

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SÍNTESE DE BIOSSURFACTANTE POR FUNGO DA CAATINGA

Rayza Morganna Farias Cavalcanti¹, Dayse Pereira Dias Silva², Mabel Calina de França Paz³, Jean Cesar Farias de Queiroz⁴

¹ Doutoranda em Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, 14800-900, Araraquara - SP, Brasil. rayzaaires@hotmail.com

² Mestranda em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Minter Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal de Campina Grande, 58540-000, Sumé - PB, Brasil

³ Doutora em Ciências Biológicas, Unidade Acadêmica de Ciência Médica, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, 58430 – 800, Campina Grande - PB, Brasil

⁴ Doutor em Biotecnologia, Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, 58540-000, Sumé - PB, Brasil

RESUMO

O Bioma Caatinga é fonte potencial para obtenção de compostos bioativos produzidos por microrganismos, como os biossurfactantes, moléculas anfipáticas capazes de emulsificar hidrocarbonetos e de ampla aplicação industrial. Diante disto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial de síntese de biossurfactantes por fungo isolado do bioma Caatinga, coletado no município de Sumé e armazenado na coleção de fungos filamentosos do CDSA/UFCG. Nesta pesquisa, o fungo CDSA109 foi avaliado para produção de biossurfactantes em Fermentação Submersa analisando os parâmetros Índice de Emulsificação (IE), estabilidade da emulsão (E_{24}) e Atividade de Emulsificação (AE). O biossurfactante produzido foi caracterizado em relação à estabilidade térmica e ao pH. Os resultados demonstraram que o CDSA109, identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*, é capaz de sintetizar biossurfactante nas condições de cultivo expostas com I_{24} de 85%, manter a emulsão estável a 60°C por 60 minutos e estabilidade em faixas de pH de 5,0 e 7,0. Deste modo, o fungo filamentoso isolado do bioma Caatinga demonstrou potencial para produzir biossurfactante com características interessantes para futuras aplicações industriais.

Palavras-Chave: Surfactante; *Aspergillus*; Fermentação; Biotecnologia.

POTENTIAL ASSESSMENT BIOSURFACTANT SYNTHESIS IN THE FUNGUS CAATINGA

ABSTRACT

The Caatinga Biome is a potential source for obtaining bioactive compounds synthesized by microorganisms, such as biosurfactants, amphipathic molecules capable of emulsifying hydrocarbons and of wide industrial application. The objective of this study was to evaluate the potential of biosurfactant synthesis by a fungus isolated from the Caatinga biome,



collected in the city of Sume and stored in the collection of filamentous fungi of CDSA/UFCG. In this research, the fungus CDSA109 was evaluated for the production of biosurfactants in Submerged Fermentation and the parameters Emulsification Index (EI), emulsion stability (E_{24}) and Emulsification Activity (EA) were analyzed. The biosurfactant produced was characterized in relation to thermal stability and pH. The results demonstrated that CDSA109, identified as belonging to the genus *Aspergillus*, is able to synthesize biosurfactant under conditions exposed with I_{24} of 88.3%, to maintain the emulsion stable at 60°C for 60 minutes and in pH ranges of 5.0 and 7.0. In this way, the isolated Caatinga biome filamentous fungus demonstrated its potential to produce biosurfactant with interesting characteristics for future industrial applications.

Keywords: Surfactant; *Aspergillus*; Fermentation; Biotechnology.

INTRODUÇÃO

O bioma Caatinga abrange cerca de dez estados brasileiros estendendo-se pela região Nordeste e o estado de Minas Gerais (1), caracteriza-se por possuir condições ambientais diferenciadas, com altas temperaturas, médias anuais entre 25°C e 30°C, diferentes disponibilidades de nutrientes de acordo com os tipos de solos encontrados e disponibilidade hídrica baixa (2). É considerado como o único bioma exclusivamente brasileiro e apesar de sua biodiversidade ainda ser mal conhecida é a mais diversa do que qualquer outro bioma o qual esteja exposto às mesmas condições de clima e de solo (3). Devido as suas condições ambientais, espécies oriundas deste bioma desenvolveram adaptações fisiológicas e reprodutivas para viver nesta região (4). Deste modo, apresentam diferentes tipos de metabolismos e respostas adaptativas interessantes no âmbito científico e potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos (3).

