



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA**

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOSCIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE HONGOS AISLADOS DE
AMBIENTES MARINOS**

OSVALDO MANUEL NÚÑEZ NOGUERA

Foz de Iguaçu, Estado de Paraná

2024

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE HONGOS AISLADOS DE
AMBIENTES MARINOS**

OSVALDO MANUEL NÚÑEZ NOGUERA

Disertación de maestría presentado al Programa de Posgraduación en Biociencias, del Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial obtener el título de Maestro en Biociencias.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Marcela Boroski

Foz de Iguaçu, Estado de Paraná

2024

OSVALDO MANUEL NUÑEZ NOGUERA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLOGICO DE HONGOS AISLADOS DE
AMBIENTES MARINOS**

Disertación de maestría presentado al Programa de Posgraduación en Biociencias, del Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial obtener el título de Maestro en Biociencias.

JUNTA DE EXAMEN

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini
Asesor
UNILA

Dra. Marcela Boroski
Co-asesora
UNILA

Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
Examinadora
UNILA

Dra. Júlia Ronzella Ottoni
Examinadora
UDC

Foz de Iguaçu, Estado de Paraná, 28 de junio de 2024.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - CENTRAL

N992

Núñez Noguera, Osvaldo Manuel.

Evaluación del potencial biotecnológico de hongos aislados de ambientes marinos / Osvaldo Manuel Núñez Noguera. - Foz do Iguaçu, 2024.

45 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu - PR, 2024.

Orientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). 2. Corante Azul Brilhante de Remazol R (RBBR). 3. Pireno. I. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. II. Título.

CDU 60:582.29

AGRADECIMIENTO

Este trabajo cuenta con el apoyo de la Fundación Coordinadora para el Perfeccionamiento del Personal de Educación Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamiento 001, beca DS (Programa de Demanda Social).

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento por el generoso apoyo financiero. Gracias a su inversión, he podido avanzar significativamente en mi investigación y alcanzar metas que de otro modo habrían sido inalcanzables. Su contribución ha sido fundamental para hacer realidad este proyecto y estoy profundamente agradecido por su confianza en mí.

Estimado profesor Michel Rodrigo Zambrano Passarini y estimada Profesora Marcela Boroski. Quiero aprovechar esta oportunidad para expresarles mi más sincero agradecimiento por su invaluable orientación y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto. Su sabiduría, paciencia y dedicación han sido fundamentales para cada paso que hemos dado juntos en este camino.

Gracias a su orientación experta y comprometida, he podido crecer académica y profesionalmente de una manera que nunca hubiera sido posible sin ustedes. Cada consejo, cada reunión y cada palabra de aliento han sido crucial para alcanzar nuestros objetivos.

Estoy profundamente agradecido/a por su tiempo, su conocimiento y su confianza en mí. Su guía ha sido inspiradora y me ha permitido no solo completar este proyecto, sino también crecer como investigador y como persona.

NOGUERA, Osvaldo Manuel Nuñez. **Evaluación del potencial biotecnológico de hongos aislados de ambientes marinos**. Asesores: PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano (asesor); BOROSKI, Marcela (co-asesora). 45 h.. Disertación (Maestría) - PPG-BC (Programa de Postgrado en Biociencias), UNILA (Universidad Federal de la Integración Latinoamericana), Foz de Iguazu, 2024.

RESUMEN

El ambiente marino ha estado expuesto a una contaminación constante por compuestos derivados del petróleo, entre los cuales los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) destacan por su alta toxicidad. Frente a este problema, se han propuesto métodos más sostenibles, como la biorremediación, para mitigar el impacto ambiental de los HAPs en diversos ecosistemas. En este contexto, se evaluó el potencial de hongos marinos para biodegradar compuestos derivados del petróleo. Estos hongos fueron recolectados en las costas de los estados de Paraná y Santa Catarina (Brasil) y se encontraban conservados en los laboratorios de biotecnología ambiental de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA). Se reactivaron 16 hongos, las cuales fueron sometidas a ensayos de selección. En la prueba de decoloración del tinte Remazol Brilliant Blue R (RBBR) a 500 mg L^{-1} , se alcanzó la decoloración del 30 - 90% con los hongos FM02, FM14, FM16, FM12 y FM13. En cuanto a la tolerancia al óleo diésel (2% v/v) y al pireno (50 mg L^{-1}), se observó una tasa de crecimiento significativa, con valores de 0,04 a $0,16 \text{ g mL}^{-1}$ para pireno y de 0,03 a $0,06 \text{ g mL}^{-1}$ con diésel, siendo estas las únicas fuentes de carbono disponibles. En la producción de biosurfactantes, solo el hongo FM14 destacó, con un índice de emulsificación del 17,5%. Se seleccionaron tres hongos (FM02, FM14 y FM16) para evaluar la degradación de pireno, utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la cuantificación. A partir de una concentración inicial de $66,7 \text{ mg L}^{-1}$ de pireno, se observó la degradación del 34,48% (FM02), 39,40% (FM14) y 50,31% (FM16) tras 8 días de incubación. El hongo FM16 mostró el mayor rendimiento en la degradación de pireno, convirtiéndolo en un candidato prometedor para futuros estudios. La optimización de las condiciones de cultivo podría potenciar aún más su eficiencia y viabilidad a gran escala.

Palabras claves: RBBR; HAPs; pireno; biorremediación; hongos marinos.

NOGUERA, Osvaldo Manuel Nuñez. ***Evaluation of the biotechnological potential of fungi isolated from marine environments***. Advisors: PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano (advisor); BOROSKI, Marcela (co-advisor). 45 s.. *Dissertation (Master's degree)* - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu, 2024.

ABSTRACT

The marine environment has been exposed to constant pollution from petroleum-derived compounds, among which polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) stand out due to their high toxicity. In response to this issue, more sustainable methods such as bioremediation have been proposed to mitigate the environmental impact of PAHs in various ecosystems. In this context, the potential of marine fungi to biodegrade petroleum-derived compounds was evaluated. These fungi were collected from the coasts of Paraná and Santa Catarina (Brazil) and were preserved in the environmental biotechnology laboratories of the Federal University for Latin American Integration (UNILA). Sixteen fungi were reactivated and subjected to selection tests. In the Remazol Brilliant Blue R (RBBR) dye decolorization test at 500 mg L⁻¹, decolorization levels of 30-90% were achieved with the fungi FM02, FM14, FM16, FM12, and FM13. Regarding tolerance to diesel oil (2% v/v) and pyrene (50 mg L⁻¹), a significant growth rate was observed, with values ranging from 0.04 to 0.16 g mL⁻¹ for pyrene and from 0.03 to 0.06 g mL⁻¹ for diesel, with these compounds as the only carbon sources available. In biosurfactant production, only the FM14 fungus stood out, with an emulsification index of 17.5%. Three fungi (FM02, FM14, and FM16) were selected to evaluate pyrene degradation, using high-performance liquid chromatography (HPLC) for quantification. Starting from an initial concentration of 66.7 mg L⁻¹ of pyrene, degradation of 34.48% (FM02), 39.40% (FM14), and 50.31% (FM16) was observed after 8 days of incubation. FM16 showed the highest pyrene degradation efficiency, making it a promising candidate for future studies. Optimizing growth conditions could further enhance its efficiency and viability on a large scale.

Keywords: RBBR; PAHs; pyrene; bioremediation; marine fungi.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los 16 HAPs considerados contaminantes prioritarios por la USEPA.....	13
Figura 2. Vía de degradación del pireno por <i>Corioliopsis byrsina</i> APC5.....	15
Figura 3. Coordenadas de los puntos de colecta.....	20
Figura 4. Gráfico de determinación de LD (a) y LQ (b) a través de los parámetros analíticos de la curva.....	25
Figura 5. Porcentaje de decoloración del tinte RBBR por hongos de origen marino.....	27
Figura 6. Semejanza estructural entre el antraceno y el colorante RBBR.....	28
Figura 7. Gráfico de crecimiento fúngico con pireno y oleo diésel como única fuente de carbono.....	29
Figura 8. Curva analítica de 0,1 mg L ⁻¹ a 4 mg L ⁻¹ para pireno en caldo de cultivo.....	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de la curva analítica.....	32
Tabla 2. Precisión, exactitud y repetibilidad del método.....	33
Tabla 3. Resultados del análisis de degradación de pireno por HPLC.....	34
Tabla 4. Media de los porcentajes de degradación de pireno por hongos marinos.....	34
Tabla 5. Hongos de origen marino o terrestre que presentaron altas tasas de degradación de pireno.....	35

