

Bioemulsificante produzido por um fungo promissor *Absidia* sp. UCP 1144 isolado de solo da Caatinga no Nordeste do Brasil**Bioemulsifier Produced by a Promising fungus *Absidia* sp. UCP 1144 Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil**

DOI:10.34117/bjdv5n11-204

Recebimento dos originais: 07/10/2019

Aceitação para publicação: 20/11/2019

Rafael de Souza Mendonça

Graduando em Engenharia Química pela Universidade Católica de Pernambuco
Instituição: Universidade Católica de Pernambuco
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, Recife - PE, 50050-900
E-mail: rafa.13souza@hotmail.com

Marcelly Figueiredo Alves

Graduanda em Engenharia Química pela Universidade Católica de Pernambuco
Instituição: Universidade Católica de Pernambuco
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife - PE
E-mail: marcelly_figueiredo@hotmail.com

Adriana Ferreira Souza

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal Rural de Pernambuco
Instituição: Universidade Católica de Pernambuco
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife - PE
E-mail: adrife.souza@gmail.com

Dayana Montero Rodríguez

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
Instituição: PNPd-CAPES, Universidade Católica de Pernambuco
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife - PE
E-mail: dayanamontero87@gmail.com

Galba Maria de Campos Takaki

Doutora em Microbiologia e Imunologia pela
Universidade Federal de São Paulo/Newcastle upon Tyne-Inglaterra
Instituição: Professora Titular, Universidade Católica de Pernambuco
Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-590 Recife - PE
E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

RESUMO

Os bioemulsificantes (BEs) são moléculas anfipáticas que formam emulsões estáveis entre dois líquidos imiscíveis, produzidas por diferentes micro-organismos, a partir da bioconversão de resíduos agroindustriais. Os BEs são moléculas promissoras, considerando as diversas vantagens sobre os de origem sintética, como baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e estabilidade em valores extremos de temperatura, pH e salinidade, e uso em impactos ambientais, entre outras aplicabilidades. A produção em escala industrial ainda não foi atingida, devido aos baixos rendimentos e elevado custos de produção. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de *Absidia* sp. UCP 1144 na produção de BE utilizando diferentes resíduos agroindustriais (glicerol bruto,

milhocina e soro de leite) como substratos, visando minimizar os custos de produção. As fermentações foram conduzidas de acordo com um planejamento fatorial completo 2³, a temperatura de 28°C, 150 rpm em 96 h. Após esse período, os líquidos metabólicos livres de células foram utilizados para determinar o índice de emulsificação (IE₂₄). Os resultados obtidos demonstraram que o fungo produziu uma molécula com atividade emulsificante na condição 6 do planejamento (glicerol 3%, milhocina 3% e soro de leite 4%) com IE₂₄=79,17%, utilizando óleo motor queimado, com óleo de mamona (73,68%) e o óleo motor in natura (92,31%). A análise estatística comprovou a influência significativa das concentrações dos resíduos glicerol bruto, milhocina e soro de leite na produção do BE, constituindo substratos alternativos e de baixo custo, sendo um bioprocessamento econômico e atrativo para a indústria. Além disso, este é o primeiro relato sobre a produção de BE por *Absidia*, com potencial de aplicação na biorremediação de ecossistemas contaminados com petróleo e derivados.

Palavras-chave: Fungos Mucorales, índice de emulsificação, substratos renováveis, planejamento fatorial.

ABSTRACT

Bioemulsifiers (BEs) are amphipathic molecules that form stable emulsions between two immiscible liquids produced by different microorganisms from the bioconversion of agroindustrial residues. BEs are promising molecules, considering the many advantages over synthetic ones, such as low toxicity, high biodegradability and stability at extreme values of temperature, pH and salinity, and use in environmental impacts, among other applications. Production on an industrial scale has not yet been achieved due to low yields and high production costs. In this context, the objective of this study was to evaluate the potential of *Absidia* sp. CPU 1144 in the production of BE using different agroindustrial residues (crude glycerol, corn steep and whey) as substrates, aiming to minimize production costs. The fermentations were conducted according to a complete factorial design 2³, at 28°C, 150 rpm in 96 h. After this period, cell free metabolic fluids were used to determine the emulsification index (IE₂₄). The results showed that the fungus produced a molecule with emulsifying activity in the planning condition 6 (glycerol 3%, 3% corn steep liquor and 4% whey) with IE₂₄ = 79.17%, using burnt motor oil with castor oil (73.68%) and in natura motor oil (92.31%). Statistical analysis confirmed the significant influence of the concentrations of residues crude glycerol, corn steep liquor and whey in the production of BE, constituting alternative and low-cost substrates, being an economical and attractive bioprocess for the industry. In addition, this is the first report on *Absidia* sp. bioemulsifier production, with potential application in bioremediation of petroleum-contaminated ecosystems.

