

SAÚDE E AMBIENTE

V.9 • N.3 • 2024 - Fluxo Contínuo

ISSN Digital: 2316-3798

ISSN Impresso: 2316-3313

DOI: 10.17564/2316-3798.2024v9n3p7-23



CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *CURVULARIA LUNATA* - UFPEDA885 PARA DESCONTAMINAÇÃO DE SOLOS POR ÓLEO AUTOMOTIVO

CHARACTERIZATION OF BIOSURFACTANT BY *CURVULARIA LUNATA* - UFPEDA885 FOR SOIL DECONTAMINATION BY AUTOMOTIVE OIL

CARACTERIZACIÓN DE BIOSURFACTANTE POR *CURVULARIA LUNATA* - UFPEDA885 PARA DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS POR ACEITE AUTOMOTRIZ

Carla do Couto Soares Maciel¹
Rosileide Fontenele da Silva Andrade²
Norma Buarque de Gusmão³
Galba Maria de Campos Takaki⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a produção de biossurfactante pelo fungo *Curvularia lunata* - UFPEDA885 para descontaminação de solos por óleo automotivo. Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional com as variáveis independentes: tamanho do inóculo (discos de gelose de 0,6 cm), concentração de NH_4NO_3 , $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. O fungo foi inoculado em meio mineral adaptado com 2 % de óleo diesel, cultivo por 72 horas a 40°C. Foram avaliadas: tensão superficial e atividade emulsificante, toxicidade do biossurfactante frente sementes de *Cucumis sativus*, ao microcrustáceo *Artemia salina* e biorremoção de óleo automotivo em solo pelo biossurfactante. Por fim, foi avaliada a estabilidade da emulsão e os efeitos do pH, temperatura e NaCl na atividade emulsificante. *C. lunata* é produtor de biossurfactante, reduzindo a tensão superficial até 32,9 mN/m. A redução da tensão superficial foi otimizada com inóculo, nitrogênio e manganês nas concentrações de 30 discos, 2 g/L e 0,1 g/L, respectivamente, e para o cobre 0,1 g/L. Além disso, este fungo produz um bioemulsificante capaz de promover a emulsificação de até 98% de óleo automotivo, com elevada estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e salinidade. O biossurfactante produzido por *C. lunata* - UFPEDA885 apresenta 0,02 % de proteínas, 6,5 % de açúcares e 87 % de lipídios totais. Houve remoção de 93,5 % de óleo automotivo contaminando solo arenoso e baixa fitotoxicidade frente às sementes de *C. sativus*, já para *A. salina* a toxicidade ocorreu em concentrações do extrato a partir de 25 %. *C. lunata* é considerado promissor na produção de biossurfactante com aplicação na biorremediação.

PALAVRAS-CHAVE

Biossurfactante, biorremediação, solos, óleo automotivo

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize the production of biosurfactant by *Curvularia lunata*-UFPE-DA885 for soil decontamination by automotive oil. A Central Rotational Composite Design was performed with the variables: inoculum size, concentration of NH_4NO_3 , $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. The fungus was inoculated in mineral medium with 2% diesel oil, with cultivation for 72 hours at 40°C. The following were evaluated: surface tension and emulsifying activity, toxicity of the biosurfactant against *Cucumis sativus* seeds, the microcrustacean *Artemia salina* and bioremoval of automotive oil in soil by the biosurfactant. Finally, the stability of the emulsion and the effects of pH, temperature and NaCl on the emulsifying activity were evaluated. *C. lunata* is a biosurfactant producer, reducing surface tension up to 32.9 mN/m. The surface tension reduction was optimized with inoculum, nitrogen and manganese at concentrations of 30 disks, 2 g/L and 0.1 g/L, respectively, and for copper 0.1 g/L. Furthermore, this fungus produces a bioemulsifier capable of promoting the emulsification of up to 98% of automotive oil, with high stability at different pH, temperature and salinity values. The biosurfactant produced by *C. lunata* UFPE-DA885 has 0.02 % of proteins, 6.5% of sugars and 87 % of total lipids. There was removal of 93.5 % of automotive oil contaminating sandy soil and low phytotoxicity against *C. sativus* seeds, whereas for *A. salina* toxicity occurred at extract concentrations from 25 %. *C. lunata* is considered promising in the production of biosurfactant with application in bioremediation.

KEYWORDS

Biosurfactant, bioremediation, soils, automotive oil

RESUMÉN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la producción de biosurfactante por *Curvularia lunata* -UFPE-DA885 para la descontaminación de suelos por aceite automotriz. Se realizó un Diseño Compuesto Rotacional Central con las variables: tamaño del inóculo, concentración de NH_4NO_3 , $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$. El hongo se inoculó en medio mineral con aceite diesel al 2 %, con cultivo durante 72 horas a 40°C. Se evaluaron: tensión superficial y actividad emulsionante, toxicidad del biosurfactante contra semillas de *Cucumis sativus*, el microcrustáceo *Artemia salina* y biorremoción de aceite automotriz en