ÍNDICE

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	viii
1 INTRODUCCIÓN.....	11
2 FUNDAMENTO TEÓRICO.....	12
2.1 Hidrocarburos del petróleo.....	12
2.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos y biotoxicidad.....	12
2.3 Biodegradación de HAPs por hongos.....	14
2.4 Hongos de origen marino en la biodegradación de HAPS.....	16
2.5 Producción de biosurfactantes.....	17
2.6 Justificativa.....	17
2.7 Pregunta norteadora.....	18
2.8 Hipótesis.....	18
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 General.....	19
3.2 Específicos.....	19
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Reactivación de los hongos.....	20
4.2 Selección de hongos con potencial biotecnológicos.....	21
4.2.1 Crecimiento en oleo diésel o pireno como fuente de carbono.....	21
4.2.2 Decoloración del tinte RBBR (Remazol Brilliant Blue R) en medio liquido.....	21
4.2.3 Prueba de índice de emulsificación (EI ₂₄).....	22
4.3 Validación del método quechers/liofilización.....	22
4.3.1 Condición de cultivo.....	22
4.3.2 Preconcentración, extracción y limpieza.....	23
4.3.3 Condiciones cromatográficas.....	23
4.3.4 Linealidad.....	24
4.3.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ).....	24
4.3.6 Precisión, exactitud y recuperación.....	25
4.4 Análisis cromatográfica en fase liquida acoplado a detector de fluorescencia para la degradación de pireno.....	25
5 RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
5.1 Decoloración del RBBR.....	27

5.2 Tolerancia a pireno y oleo diésel.....	28
5.3 Producción de biosurfactantes.....	30
5.4 Validación de método quechers/liofilización.....	31
5.4.1 <i>Linealidad.....</i>	31
5.4.2 <i>Límite de detección y cuantificación.....</i>	32
5.4.3 <i>Precisión, exactitud y recuperación.....</i>	32
5.5 Degradación de pireno por hongos de origen marino.....	33
6 CONCLUSIÓN.....	36
7 REFERÉNCIAS.....	37

1 INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de compuestos ambientales ubicuos que poseen propiedades tóxicas y, debido a su lenta descomposición, tienden a bioacumularse en organismos marinos (PATEL *et al.*, 2020). Estudios en animales han demostrado que los HAPs son tóxicos para órganos como el riñón y el hígado, y pueden acumularse en tejidos de peces destinados al consumo humano, lo que incrementa la preocupación por los posibles efectos adversos en los consumidores (JAKOVLJEVIĆ *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2018). En respuesta a esta amenaza, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) designó a los HAPs como contaminantes prioritarios en 1983, basándose en su potencial exposición humana, toxicidad y alta frecuencia en sitios de desechos peligrosos.

Los HAPs presentes en el ambiente marino provienen tanto de fuentes petrogénicas, derrame accidental de petróleo como la de 2019 en Brasil que afectó alrededor de 120 municipios desde la costa norte, noroeste y sureste del país, Llegando a impactar de forma negativa a áreas marinas protegidas (NUNES *et al.*, 2023) pirogénicas (combustión incompleta), siendo transportados desde zonas urbanas a través de vías fluviales. Aunque existen métodos físicos y químicos como la incineración, oxidación UV, y extracción por solventes para tratar ecosistemas contaminados con HAPs, estos presentan desventajas como altos costos, complejidad y una significativa carga regulatoria.

En este contexto, la biorremediación surge como una alternativa ecológica, sostenible y más económica para abordar estas problemáticas (PASSARINI *et al.*, 2011). Esta técnica utiliza microorganismos para transformar, eliminar o degradar sustancias nocivas. El ambiente marino es especialmente prometedor en la búsqueda de microorganismos adaptados a condiciones de estrés osmótico debido a la alta salinidad de estos entornos. Estos organismos marinos pueden producir enzimas y compuestos únicos con potencial biotecnológico, distintos a los de organismos terrestres (NUNES *et al.*, 2021; PASSARINI *et al.*, 2011; BIROLLI *et al.*, 2018).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial biotecnológico de hongos filamentosos aislados de ambientes marinos en la producción de compuestos biosurfactantes, decoloración de tintes sintéticos, tolerancia a derivados del petróleo y degradación del HAP pireno, con miras a futuras aplicaciones en la descontaminación de estos contaminantes en entornos marinos.

2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Hidrocarburos del petróleo

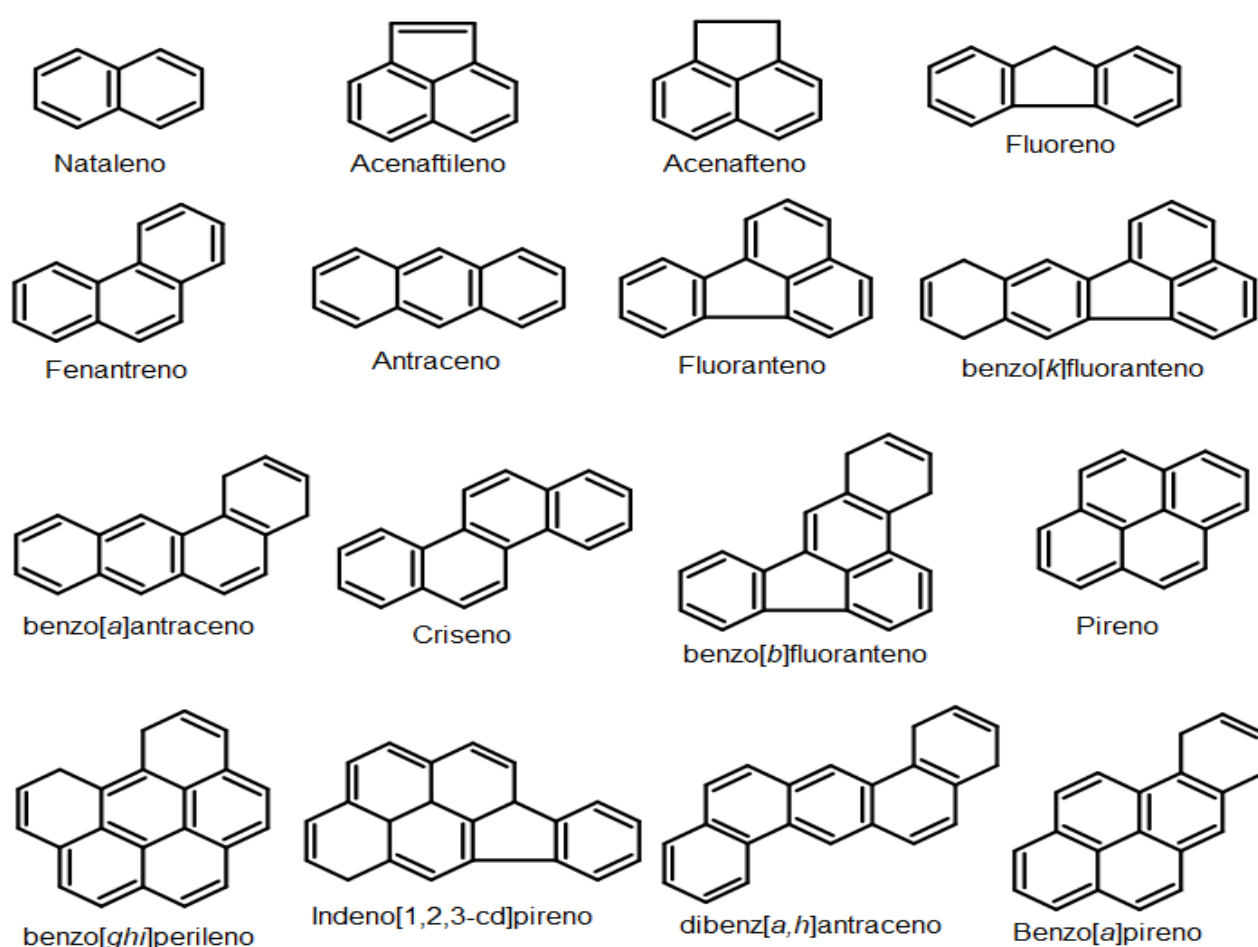
El petróleo crudo es una mezcla compleja de múltiples hidrocarburos, destacándose los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) que son considerados como los más tóxicos y por lo general son usados como marcadores de la toxicidad del petróleo (MUTHUKAMALAM *et al.*, 2017). Los HAPs de bajo peso molecular debido a su mayor solubilidad tienden a permanecer en el agua, por lo que pueden ser ingeridos o respirados por mamíferos marinos. Siendo estos considerados más tóxicos para la fauna marina que los de alto peso molecular, debido a que estos son menos solubles en agua (CERNIGLIA y SUTHERLAND, 2010). Cabe destacar que la solubilidad aumenta con la temperatura, en consecuencia, volviéndose más biodisponible para la absorción por los organismos marinos durante los meses más calurosos (RUBERG; ELLIOTT; WILLIAMS, 2021). Los derrames de petróleo son la principal fuente de contaminación por HAPs en las zonas costeras y suelos cercanos a industrias de refinera. En el caso de la contaminación de las costas marinas y el mar, se debe a accidentes sufridos por los buques de transporte del petróleo, que por lo general suele ser una liberación masiva del producto, así como por la liberación crónica en las costas a la hora del desembarque (ADENIJI; OKOHOKOH, 2017).