Key words: Mucoralean fungi, emulsification index, renewable substrates, factorial design

1 INTRODUÇÃO

Os bioemulsificantes (BEs), são compostos microbianos de natureza anfipática, que têm a capacidade de formar emulsões estáveis com compostos hidrofóbicos e geralmente possuem elevado peso molecular (UZOIGWE et al., 2015; RAHMAN et al. 2019). Comparados aos compostos sintéticos, os emulsificantes de origem biológica apresentam vantagens como menor toxicidade, biocompatibilidade e estabilidade a valores extremos de temperatura, salinidade e pH, pelo que podem ser aplicados nas indústrias petroquímica, alimentícia e agrícola como agentes espumantes, dispersantes, estabilizadores e detergentes, dentre outros (PERFUMO et al., 2010; DERGUINE-MECHERI et al., 2017; BIRDILLA et al., 2018; XIA et al., 2019).

Os BE são produzidos na sua maioria por bactérias e leveduras (DERGUINE-MECHERI et al., 2017; RULLI et al., 2019), contudo, são escassos os estudos com a produção de BE por fungos filamentosos. No entanto, os fungos filamentosos apresentam elevado potencial biotecnológico para a produção de biossurfactantes (BS) e BE, considerando a sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, como resultado de variações de suas atividades fisiológicas, bioquímicas e genéticas (SILVA et al., 2018). Dentre os fungos filamentosos, destacam-se os representantes da ordem Mucorales, como *Cunninghamella echinulata*, *Mucor circinelloides* e *Rhizopus arrhizus*, que recentemente têm demonstrado excelente capacidade para produzir compostos tensoativos (ANDRADE et al., 2018; MARQUES et al., 2019; PELE et al., 2018; 2019).

Embora, os BEs sejam menos agressivos ao meio ambiente, e possuem diversas vantagens, ainda não competem industrialmente com os de origem sintética, tendo em vista o elevado custo de produção e baixo rendimento (BANAT et al., 2014; SILVA et al., 2018). Uma estratégia para minimizar esse problema vem sendo o aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos renováveis e de baixo custo, como milhocina, glicerol bruto (excedente da produção de biodiesel), soro de leite, melaço, entre outros (GUDIÑA, TEIXEIRA e RODRIGUES et al., 2016; DERGUINE-MECHERI et al., 2018; PELE et al., 2019).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de *Absidia sp.* UCP 1144 na bioconversão de resíduos agroindustriais (glicerol bruto, milhocina e soro de leite) como alternativa sustentável para a produção de BE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado nesse estudo foi o fungo filamentoso *Absidia sp.* UCP 1144, gentilmente cedido pelo Banco de Culturas de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), registrado no World Federation for Culture Collection (WFCC). A cepa vem sendo mantida no meio Ágar Sabouraud (40 g/L de glicose, 10 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de ágar), sob temperatura de 5°C.

3.2 Substratos agroindustriais

Os substratos agroindustriais utilizados foram glicerol bruto, subproduto da produção de biodiesel a partir de óleo de algodão (CETENE-PE, MCT, Brasil); milhocina, proveniente da indústria do processamento de milho Corn Products (Cabo de Santo Agostinho-PE, Brasil) e soro de leite, proveniente de uma indústria leiteira local, a partir do processamento de queijo.

3.3 Preparação do inoculo

Absidia sp. UCP 1144 foi transferida para placas contendo o meio Agar Sabouraud dextrose ágar, incubada à 28°C por 96 h. Após esse período foi preparada uma suspensão de esporos (10^7 esporos/ml) em água destilada estéril, de acordo com PELE et al., (2019).