Nos diversos ambientes os fungos merecem destaque pela sua importância como decompositores e produtores de metabólitos. Nas indústrias, vêm adquirindo status de destaque para vários tipos de aplicações por sintetizar diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteroides (5). Nas últimas décadas microrganismos do Bioma Caatinga são alvos de pesquisas para busca de espécies ou isolados capazes de degradar e sintetizar compostos utilizados em processos biotecnológicos de interesse agrícola, industrial e/ou ambiental (6). Dentre esses compostos, os surfactantes biológicos têm se destacado como metabólito com inúmeras propriedades e aplicações industriais.

Estudos relacionados aos biosurfactantes tiveram início em 1960 e sua utilização se estendeu nas últimas décadas, especialmente em indústrias farmacêuticas, alimentícias e



refinarias (7, 8), devido à baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficiência em valores de temperatura, pH e salinidade extremos, como também seu papel na recuperação de ecossistemas (9, 10). Biossurfactantes são biopolímeros de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, promovendo a formação de espuma (11, 12). São moléculas anfifílicas que podem reduzir tensões superficiais acumulando-se na interface de fluidos imiscíveis aumentando a solubilidade, biodisponibilidade e biodegradação de compostos hidrofóbicos (13). Biossurfactantes são metabólicos secundários produzidos extra ou intracelularmente por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (14, 15), possibilitando, então, a utilização desses microrganismos nos processos de biorremediação, como na solubilização e remoção de petróleo e seus derivados em ambientes contaminados (8).

O aumento da preocupação ambiental e as novas legislações de controle do meio ambiente acarretaram a substituição de surfactantes sintéticos, derivados em sua maioria do petróleo, por surfactantes biológicos como alternativa para produtos já existentes (9, 10, 14). Ambientes pouco explorados e com características peculiares, como Bioma Caatinga, são fontes para exploração sustentável de novas espécies de interesse biotecnológico em busca de inovação tecnológica. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar a síntese de biossurfactante por fungo isolado do bioma Caatinga, visando exploração biotecnológica da microbiota deste bioma, bem como uma nova fonte para síntese de biossurfactantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo faz parte da coleção de Fungos Filamentosos da Caatinga do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). O fungo filamentoso, denominado como CDSA109, foi adquirido a partir de coletas no Bioma Caatinga no município de Sumé - PB e conservado em meio de cultura BDA (Batata 200 g/L; Dextrose 20 g/L; Ágar 5 g/L) sob refrigeração, a 4 °C.

O fungo foi ativado por repique no meio YEPD (Extrato de Levedura 5 g/L; Peptona 20 gL⁻¹; Glicose 20 g/L) acrescido de ágar (5 g/L), incubado por 72 horas, à 37 °C.



Identificação pela técnica de microcultivo

A identificação do microrganismo foi realizada pela técnica de microcultivo, seguindo os métodos descritos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (16). Na lâmina foi adicionado 1 mL do meio BDA, em seguida, o esporo fúngico foi inoculado e a lamínula depositada, um esmalte base foi utilizado para selar três lados da lamínula. A lâmina foi armazenada sob um papel filtro úmido dentro de uma placa de Petri, a 37°C. A cada 24 horas a cultura foi visualizada em microscópio até o período de 96 horas.

Produção de biossurfactante

Para produção de biossurfactante um pré-inóculo foi preparado a partir dos esporos fúngicos do CDSA109. O microrganismo foi cultivado em Fermentação Submersa no meio de cultura YEPD (pH 6,8). Inicialmente, o fungo foi incubado *overnight* sob agitação orbital a 150 rpm, a 37 °C, em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos de Erlenmeyers contendo 50 mL do meio YEPD. Os ensaios foram realizados em duplicata nas condições de 150 rpm de agitação, por 96 horas, a temperatura de 37 °C.