2.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos y biotoxicidad

Los HAPs son compuestos orgánicos que están formados por la fusión de dos o más anillos aromáticos. El número de anillos aromáticos presentes se utiliza para clasificarlos en HAPs con bajo peso molecular (dos a tres anillos aromáticos) y HAPs de alto peso molecular (cuatro o más anillos aromáticos). Dependiendo de este peso molecular los HAPs se presentan en forma gaseosa (bajo) o particulado (alto) (GHOSAL, *et al.*, 2016). Con el aumento del peso molecular, la solubilidad en agua tiende a disminuir tornándolas lipofílicas, favoreciendo su bioacumulación en animales marinos o terrestres, con la posibilidad de ser transferidos a los seres humanos a través de la ingesta de los mismos. Otra característica importante es la existencia de electrones π o enlaces π en los anillos aromáticos. Estos al ser planos proporcionan mayor estabilidad, permitiendo una mayor persistencia en el ambiente (PATEL *et al.*, 2020). En 1983, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) declaro a 16 HAPs como

contaminantes prioritarios, con base en su posible exposición humana, toxicidad y frecuencia de ocurrencia en sitios de desechos peligrosos. Estos 16 HAP incluyen acenafteno, benzo[ghi]perileno, criseno, acenaftileno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno, naftaleno, fenantreno, dibenz[a,h]antraceno, fluoreno y pireno. Las diferentes estructuras de los HAPs pueden ser observados en la figura 1 (MOJIRI *et al.*, 2019; GHOSAL *et al.*, 2016).

Figura 1. Estructura de los 16 HAPs considerados contaminantes prioritarios por la USEPA



Fuente: GHOSAL *et al.*, 2016.

Los HAPs se originan de fuentes naturales como erupciones volcánicas, incendios forestales y procesos biológicos, por lo general son consideradas insignificantes comparadas con los de origen antropogénico que incluyen procesos industriales, pirólisis (combustión incompleta de biomasa o materia orgánica) y los de origen petrogénicos que ingresan al medio marino por medio del transporte o exploración del petróleo, por fuga o derramamiento del óleo crudo (CERNIGLIA y SUTHERLAND, 2010; PATEL. *et al.*, 2020).

Algo a destacar es que, en el pirólisis, se producen mayoritariamente HAPs de alto peso molecular y los de origen petrogénicos predominan los HAPs de bajo peso molecular.

Estos HAPs de alto peso molecular son adsorbidos fuertemente por las partículas del suelo, debido a su baja presión de vapor y alta hidrofobicidad, convirtiendo al suelo o sedimento en el principal medio de propagación para que lleguen a aguas subterráneas o costeras, plantas y alimentos (GERESLASSIE *et al.*, 2018; DOMINGO y NADAL, 2015). Un ejemplo sería los desagües fluviales que desembocan en ríos o en ambientes costeros, donde todos esos HAPs producidos por el humo o fricción de los neumáticos con el asfalto son arrastrados por la lluvia hasta esos ambientes. Según estudios, la contaminación por HAPs es a nivel global y afecta tanto a zonas urbanas como a ambientes acuáticos/marinos (DURAN y CRAVO-LAUREAU, 2016; NUNES *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2021; TIAN *et al.*, 2021).

Los efectos tóxicos de los HAPs dependen de la duración y el modo de exposición. Los efectos a corto plazo incluyen irritación de la piel y los ojos, náuseas, vómitos e inflamación, mientras que los efectos a largo plazo se asocian con el desarrollo de cánceres como (piel, pulmón, vejiga, gastrointestinales y riñón), daño hepático y cataratas, así como la mutación genética (JAKOVLJEVIĆ *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2018). Por ejemplo, en el metabolismo de algunos HAPs ocurre la formación de intermedios reactivos, que no son lo suficientemente polares como para ser excretados. Estos metabolitos pueden unirse a las proteínas y al ADN, provocando interrupciones bioquímicas como replicación o transcripción, por lo tanto, pueden causar mutaciones que generen cánceres, inmunosupresión y efectos teratógenos (EWA y DANUTA, 2016). Estas mutaciones genéticas están asociadas con el desarrollo de malformaciones fetales y tumores. Teniendo en cuenta que los HAPs existen comúnmente como una mezcla compleja de diferentes estructuras, pueden exhibir efectos sinérgicos, posiblemente aumentando su toxicidad (EWA y DANUTA, 2016; PATEL *et al.*, 2020).

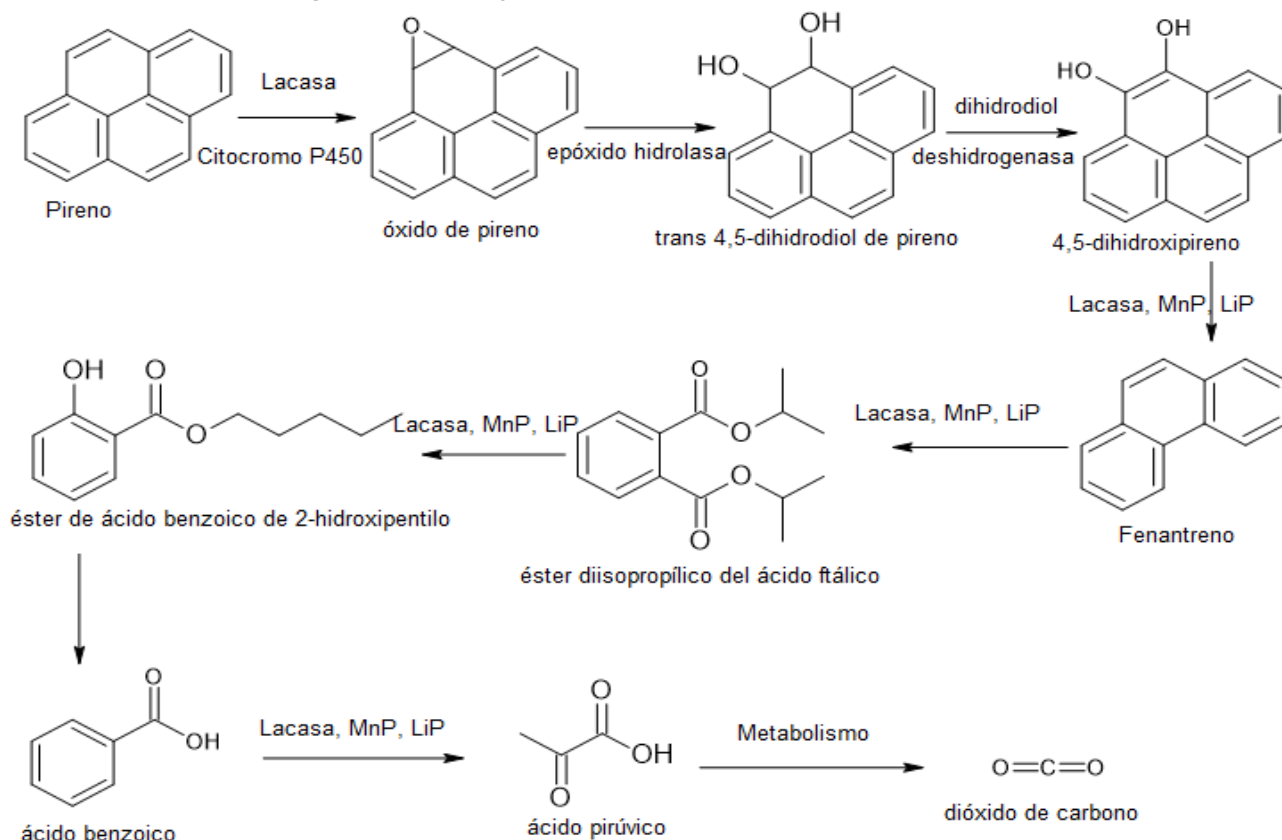
2.3 Biodegradación de HAPs por hongos

En los últimos años los hongos filamentosos se han utilizado con mayor frecuencia en la degradación de HAPs, mostrando gran capacidad para degradar altas concentraciones de estas. Esto se debe principalmente a la actividad de sistemas enzimáticos extracelulares como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MgP) y Lacasas, siendo hasta hace pocos años los hongos de podredumbre blanca

(Basidiomycota) los más estudiados por su capacidad innata de producir estas enzimas para la degradación de la lignina y que pueden ser aplicados en la degradación de HPAs (GHOSAL *et al.*, 2016).