3.4 Produção do bioemulsificante

A produção do BE foi realizada em frascos de Erlenmeyers de 500mL de capacidade, contendo 100 ml de meio constituído por solução salina (KH_2PO_4 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g em água destilada 1000 ml), com adição de 1% de solução traço ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,63 mg, MnSO_4 0,01 mg, ZnSO_4 0,62 mg, água destilada 100 ml). Os resíduos (glicerol bruto, milhocina e soro de leite) foram adicionados de acordo com o planejamento fatorial de 2^3 , o pH ds meios foi ajustado para 5,5. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 min e após resfriamento a temperatura ambiente, foram inoculados ao 5% da suspensão de esporos de *Absidia* sp., incubados a 28°C e 150 rpm, por 96 h. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 8000 g por 15 min e filtradas para obter-se os líquidos metabólicos livre de células.

3.5 Planejamento fatorial

Um planejamento fatorial completo 2^3 foi utilizado para avaliar os principais efeitos e interações das três variáveis independentes (glicerol bruto, milhocina e soro de leite), sobre o índice de emulsificação como variável resposta. Cada variável independente foi investigada em três níveis, mínimo (-1), zero (0) e máximo (+1), conforme a Tabela 1. Foram realizados 11 ensaios experimentais e os dados obtidos foram analisados pelo software Statistica®, versão 10.0 (StatSoft Inc., USA), testando a significância dos resultados ($p < 0,05$).

3.6 Determinação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987), utilizando como substratos hidrofóbicos o óleo motor queimado com os líquidos metabólicos provenientes dos ensaios do planejamento fatorial. A condição onde se obteve o melhor resultado foi utilizada para determinar o índice de emulsificação com óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol, óleo de canola, óleo de mamona, óleo de soja pós-fritura, azeite de oliva e óleo motor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de BE por *Absidia* sp. UCP 1144 utilizando resíduos agroindustriais

A capacidade de estabilização da emulsão de um composto tensoativo é avaliada pela sua habilidade de manter pelo menos 50% do volume original da emulsão após 24 horas de sua formação (LIMA et al., 2017; PELE et al., 2018). Considerando este critério, *Absidia* sp. UCP 1144 demonstrou

a produção de um composto emulsificante na condição 6 do planejamento fatorial, no meio contendo 3% de glicerol bruto, 3% de milhocina e 4% de soro de leite (Tabela 1). Nesta condição, obteve-se o valor mais elevado do índice de emulsificação (79,17%), com óleo motor queimado usando o líquido metabólico após 96 h de cultivo.

Tabela 1: Planejamento fatorial completo 2^3 empregados na produção de BE por *Absidia* sp. UCP 1144, após 96 h de cultivo nos meios contendo resíduos agroindustriais. índice de emulsificação, utilizado como variável resposta, obtidos experimentalmente e preditos pelo modelo estatístico empregado.

Ensaio s	Glicerol bruto (%)	Milhocina (%)	Soro de leite (%)	Índice de emulsificação (%)	
				Experimental	Predito
1	2	3	0	34,48	34,20
2	3	3	0	31,03	30,75
3	2	5	0	40,74	40,46
4	3	5	0	37,50	37,22
5	2	3	4	44,00	43,72
6	3	3	4	79,17	78,89
7	2	5	4	50,00	49,72
8	3	5	4	41,67	41,39
9	2,5	4	2	43,48	44,54
10	2,5	4	2	44,44	44,54
11	2,5	4	2	43,42	44,54

4.2 Avaliação estatística do bioemulsificante (BE)

Neste estudo, utilizando o planejamento fatorial completo 2^3 para analisar a influência dos três resíduos agroindustriais utilizados como componentes do meio de cultura para a produção de BE por *Absidia* sp. UCP 1144. A variável dependente utilizada foi o índice de emulsificação e a seguinte equação foi usada para estabelecer sua relação com as variáveis independentes:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \text{ (Eq. 1)}$$

onde Y é a variável resposta (índice de emulsificação); b_0 é uma constante; b_1 , b_2 e b_3 são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares e b_{12} , b_{13} , b_{23} e b_{123} são os coeficientes de interação.