Após o período de incubação, os cultivos foram submetidos à filtração a vácuo, o líquido metabólico extracelular obtido foi utilizado para estimar da produção de biossurfactante.

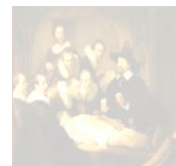
A biomassa foi armazenada em estufa a 70°C, por 24 horas, logo após, submetida à dessecador por 15 minutos e em seguida realizada aferição por gravimetria. A curva de crescimento foi determinada por meio do peso seco das células presentes num determinado volume de cultura e expressa em g/L.

Determinação da presença de biossurfactante

A presença de biossurfactante foi identificada por meio dos testes de Índice de Emulsificação (IE), estabilidade da emulsão (E_{24}) e Atividade de Emulsificação (AE).

Índice de Emulsificação (IE) e Estabilidade da emulsão (E_{24})

O Índice de Emulsificação foi determinado utilizando 2 mL de líquido metabólico e 1 mL de querosene, seguido por agitação por 2 minutos a temperatura ambiente (25°C) (17). Os



ensaios foram realizados em duplicata e o Índice foi calculado a partir da Equação 1. A estabilidade da emulsão (E_{24}) foi verificada em temperatura ambiente após 24 horas.

$$\text{Índice da emu} \quad (1)$$

Em que:

He: altura da emulsão;

Ht: altura total do líquido.

Atividade de Emulsificação (AE)

A Atividade de Emulsificação (AE) foi quantificada empregando 2 ml do líquido metabólico, 2 ml de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 3.0) e 1 ml de querosene (18). A mistura foi agitada por 2 minutos, seguido de repouso por 10 minutos, logo após, realizada leitura em espectrofotômetro a 540 nm. O resultado foi expresso em Unidade de Atividade de Emulsificação (UAE), de acordo com a Equação 2 (19).

(2)

Em que:

UAE = Unidade de Atividade de Emulsificação;

Abs = Absorbância.

Efeito da temperatura e pH no Índice de Emulsificação

Os líquidos metabólicos livres de células foram incubados nas temperaturas de 3°C e 60°C por 10 minutos para verificar o efeito da temperatura no biossurfactante, após este período as soluções foram resfriadas a temperatura ambiente e determinados o Índice de Emulsificação (IE).

Para analisar o efeito do pH no biossurfactante, o pH do líquido metabólico foi ajustado para 5,0; 7,0 e 9,0, utilizando NaOH e HCl. Após 30 minutos, foi determinado IE.

Análise dos experimentos



Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Os experimentos foram analisados com base na média e no erro padrão. Para análise dos dados obtidos e representações gráficas foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft) e OriginPro 8 (OriginLab Corporation), respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação do fungo filamentososo isolado da Caatinga

O fungo filamentososo CDSA109 isolado do bioma Caatinga foi identificado pela técnica de microcultivo em microscópio óptico com aumento de 40x, o que permitiu estudo das diferentes estruturas fúngicas e a disposição destas ao longo das hifas. As características macro e microscópicas apresentadas pelo CDSA109 são semelhantes as do gênero *Aspergillus*, com colônias filamentosas e micélio inicialmente branco variando ao longo do crescimento. Este gênero apresenta conídios globosos e ornamentados que se formam de forma radial na ponta da fiálide reta e solitária, em torno de uma vesícula, características presentes no CDSA109.

Na literatura é reportado o potencial que algumas espécies do gênero *Aspergillus* possuem para produzir biossurfactantes, como *A. fumigatus* (20, 21), *A. ochraceus* (22), *A. flavus* (11, 23), *A. ustus* MSF3 (24) e *A. niger* (23). Entretanto, ainda são escassos estudos relativos a produção e caracterização de biossurfactantes de fungos filamentosos quando comparados aos sintetizados por bactérias e leveduras.