Sin embargo, esta tendencia termino porque especies que pertenecen a otros filos ascomicetos como *Tolyptocladium* sp. CBMAI 1346 consiguen degradar 94% de pireno utilizando una vía en conjunta con enzimas del citocromo P450 y enzimas ligninolíticas (VASCONCELOS *et al.*, 2019). Así como también las enzimas ligninolíticas producidas por el hongo de origen marino *Lasiodiplodia theobromae* en el caso de la degradación de Benzo[a]pireno observándose la actividad de lignina peroxidasa y lacasa (CAO *et al.*, 2020).

Figura 2. Vía de degradación del pireno por *Corioloris byrsina* APC5



Fuente: AGRAWAL; SHAHI, 2017.

El mecanismo de degradación aeróbica del pireno por la cepa *Corioloris byrsina* APC5 se resume en la figura 2 de la siguiente manera: el pireno se oxida por la acción de la lacasa en el estanco 4-5 (región K) a óxido de pireno, que a su vez se convierte en trans 4,5-pireno dihidrodiol. La transformación por deshidrogenación del trans 4,5-pireno

dihidrodiol resultó en 4,5-dihidroxipireno. El compuesto formado posteriormente, en una reacción de oxidación por lacasa, LiP y MnP y un proceso de escisión del anillo, se convierte en fenantreno, que posteriormente se metaboliza a éster diisopropílico del ácido ftálico y luego a ácido benzoico bajo una sucesión de reacciones enzimáticas que involucran las enzimas extracelulares lacasa, LiP y MnP. A partir del ácido benzoico, se elimina la cadena lateral y, por escisión del anillo, bajo la acción de la lacasa, LiP y MnP, el ácido benzoico se convierte en ácido pirúvico, que posteriormente se metaboliza en la vía metabólica hacia el dióxido de carbono (AGRAWAL; SHAHI, 2017).

2.4 Hongos de origen marino en la biodegradación de HAPS

La biodegradación de HAPs por hongos de origen marino ha sido ampliamente estudiada en los últimos años y se han reportado que numerosas especies de hongos son capaces de metabolizar diferentes HAPs y son ampliamente distribuidas por diferentes géneros incluyendo (*Aspergillus*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*) (DELL ANNO *et al.*, 2021; VIRUÉS-SEGOVIA, J. R. *et al.*, 2023). El interés en los hongos de origen marino para la biorremediación de este ambiente es que ya presentan adaptaciones a las condiciones tal como salinidad, temperatura y por sobre todo al ser aislados de ambientes contaminados, pueden sintetizar enzimas catalíticas y utilizar compuestos orgánicos (contaminantes) como fuentes de carbono (BIROLLI *et al.*, 2018; PASSARINI *et al.*, 2011). Algo a destacar es que la mayoría de los hongos no pueden utilizar HAPs como únicas fuentes de carbono y energía, sin embargo, pueden co-metabolizar HAPs a una amplia variedad de productos oxidados y a veces a CO₂.

La transformación de los HAPs por hongos implica varias vías enzimáticas, dependiendo de las especies y las condiciones de crecimiento. Los hongos implicados en la biodegradación de los HAPs son principalmente de dos tipos entre ellos, hongos ligninolíticos, que tienen la capacidad de producir enzimas como la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas, los cuales pueden oxidar los HAPs y se convierten en intermedios de difenol, que eventualmente se oxidan en quinonas; y el segundo grupo, los hongos no ligninolíticos, aquellos que no producen peroxidasa o lacasas, sino que utilizan las enzimas monooxigenasa del citocromo P450 (GHOSAL, *et al.*, 2016 ; PATEL, *et al.*, 2020).

2.5 Producción de biosurfactantes

Los biosurfactantes, son compuestos anfifílicos de origen vegetal (saponina), animal (fosfolípidos, tensioactivos pulmonares y sales biliares) y microbiano (glicolípidos). Los biosurfactantes microbianos presentan altas propiedades tensioactivas que permiten reducir el impacto ambiental causado por diversos residuos liberados al medio ambiente como los hidrocarburos (DA SILVA *et al.*, 2021). En comparación con los surfactantes producidos por síntesis química, los biosurfactantes son menos tóxicos que sus homólogos derivados del petróleo, presentado ventajas como biodegradabilidad, baja toxicidad y tolerancia a diferentes factores ambientales pH, temperatura y salinidad (VAZQUEZ *et al.*, 2018). Por otro lado, los biosurfactantes son estructuralmente más complejos que los tensioactivos sintéticos, ya que se forman a partir de combinaciones de biomoléculas (proteínas, carbohidratos y lípidos) (KUBICKI *et al.*, 2019). Los biosurfactantes producido por microorganismos se clasifican en función de su estructura química, por ejemplo, los glicolípidos se componen de carbohidratos (glucosa, ramnosa y galactosa) combinados con ácidos alifáticos de cadena larga o ácidos hidroxialifáticos (ácidos grasos que contienen grupos hidroxilo (OH) y ramas alquílicas). Los lipopéptidos están formados por biomoléculas donde los aminoácidos están unidos a grupos carbonilos e hidroxilos de una cadena de ácidos grasos de 14 carbonos, los biosurfactantes poliméricos son complejos de polisacárido-proteína (SANCHES *et al.*, 2021). Dadas las características ventajosas de los biosurfactantes en comparación con las sintéticas, lo convierten en una alternativa promisorio a ser aplicado en varios campos industriales, como en la industria farmacéutica, cosmética en el tratamiento de aguas residuales, así como en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

2.6 Justificativa

La utilización de sustancias derivadas del petróleo presenta cierta desventaja por producir subproductos recalcitrantes como los HPAs, que son sustancias consideradas neurotóxicas, carcinogénicas y teratogénica. Pudiendo llegar a causar varias complicaciones a los seres humanos. A través de las actividades antropogénicas como la refinería o transporte de petróleo, estas sustancias llegan a los ambientes marinos, donde afectan la vida acuática y por sus características fisicoquímicas se bioacumulan en los animales, lo cual facilita aún más la exposición humana a estos compuestos por medio de

la alimentación. En este escenario, los hongos de origen marino han sido estudiados por su capacidad de producir enzimas y moléculas que presentan potencial biotecnológico para la degradación de HPAs en ambientes acuáticos. Es fundamental realizar investigaciones para encontrar los mejores candidatos para futuros tratamientos de biorremediación.

2.7 Pregunta norteadora

¿Será que los hongos aislados de las costas de Brasil presentan potencial para degradar el HPA pireno o producir biosurfactantes? y ¿Cuáles son las técnicas de selección que presentan mejores resultados?

2.8 Hipótesis

Los hongos aislados de las costas de Brasil presentan adaptaciones que permiten la producción de biosurfactantes o capacidad para degradar el HPAs pireno.

3 OBJETIVOS

3.1 General

- evaluar el potencial biotecnológico de hongos de origen marinos aislados de las costas del estado de Paraná y Santa Catarina (Brasil) e preservados en los laboratorios de biotecnología ambiental de la UNILA, a través de ensayos en la tolerancia y/o biodegradación de contaminantes ambientales como tintes sintéticos, compuestos derivados del petróleo como el HAP pireno y producción de biosurfactantes.

3.2 Específicos

- reactivar los hongos preservados en el laboratorio de biotecnología ambiental de la UNILA;
 - seleccionar los hongos reactivos que consigan descolorar el tinte RBBR;
 - seleccionar los hongos reactivados por medio de su capacidad en crecer utilizando óleo diésel o pireno como única fuente de carbón;
 - verificar la producción de biosurfactantes por parte de los hongos reactivos; y
 - cuantificar la degradación do HAP pireno por parte de los hongos previamente seleccionados, a través de HPLC.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivación de los hongos

Para este estudio fueron utilizados 45 hongos filamentosos previamente aislados de muestras marinas, incluidos sedimentos e invertebrados marinos (coral y erizo de mar), en las costas de Paraná (25° 49' 03" S y 48° 32' 34" W) y Santa Catarina (27° 07' 54" S y 48° 31' 40" W) Brasil entre los años 2015 y 2017 (Figura 3). Los aislados se encuentran conservados como discos de 5 mm de diámetro, conteniendo micelios fúngicos inmersos en microtubos de 2 mL con glicerina 20% a -80 °C en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Federal de Integración Latinoamericana – UNILA, Foz do Iguaçu - PR. Los hongos fueron reactivados separadamente, colocando 1 disco de micelio de cada aislado en placas de Petri con Batata dextrosa agar (BDA: Infusión de batata 4 g L⁻¹; dextrosa 20 g L⁻¹; agar 15 g L⁻¹) y colocados para su crecimiento en estufas incubadoras por 8 días a 28 °C.