Para analisar o modelo matemático, ajustes foram feitos pelos métodos de regressão não lineares e na Tabela 1 se mostram os valores de índice de emulsificação obtidos experimentalmente e os preditos pelo modelo. O elevado coeficiente de determinação ($R^2=0,99809$) obtido na análise de variância (ANOVA) (Tabela 2) demonstrou que a Equação 2 proposta pelo modelo matemático explica os valores de índice de emulsificação obtidos. O ajuste do modelo foi de 99,36% (R^2 ajustado=0,99363), demonstrando que o modelo matemático descrito está de acordo aos dados experimentais.

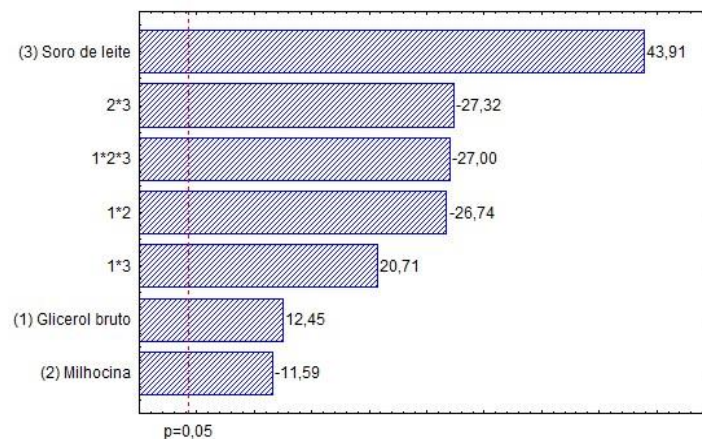
$$Y = 44,53909 + 2,51875x_1 - 2,34625x_2 + 8,88625x_3 - 5,41125x_1x_2 + 4,19125x_1x_3 - 5,52875x_2x_3 - 5,46375x_1x_2x_3 \text{ (Eq.2)}$$

Tabela 2: ANOVA obtida a partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 para analisar a influência das variáveis independentes (glicerol bruto, milhocina e soro de leite) na variável dependente (índice de emulsificação)

Efeito	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
(1) Glicerol bruto	50,753	1	50,7528	154,923	0,006393
(2) Milhocina	44,039	1	44,0391	134,430	0,007357
(3) Soro de leite	631,724	1	631,7235	1928,338	0,000518
1x2	234,253	1	234,2530	715,058	0,001396
1x3	140,533	1	140,5326	428,976	0,002323
2x3	244,537	1	244,5366	746,449	0,001337
1x2x3	238,821	1	238,8205	729,000	0,001369
Falta de ajuste	2,377	1	2,3769	7,256	0,114612
Erro puro	0,655	2	0,3276		
Total	1587,690	10			

A ANOVA indicou ainda que as três variáveis e suas interações foram estatisticamente significativas sobre o índice de emulsificação, para os dados experimentais obtidos, quando analisados no nível de confiança de 95%. Isto foi comprovado pelo diagrama de Pareto (Figura 1), onde o ponto no qual os efeitos estimados são estatisticamente significativos ($p = 0,05$) indicado pela linha vertical vermelha tracejada.

Figura 1: Diagrama de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência das variáveis independentes: glicerol bruto (1), milhocina (2) e soro de leite (3) sobre o índice de emulsificação como variável dependente.



De acordo com o diagrama de Pareto é possível constatar que apenas o glicerol bruto, o soro de leite e a interação dentre eles apresentaram efeito positivo sobre o índice de emulsificação, enquanto a milhocina e suas interações com as outras variáveis apresentaram efeito negativo (Figura 1). Pele (2017), informou efeitos similares do glicerol bruto e de milhocina quando foram utilizados na produção de BE por *Rhizopus arrhizus* UCP 1607. O aproveitamento de resíduos agroindustriais, como substratos na produção de BE torna-se uma estratégia promissora, considerando que a produção biotecnológica desses metabólitos microbianos depende do desenvolvimento de processos mais econômicos, viabilizando a geração de um bioprocessos, com aproximadamente 50% de redução do custo final do produto, segundo SILVA et al, (2018) e RULLI et al.,(2019).