Produção de biossurfactante pelo fungo CDSA109

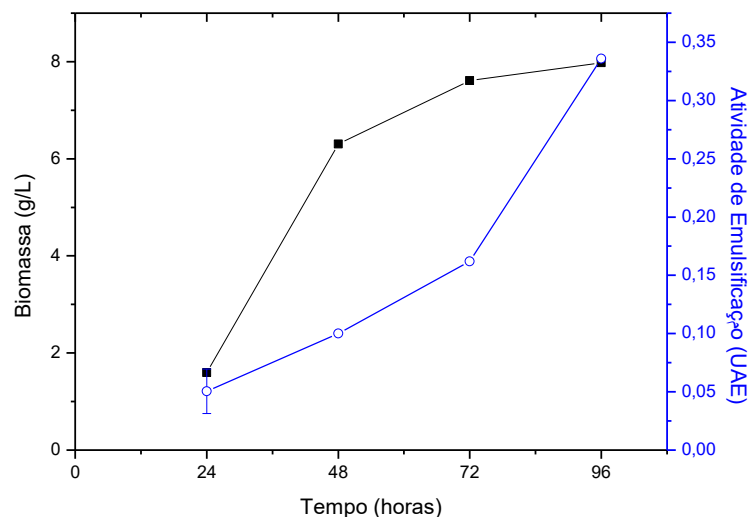
O fungo *Aspergillus* CDSA109 foi capaz de produzir biossurfactante nas condições de cultivo expostas, com IE de 24,28%, E_{24} de 88,3% e Atividade de Emulsificação de 0,503 UAE, demonstrando a habilidade emulsificante, o grau de emulsificação e a capacidade do biossurfactante produzido em permanecer estável sob condições específicas de tempo e temperatura. Após 30 dias a emulsão manteve-se com estabilidade de 85% em temperatura ambiente, fator importante para aplicação em produtos das indústrias de cosméticos, alimentos e química.

A formação de emulsão varia de acordo com o microrganismo produtor e o hidrocarboneto utilizado (25), explicando as variações de propriedades emulsificantes



relatadas na literatura. Resultado semelhante obtido neste estudo foi observado para o biossurfactante produzido por *Cunninghamella echinulata*, fungo filamentoso isolado do solo da Caatinga, com E_{24} de 80% empregando óleo de motor e óleo de combustão como agentes emulsificantes (26). Contudo, Índices relativamente inferiores foram relatados para os compostos sintetizados por *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus*, com E_{24} de 61,30%, 57,30% e 10,30% respectivamente, quando utilizado querosene como hidrocarboneto (23). Na presença de óleo de soja comercial e óleo residual de frita, o biossurfactante de *Pleurotus* apresentou E_{24} de 66,6% e 65,8%, respectivamente (25), enquanto que o biossurfactante de *A. ochraceus* apresentou E_{24} de 44,21% na presença de óleo diesel (22).

Analisando a influência do tempo de cultivo na produção de biossurfactante pelo fungo *Aspergillus* CDSA, observa-se que as máximas Atividades de Emulsificação (AE) foram obtidas nos instantes de 72 e 96 horas de fermentação (Figura 1), apresentando AE de 0,162 e 0,336 UAE, respectivamente. Relacionando a síntese deste composto com o crescimento microbiano, verifica-se que as maiores AE foram obtidas quando o microrganismo, possivelmente, iniciou a fase estacionária de crescimento. O tempo de incubação para produção desses compostos depende dos microrganismos e das condições de cultivos empregadas (8). Os biossurfactantes produzidos por *Yarrowia lipolytica* e *A. ustus* MSF3 apresentaram maiores Atividades Emulsificantes e crescimento celular em 72 e 96 horas de cultivo (27), com pico de produção no final da fase exponencial e início da fase estacionária (24).



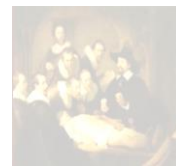


Figura 1. Influência do tempo de cultivo na produção de biossurfactante, analisando a Atividade de Emulsificação (○), e o crescimento microbioano (■) do fungo isolado da Caatinga *Aspergillus* CDSA109, cultivado em YEPD, 150 rpm a 37°C.