suelo por el biosurfactante. Finalmente, se evaluó la estabilidad de la emulsión y los efectos del pH, la temperatura y el NaCl sobre la actividad emulsionante. *C. lunata* es un productor de biosurfactantes, reduciendo la tensión superficial hasta 32,9 mN/m. La reducción de la tensión superficial se optimizó con inóculo, nitrógeno y manganeso a concentraciones de 30 discos, 2 g/L y 0,1 g/L, respectivamente, y para cobre 0,1 g/L. Además, este hongo produce un bioemulsionante capaz de promover la emulsificación de hasta el 98 % del aceite de automoción, con alta estabilidad a diferentes valores de pH, temperatura y salinidad. El biosurfactante producido por *C. lunata - UFPEDA885* tiene 0,02 % de proteínas, 6,5 % de azúcares y 87 % de lípidos totales. Hubo remoción del 93,5 % del aceite automotriz que contamina el suelo arenoso y baja fitotoxicidad contra semillas de *C. sativus*, mientras que para *A. salina* la toxicidad se presentó a concentraciones de extracto a partir del 25 %. *C. lunata* se considera prometedora en la producción de biosurfactantes con aplicación en biorremediación.

PALABRAS CLAVE

Biosurfactante, biorremediación, suelos, aceite automotriz

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por óleo diesel e outros produtos petroquímicos põe em perigo diferentes ecossistemas (RAKOWSKA, 2020). No solo, derramamentos acidentais de hidrocarbonetos podem alterar as propriedades físico-químicas e bioquímicas, resultando em baixa fertilidade, alterações na microbiota e desequilíbrio ecológico (SILVA *et al.*, 2020). Os riscos e efeitos negativos do transporte, produção e comercialização de petróleo e seus derivados têm impulsionado o interesse no desenvolvimento de técnicas de remediação para estes poluentes orgânicos (GAUR *et al.*, 2021).

Várias técnicas mecânicas e químicas têm sido empregadas para a remoção dos poluentes de hidrocarbonetos dos ambientes, no entanto, esses métodos podem ter efeitos prejudiciais ao meio ambiente quando comparados à biorremediação. A alternativa biológica utiliza biosurfactantes, que são metabólitos secundários microbianos que reduzem a tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis como água e óleo (FERREIRA *et al.*, 2020). A propriedade permite que estes produtos do metabolismo possam ser utilizados para a descontaminação ambiental de locais impactados por hidrocarbonetos do petróleo, na indústria farmacêutica e até interferindo nas interações entre as proteínas da superfície do SARS-COV-2 vírus e os locais receptores das células hospedeiras (UZOIGWE *et al.*, 2015; KASHIF *et al.*, 2022). Na biorremediação, a principal vantagem da utilização de biosurfactantes em comparação aos surfactantes sintéticos ocorre pela baixa toxicidade e alta biodegradabilidade que estes produtos oferecem, sendo mais compatíveis com o meio ambiente (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Entre os microrganismos usados na tecnologia de biorremediação hoje em dia, os fungos são eficientes, confiáveis, econômicos e ecologicamente adequados para limpar e desintoxicar contami-

nantes de hidrocarbonetos do meio ambiente. A biorremediação com fungos garante a degradação completa e mineralização de contaminantes de hidrocarbonetos. Em geral, eles são mais eficientes e eficazes na remoção de hidrocarbonetos contaminantes dos ambientes, ou seja, água, solo e sedimentos (MAHMUD *et al.*, 2022).

Dentre os fungos desta classe, *Curvularia lunata* é apontado com grande potencial genômico para uso em recursos biotecnológicos e em condições de tolerância ao estresse podendo ser destacada sua ação produtora de agentes tensoativos, entretanto estes ainda não foram caracterizados (RAVINDRAN *et al.*, 2020; PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002). Diante deste fato, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a produção de biossurfactante por *Curvularia lunata* - UFPEDA885 para descontaminação de solos por óleo automotivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

Foi utilizado o fungo *Curvularia lunata* - UFPEDA885, proveniente da Coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos, da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco-Brasil. As culturas foram mantidas em meio Bushnell Haas Sólido acrescido de 2 % de óleo diesel e conservadas a 4 °C (ATLAS, 1995).

2.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE

Foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR 2⁴, com quatro variáveis independentes: X1 - tamanho do inóculo (em blocos de gelose de 0,6 cm); X2 - concentração de NH₄NO₃ (g/L); X3 - concentração de MnSO₄H₂O (g/L) e X4 - concentração de CuSO₄5H₂O (g/L). Os fatores foram distribuídos em 5 níveis, a partir dos quais obteve-se 27 experimentos que incluíram 16 nos pontos fatoriais (-1 e +1), 8 nos pontos axiais (-2 e +2) e 3 repetições nos pontos centrais (nível 0). No quadro 1, a seguir, podem ser visualizados os valores reais das variáveis independentes e os valores codificados (entre parênteses), cujos experimentos foram conduzidos para estimar a variável dependente: tensão superficial na condição estática (Y1) e sob agitação (Y2).