4.3 Propriedades emulsificantes com diferentes substratos

Os resultados obtidos com emulsificação com diferentes substratos hidrofóbicos, como: óleo de milho (63,64%), óleo de mamona (73,68 %) e óleo motor in *natura* (92,31 %). A literatura relata que BE produzido por outros fungos da ordem Mucorales têm apresentado propriedades emulsificantes estáveis e bem compactas (ANDRADE et al., 2018; SILVA et al., 2018; PELE et al., 2019).

Outros estudos foram realizados com diferentes substratos hidrofóbicos considerando as diferentes composições de ácidos graxos. Assim, as propriedades do BE produzido por *Absidia* sp. UCP 1144 na condição 6 do planejamento fatorial, foi confirmado com outros compostos substratos hidrofóbicos, como apresentado na Figura 2 e Tabela 3 .

Figura 2: Emulsões formadas pelo líquido metabólico livre de células da condição 6 do planejamento fatorial (3% de glicerol, 3% milhocina e 4% de soro de leite) com diversos substratos hidrofóbicos: óleo de soja (A), óleo de milho (B), óleo de girassol (C), óleo de canola (D), óleo de mamona (E), óleo de soja pós-fritura (F), azeite de oliva (G) e óleo motor *in natura*(H).

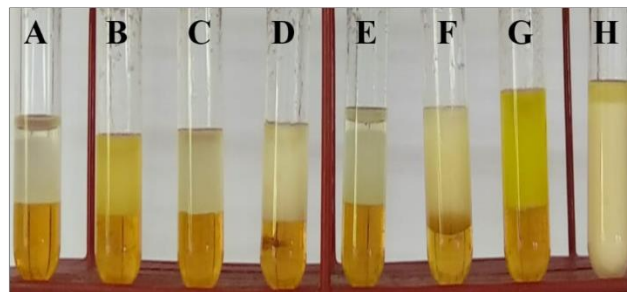


Tabela 3. Resultados das emulsões da condição 6 (3% glicerol bruto, 3% milhocina e 4% soro de leite), do planejamento fatorial 2³, com vários compostos hidrofóbicos

Composto hidrofobico	Índice de emulsificação % (IE ₂₄)
Óleo de soja (A)	60,0
Óleo de milho (B)	63,64
Óleo de girassol (C)	40,0
Óleo de canola (D)	50,0
Óleo de mamona (E)	73,68
Óleo de soja pós-fritura (F)	52,63
Azeite de oliva (G)	60,0
Óleo motor (H)	92,31

Associado aos estudos com as diferente emulsões do BE isolado de *Absidia* sp. torna-se fundamental demonstrar que os óleos utilizados apresentam diferentes composições lipídeos,

enriquecendo as emulsões formadas, como descrito pela literatura (AUED-PIMENTEL et al., 2009; LÔBO et al., 2009):

Óleo de Soja: um dos mais utilizados na alimentação domiciliar e indústria de alimentos. Tem alto teor de ácido linoléico (ômega 6), ácido oleico (ômega 9) e ácido linolênico (ômega 3).

Óleo de Canola: tem 7 a 10% de ômega 3, há evidências de que pode reduzir o LDL colesterol (colesterol ruim), rico em vitamina E tem propriedades antioxidantes. Como o óleo de soja pode ser utilizado de forma adequada para frituras.

Óleo de Girassol: apresenta alto teor de ácido linoleico e vitamina E. Muito utilizado na preparação de saladas, cozidos e conservas.

Óleo de Milho: é fonte de fitosteróis e contém ácidos graxos poli-insaturados linoléico e linolênico.

Azeite de Oliva: é tido como uma das opções mais saudáveis para uso culinário por ser rico em gordura monoinsaturada, que auxilia a reduzir os níveis de LDL colesterol.

O óleo de mamona é rico em triacilglicerol, e o óleo de motor é constituído por hidrocarbonetos de cadeia longa (alifáticos e aromáticos de 15 a 50 carbonos).

