUTAM, G. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v. 04, n. 06, 2014.
- GAUTAM, G. et al. A cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v. 04, n. 06, 2014.
- ISHAQ, U. et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 4, p. 1035–1045, 2015.
- LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 558–65, nov. 2012.

- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. p. 119–128, 2013.
- NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.
- QAZI, M. A. et al. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp . BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, v. 3, n. 6, 2013.
- RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants : potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, n. February, p. 609–618, 2006.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. In: *Environmental microbiology*. Blackwell ed. [s.l: s.n.]. v. 3p. 229–236.
- SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, jan. 2016.
- SENA, H. H. et al. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest *International Journal of Microbiology*, 2018.
- SILVA, A. C. S. et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Agricultural Microbiology/ Review article*, v. 85, p. 1–12, 2018.
- ULLAH, I. et al. Surface, aggregation properties and antimicrobial activity of four novel thiourea-based non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 464, p. 104–109, jan. 2015.
- CAMPOS, J. M. et al. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicology Reports*, v. 2, p. 1164–1170, 2015.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts -Third Edition. CLSI document M27-A3. [s.l: s.n.].
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.
- DA SILVA, A. F. et al. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2021.
- DA SILVA, M. et al. Biosurfactant production of *Piper hispidum* endophytic fungi. *Appl Microbiol*, p. 0–1, 2019.
- EMINE, Y.; AYSUN, E. Screening the Antimicrobial Activity of Biosurfactants Produced by Microorganisms Isolated from Refinery Wastewaters. *Journal of Applied Biological Sciences*, v. 3, n. 2, 2009.
- GAUTAM, G. A Cost Effective Strategy for Production of Bio-surfactant from Locally Isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and Its Applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v. 04, n. 06, 2014.
- GAUTAM, G. et al. A cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v. 04, n. 06, 2014.
- ISHAQ, U. et al. Production and characterization of novel self-assembling biosurfactants from *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 119, n. 4, p. 1035–1045, 2015.
- LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.
- MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology*, v. 30, n. 11, p. 558–65, nov. 2012.

- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. p. 119–128, 2013.
- NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, v. 204, n. 2, p. 205–208, 1997.
- QAZI, M. A. et al. Role of Biosurfactant Produced By *Fusarium* sp . BS-8 in Enhanced Oil Recovery (EOR) Through Sand Pack Column. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, v. 3, n. 6, 2013.
- RODRIGUES, L. et al. Biosurfactants : potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, n. February, p. 609–618, 2006.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. In: *Environmental microbiology*. Blackwell ed. [s.l: s.n.]. v. 3p. 229–236.
- SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International journal of molecular sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, jan. 2016.
- SENA, H. H. et al. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest *International Journal of Microbiology*, 2018.
- SILVA, A. C. S. et al. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Agricultural Microbiology/ Review article*, v. 85, p. 1–12, 2018.
- ULLAH, I. et al. Surface, aggregation properties and antimicrobial activity of four novel thiourea-based non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 464, p. 104–109, jan. 2015.

6 CONCLUSÃO

- Foram isolados 154 fungos de solo e serapilheira
- *C. rosea* 24 e *F. oxysporum* LM5634 apresentam atividade emulsificante e tensoativa, possuindo capacidade de produzir a substância ainda na fase exponencial de crescimento.
- Os fungos estudados possuem versatilidade no uso de fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biosurfactante.
- O principal composto detectado por CG-MS no biosurfactante produzidos por *F. oxysporum* LM5634 foi o cis-ácido vacênico e no biosurfactante produzido por *C. rosea* 24 foi o 2,2-dimetoxibutano.
- Na análise de FTIR foram observadas bandas correspondentes às moléculas de ácidos graxos, proteínas e polissacarídeos nos biosurfactantes produzidos por *F. oxysporum* LM5634 e *C. rosea* 24.
- O biosurfactante de *F. oxysporum* LM5634 possui atividade antifúngica contra *Candida albicans*, e ambos não são tóxicos
- Os biosurfactantes tem potencial estabilidade frente as variações de temperatura, pH e salinidade

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHARDWAJ, G. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 04, n. 06, p. 1–6, 2013.

GUIMARÃES, F. S. As campinas e campinaranas amazônicas. **Caderno de Geografia**, v. 26, n. 45, p. 113–133, 2016.

KHOPADE, A. et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardia* sp. B4. **Desalination**, v. 285, p. 198–204, jan. 2012.

LÉMERY, E. et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 469, p. 166–179, mar. 2015.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology letters**, v. 34, n. 9, p. 1597–605, set. 2012.

SANCHES, M. A. **Utilização de resíduos vegetais para a produção de biossurfactantes por fungos isolados de amostras de solo da região Amazônica**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2016.

SENA, H. H. **Produção de biossurfactantes por fungos Isolados da Floresta Amazônica**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2014.



SOBRINHO, H. B. S. et al. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 4, 15 jul. 2013.