Figura 3. Coordenadas de los puntos de colecta



Aviso: Matinhos - PR (25° 49' 03" S y 48° 32' 34" W). Porto Belo – SC (27° 07' 54" S y 48° 31' 40" W).

Fuente: GOOGLE, 2024.

4.2 Selección de hongos con potencial biotecnológicos

4.2.1 Crecimiento en oleo diésel o pireno como fuente de carbono

Para la realización del ensayo, se cortaron dos discos de micelio (5 mm de diámetro) de los bordes de cada colonia fúngica reactivada en BDA y fueron inoculados por separados en Erlenmeyer de 50 mL conteniendo 30 mL de medio específico para el crecimiento de hongos adaptados a hidrocarburos (HAF: KCl 250 mg L⁻¹; MgSO₄ 0.5 g L⁻¹; NaH₂PO₄ 1 g L⁻¹; NH₄NO₃ 1 g L⁻¹; pH 7.0) adaptado de Elshafie *et al.*, (2007). Fueron realizados dos pruebas por separado, en la primera se añadió 1 mL de Oleo diésel y en la segunda 2 mg de Pireno, por matraz. Se incubaron por 8 días a 150 rpm y 28 °C en estufa con agitador. Cada prueba fue realizada en triplicado y dos controles. Un control fue el medio HAF con inóculo y el otro, el medio HAF que contenía oleo diésel o pireno. La cuantificación del crecimiento se realizó pesando la biomasa seca de las muestras. Para ello, después de la incubación fue realizado una filtración al vacío (utilizando: papel de filtro, Kitasato, Buchner y bomba de vacío) recuperándose la biomasa. Los papeles de filtro fueron pesados previamente para no interferir en el peso real de la biomasa. Terminado la filtración se recolectó los papeles de filtro con biomasa y se llevaron a la estufa a 60 °C por 24 horas para el secado. Los hongos que mostraron un mejor crecimiento se consideraron los más prometedores para la degradación de hidrocarburos, siendo estas seleccionadas para pruebas posteriores.

4.2.2 Decoloración del tinte RBBR (Remazol Brilliant Blue R) en medio líquido

El ensayo fue realizado adaptando la metodología de Bernal *et al.*, (2021). Se cortaron dos discos de micelio (5 mm de diámetro) de los bordes de cada colonia fúngica reactivada en BDA y fueron inoculados por separados en Erlenmeyer de 50 mL conteniendo 30 mL de medio HAF, más dextrosa 20 g L⁻¹ y RBBR 0,5 g L⁻¹. Cada matraz fue recubierto con papel aluminio para evitar la fotodegradación del RBBR, enseguida se incubaron por 8 días con agitación a 150 rpm y 28 °C. Se realizaron tres replicas para cada aislado y dos controles. Siendo uno el blanco con medio HAF e dextrosa con inóculo (un blanco para cada aislado) y el control negativo con medio HAF, dextrosa e RBBR sin inóculo. Pasado la incubación cada muestra fue recolectada en tubos Falcon y fueron llevados para ser triturados con el ultraturax a 9000 rpm por 10 min. Seguidamente se

filtraron al vacío para obtener el caldo libre de células. A partir de esta se extrajeron alícuotas de 1 mL que fueron diluidas 10 veces en agua ultrapura para evitar la saturación. Fueron transferidos 2 mL de la disolución diluida en cubetas de vidrio y llevados al espectrofotómetro para ser cuantificado la reducción de la absorbancia (A) a una longitud de onda de 580 nm. La eficacia de la decoloración se expresa utilizando la ecuación 1, donde: A_i , es la A del control negativo y A_f , es la A de cada muestra:

$$D\% = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) \times 100$$

4.2.3 Prueba de índice de emulsificación (EI_{24})

Los ensayos de emulsificación fueron realizados cortando dos discos de micelio (5 mm de diámetro) de los bordes de cada colonia fúngica reactivada en BDA y fueron inoculados por separados en Erlenmeyer de 50 mL conteniendo 30 mL de medio HAF con 5% (m/v) de Dextrosa e incubados por 8 días a 150 rpm a 28 °C. La actividad emulsificante se determinó mediante el método descrito por Cooper y Goldenberg (1987). Se añadieron 2 mL de oleo diésel e igual volumen del sobrenadante del cultivo en un tubo de ensayos, seguido de homogenización en vortex a alta velocidad por 2 min. La estabilidad de la emulsificación se medirá después de 24 horas y el índice de emulsificación se calculó midiendo la relación entre el volumen emulsionado y el volumen total de la muestra analizada como se muestra en la ecuación (2). Como control positivo se utilizó una solución de Tween 2% y como negativo el medio de cultivo sin inocular:

$$EI_{24}\% = \frac{\text{Volumen emulsionado}}{\text{volumen total}} \times 100$$

4.3 Validación del método quechers/liofilización

4.3.1 Condición de cultivo

Para el cultivo de hogos fueron seleccionados tres cepas fúngicas que demostraron mejor rendimiento en las pruebas previas. El caldo de cultivo, que sería utilizado como matriz, se obtuvo inoculando dos discos de micelio (5 mm de diámetro) de cada cepa en matraces de 50 mL por separado, conteniendo 30 mL de HAF con 5% (m/v) de Dextrosa. Se realizaron 18 réplicas para cada cepa y seguidamente fueron incubados a 28 °C con 150 rpm de agitación por 8 días. Para la adición posterior de pireno se preparó 5 mL de

solución de 200 mg L⁻¹ de pireno disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) y a partir de esta se formó una solución madre de 4 mg L⁻¹.

4.3.2 Preconcentración, extracción y limpieza

Finalizado la etapa de crecimiento, los cultivos fueron transferidos de forma individual a tubos Falcon de 50 mL que se llevaron a congelar al ultrafreezer por 24 horas a -80 °C. Pasado este periodo se colocaron en el liofilizador por 72 hs a -30 °C y 430000 µm Hg. Esto con el fin de disminuir al máximo la presencia de agua y concentrar el analito. Con las muestras liofilizadas se continuo con el método QuEChERS, el cual es un sistema de extracción en fase solido dispersivo (dSPE) que consta de dos etapas claves. La primera es una extracción simple con un disolvente orgánico en presencia de diferentes sales, las sales auxilian a la partición del analito a la fase orgánica y la separación de las fases acuosa y orgánica. La segunda fase corresponde a la limpieza en la cual se facilita la eliminación del agua residual y de los compuestos presentes en la matriz que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos (SLÁMOVÁ *et al.*, 2020). Para ello, los liofilizados se resuspendieron en 15 mL de solución acetonitrilo (99,9%) y agua ultrapura (18 MΩ) en proporción 2:1 (v/v) y homogeneizados con ultraturrax a 9000 rpm por 5 min. Se siguió a la precipitación salina con 5 g de mezcla de MgSO₄: NaCl (4:1 m/m), vortex por 1 minuto y centrifugación a 4000 rpm por 15 min. En la limpieza se transfirió 2 mL de la fase orgánica a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 100 mg de C18, 50 mg PSA y 300 mg de MgSO₄, vortex por 1 min y centrifugación a 4000 rpm por 15 min. Se filtró 1 mL de sobrenadante con filtros de jeringa (0,22 µm PTFE hidrofóbico) y transferidos a viales de 1,5 mL para su posterior análisis.

4.3.3 Condiciones cromatográficas

Se utilizo un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Dionex UltiMate 3000 series, Thermo Fisher Scientific), acoplado a un detector de fluorescencia (FLD) y equipado con una bomba cuaternaria (LGP-3400SD) y un auto inyector (20 µL). Se tuvo como referencia los parámetros de estudio de Farhadian *et al.*, (2012) y Roseiro *et al.*, (2011). La fase móvil estaba compuesta por 85% de acetonitrilo y 15% de agua

ultrapura, bombeada a través de la columna a un caudal constante de 1 mL min^{-1} . La separación se realizó bajo condiciones isocráticas, utilizando una columna ACE 5 C18 (número de lote V13-7473) ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$; tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$; porosidad de partícula de 110 \AA), mantenida a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. El detector de Fluorescencia (FLD) registró los espectros (λ_{ex} : 260 nm , λ_{em} : 430 nm) para el pireno.