Durante o crescimento microbioano ocorrem variações no pH do meio de cultura, como observado no cultivo de *Aspergillus* CDSA109 (Figura 2). O pH sofreu alterações ao longo da fermentação em relação ao pH inicial de 6,8. No instante de 24 horas atingiu a faixa de 4,5, em seguida apresentou faixas de extrema de acidez, mantendo-se parcialmente constante até o período de 96 horas. Variações de pH podem indicar a produção e secreção de metabólitos (28). Neste caso a redução ocorreu de acordo com o aumento da Atividade Emulsificante e maior biomassa fúngica. Contudo, é relatado que o pH extremo ácido não estimula a secreção de biossurfactante, é apenas um indicador do acúmulo de biomassa e metabólitos (29). Deste modo, considerando que o pH não foi controlado ao longo da fermentação e que este sofreu alterações a partir das 24 horas de cultivo, é possível que seu controle contribua para obtenção de uma maior eficiência na síntese de biossurfactante.

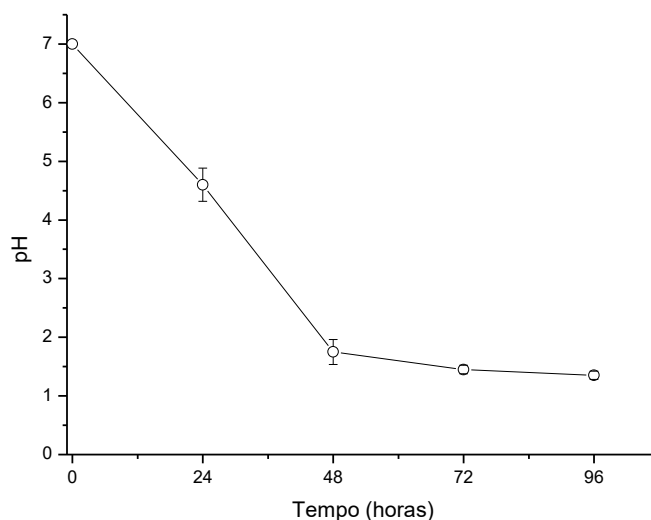
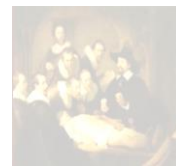


Figura 2. Variações do pH durante cultivo do fungo isolado da Caatinga *Aspergillus* CDSA109 em YEPD, 150 rpm a 37°C.

Estabilidade a temperatura e pH

Analisando a estabilidade térmica foi observado que quando submetido a temperatura de 60°C o biossurfactante produzido por *Aspergillus* CDSA109 apresentou IE levemente



superior (21,87%) quando comparado à temperatura de 3°C (19,44%). Demonstrando que tanto o aquecimento quanto resfriamento não alteraram a propriedade emulsificante deste composto. Resultado também observado para os biossurfactantes produzidos por *A. flavus* (11), *C. echinulata* (26) e *Nocardioopsis* sp. B4 (30).

Verificando a estabilidade da emulsão em diferentes tempos (10, 20, 40 e 60 minutos) a 60°C, é possível observar na Figura 3 que o IE aumentou cerca de 7% no instante de 20 minutos, mantendo-se estável por 60 minutos. Esta capacidade de manter a emulsão estável em alta temperatura por um determinado período de tempo demonstra potencial para aplicação em indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos, em que o aquecimento para se atingir a esterilização é de primordial importância (31).