Hindawi
International Journal of Microbiology
Volume 2021, Article ID 6669263, 11 pages
<https://doi.org/10.1155/2021/6669263>



Review Article

Production of Biosurfactants by Ascomycetes

Michele Alves Sanches,¹ Isabella Galvão Luzeiro,² Ana Cláudia Alves Cortez,³
Érica Simplicio de Souza,⁴ Patrícia Melchionna Albuquerque ,⁴ Harish Kumar Chopra,⁵
and João Vicente Braga de Souza ³

¹Program in Biodiversity and Biotechnology of the Bionorte Network (PPG-BIONORTE), Amazonas State University (UEA), Manaus, Brazil

²INPA Scientific Initiation Program, National Institute for Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil

³Mycology Laboratory, National Institute for Amazonian Research (INPA), Manaus, Brazil

⁴Higher School of Technology, Amazonas State University (UEA), Manaus, Brazil

⁵Department of Chemistry, Sant Longowal Institute of Engineering and Technology, Sangrur 148106, Longowal, Punjab, India

Correspondence should be addressed to João Vicente Braga de Souza; joaovicentebragasouza@yahoo.com.br

Received 24 December 2020; Revised 16 February 2021; Accepted 5 April 2021; Published 15 April 2021

Academic Editor: Carlo Genovese

Copyright © 2021 Michele Alves Sanches et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Surfactants are utilized to reduce surface tension in aqueous and nonaqueous systems. Currently, most synthetic surfactants are derived from petroleum. However, these surfactants are usually highly toxic and are poorly degraded by microorganisms. To overcome these problems associated with synthetic surfactants, the production of microbial surfactants (called biosurfactants) has been studied in recent years. Most studies investigating the production of biosurfactants have been associated mainly with bacteria and yeasts; however, there is emerging evidence that those derived from fungi are promising. The filamentous fungi ascomycetes have been studied for the production of biosurfactants from renewable substrates. However, the yield of biosurfactants by ascomycetes depends on several factors, such as the species, nutritional sources, and environmental conditions. In this review, we explored the production, chemical characterization, and application of biosurfactants by ascomycetes.

1. Introduction

Biosurfactants are compounds that are produced by plants and animals, but are largely produced by microorganisms, such as bacteria, yeasts, and filamentous fungi. The combination of several properties including biomolecules (proteins, carbohydrates, and lipids) reduces surface tension to act as an emulsifier [1]. All biosurfactants are amphiphilic and consist of polar and nonpolar parts.

The demand for biosurfactants has increased because of their environmental compatibility and versatility in emulsification. Other advantages of biosurfactants include biodegradability, low toxicity, and tolerance to different environmental factors (pH, temperature, and salinity). Given these advantages, the interest by the scientific community in studying the potential of biosurfactants has increased substantially [2]. However, issues such as high production costs and difficulties in the recovery of the pure

products must be addressed before large-scale production at an industrial level can commence, allowing for their synthetic counterparts to have a competitive advantage [3, 4]. In addition, the combination of microorganisms and culture media used for production directly influences the recovery of biosurfactants during downstream processes.

The cost of biosurfactant production and recovery are the limiting factors in the industrial production of these molecules, as indicated by several recent studies [5–7]. In contrast, several studies have demonstrated laboratory-scale alternatives as a probable solution to the challenge involving production [2, 8].

The structural diversity of biosurfactants enables various applications in many industries such as food, pharmaceuticals, and cosmetics. Future industrial biosurfactant production depends on the ratio between production costs and application benefits [9, 10]. Therefore, the optimization of physicochemical and nutritional parameters and

characteristics of biosurfactants needs to be studied for the development at an industrial scale [3]. In recent years, researchers have largely focused on the production of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants from bacteria and yeast, whereas the commercial utilization of fungi for biosurfactant production has been very limited and, thus, only few reports are available on the subject [8]. Therefore, the main focus of this review was to discuss strategic tools for the enhancement of biosurfactant production from the fungi ascomycetes and their applications.

2. Synthetic Surfactants vs. Biosurfactants

Surfactants are versatile molecules composed of two distinct polar and nonpolar components [11]. They act at the interface between liquids at different polarities by reducing surface tension and producing emulsions [12] (Figure 1).

Synthetic and chemical surfactants are conventionally produced by organic functional group transformation reactions of petroleum-based raw materials [13]. Based on the charge of their hydrophilic head, surfactants are classified as ionic, (negatively charged), cationic (positively charged), nonanionic (without any charge), or amphoteric (both positively and negatively charged); the hydrophobic tail of the surfactant is characterized by a long chain of fatty acids. The most commonly used commercial surfactants are sodium lauryl sulfate (sodium dodecyl sulfate) (Figure 2) and ammonium lauryl sulfate, which are used in the cleaning and cosmetic industries [11]. Domestic and industrial consumption of surfactants has increased in recent years without limits and restrictions. Accumulation of these surfactants in the ecosystem can lead to environmental problems [14], in addition to the manifestations of surfactant toxicity [10, 14–16]. Synthetic surfactants can reach toxic levels when they exceed the concentrations than those prescribed, in terms of hydrophobicity and chemical structure characteristics [3, 14]. Although there have been a large number of reports in the literature about the adverse effects of surfactants on the environment and human health, a total ban on the use of surfactants is impossible due to the lack of economically viable alternatives. Considering these, the utilization of biosurfactants can decrease the use of synthetic surfactants [10, 14].