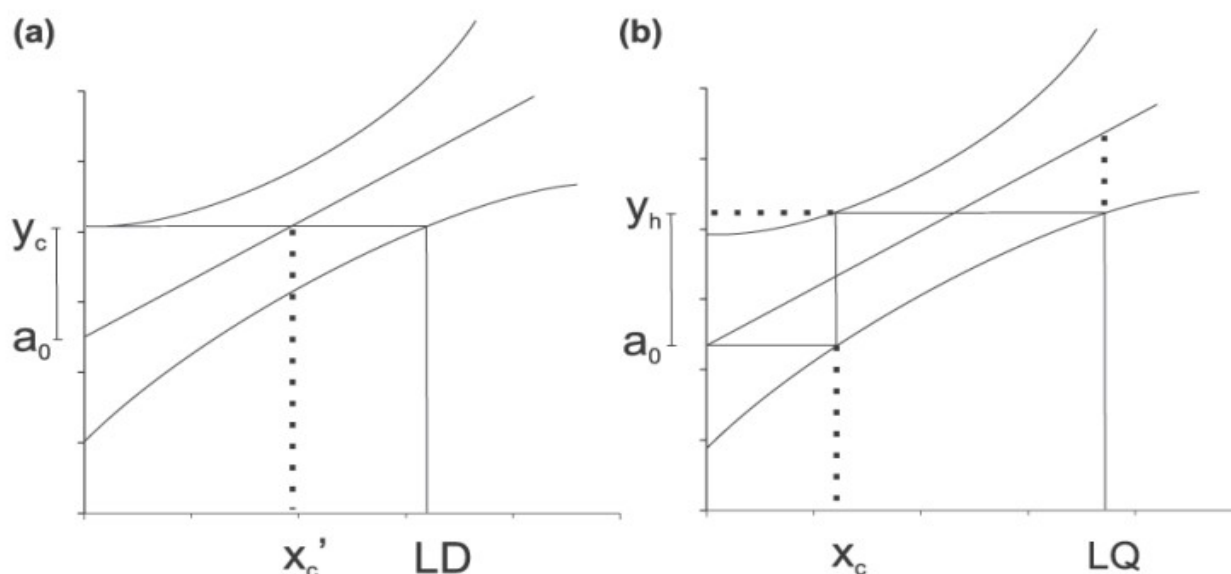
4.3.4 Linealidad

La curva analítica se construyó utilizando triplicados de 6 concentraciones de pireno (4 mg L^{-1} ; 2 mg L^{-1} ; 1 mg L^{-1} ; $0,5 \text{ mg L}^{-1}$; $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$). Cada punto fue preparado en 30 mL del caldo fermentado, con posterior preconcentración y extracción. A través de los resultados se evaluaron el coeficiente de determinación (R^2) y la homocedasticidad por medio del grafico de residuos.

4.3.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Se optó por la utilización de la planilla electrónica de validación elaborada por Ribeiro *et al.*, (2008), que se basa en los parámetros de la curva analítica para estimar los límites de detección y cuantificación. La estimación de la señal analítica a partir de la ecuación de regresión presenta un error estándar, y el producto de este error por el valor apropiado de t de la distribución de Student permite calcular el intervalo de confianza de la curva analítica, que tiene la forma de dos líneas hiperbólicas alrededor de la curva. El intercepto del límite superior del intervalo de confianza es conocido como y_c crítico (y_c) y su proyección en el límite inferior es una estimación de la concentración mínima que puede ser medida con un grado de confianza comprobado estadísticamente, es decir, el límite de detección del método. De la misma manera, estimándose los valores de x_c que es el valor de la concentración de (x) en el punto en que el valor de a_0 intercepta la recta de regresión e y_h que es el valor de y para la proyección de x_c en el límite de control superior, en la figura 4 se muestra las líneas hiperbólicas formadas a través de esta estimación. Utilizando estas dos informaciones se estimó el límite de cuantificación.

Figura 4. Gráfico de determinación de LD (a) y LQ (b) a través de los parámetros analíticos de la curva



Fuente: Adaptado de Ribeiro *et al.*, 2008.

4.3.6 Precisión, exactitud y recuperación

Estos estudios se llevaron a cabo añadiendo 3 niveles de pireno ($0,15 \text{ mg L}^{-1}$; $0,7 \text{ mg L}^{-1}$; 3 mg L^{-1}) en 10 réplicas de muestras de caldo fermentado. Para el análisis de la precisión intermedia, se preparó un segundo lote por el mismo analista en días diferentes, en el mismo laboratorio y utilizando el mismo equipo.

4.4 Análisis cromatográfica en fase líquida acoplado a detector de fluorescencia para la degradación de pireno

Se inoculó 2 discos de micelio en cada matraz de 50 mL, conteniendo 30 mL de HAF con 5% (m/v) de dextrosa. Siendo adicionado 2 mg de Pireno disuelto en Dimetilsulfóxido después de 48 horas (PASSARINI, M. *et al.* 2011). Se incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ con 150 rpm de agitación por 8 días y se realizaron muestreos en los días 4 y 8. El procedimiento de extracción y limpieza fue por medio del método quechers/liofilización. La muestra resultante fue diluida 50 veces con acetonitrilo para que este pudiese encajar en el rango lineal. Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Dionex UltiMate 3000 series, Thermo Fisher Scientific), acoplado a un detector de fluorescencia (FLD) y equipado con una bomba cuaternaria (LGP-3400SD) y un auto inyector ($20 \text{ } \mu\text{L}$). Se tuvo como referencia los parámetros de estudio de Farhadian *et al.*, (2012) y Roseiro *et al.*, (2011). La fase móvil estaba compuesta por 85% de acetonitrilo y

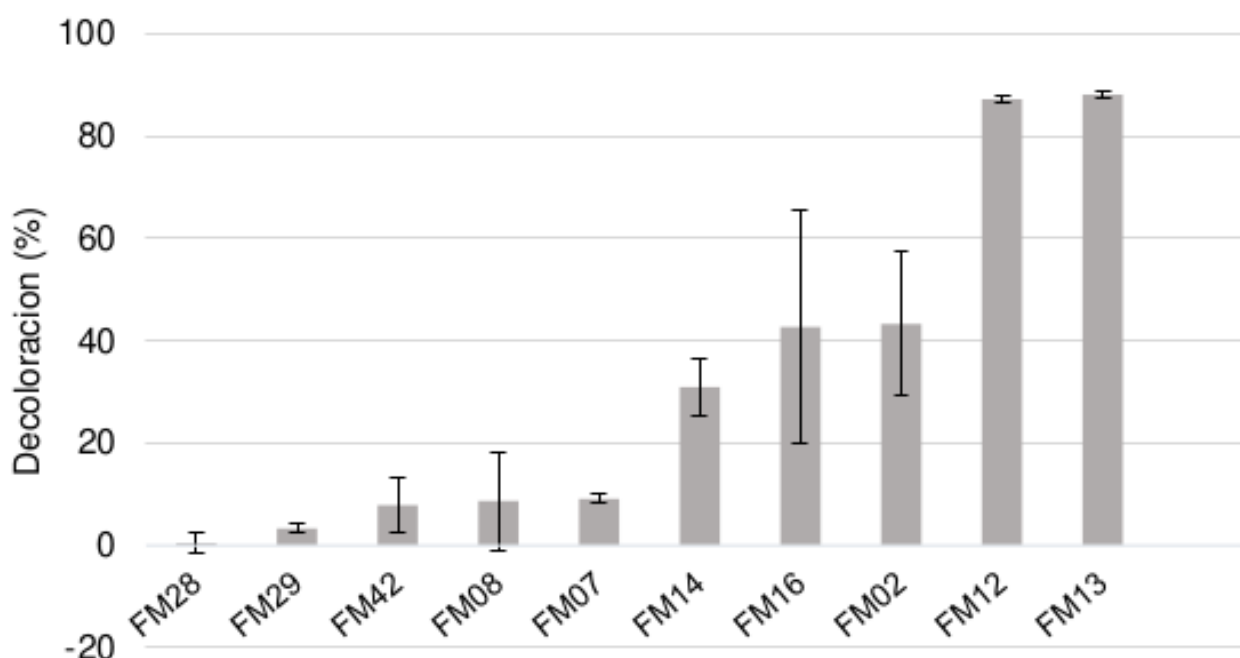
15% de agua ultrapura, bombeada a través de la columna a un caudal constante de 1 mL min⁻¹. La separación se realizó bajo condiciones isocráticas, utilizando una columna ACE 5 C18 (número de lote V13-7473) (250 mm × 4.6 mm; tamaño de partícula de 5 µm; porosidad de partícula de 110 Å), mantenida a 30 °C. El detector de Fluorescencia (FLD) registró los espectros (λ_{ex} : 260 nm, λ_{em} : 430 nm) para el pireno. Los puntos de la curva analítica se analizaron en conjunto con las muestras para obtener la ecuación lineal, para que partir de esta, se calcule la concentración de pireno que no fue degradado e inferir su tasa de degradación.