O cultivo do fungo ocorreu em frascos de Erlenmeyer-250mL contendo meio mineral Bushnell Haas - modificado, acrescido de 2% de óleo diesel (cedido pela Petrobras Transporte S.A.) como exclusiva fonte de carbono. As alíquotas do fungo e as concentrações de minerais no meio acrescido de óleo como fonte de carbono, variaram de acordo com as condições descritas na matriz DCCR apresentada no quadro 01. O pH foi ajustado para 4.0 e o material incubado por 72 horas a 40°C seguindo protocolos das condições ideais de cultivo para a estirpe (MACIEL *et al.*, 2010). As amostras foram cultivadas de modo estático (CE) e sob agitação de 150 rpm (CA). Após o período de cultivo, o material foi filtrado e foi verificada a redução da tensão superficial para detecção de produção de biossurfactante e a atividade emulsificante para detecção da produção de um bioemulsificante.

2.2.1 ANÁLISE DA TENSÃO SUPERFICIAL

A tensão superficial foi verificada pela leitura em tensiômetro marca sigma 703D, de acordo com o método de Du-Noy's (KUYUKINA *et al.*, 2001). Em todo aferimento, utilizou-se água destilada como controle.

2.2.2 ANÁLISE DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

Foi verificada de acordo com Paraszkievicz *et al.* (2002) frente às fontes oleosas: óleo de canola, óleo mineral, óleo de soja, óleo de soja após fritura, óleo automotivo e óleo diesel. O filtrado celular obtido no planejamento experimental foi homogeneizado com as fontes oleosas (1:1 v/v) por 2 minutos em vórtex a 700 min^{-1} . Após 24 horas a altura da proporção de óleo emulsificado foi comparada com a altura do volume total de óleo adicionado (E24).

Quadro 1 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional- DCCR 24, com valores reais e codificados das variáveis independentes

Condições experimentais	Variáveis independentes		
	X1 Quantidade do inóculo	X2 NH ₄ NO ₃ (g/L)	X3 MnSO ₄ H ₂ O (g/L)
1	20(-1)	1(-1)	0,05(-1)
2	20(-1)	1(-1)	0,05(-1)
3	20(-1)	1(-1)	0,15(1)
4	20(-1)	1(-1)	0,15(1)
5	20(-1)	3(1)	0,05(-1)
6	20(-1)	3(1)	0,05(-1)
7	20(-1)	3(1)	0,15(1)
8	20(-1)	3(1)	0,15(1)
9	40(1)	1(-1)	0,05(-1)
10	40(1)	1(-1)	0,05(-1)
11	40(1)	1(-1)	0,15(1)
12	40(1)	1(-1)	0,15(1)
13	40(1)	3(1)	0,05(-1)
14	40(1)	3(1)	0,05(-1)
15	40(1)	3(1)	0,15(1)
16	40(1)	3(1)	0,15(1)
17	10(-2)	2(0)	0,1(0)

Condições experimentais	Variáveis independentes		
	X1 Quantidade do inóculo	X2 NH ₄ NO ₃ (g/L)	X3 MnSO ₄ H ₂ O (g/L)
18	50(2)	2(0)	0,1(0)
19	30(0)	0(-2)	0,1(0)
20	30(0)	4(2)	0,1(0)
21	30(0)	2(0)	0(-2)
22	30(0)	2(0)	0,2(2)
23	30(0)	2(0)	0,1(0)
24	30(0)	2(0)	0,1(0)
25	30(0)	2(0)	0,1(0)
26	30(0)	2(0)	0,1(0)
27	30(0)	2(0)	0,1(0)

Fonte: Dados da pesquisa

2.2.3 EFEITO DO PH, TEMPERATURA E SALINIDADE NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE

Para verificação da estabilidade do bioemulsificante, o material filtrado livre de células foi distribuído em tubos de ensaio e submetido a diferentes condições de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12), temperatura (20, 50, 75, 100 e 125°C) e salinidade- NaCl (5, 10, 15, 20 e 25%) por 15 minutos. Após o período, foi verificada a atividade emulsificante visando a caracterização do efeito do pH, da temperatura e da salinidade na estabilidade da emulsão conforme protocolo de Liu *et al.* (2010). Para detecção das condições ideais para a atividade emulsificante, o extrato bruto do biossurfactante permaneceu por duas horas nas condições otimizadas para posterior análise conforme protocolo de Liu *et al.* (2010).

2.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOSURFACTANTE

2.3.1 ISOLAMENTO

O líquido metabólico livre de células obtido na melhor condição do planejamento fatorial foi centrifugado a 2000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 5mL de acetona foi adicionado cuidadosamente ao líquido metabólico e o material foi centrifugado novamente a 2000 x g por 15 minutos. O precipitado foi coletado, seco e pesado conforme protocolo de Paraszkiwicz *et al.* (2002).

2.3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O biossurfactante isolado teve índice de proteínas determinado pelo “Kit” de proteínas totais Labtest® onde o teor de proteínas totais é detectado pela especificidade da reação de biureto. Para a quantificação dos carboidratos foi utilizado o “Kit” para quantificação de glicose Labtest®, onde a

glicose é detectada após reação com peróxido de hidrogênio. Os lipídios foram determinados após a extração com clorofórmio e metanol (MANOCHA *et al.*, 1980).