Biosurfactants are natural surfactants synthesized by plants (e.g., saponin), animals (e.g., phospholipids, pulmonary surfactants, and bile salts), and microorganisms (e.g., glycolipids). Biosurfactants derived from microbes exhibit surfactant properties as they decrease surface tension and have high emulsifying capacity [11]. However, these biosurfactants are structurally more complex than synthetic surfactants as they are formed from combinations of biomolecules (proteins, carbohydrates, and lipids). Biosurfactants from microorganisms are classified based on their chemical structure, e.g., glycolipids are composed of carbohydrates (glucose, rhamnose, and galactose) combined with long-chain aliphatic acids or hydroxyaliphatic acids (fatty acids containing hydroxyl (OH) groups and alkyl branches); lipopeptides are formed from biomolecules in which the amino acids are bonded to carboxyl and hydroxyl

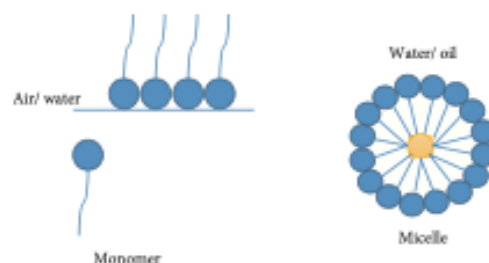


FIGURE 1: Interfacial and surface tension of the surfactant monomer (polar head and hydrocarbon tail); micelle formation in water/oil.

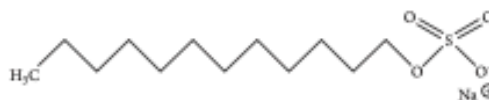


FIGURE 2: Chemical structure of sodium dodecyl sulfate.

groups of a 14-carbon fatty-acid chain; and polymeric biosurfactants are polysaccharide-protein complexes [11, 17–19] (Figure 3).

Biosurfactants show better properties than their synthetic counterparts. Some of the important properties observed in most biosurfactants are given below:

- Low toxicity: given that biosurfactants are used in cleaning, food and cosmetic products, and in bioremediation, determining that biosurfactants indeed have low or no toxicity is essential. Recent studies have demonstrated the absence of toxic effects by biosurfactants against microorganisms or microcrustaceans or in the germination of seeds; the potential of biosurfactant use in bioremediation of contaminated soil and water has also been demonstrated [20]. Tests to check for the toxic application of surfactants in detergents include acute dermal irritation, acute oral toxicity (LD₅₀ and LC₅₀), surface activity, washing efficiency, and compatibility tests with purified hard water [21].
- High biodegradability: biosurfactants are degradable in water and soil, which allows them to be used in the process of bioremediation, to release contaminants from soil, in pesticide formulations, and in biological control [22–24].
- Tolerance to pH variation, salinity, and temperature: biosurfactants have gained increased research attention for their commercial application owing to the novel biosurfactants being able to perform efficiently under extreme temperatures, pH, and salinity [3, 25].
- Use of renewable substrates: the use of economically cheaper substrates renders a cost-effective biosurfactant production process in industries [6].

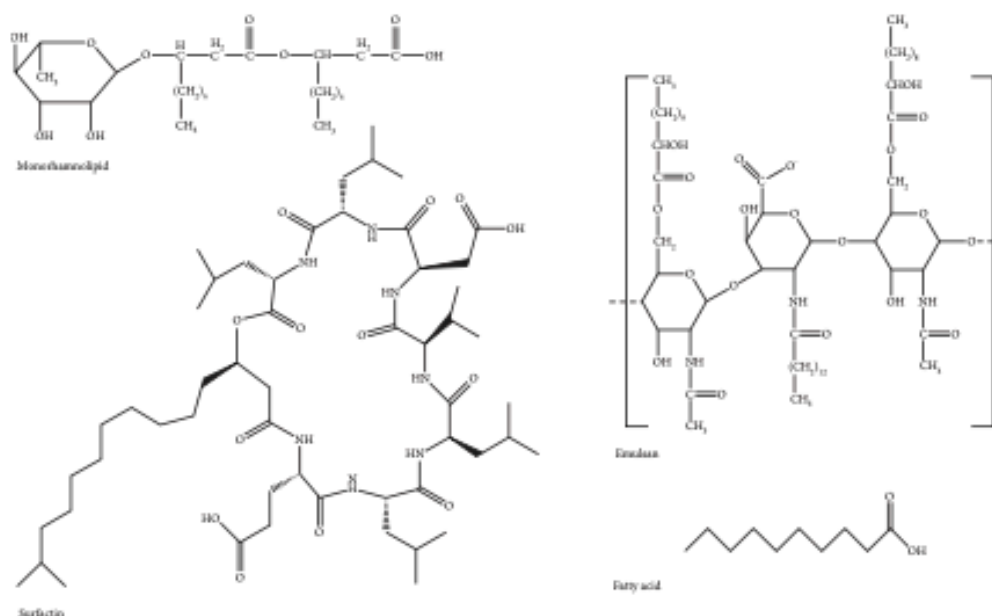


FIGURE 3: Structural diversity of some common biosurfactants. • Structures are designed with the aid of the Chemdraw program.