Observa-se que com todos os óleos usados independente da composição em lipídeos foram formadas emulsões estáveis.

Tabela 4. Estudo comparativo dos índices de emulsificação (E_{24}) do BEs produzidos por fungos de vários gêneros da ordem Mucorales empregando diferentes substratos

Fungos da ordem Mucorales	Índice de Emulsificação (E_{24}) % /Óleos					Referências
	Soja	Milho	Mamona	Oliva	Motor	
<i>Absidia</i> sp.	60,0	63,64	73,68	60,0	92,31	Presente estudo
<i>Cunninghamella echinulata</i> UCP 1299	37,9	-	-	-	-	Andrade et al., 2018
<i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1607	-	-	-	-	50	Pele et al., 2018
<i>C. phaeospora</i> UCP 1303	-	65,31	48,84	-	-	Lins et al., 2017
<i>C. echinulata</i>	60	-	-	-	80	Silva et al., 2014
<i>Mucor circinelloides</i>	-	-	-	-	78,0	Acioly et al., 2012

No presente estudo observa-se que os índices de emulsificação apresentados por *Absidia* sp. É superior aos descritos na literatura para *Cunninghamella echinulata* UCP 1299, *Rhizopus arrhizus* UCP 1607, *C. phaeospora* UCP 1303, *C. echinulate* e *Mucor circinelloides*.

A produção de BE por *Absidia* sp., apresenta elevado de aplicação em diferentes áreas industriais, como alimentos, na formulação de cosméticos, ou mesmo na biorremediação de ambientes contaminados com petroderivados (SOUZA et al., 2016; MAIA et al., 2018; RAHMAN et al., 2019).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados demonstram o potencial biotecnológico de *Absidia* sp. UCP 1144 na produção de BE, a partir da bioconversão de resíduos da agroindústria, com elevada propriedade de emulsificação em diferentes substratos hidrofóbicos. A utilização de substratos de baixo custo, disponíveis no Brasil, torna-se uma estratégia sustentável e economicamente viável para a indústria nacional, na obtenção de um bioproduto com possíveis aplicabilidades industriais e ou ambiental.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro da FACEPE (APQ.0291-2.12/15), da CAPES e do CNPq (Processo No. 314422/2018-8).

REFERÊNCIAS

ACIOLY, L. M. L.; SILVEIRA, A. A. B.; ANJOS, M. N.; SILVA, G. K. B.; LEITE, M. V.; OKADA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* using apple peel, vegetable oil and corn steep liquor as substrate. *Microbes in Applied Research*, p. 344 – 347. 2012

ANDRADE, R. F. S.; SILVA, T. A. L.; RIBEAUX D. R.; RODRÍGUEZ, D. M.; SOUZA, A. F.; LIMA, M. A. B.; LIMA, R. A.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Promising Biosurfactant Produced by *Cunninghamella echinulata* UCP 1299 Using Renewable Resources and Its Application in Cotton Fabric Cleaning Process. *Advances in Materials Science and Engineering*, v. 2018, p. 1-12, 2018

AUED-PIMENTEL, S.; KUMAGA, E.E.; KUS, M.M.M.; CARUSO, M.S.F.; TAVARES, M.; ZENEBON, O. Trans fatty acids in refined polyunsaturated vegetable oils commercialized in the city of São Paulo, Brazil. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v. 29, n.3, p. 646-651, jul.-set. 2009.

BANAT, I. M., SATPUTE, S. K., CAMEOTRA, S. S., PATIL, R., & NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, v.5. n. 697, Dec. 2014.

BIRDILLA SELVA DONIO, M., CHELLADURAI KARTHIKEYAN, S., MICHAELBABU, M., UMA, G., RAJA JEYA SEKAR, R., & CITARASU, T. Haererehalobacter sp. JS1, a bioemulsifier producing halophilic bacterium isolated from Indian solar salt works.

Journal of Basic Microbiology, v. 58, n.7, p. 597-608, Jul. 2018.

DERGUINE-MECHERI, L., KEBBOUCHE-GANA, S., KHEMILI-TALBI, S., & DJENANE, D. Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt- tolerant halophilic *Cryptococcus* strain YLF isolated from crude oil. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 162, p. 712–724, Oct. 2017.