2.3.3 TESTE DE TOXICIDADE DO BIOSSURFACTANTE FRENTE À *CUCUMIS SATIVUS L.*

Para análise da fitotoxicidade do biossurfactante foram utilizadas sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus L.*). As sementes foram desinfetadas e em seguida transferidas (10 unidades) para placas de Petri previamente forradas com papel de filtro duplo embebido em 2 mL do líquido metabólico livre de células, este procedimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas (+ 28°C) por 5 dias. Foram utilizados dois controles, um com água destilada e outro com diesel. Após o período de incubação, foram calculados o percentual de crescimento da raiz e o percentual de germinação visando obtenção do índice de germinação: % germinação X % crescimento das raízes/ 100 (TIQUIA *et al.*, 1996).

2.3.4 TESTE DE TOXICIDADE DO BIOSSURFACTANTE FRENTE À *ARTEMIA SALINA*

A toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foi verificada após a eclosão dos cistos após 24 horas em solução de sal marinho sintético (32 g/L), com aeração e a + 30°C (MATTHEWS, 1995). Após a eclosão, dez larvas do microcrustáceo foram selecionadas e incubadas, em tubos de penicilina contendo as concentrações do biossurfactante de 1% a 100% por 24 horas para observação da mortalidade. Controles negativos foram utilizados paralelamente com solução de sal marinho sintético. Após o período de incubação, foi feita a contagem do número de larvas mortas. Todos os testes de toxicidade foram conduzidos em quintuplicatas.

2.3.5 APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE ÓLEO EM SOLO

Foi adicionado 10g de solo arenoso coletado na Praia de Suape-PE, Brasil com a seguinte caracterização: pH- 8.0, Umidade: 8,7%, Nitrogênio 7,9 g/Kg; Matéria Orgânica 1,65 g/Kg e, Carbono orgânico - 0,96 g/Kg. O solo foi impregnado por 5mL de óleo automotivo e 75mL do líquido livre de células, obtido na melhor condição e como controle utilizou-se água destilada esterilizada em substituição ao líquido livre de células. O material foi incubado por 48 horas a 150 rpm e em seguida o sobrenadante foi removido por centrifugação, o solo foi lavado e seco para detecção do percentual de remoção do óleo do solo de acordo com Luna *et al* (2009).

2.3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para o planejamento experimental para produção do biossurfactante, foi desenvolvido um modelo de regressão empírico relacionado às respostas das quatro variáveis envolvidas no processo de redução da tensão superficial verificada pelo DCCR, visando a determinação das condições otimizadas. A Análise de Variância (ANOVA) para o modelo foi desenvolvida com base na significância estatística de acordo com a equação polinomial e pelo F-valor (variação de Fisher) ao nível de significância de 95%. Os coeficientes de regressão foram utilizados para conduzir cálculos estatísticos e para a construção dos modelos de regressão lineares, quadráticos e os efeitos de interação entre as variáveis testadas.

Realizou-se ainda o ajuste por meio da ANOVA, visando verificar a qualidade do modelo adotado pelo Coeficiente de Determinação (R^2), que fornece uma medida da proporção da variação (pela

equação de regressão) e o teste t, que avalia a significância da regressão. A ANOVA, as superfícies resposta, o coeficiente de determinação, teste T e as análises de significância foram realizadas pelo programa Statistic® 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curvularia lunata-UFPEDA 885 utilizou óleo diesel como única fonte de carbono e produziu biosurfactante capaz reduzir a tensão superficial para valores entre 32 mN/m e 60,6 mN/m, o que mostra a influência das variáveis escolhidas na resposta de redução da tensão superficial (Quadro 2). Os melhores valores ocorreram nas condições do ponto central ($X_1 = 30$; $X_2=2$; $X_3=0,1$ e $X_4=0,2$), especialmente para o cultivo estático, indicando repetibilidade do processo. De acordo com Paraszkiwicz *et al.* (2002), há poucos relatos na literatura de fungos filamentosos capazes de usar esteróides para a síntese de agentes biosurfactantes.

Os resultados obtidos no cultivo estático foram selecionados para análise por meio do *software Statistica*® 6.0. As variáveis isoladas exerceram influência na redução da tensão superficial: Inóculo, NH_4NO_3 , $MnSO_4 \cdot H_2O$ e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ao nível de significância de 95%, bem como a interação linear entre $MnSO_4 \cdot H_2O$ e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ que promoveu um efeito negativo na redução da tensão superficial, de acordo com o gráfico de Pareto, enquanto a fonte de nitrogênio (NH_4NO_3) foi a variável que, isoladamente exerceu maior influência no processo de redução da tensão superficial pelo surfactante produzido por *Curvularia lunata*-UFPEDA 885 (Figura 1). Segundo Silva *et al.* (2021), a suplementação com aminoácidos e micronutrientes como magnésio, fósforo, sódio, cobre e manganês pode atender a essas necessidades nutricionais e favorecer a produção de biosurfactantes.