(e) Widespread applications: various types of biosurfactants have shown potential for application in numerous areas, owing to their emulsifying, antimicrobial, antitumor, antiadhesive, and anticorrosion activities. These properties are of interest to the food, textile, and biomedical industries.

The foaming properties of biosurfactants in comparison to that of synthetic surfactants make them a promising alternative for commercial production using raw materials [26, 27]. However, there are limitations associated with the production of biosurfactants, and strategies must be adopted to ensure that they can be competitive against synthetic surfactants. These strategies include the use of renewable substrate residues to reduce initial production costs and the development of efficient bioprocesses including optimization of culture conditions, improvement of downstream processes, and the use of improved strains with genetic modifications or of naturally productive potential [26].

Rhamnolipids and sophorolipids have been studied extensively and have consequently gained prominence in their applications in the global industrial sector [28]. The biotechnological advancements in the production of biosurfactants on an industrial scale are closely monitored by concerned industries. Among these, Evonik Industries pioneered the production of key components for the production of shampoos, shower gels, and household cleaning products [29]; such biosurfactants are produced mainly by bacteria and yeasts, although no biosurfactants produced by filamentous fungi are commercially available [30–32].

However, several studies have demonstrated the potential of fungi as producers of tension-active molecules [33] and with even greater yields in comparison to biosurfactants produced from bacteria [34].

3. Biosurfactant Production by Ascomycetes

Ascomycetes are a type of asexual fungi, or anamorph, which produce asexual spores (such as conidia) on branching structures called conidiophores. They are septate fungi with filaments partitioned by cells called septa [35, 36]. Ascomycetes biosynthesize secondary metabolites by absorption or exchange (heterotrophy). As they represent the largest group of fungi, 57,000 known species from approximately 6100 genera of ascomycetes exist in a variety of forms, including molds, yeasts, or sporocarps, and the term ascocoma is generally used to describe their “fleshy” fruiting body [37, 38].

Ascomycetes are abundant in the soil, but can also be found in aquatic environments and in plants as several of them are phytopathogens [39, 40]. Egidi et al. [40] identified patterns and ecological drivers of dominant soil fungal taxa occurring in the Ascomycota phylum. Studies indicate that globally distributed fungi include genera such as *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Acremonium*, and *Curvularia*, which are anemophilous fungi that can be dispersed through air. Most of these dominant fungi are characterized by their genomic potential for use in biotechnological resources, competition

between microorganisms in the environment, and stress tolerance compared to other fungi; however, studies suggest that ascomycetes may be better equipped to withstand environmental stresses and can utilize a higher number of resources, thus leading to more generalist strategies that may contribute to their increased dominance in soils.

Aspergillus, *Penicillium*, and *Fusarium*, among others, are ascomycetes that are being studied as biosurfactant producers [41–43]. Table 1 provides an overview of a few sources of isolation and types of reported biosurfactants produced by these ascomycetes. It can be concluded that *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium* are the genera most studied for the production of biosurfactants. Filamentous ascomycetes showed advantages in the production of biosurfactants [66] and displayed a potential to produce biosurfactants with higher yields in comparison to those by yeasts [67]. Therefore, the abovementioned genera are promising producers of biosurfactants and emulsifiers with stable emulsions and have an excellent capacity to reduce surface and interfacial tension [44, 49, 53, 55, 59, 68].

Ascomycetes that produce biosurfactants have been obtained from different sources such as plants, soil, and contaminated environments and can produce a variety of biosurfactants in synthetic media or on renewable substrates (Table 1). Additionally, they can be isolated from areas contaminated with oil, effluents, or hydrocarbons [45, 53, 59, 69], which increases the chances of isolating a fungus that produces the compound. However, several studies have demonstrated the isolation of areas such as soil, plants, and in marine environments [42, 49, 50, 61].

Table 1 provides an overview of the genera most commonly used for the production of biosurfactants and commonly isolated biosurfactants containing glycolipids, lipopeptides, enamides, etc. The main types of biosurfactants produced by ascomycetes are low-molecular-weight biosurfactants (such as glycolipids and lipopeptides) [70]. Glycolipids are composed of glycosyl and lipid fractions with amphiphilic properties, conferring them surfactant properties. Fungal glycolipids are intracellular metabolites [44] or secondary metabolites that help in the predominance of fungi in competition with other microorganisms in a given environmental niche [68, 71].

Lipopeptides and glycolipids are biosurfactants excreted by fungal strains produced during fermentation on mineral media with olive oil as a carbon source [44] and have higher emulsification activity than that does Triton X-100 among other chemically synthesized surfactants [46].