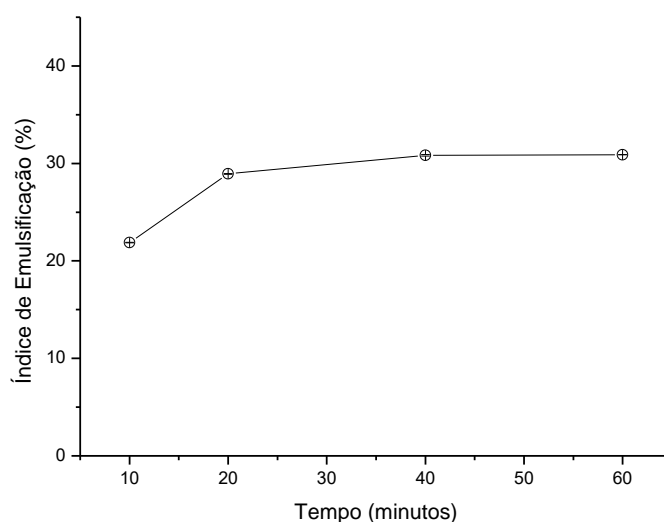


Figura 3. Estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *Aspergillus* CDSA109 a temperatura de 60°C em diferentes tempos.

Com relação à estabilidade em diferentes faixas de pH, de acordo com a Figura 4, o biossurfactante apresentou estabilidade nas faixas de pH 5,0 e 7,0, com IE de 26,47% e 22,86%, respectivamente, atuando, deste modo, em pH ácido e neutro. No pH alcalino a emulsão sofreu uma redução de 11%, possivelmente devido a desnaturação de compostos proteicos presentes na molécula (32).

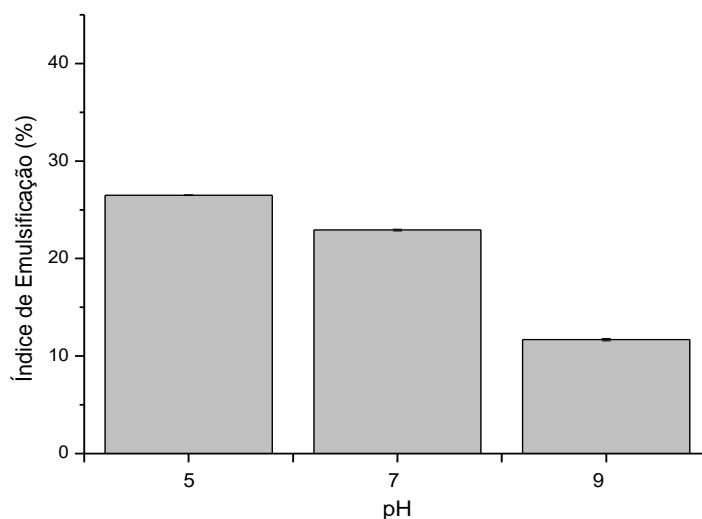
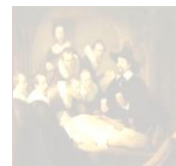


Figura 4. Estabilidade da emulsão do biossurfactante produzido por *Aspergillus* CDSA109 em diferentes faixas de pH.

CONCLUSÃO

A exploração da microbiota da Caatinga para síntese de biossurfactantes permitiu detectar o potencial do fungo CDSA109, identificado como pertence ao gênero *Aspergillus*, em sintetizar este composto nas condições expostas neste estudo. O biossurfactante produzido apresentou características importantes necessárias em processos industriais, como estabilidade da emulsão por 30 dias, estabilidade térmica e a pH ácido e neutro.

Deste modo, o bioma Caatinga representa uma potencial fonte para obtenção de biossurfactantes com características únicas com ampla aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de biomas e de vegetação. 2004. [acesso em 2014 fevereiro 04]. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>
2. Moura PA, Bezerra Filho CM, Silva LCN, Silva MV, Correia MTS. Caatinga plants as weapons against microorganisms : advances and challenges. In: Méndez-Vilas A, editor. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. Formatex Research Center, 2015. p. 117-124.
3. Silva I, Coelho L, Silva L. Biotechnological Potential of the Brazilian Caatinga Biome. Adv. Res. 2015; 5(1): 1-17.
4. Oliveira G, Araujo MB, Rangel TF, Algador D, Diniz-Filho JAF. Conserving the Brazilian