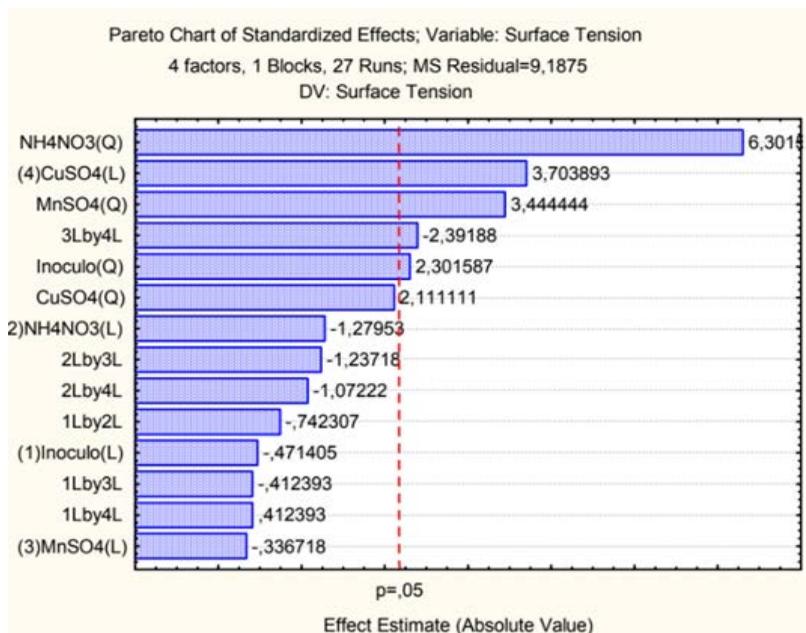
Quadro 2 – Atividade Emulsificante e Tensão Superficial observadas nas 27 condições experimentais de *Curvularia lunata*-UFPEDA885 em óleo diesel

Condições experimentais	Tensão Superficial (mN/m) Estática -Y1	E24(%) para as distintas fontes oleosas						
		Tensão Superficial (mN/m) Agitação - Y2	Óleo de Soja	Óleo de Soja queimado	Óleo de canola	Óleo mineral	Óleo diesel	Óleo auto-ativo
1	34,8	54,86	75	33	55	50	33	75
2	48,5	60,63	75	53	40	67	33	50
3	41,5	55,56	45	33	48	60	35	50
4	40,7	56,39	45	27	40	50	29	60

Condições experimentais	Tensão Superficial (mN/m) Estática -Y1	E24(%) para as distintas fontes oleosas						
		Tensão Superficial (mN/m) Agitação - Y2	Óleo de Soja	Óleo de Soja queimado	Óleo de canola	Óleo mineral	Óleo diesel	Óleo auto-motivo
5	40,1	53,9	50	47	48	40	29	40
6	46,2	53,53	45	20	45	37	29	95
7	40,7	56,52	45	33	50	55	35	56
8	41	56,67	45	40	45	60	29	83
9	38,7	40,91	45	55	45	55	29	71
10	48,5	57,41	45	27	55	50	23	88
11	41,2	52,26	50	40	45	60	27	68
12	46	58,41	40	33	50	50	29	98
13	40,8	52,95	50	30	45	48	23	75
14	48,4	50,12	25	40	70	50	23	90
15	37,6	53,08	45	20	50	45	24	75
16	40,1	53,98	40	20	50	45	14	60
17	44	55,05	50	27	60	53	14	90
18	37,3	52,31	45	33	45	53	25	74
19	55,5	50,19	50	33	50	48	24	98
20	47	50,36	50	25	50	50	30	98
21	40,8	51,44	45	35	50	50	18	78
22	46,5	50,67	45	25	50	50	24	88
23	45,5	51,08	50	27	50	50	24	75
24	43,2	52,09	50	33	45	47	24	70
25	34,3	44,17	73	47	60	60	33	98
26	34,4	43,76	75	46	60	60	33	98
27	32,9	44,01	75	47	60	58	33	97