4. Biosynthesis of Biosurfactants

Biosurfactants have been synthesized using a variety of substrates. They can be produced spontaneously or induced by the presence of lipophilic compounds, pH variations, agitation speed, stresses, and low concentrations of nitrogen [72]. The first reported biosurfactants were rhamnolipids, produced by *Pseudomonas aeruginosa*, and lipopeptide (surfactin), produced by *Bacillus subtilis*. Studies looking into the production of fungi-derived biosurfactants have found the lipid mannosylethitritol (MEL)—derived from *Candida* [73].

The biosynthesis of biosurfactants generally involves separate pathways to form hydrophilic and hydrophobic moieties, which are subsequently combined [74]. The main metabolic pathways involved in the precursor synthesis of biosurfactants depend on the carbon source; the main carbon sources are carbohydrates and lipids or hydrocarbons. When carbohydrates are used as the sole carbon source in the culture medium for the production of glycolipids, carbon flow is directed to both the lipogenic (lipid formation) and glycolytic pathways (hydrophilic portion formation). In contrast, when a hydrocarbon source is used, biosynthesis is directed to the lipolytic and gluconeogenesis pathways [75]. An example of biosurfactant biosynthesis is the production of rhamnolipids by bacteria in a medium containing glycerol [30]. The molecular biosynthetic regulation of rhamnolipid, a glycolipid-type biosurfactant produced by *P. aeruginosa*, was the first to be deciphered [76] (Figure 4).

Although filamentous fungi can produce biosurfactants and it is possible to identify the type of biosurfactant, the biosynthesis of these compounds, their genetic basis, and the production route of the biosurfactant are not yet fully understood. The biosynthesis of most biosurfactants is strictly regulated, and the biosynthesis of hydrophobins by *Trichoderma reesei* depends on *hfb1* and *hfb2* genes [76].

An area of study that needs to be further explored is the availability of sequencing methods and tools for bioinformatic analysis that may allow the deduction of biosynthetic genes from the fungal genome biosurfactant.

5. Influence of Bioprocess and Nutritional Conditions on the Production of Biosurfactants

During the production process of biosurfactants, critical factors that directly influence cultivation conditions were evaluated and classified as external factors; these include agitation, aeration, and volume. Additionally, nutritional factors are directly related to the microorganism used and therefore influences the type of biosurfactant produced [67]. The synthesis of biosurfactants depends largely on the availability of carbon sources and the balance between carbon and other nutrients. Each fungus has specific nutritional needs that favor the production of a class of biosurfactants, but this optimization/characterization correlation is yet to be explored, with an increase in the yield of biosurfactant production being the main objective of this field of research (Table 2).

Carbon sources play an important role in the growth and production of biosurfactants by various microorganisms and vary from species to species. The main sources of carbon used for the production of ascomycetes are soybean oil, crude oil, agroindustrial residues, hydrocarbons, and glucose [50, 57, 58, 60, 61, 78].

Nitrogen is the second most important supplement for the production of biosurfactants by microorganisms. Various organic and inorganic nitrogen sources have been used in the production of biosurfactants as a mineral medium,

TABLE 1: Several classes of biosurfactants produced by fungi isolated from different environmental sources.

Fungi	Source	Type of biosurfactant	Reference
<i>Aspergillus niger</i>	—	Monoglucosyloxyoctadecenoic (glycolipid)	[44]
<i>Cladosporium resinae</i>	Jet fuel	Cladosan	[45]
<i>Curvularia lunata</i> IM 2901	Collection	Polymeric biosurfactant	[46]
<i>Penicillium citrinum</i>	—	Glycolipid	[47]
<i>Penicillium</i> sp.	Soil	—	[48]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Soil	—	[49]
<i>Aspergillus ustus</i> MSF3	Marine sponge (<i>Fasciospongia cavernosa</i>)	Glycoprotein	[50]
<i>Exophiala dermatitidis</i> SK80	Soil	Monoglycerides	[51]
<i>Aspergillus niger</i>	Soil	Glycolipid	[52]
<i>Aspergillus flavus</i>	Soil contaminated with diesel oil	—	[53]
<i>Fusarium</i> sp.	Plant (<i>Melia azedarach</i>)	Fusaroside (glycolipid)	[54]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Plant (<i>Lilium lancifolium</i>)	L9	[55]
<i>Fusarium</i> SP BS-8	Soil	Lipopeptide	[56]
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNPS	Soil	Lipopeptide	[57]
<i>Fusarium proliferatum</i>	Rice bran	Enamide	[58]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Soil contaminated with hydrocarbons	α , β -Trehalose (glycolipid)	[59]
<i>Xylaria regalis</i>	Plant (<i>Thuja plicata</i>)	—	[60]
<i>Fusarium oxysporum</i> LM5634	Soil	—	[61]
<i>Fusarium</i> sp.	Collection	Glycolipid	[62]
<i>Aspergillus niger</i>	Plant (<i>Piper hispidum</i>)	—	[63]
<i>Penicillium chrysogenum</i> MUT 5039	Marine	Sap-Pc protein	[64]
<i>Aspergillus terreus</i> MUT 271	Marine	Cerato-platanins	[65]