- semiarid (Caatinga) biome under climate change. *Biodivers. Conserv.* 2012; 21(11): 2913-26.
5. Braga GUL, Destéfano RHR, Messias CL. Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium Anisopliae* cultures. *Rev. Microbiol.* 199;. 30 (2):107-13.
6. Silva NA, Lins EL. Fungos filamentosos em solo de caatinga: diversidade e atividade enzimática. *In: XVI Congresso de iniciação científica UFPE. Pernambuco, 2008.*
7. Nitschke M, Pastore GM. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Quím. Nova.* 2002; 25 (5): 772-6.
8. Bhardwaj G, Cameotra SS, Chopra HK. Biosurfactants from Fungi : A review. *J. Pet Environ. Biotechnol.* 2013; 4 (6):1-6.
9. Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; 61(1): 47-64.
10. Shekhar S, Sundaramanickam A, Balasubramanian T. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 2015; 45 (14): 37-1.
11. 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 (4):1035-45.
12. Saharan BS, Sahu RK, Sharma D. A Review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genet Eng Biotechnol J.* 2012; 2011:1-14.
13. Shukla A, Bhandari R. Biosurfactants from fungi and its application: A review. *J. Basic Appl. Mycol.* 2015; 11:14-8.
14. Banat I, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M, Fracchia L, Smyth T. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 87: 427-44.
15. Sachdev DP, Cameotra SS. Biosurfactants in agriculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 97: 1005-16.
16. Levy CE. Detecção e identificação dos fungos de importância médica. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.* 2004: 381.
17. Cooper DG, Paddock DA. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; 47(1):173-6.
18. Cirigliano MC, Carman GM. Isolation of a emulsifier from a *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984; 48: 747-50.
19. Paz MC, Ceballos BSO, Albuquerque CDC, Campos-Takaki GM. Influência de cloreto de sódio e de cobre na produção de biomassa e biosurfactante por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986. *Rev. Biol. Ciênc. Terra.* 2006; 1: 56-4.
20. Martins VG, Kalil SJ, Costa, JAV. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Quím. Nova.*



2008; 31(8): 1942-7.

21. Castiglioni GL, Bertolin TE, Costa JAV. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Quim. Nova.* 2009; 32(2): 292-5.
22. Lima BM. Produção de biossurfactantes pelos fungos *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium expansum* em fermentação semi-sólida utilizando resíduos agroindustriais como substrato. [Dissertação]. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2012.
23. Adekunle AT, Ester BB, Peter AO, Bankole OS, Joshua IUJ, Alfa S. Characterization of new glycosphorolipid-surfactant produced by *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *European J. Biotechnol. Biosci.* 2015; 3(4):34-9.
24. Kiran GS, Hema TA, Gandhimathia R, Selvina J, Thomas TA, Ravjia R. et al. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* 73 MSF3. *Colloids Surf. B.* 2009; 73:250-6.
25. Alves EP, Tavares LBB, Gern RMM, Silva DAK, Furlan AS, Wisbeck E. Produção e caracterização de biossurfactantes metabolizados por *Pleurotus sajor-caju* a partir de óleo de soja. *Matéria (Rio J.)*. 2017; 2(3):1-10.
26. Andrade Silva NRA, Luna MA, Santiago AL, Franco LO, Silva GKB, Souza PM. et al. Biosurfactant-and-Bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga soil in the Northeast of Brazil. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15:15377-95.
27. Fontes GC, Amaral PFF, Nele M, Coelho MAZ. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *J. Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:1-8.
28. Souto PC, Souto JS, Paes JR. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob Caatinga no semi-árido da paraíba. *Rev. Bras. Ciênc. Solo.* 2008; 1(1):151-60.
29. Souza Sobrinho HBD. Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para produção de biossurfactantes por *Candida sphaerica*. [Dissertação]. Recife: Universidade Católica de Pernambuco; 2007.
30. Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardioopsis* sp . B4. *Desalination.* 2012a; 285:198-04.
31. Khopade A, Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *J. Colloid Interface Sci.* 2012b; 367(1): 311-8.
32. Ghurye GL, Vipulanandan C, Willson RC. A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 1994; 44:661-6.