Fonte: Dados da pesquisa

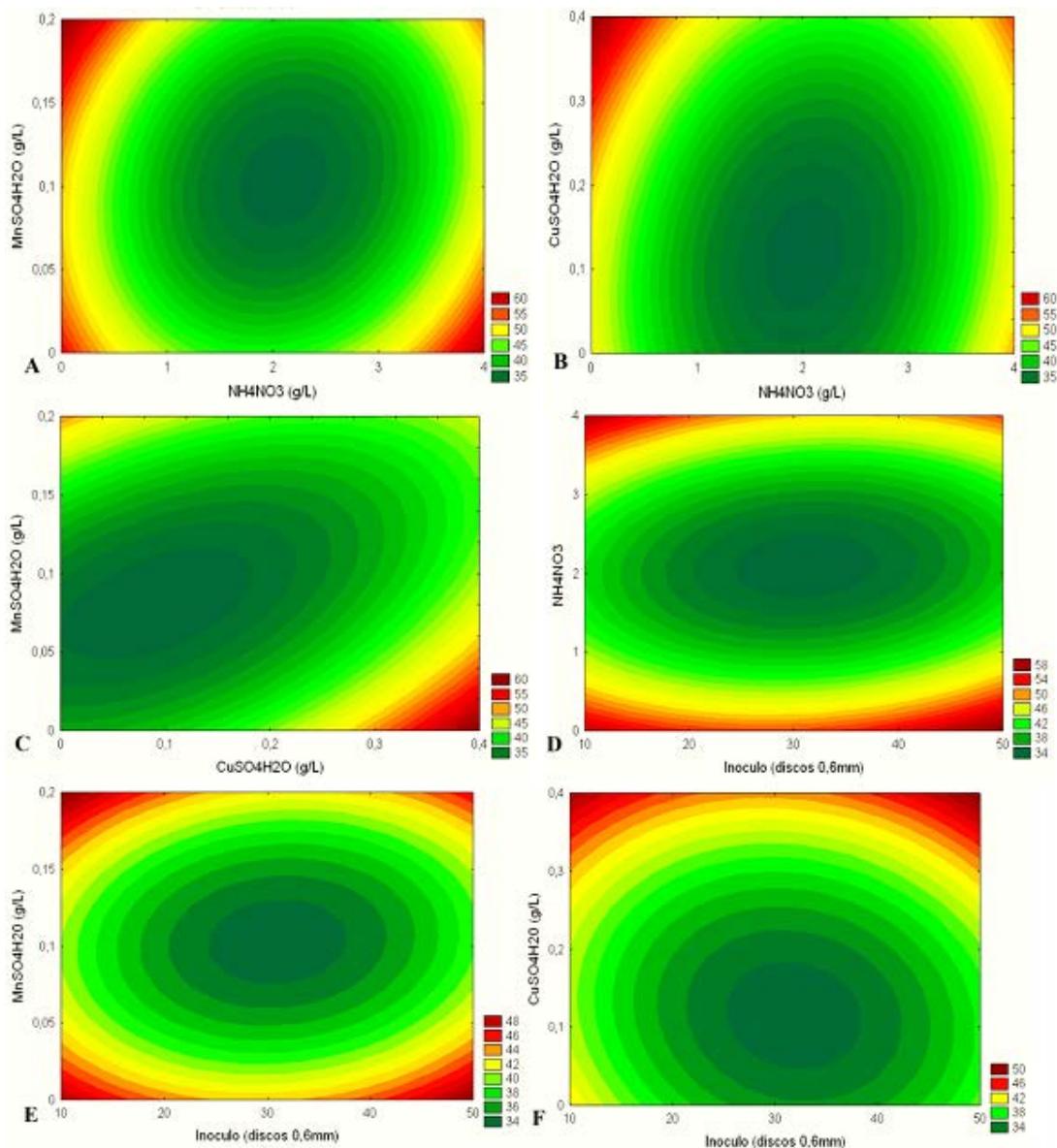
Figura 1 – Gráfico de Pareto com as variáveis que apresentaram maior influência na redução da tensão superficial por *Curvularia lunata*-UFPEDA 885 em cultivo estático, ao nível de significância de 95%



Fonte: Dados da pesquisa

O modelo utilizado foi considerado válido pois o F calculado (19,8) foi superior ao F crítico (3,03), o que possibilitou a realização de curvas de superfícies resposta para as variáveis significantes em função da tensão superficial. Estes gráficos foram construídos com base no modelo reparametrizado da equação de regressão: Y_1 (Tensão Superficial) = 35,8 + 1 X₁₂ + 3,7 X₂₂ + 1,8 X₃₂ + 2,3 X₄ - 1,8 X_{3X4}. As curvas revelaram uma tendência de otimização do processo com as variáveis nas condições do ponto central, com a exceção do CuSO₄·5H₂O cuja concentração ótima quando interagindo com as demais variáveis foi de 0,1g/L (figura 2). De acordo com Banat (1995), o nitrogênio e o manganês exercem importante influência na produção de biossurfactantes, sendo necessário que se estabeleça níveis ótimos de produção visando a otimização de processo.

Figura 2 – Superfícies de respostas em função da tensão superficial, para a razão $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ versus $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ (A), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ versus $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ (B), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ versus $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (C), inóculo versus $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ (D), inóculo versus $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (E) e inóculo versus $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (F)



Fonte: Dados da pesquisa

O biossurfactante foi isolado na concentração de 2,2 g/L. Após análises químicas este biossurfactante foi caracterizado como um polímero composto por proteínas (0,02%), polissacarídeos (6,5%) e ácidos graxos (87%), sendo considerado um lipossacarídeo. Paraszkievicz *et al.* (2002) obtiveram 2,6 g/L de biossurfactante produzido por *C. lunata* - IM2901 após 47 horas de incubação em meio mineral, utilizando um substrato hidrofóbico e, este biossurfactante apresentou em sua composição 48% de carboidratos, 25% de proteínas e nenhum ácido graxo.

São diversos os fatores que interferem na produção de biossurfactantes como a natureza do substrato, as vias sintéticas, as composições dos meios de cultura (íons como fósforo, nitrogênio, magnésio, manganês, oxigênio e ferro) e condições de cultivo. Os autores ainda citam que estes podem ser aplicados na descontaminação ambiental, indústria farmacêutica e ainda no combate à pandemia Covid-19. Verifica-se que a produção de biossurfactantes a partir de resíduos pode desempenhar um papel significativo na melhoria da bioeconomia circular e da sustentabilidade ambiental (KASHIF *et al.*, 2022).