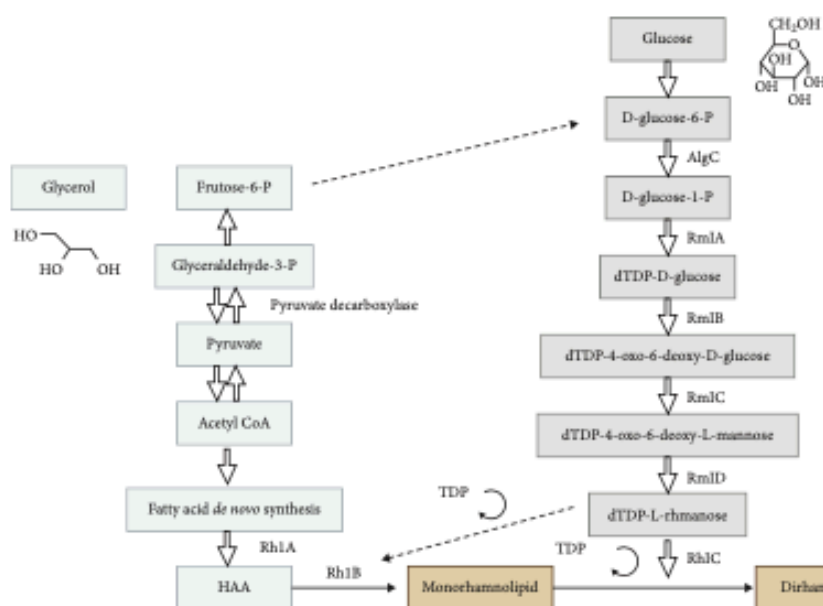


FIGURE 4: Biosynthesis related to the production of biosurfactants or bioemulsifiers using hydrophilic and hydrophobic sources as substrates [30]. *Image was created using Biorender.

TABLE 2: Different statistical strategies used for the optimization of biosurfactant production by ascomycetes.

Fungi	Type of biosurfactant	Process optimization	Optimized condition	E_{24} (%) / ST (mN/m)	Reference
<i>Aspergillus ustus</i> (MSF3)	Glycoprotein	pH, temperature, salt concentration, carbon nitrogen sources, and metals (univariate and response surface methodology)	pH 7/3% NaCl/glucose and cheapest raw/ratio C:N 3:2	75%	[77]
<i>Penicillium 8CC2</i>	—	Sources of carbon and nitrogen, pH, and production time using factorial design with repetition at the central point	Soybean oil, 20 g/L ⁻¹ ; yeast extract, 30 g/L ⁻¹ ; pH6	79.82%	[42]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	α , β -Trehalose	pH, incubation time, agitation, and inoculum (Plackett–Burman + central rotational compound arrangement)	Temperature, agitation, and incubation time variables, significantly temperature 47 °C, 120 rpm for 7 days of incubation	PB: 24.08 mN/m CCRD: 20.08 mN/m	[59]
<i>Fusarium oxysporum</i>	—	Agroindustrial substrate, carbon source, nitrogen, pH, and agitation factorial design	Waste significantly influenced	67.74%	[61]

* E_{24} (%) - emulsification index, **ST - surface tension.

yeast extract, and peptone [57, 58, 60, 61, 67, 79]. Supplementation with glucose as a carbon source can increase biosurfactant production, and yeast extract as a nitrogen source also plays an important role in biosurfactant production [50] (Table 2).

The important characteristics of most organisms are their strong dependence on the pH for cell growth and for the production of secondary metabolites. They produce the highest yield of biosurfactants in the range of pH 6–7 [50, 61, 78]. Biosurfactant composition depends on the fungal isolation conditions: a fungus isolated from marine environment requires the addition of salt in the culture medium. If the organism was isolated from a place contaminated with oil, oil can be used as an inducer in the bioprocess [45, 50, 59].

Most bioprocess conditions occur in incubation temperatures between 25–30°C and agitation between 100 and 150 rpm over around 3–20 days [57–59, 61]. These conditions can be optimized and customized for each fungus, such as by changing the appropriate pH and nutrient composition (Table 2).

Statistical analyses of cultivation conditions along with factorial design have proven to be effective tools for optimizing the production of biosurfactants. Such tools result in a reduction of the number of laboratory experiments, acquisition of mathematical models that can be used in industry, demonstrating which factors are important, and their interaction in the production of biosurfactants. Table 2 provides an overview of some optimization processes and conditions for the growth of certain ascomycete fungi. The search for the best conditions (such as substrate, pH, and temperature) for biosurfactant production has been explored, specifically in the use of agroindustrial waste [50, 52, 53].

The use of statistical tools is very efficient in increasing the production and properties of biosurfactants, most of which are factorial designs and response surface methodologies (RSMs), with the objective of optimizing the response, which is influenced by several independent variables [50, 61, 80]. The association of filamentous fungi producing

biosurfactants has been extensively studied using these statistical tools; in the last few years, the use of Plackett–Burman as a selection tool stands out, considering that authors test various fungi, conditions, and variables [59].