5 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Decoloración del RBBR

Los ensayos del presente estudio fueron realizados con 16 linajes fúngicos, las cuales fueron capaces de crecer después largos periodos de preservación a bajas temperaturas. De entre estas, diez que están presentados en la figura 5, mostraron tolerancia y decoloración del RBBR. Las cepas FM14, FMA16 y FM02 presentaron decoloración mayor al 30%. Siendo las cepas FM12 y FM13 las más eficientes, consiguiendo degradar más del 80%.

Figura 5. Porcentaje de decoloración del tinte RBBR por hongos de origen marino



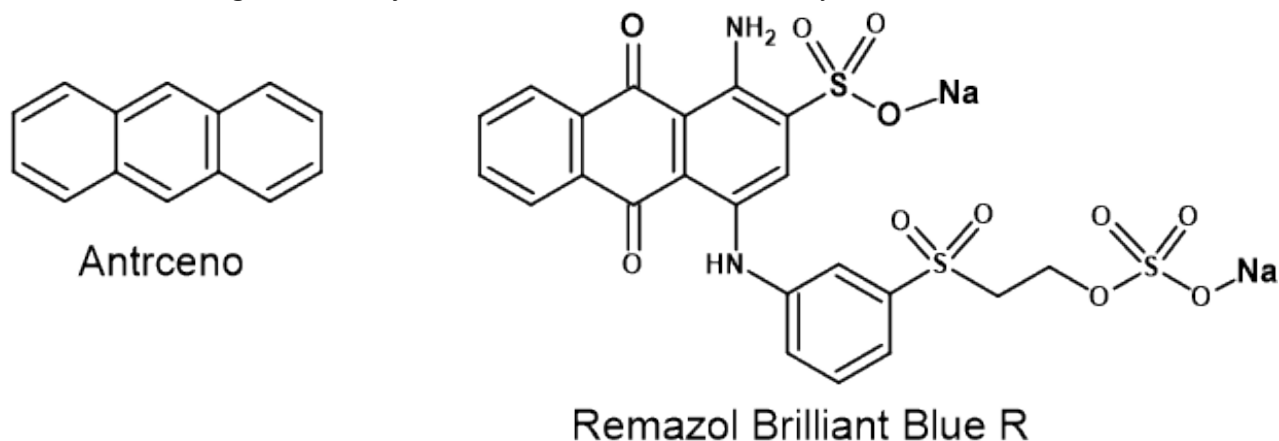
Fuente: del autor, 2024.

La decoloración de RBBR ha sido propuesta como un método eficiente para la bioprospección de hongos capaces de degradar contaminantes recalcitrantes, debido a que, el colorante RBBR es un derivado del antraceno presentando características fisicoquímicas similares a los HPAs como mostrado en la figura 6 (VIRUÉS-SEGOVIA *et al.*, 2023).

La capacidad de decolorar tintes sintéticos como el RBBR por hongos derivados de ambientes marinos han sido registrados por los hongos del filo basidiomicetos destacándose *Tinctoporellus* sp. CBMAI 1061 (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2011) y ascomicetos *Penicillium citrinum* CBMAI 853 (DA SILVA M. *et al.*, 2008) que presentaron

una eficacia del 100% en degradar el tinte. Así también presentaron la producción de enzimas lacasas, MnP y LiP registrados como los principales responsables en la decoloración de tintes sintéticos (RAJHANS *et al.*, 2021).

Figura 6. Semejanza estructural entre el antraceno y el colorante RBBR



Fuente: CHEMSKETCH, 2024.

Estudios actuales se centran en la optimización en producir y extraer enzimas lacasas y MnP en la decoloración de RBBR por parte de diferentes hongos (SYAFI UDDIN; FULAZZAKY, 2021). En los estudios de optimización de (BEN ALI *et al.*, 2020) se utilizó CuSO_4 1,8 mM, 1 % de NaCl y 3 % de sacarosa. Logrando producir oxidasas con actividad de lacasas en sobrenadantes libres de células de *Trichoderma asperellum* 1 que alcanzaron 60 a 80% de decoloración del RBBR. Así también, en otro estudio utilizando lacasa cruda de *Ganoderma lucidum*. Se obtuvo un porcentaje de decoloración de 98,7 %, en las siguientes condiciones, temperatura a 35 °C; pH 4.0; 0,2 g L^{-1} de RBBR y 0,1 mM de vanilina por 30 minutos de reacción (QIN *et al.*, 2019).

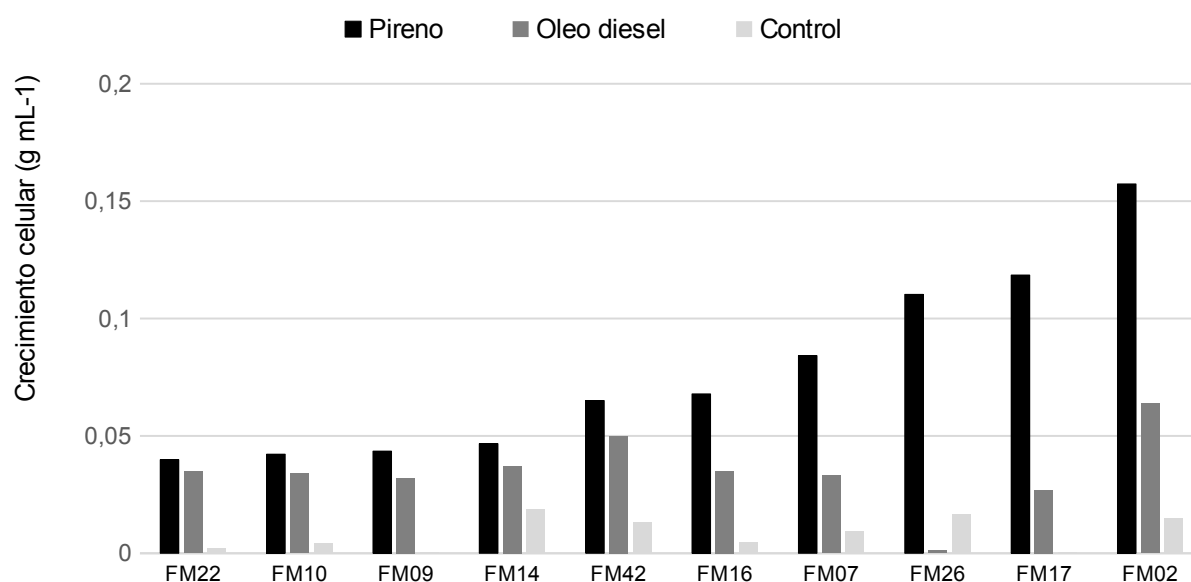
De esta forma, podemos decir que hongos filamentosos de origen marino pueden ser candidatos prometedores para los procesos de decoloración de tintes sintéticos RBBR en ambientes acuáticos.

5.2 Tolerancia a pireno y oleo diésel

En esta prueba se observó que 10 hongos presentaron crecimientos satisfactorios en presencia de oleo diésel y pireno como únicas fuentes de carbono. Consiguiéndose un crecimiento entre 0,04 a 0,16 g mL^{-1} con pireno y 0,03 a 0,06 g mL^{-1} con oleo diésel como mostrado en la figura 7. El control utilizado fue el medio HAF con inóculo sin oleo diésel o

pireno y los hongos que mostraron mayor crecimiento que esta se consideraron tolerantes.

Figura 7. Gráfico de crecimiento fúngico con pireno y oleo diésel como única fuente de carbono



Fuente: del autor, 2024.

Los resultados obtenidos se alinean con los obtenidos por (CARLOS *et al.*, 2023) en la cual los hongos consiguieron crecer en presencia de pireno entre 0,08 y 0,13 g mL⁻¹ y con oleo diésel 0,001 a 0,084 mg mL⁻¹, siendo este último crecimiento mucho mayor en nuestro estudio, indicando talvez una mayor adaptabilidad de los hongos a la presencia de compuestos derivados del petróleo.

La mayoría de los estudios de tolerancia al óleo diésel, pireno o petróleo son realizados en medio solido como método de cribado para identificar hongos que presenten estas cualidades. Tal es el caso de (ASLAN HWANHWI LEE *et al.*, 2020) que utilizo una mezcla de HPAs incluido pireno y midiendo el radio de crecimiento, consiguió aislar el hongo *Peniophora incarnata* que presento un rango de degradación de HPAs entre 40 a más de 90%. Otra forma también fue la presentada por (ELSHAFIE *et al.*, 2007) en donde midió la biomasa micelar producida por *Aspergillus niger* (20,0 mg), *Aspergillus terreus* (29,4 mg) y *Penicillium chrysogenum* (32,9 mg) para degradar los n-alcános C13 a C18 y el petróleo crudo, pudiendo obtener una correlación entre la biomasa y el petróleo degradado.