Ainda de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, houve a formação de emulsão em presença de todas as fontes oleosas testadas, indicando que *C. lunata* -UFPEDA885 é produtor de um bioemulsificante cuja atividade máxima ocorreu com o óleo automotivo (98%). Com base neste resultado, o óleo lubrificante automotivo foi selecionado para caracterização de efeito e estabilidade da emulsão. Paraszkievicz *et al.* (2002) em ensaios, utilizando *C. lunata* obteve 100% de atividade emulsificante frente a óleo mineral e 95% após contato do biossurfactante com óleo vegetal e querosene, estes foram os óleos selecionados pelo autor para avaliar a estabilidade da emulsão.

Silva *et al.* (2021), referem que os biossurfactantes reduzem a tensão superficial/interfacial entre as fases fluidas e apresentam estabilidade superior aos surfactantes químicos sob diferentes condições físico-químicas. Os autores ainda relatam que as estratégias relacionadas aos parâmetros e variáveis do processo, produção simultânea, otimização de processos por meio de ferramentas estatísticas e genéticas, processamento *downstream* e alguns aspectos são formulações de produtos comerciais que poderiam ser aplicados no futuro.

Fatores ambientais como salinidade, pH e temperatura afetam a atividade do biossurfactante. De acordo com as temperaturas avaliadas, não houve redução significativa na atividade do bioemulsificante produzido por *C. lunata* em 4, 20, 50 e 100°C. Na temperatura de 125°C a atividade emulsificante diminuiu 80%. Apesar desta redução na atividade do bioemulsificante, este percentual de emulsificação é considerado pela literatura como um eficaz bioemulsificante (ILORI *et al.*, 2005).

Kim *et al.* (1997), avaliando o surfactante sintético SDS a temperaturas acima de 70°C, encontraram diminuição na atividade emulsificante chegando até 20% de atividade a 100°C. O pH 2,0 foi a única condição em que a atividade emulsificante diferiu significativamente estando abaixo de 95%. Nas demais condições de pH (4 a 12) esta atividade esteve entre 95% e 100%. Sarubbo *et al.* (2007) detectaram estabilidade emulsificante de surfactina produzida por *Bacillus subtilis*, entre pH 3 e 11, com redução na atividade nos valores de pH fora desta faixa.

Por fim, o efeito da força iônica na atividade do bioemulsificante, ocorreu em todas as concentrações de NaCl testadas estando a atividade emulsificante entre 45% e 75%. Méndez-Vilas *et al.* (2007) observaram índice de emulsificação entre 50% e 40% para o bioemulsificante produzido por *Pseudomonas fluorescens* em concentrações de 5 a 30% de cloreto de sódio.

Em relação à fitotoxicidade do extrato bruto do biossurfactante, o índice de germinação das sementes de Pepino caipira (*Cucumis sativus*) foi de 90,8. Considera-se que quando o índice de germinação é superior a 80, não há toxicidade sendo este um dos mais importantes critérios usados pelas agências ambientais do mundo (TIQUIA *et al.*, 1996). A toxicidade dos hidrocarbonetos pode provocar inibição da germinação e a redução no crescimento da raiz de sementes vegetais (RIVERA-CRUZ; TRIJILLO-NARCÍA, 2004).

Para *Artemia salina* o extrato bruto do biossurfactante nas concentrações de 25% e 30% promoveram a letalidade de, respectivamente 50% da população testada, CL50 e 100% da população. Em ensaios semelhantes, Silva *et al* (2010) obtiveram CL50 em 52% do extrato bruto do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

O biossurfactante produzido por *C. lunata* - UFPEDA885 removeu 93,5% do óleo automotivo que impregnou o solo por 48 horas (Figura 3). Pacheco *et al.* (2010) utilizando o biossurfactante produzido, durante um mês, por *Rhodococcus erythropolis* na biorremediação de óleo cru em solo, obteve remoção de 97 a 99% pelo biossurfactante produzido. Cameotra e Makkar (1998) observaram remoção de 56% de óleo adsorvido em areia pelo biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 3 – Aspecto do solo arenoso antes da contaminação (esquerda), após contaminação por óleo automotivo (centro da imagem) e, após biorremediação de 93,5% do óleo pelo biossurfactante produzido por *C. Lunata* -UFPEDA885 (direita)



Fonte: Dados da pesquisa

4 CONCLUSÕES

Curvularia lunata - UFPEDA885 é capaz de crescer em meio mineral contendo óleo diesel como exclusiva fonte de carbono e produzir biossurfactante. Este metabólito secundário produzido é estável em variações de pH e temperatura e promissor na redução da tensão superficial de meio líquido contaminado por óleo diesel (redução até 32,9 mN/m). Sua função é otimizada quando se varia as

concentrações de inóculo, disponibilidade de nitrogênio, manganês e cobre. Este composto ainda é capaz de remover óleo automotivo em solo arenoso com baixa toxicidade frente às sementes de *Cucumis sativus* e ao microcrustáceo *Artemia salina*. *C. lunata* - UFPEDA885 é considerado promissor na produção de biossurfactante e bioemulsificante visando aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petroderivados.

REFERÊNCIAS

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **Int Biodeter Biodegrad**, v. 35, n. 1-3, p. 317-327, 1995.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oilrecovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresour Technol**, v. 51, p. 1-12, 1995.