Several factors, such as availability of carbon and nitrogen sources, pH, agitation, and incubation, need to be optimized to enhance biosurfactant yield. Table 2 summarizes the data obtained from studies that determined a high emulsification index (>60%) and a reduction in surface tension (<25 mN/m) through optimizations for the production of biosurfactants by ascomycete fungi.

In general, the use of statistical approaches to determine the effect on the factors analyzed and their interactions result in the enhancement of production biosurfactant yields, and the possibility of reproducing the mathematical model provides information of interest to industries.

6. Extraction, Purification, and Chemical Characterization of Biosurfactants

After the production of biosurfactants, the next important step is to recover them from the fermentation media followed by purification to make them readily available for various industrial applications [67]. In the bioprocess of obtaining the biosurfactant, the extract is still limited because of the cost of recovery, purification processing, or both; the cost is approximately 60% of that of the total production [6].

Methods to reduce production costs have been studied, mainly using renewable resources; however, these resources contaminate or hinder the extraction and purification process and, consequently, the characterization of biosurfactants. Several techniques are used to obtain products of biotechnological interest, such as recovery with water-miscible solvents, such as acetone and ethanol, acidification, and the addition of salts to the solution. Table 3 shows the recovery methods for biosurfactants produced by filamentous fungi. The main methods used were acidification, precipitation with alcohol, and solvents.

TABLE 3: Types of biosurfactant extraction and characterization from filamentous fungi.

Fungi	Process/solvent used in the purification	Analytical method	Reference
<i>Cladosporium resinae</i>	Reverse-phase chromatography	High-performance liquid chromatography (HPLC)	[45]
<i>Curvularia lunata</i>	Acetone/lyophilized	Gas chromatography (GC)	[46]
<i>Penicillium</i> sp.	Cold acetone 4°C	HPLC	[48]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Distilled water 90°C and solvent	Emulsifying activity	[49]
<i>Aspergillus</i> sp. O-4	Phosphate buffer pH 7.0/0.2 M/ distilled water at 90°C	Emulsifying activity and surface tension	[81]
<i>Exophiala dermatitidis</i> SK80	Ethyl acetate	Thin-layer chromatography (TLC)	[51]
<i>Aspergillus</i> sp. MSF1	Solvents	TLC, Fourier transform infrared (FT-IR), and HPLC	[79]
<i>Aspergillus niger</i>	Acid precipitate HCl/chloroform and methanol	TLC	[52]
<i>Penicillium chrysogenum</i> SNP5	Ethanol -20 °C	TLC and FT-IR	[82]
<i>Aspergillus Niger</i> and <i>Aspergillus flavus</i>	Acid precipitation with 1 M of H ₂ SO ₄ pH 2.0/chloroform and methanol	Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	[78]
<i>Aspergillus flavus</i>	Ethyl acetate	Infrared spectroscopy (IR) and mass spectrometry (MS)	[83]
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Chloroform:ethanol	FT-IR	[84]
<i>Fusarium proliferatum</i>	Acidification pH 2.0 HCl 6 N/solvent system	TLC-column chromatography, FT-IR, and nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR)	[58]
<i>Pleurotus djamon</i>	HCl pH 2.0 acidification	FT-IR	[85]
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Acidification by HCl 6 N pH 2.0/ isopropanol	FT-IR	[86]
<i>Ceriporia lacerate</i>	Ethyl acetate	LC-MS and GC-MS	[87]
<i>Fusarium oxysporum</i>	Solvent chloroform:methanol	FT-IR, NMR-spectral studies, and GC	[88]
8CC2 <i>Penicillium</i>	Precipitation with ethanol	Stability studies	[42]
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Acidification with 6 M HCl pH 4.0/ solvent acetate:methanol (1:4)	Nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR)	[59]
<i>Xylaria regalis</i>	Acidification pH 2.0 HCl (1 N)/ethyl acetate	High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)	[60]
<i>Aspergillus terreus</i> MUT 271 and <i>Trichoderma harzianum</i> MUT 290	Concentrated by air bubbling and by an Amicon Ultrafiltration cell<	Q-TOF LC/MS and circular dichroism spectroscopy	[65]

Following the characterization process, the crude biosurfactants are analyzed using a combination of spectroscopic techniques such as mass spectrometry, infrared (IR), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to elucidate the structure of the biosurfactant. Chromatographic techniques such as gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) in combination with mass spectrometry (MS) are also used for the characterization and purification of biosurfactants. In the investigation of the biosurfactant produced by *Fusarium fujikuroi*, the compounds were identified by gas chromatography coupled with MS and with a flame ionization detector [59].

Fourier transform infrared spectroscopy is often used to identify organic functional groups (alkyl, carbonyl, ether, and ester linkages in carbohydrates). In a study carried out by Pele et al., [89] the infrared spectra suggested the presence of an ester linkage, and an amide group confirmed the presence of glycoproteins on the structure of a biosurfactant produced by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607.