GUDIÑA, E.J., TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, L.R., 2016. Biosurfactants produced by marinemicroorganisms with therapeutic applications. *Marine drugs*, v. 14, n. 2, p. 38, Feb. 2016.

LINS, A. B.; BIONE, A. P.; FONSECA, T. C. S.; SILVA, T. C.; SILVA, P. H.; MORANT, K. V.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant Production by *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 Using Controlled Temperature Through of Arduino. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, V. 6, n. 12, p. 2708-2715. 2017

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova*, v.32, n.6, p.1596-1608,Jan., 2009

MARQUES N. S. A. A., SILVA T. A. L., ANDRADE R. F. S., JÚNIOR J. F. B., OKADA K. CAMPOS-TAKAKI G. M. Lipopeptide biosurfactant produced by *Mucor Circinelloides* UCP/WFCC 0001 applied in the removal of crude oil and engine oil from soil. V. 41, e38986. 2019.

PELE, M. A. Seleção de amostras de *Rhizopus* spp. produtoras de biossurfactantes/bioemulsificantes e aplicação na remoção de poluentes hidrofóbicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco. Mar. 2017.

PELE, M. A., RIBEAUX-RUBIO D., VIEIRA E. R., SOUZA A. F., LUNA M. A. C., MONTERO-RODRÍGUEZ D., ANDRADE R. F. S., ALVIANO D. S., ALVIANO C. S., BARRETO-BERGTER E., SANTIAGO A. L. C. M. A., CAMPOS-TAKAKI G. M. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 38, p. 40-48, Mar. 2019.

PELE, M. A., MONTERO-RODRIGUEZ, D., RUBIO-RIBEAUX, D., SOUZA A. F., LUNA M. A. C., SANTIAGO M. F., ANDRADE R. F. S., SILVA T. A. L., SANTIAGO A. L. C. M., CAMPOS-TAKAKI G. M. Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. *Academic Journals*, v. 17, n.6, p. 150-157, Feb. 2018.

SILVA, N. R. A.; LUNA, M. A. C.; SANTIAGO, A. L. C. M. A.; FRANCO L. O.; SILVA, G. G. B.; SOUZA, P. M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 9, p. 15377 – 15395. 2014.

PERFUMO A, SMYTH T.J.P, MARCHANT R, BANAT I.M. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, v. 2, p. 1501-1512, 2010.

RAHMAN, P. K. S. M., MAYAT, A., HARVEY, J. G. H., RANDHAWA, K. S., RELPH, L. E., ARMSTRONG, M. C. (2018). Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Algae. *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment*, v. 13, p. 169-188, Dec. 2018.

RULLI, M. M., ALVAREZ, A., FUENTES, M. S., & COLIN, V. L. Production of a microbial emulsifier with biotechnological potential for environmental applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 174, p. 459-466. Nov. 2018.

SENA, H. H., SANCHES, M. A., ROCHA, D. F. S., SEGUNDO, W. O. P. F., DE SOUZA, É. S., & DE SOUZA, J. V. B. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. *International Journal of Microbiology*, v. 2018, p. 1-8, Apr. 2018.

SILVA, A. C. S. DA, SANTOS, P. N. DOS, SILVA, T. A. L. E, ANDRADE, R. F. S., & CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. *Arquivos Do Instituto Biológico*, v. 85, Sep. 2018.

SILVA, N.R.A, LUNA, M.A., SANTIAGO, A.L., FRANCO, L.O., SILVA, G.K.; DE SOUZA, P.M., OKADA, K., ALBUQUERQUE, C.D., DA SILVA, C.A., CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, v.15, n.9, p. 15377-15395, Sep. 2014.

UZOIGWE, C., BURGESS, J.G., ENNIS, C.J., RAHMAN, P.K. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p. 245, Apr. 2015.

XIA, M., FU, D., CHAKRABORTY, R., SINGH, R. P., & TERRY, N. Enhanced Crude Oil Depletion by Constructed Bacterial Consortium Comprising Bioemulsifier Producer and Petroleum Hydrocarbon Degraders. *Bioresource Technology*, v. 282, p. 456-463, Jun. 2019.