CAMEOTRA, S. S., MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **App Microbiol Biotechnol**, v. 50, p. 520-529, 1998.

FERREIRA, I. N. S. *et al.* Biosurfactant and bioemulsifer as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. **Electron J Bio**, v. 47, p. 51-58, 2020.

GAUR, V. K. *et al.* Evolution in mitigation approaches for petroleum oil-polluted environment: recent advances and future directions. **Environ Sci Pollut Res**, v. 41, n. 29, p. 61821-61837, 2021.

GAUTAM, K.K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: a review. **J Oleo Sci**, v. 55, p. 155-166, 2006.

ILORI, M. O. *et al.* Factors affecting biosurfactant produztion by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985-992, 2005.

KASHIF, A. *et al.* Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Adv Colloid Interf Sci**, v. 306, p. 102718, 2022.

KIM, S.Y. *et al.* Biological modification of hydrophobic group in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 Emulsan. **J Ferment Bioeng**, v. 84, p. 162-164, 1997.

KUYUKINA, M. S. *et al.* Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **J Microbiol Meth**, v. 46, p. 109-120, 2001.

LIU, Z. F. *et al.* Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. **J Cent South Univ Technol**, v. 17, p. 516521, 2010.

LUNA, J. M. *et al.* A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Braz J Biol Technol**, v. 49, p. 785-793, 2009

MACIEL, C. C. S. *et al.* Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, v. 8, n. 3, p. 299-305, 2010.

MAHMUD, T. *et al.* Hydrocarbon degradation potentials of fungi: A review. **J Environl Bioremed Toxicol**, v. 5, n. 1, p. 50-56, 2022.

MANOCHA, M. S. *et al.* Lipid composition of *Paracciodioids brasilienses*: possible correlation witer virulence of different strains. **J Gen Microbiol**, v. 177, p. 147-154, 1980.

MATTHEWS, R. S. *Artemia salina* as a test organism for measuring superoxide-mediated toxicity. Free Radical Biology and Medicine. **Free Radical Bio Med**, v. 18, n. 5, p. 919-922, 1995

MÉNDEZ-VILAS, A. *et al.* Biosurfactant production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. **Commun Curr Res Educ Topics Trends App Microbiol**, p. 340-347, 2007.

PACHECO, G. J. *et al.* Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. **Braz J Microbiol**, v. 41, p. 685-693, 2010.

PARASZKIEWICZ, K. *et al.* Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **J Biotechnol**, v. 92, p. 287-294, 2002.

RAKOWSKA J. Remediation of diesel-contaminated soil enhanced with firefighting foam application. **Sci Rep**, v. 10, p. 1-10, 2020.

RAVINDRAN, A. *et al.* Revealing the efficacy of thermostable biosurfactant in heavy metal bioremediation and surface treatment in vegetables. **Front Microbiol**, v. 11, p. 222, 2020.

RIVERA-CRUZ, M.C.; TRUJILLO-NARCÍA, A. Estudio de toxicidad vegetal em suelos com petróleos nuevo e intemperizado. **Interciencia**, v. 29, n. 7, p. 369-376, 2004.

SARUBBO, L. A. *et al.* Co-utilization of Canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Curr Microbiol**, v. 54, p. 68-73, 2007.

SILVA, A. F. *et al.* Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. **Bioproc Biosyst Eng**, v. 44, n. 10, p. 2003-2034, 2021.

SILVA, C. C. B. *et al.* Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloid Surface B*, v. 79, p. 174-183, 2010

SILVA, I. G. S. *et al.* Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. **Energies**, v. 13, a. 4664, 2020.

TIQUIA, S. M. *et al.* Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environ Pollut**, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996.

UZOIGWE C. *et al.* Bioemulsifiers are not biosurfactants and require diferent screening approaches. **Front Microbiol**, v. 6, a. 245, 2015.

Recebido em: 8 de Abril de 2022

Avaliado em: 5 de Junho de 2022

Aceito em: 4 de Julho de 2022



A autenticidade desse artigo pode ser conferida no site <https://periodicos.set.edu.br>

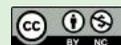
1 Bióloga, Doutora em Biologia de Fungos, Pós-doutora em Educação pela Universidade Federal do Ceará -UFC, Professora da Universidade de Fortaleza- UNIFOR, Pesquisadora do CNPq. ORCID: 0000-0001-6531-4375
E-mail: maciel.carla@gmail.com.

2 Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, Professora da Universidade Católica de Pernambuco e do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP. ORCID: 0000-0001-8526-554X.
E-mail: osileide.andrade@unicap.br

3 Bióloga, Doutora em Farmácia, Professora do Departamento de Antibióticos da UFPE e do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UFPE. ORCID: 0000-0001-6700-9876. E-mail: nbg@ufpe.br

4 Farmacêutica e Bioquímica, Doutora em Microbiologia pela Universidade de São Paulo, professora do doutorado da RENORBIO/UNICAP e coordenadora do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, UNICAP. ORCID: 0000-0002-0519-0849.
E-mail: galba.takaki@unicap.br

Copyright (c) 2023 Revista Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente



Este trabalho está licenciado sob uma licença Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