The characterization of the biosurfactants produced by filamentous fungi is still scarce, and it, at times, becomes necessary to use other techniques such as matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight MS (MALDI-TOF MS).

According to Table 3, the primary process of extracting biosurfactants by filamentous fungi is precipitation and solvent fraction. Precipitation can be promoted by acidification (HCl) or utilization of solvent systems such as chloroform, methanol, ethyl acetate, and ethanol. In addition, previous studies have demonstrated that combinations of analytical methodologies are necessary for chemical characterization, and the techniques to identify biosurfactants include thin-layer chromatography (TLC), HPLC, Fourier transform infrared (FT-IR), and MS.

7. Industrial Applications

The exploration of natural resources in the biotechnological era has promoted scientific and technological advancements by adding value to natural products. Biosurfactants have the potential for the development of significant biotechnological processes in the 21st century owing to their unique emulsification properties [7].

Biosurfactants may be used as therapeutic agents because of their antibacterial, antifungal, and antiviral properties [90, 91]. These molecules have ideal properties for incorporation in food and cosmetic formulations, and their antimicrobial and antibiofilm potential are of great interest to

TABLE 4: Filamentous fungi producing biosurfactants deposited in the patent bank.

Microorganism	Title	Inventor and date	Patent
<i>Cladosporium resinae</i>	Preparation of a new biosurfactant	Jimenez and Morales (1993)	ES 2039187B1
Fungi	Method for preparing rhamnolipid	Yang (2007)	CN 1891831
<i>Aureobasidium pullulans</i>	New biosurfactant produced by <i>Aureobasidium pullulans</i>	Kim et al. (2013)	KR 101225110
<i>Trichoderma</i>	Hydrophobin production by <i>Trichoderma</i>	Quay (2002)	US7863245B2

food processing industries [92]. Studies have investigated and established the promising potential applications of biosurfactants (some fungi have also been deposited in the patent bank; Table 4) as an alternative to synthetic surfactants in the industry. The biosurfactant application market is segmented into the food, cosmetics, health, and textile industries, with household detergents and personal-care products as the main applications of biosurfactants.

Most biosurfactant industries are in North America, Asia, and Europe; consequently, they are the main consumers. Europe dominated the biosurfactant market with a global share of 52.5% in 2019. This is attributable to the increasing awareness among consumers regarding the health hazards associated with chemical surfactants [2]. However, Latin America has immense potential owing to its enormous biodiversity and several agroindustrial residues produced that can be used as substrates for biosurfactant production; thus, the development of biosurfactants in South America, specifically in Brazil, remains a challenge, although Brazil is a leader among Latin American countries in biosurfactant research, with a high number of articles and patents [93].

The production of biosurfactants by ascomycetes filamentous fungi has been increased in recent years. Among the ascomycetes, some fungi will stand out in the industrial sector because they have demonstrated production potential when grown using different synthetic culture media and renewable substrates, in addition to their biological activities. Biosurfactants obtained from fungi have a variety of chemical classes, which favor several applications across industrial, food, biomedical, and environmental sectors. There remains a need for further studies on the patents, characterization, and application of these substances. Challenges concerning the understanding of metabolic production pathways, genes of interest, and techniques for the recovery of biosurfactants remain and should be addressed in future studies.

8. Conclusions

- (i) Ascomycetes isolated from various environments have the potential to produce biosurfactants using renewable substrates.
- (ii) The main genera of ascomycetes that are able to produce biosurfactants include species from *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*, which mainly produce glycolipids and lipopeptides.
- (iii) The production of biosurfactants from ascomycetes is largely affected by various differences in growing media conditions, pH, temperature, and carbon and nitrogen sources. The influence of production

factors has been studied, mainly through design factorial and response surface methodologies.

- (iv) The main extraction methods to obtain biosurfactants from culture media include acidification or the use of a solvent system, and characterization and structure elucidation of the biosurfactants have been achieved using a combination of analytical, chromatographic, and spectroscopic techniques.

The use of biosurfactants obtained by ascomycetes needs to be encouraged, given the advantages in comparison to their synthetic counterparts, data from several studies, and their potential to produce ecologically safe and sustainable products.

Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge funding received from the Foundation of Research Support of Amazonas State (FAPEAM 030/2013-UNIVERSAL AMAZONAS), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- [1] M. Henkel, M. M. Müller, J. H. Kögler et al., "Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 1207–1219, 2012.
- [2] Grand View Research Inc, *Biosurfactants Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Rhamnolipids, MES, APG, Sorbitan Esters, Sucrose Esters), by Application (Household Detergents, Personal Care, Industrial Cleaners) and Segment Forecasts*, Grand View Research Inc, San Francisco, CA, USA, 2014.
- [3] Q. Helmy, E. Kardena, N. Funamizu, and Wisjnuaprpto, "Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts," *International Journal of Biotechnology*, vol. 12, pp. 66–86, 2011.
- [4] R. Marchant and L. M. Banat, "Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation," *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 11, pp. 558–565, 2012.