En otro estudio analizando la capacidad de biodegradar petróleo crudo por parte de hongos aislados de ambiente marinos, se destacaron 4 aislados (*Penicillium polonicum*

AMF16, *P. chrysogenum* AMF47 y 2 aislados (AMF40 y AMF74) afiliados a *P. cyclopium*) al conseguir crecer con petróleo crudo como única fuente de carbono en medio sólido, se utilizó diclorofenolindofenol un indicador redox del metabolismo microbiano que pasa del color azul a incoloro al reducirse por los electrones de la cadena respiratoria. Estos hongos no solo degradaron satisfactoriamente los hidrocarburos del petróleo, sino que también se observó la producción de biosurfactantes, lo que facilita la emulsificación y biodegradación del petróleo (MAAMAR *et al.*, 2020).

Este resultado indica que los hongos en estudio son prometedoras para aplicaciones de biorremediación de aguas contaminadas con diésel y pireno. Un enfoque futuro podría centrarse en optimizar las condiciones de cultivo y en la ingeniería de cepas con mayor eficiencia de degradación. Además, la aplicación en condiciones de campo debe ser evaluada para confirmar la viabilidad y efectividad de estas cepas.

5.3 Producción de biosurfactantes

Esta prueba se basa en el principio de que los biosurfactantes o bioemulsificante presentes en las muestras, al entrar en contacto con sustratos hidrofóbicos, alcanzarán una fase de equilibrio entre el sistema aceite/agua/biosurfactante y promoverán la solubilización para formar emulsiones. Consiguiendo a través de esta prueba mensurar la capacidad que tiene el analito para formar emulsiones estables entre dos líquidos inmiscibles, en este caso agua y oleo diésel, midiendo la relación entre el volumen emulsionado y el volumen total de la muestra analizada (SILVA, A. *et al.*, 2021).

El hongo FM14 fue el único que demostró actividad emulsificante, consiguiendo un índice de emulsificación del 17,5%. La producción de biosurfactantes por hongos de origen marino se encuentra bien reportado en la literatura, el aislamiento de *Trichoderma harzianum* MUT 290, del mar Mediterráneo con antecedentes de derrames de petróleo, produjo proteínas identificadas como cerato-platanin con propiedades biosurfactantes. Esta proteína presentó un IE_{24} de 70 hasta 83% (PITOCCHI *et al.*, 2020). En otro estudio se realizó la purificación una nueva proteína tensioactiva denominada Sap-*Pc* a partir de una cepa marina de *Penicillium chrysogenum*, llegando a tener un desempeño de EI_{24} del 70% tanto en condiciones neutras como alcalinas (CICATIELLO, P. *et al.*, 2019).

A pesar de que apenas un linaje fúngico presenta actividad emulsificante, podemos decir que los de ambientes marinos pueden presentar el potencial para producir moléculas con actividad emulsificante, característica que puede permitir la utilización del

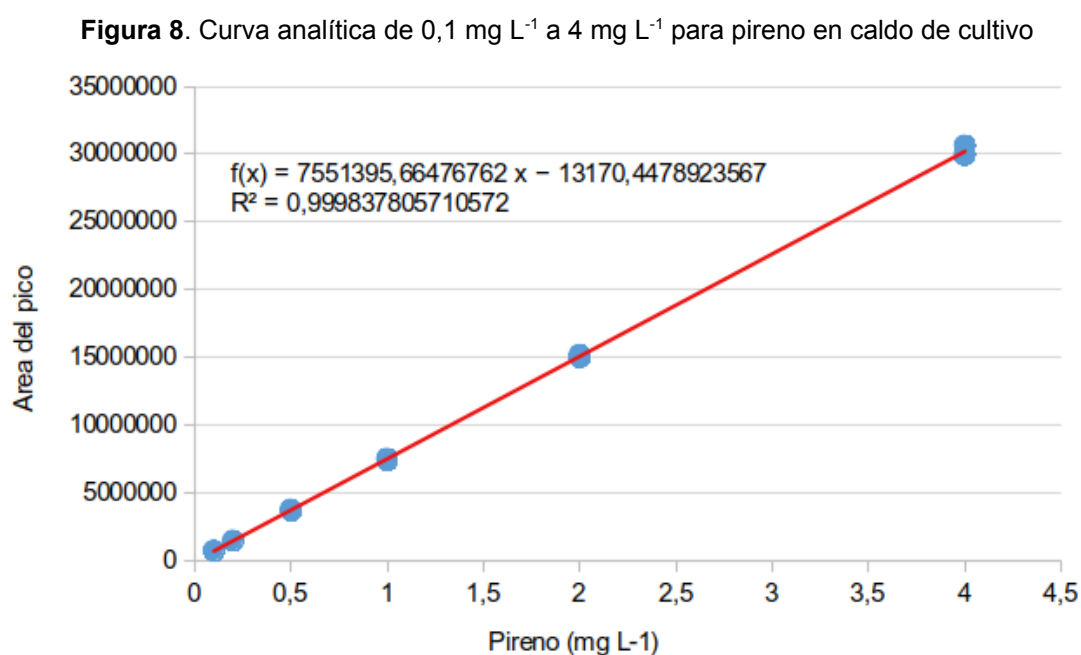
aislado FM14 en conjunto con otros microorganismos degradadores de contaminantes, en procesos de biorremediación en ambientes acuosos.

5.4 Validación de método quechers/liofilización

5.4.1 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a su capacidad (dentro de un rango lineal) de obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Evaluándose esta relación por medio de la regresión lineal, graficándose la respuesta frente a las concentraciones conocidas del analito obteniéndose la ecuación lineal (que sirve para predecir las concentraciones del analito en las muestras) y el coeficiente de correlación R^2 (indica qué tan bien se ajustan los datos experimentales a una relación lineal e idealmente debe ser cercano a 1) (INMETRO., 2020).

A partir de los parámetros obtenidos de la curva analítica, construida mediante regresión lineal entre la respuesta analítica y la concentración de la muestra estándar de pireno, se obtuvo la siguiente ecuación lineal: $y = 7.551.395,6648x - 13.170,45$ y con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9999$, como se muestra en la figura 8. Estos resultados demuestran una alta correlación de la curva, cumpliendo con las directrices establecidas por el INMETRO.



Fuente: del autor, 2024.

5.4.2 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) es la menor medida que puede ser detectada, pero no cuantificada dentro de un método. Por otro lado, el límite de cuantificación (LC) es la menor concentración del analito que puede ser analizado con precisión y exactitud. Los resultados de LD y LC utilizando los parámetros de la curva se presentan en la (Tabla 1). Se observa que el LC es mayor al menor punto del rango lineal, pero esto no represento un problema para el estudio debido a que el analito es previamente diluido para el análisis y el rango de trabajo se encuentra entre 2 a 4 mg L⁻¹.

Tabla 1. Parámetros de la curva analítica

Coeficientes de la ecuación lineal			Rango lineal (mg L ⁻¹)	LD 95% (mg L ⁻¹)	LC 95% (mg L ⁻¹)
lineal	angular	r			
-13170,45	7551395,6648	0,9999	0,1 – 4	0,082	0,123

Aviso: r = coeficiente de determinación; LD 95% Limite de detección con 95% de confianza; LC 95% Limite de cuantificación con 95% de confianza.

Fuente: del autor, 2024.

5.4.3 Precisión, exactitud y recuperación

Los parámetros de precisión, exactitud y recuperación fueron estimados en tres niveles de concentración, cada uno en triplicado. La precisión se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se define como la precisión de los resultados obtenidos por el mismo analista, metodología, equipamiento de medición y lugar, con intervalos de medición cortos. Por otra parte, la precisión intermedia evalúa las observaciones realizadas en intervalos de tiempo más extensos. En este estudio, la extracción y el análisis se realizaron en dos días diferentes, con un intervalo de 24 horas.

Se observa que los intervalos de desviación estándar relativa (%DPR) para la repetibilidad varían de 0,81% a 4,97%, y los de precisión intermedia, de 1,49% a 3,47%. Ambos intervalos no exceden los límites establecidos por las normativas del INMETRO y AOAC, que son 15% para concentraciones de 0,15 mg L⁻¹ y 11% para concentraciones de 3 mg L⁻¹. Según la normativa del INMETRO y AOAC, el límite de recuperación para las muestras con concentración de 0,15 a 3.00 mg L⁻¹ corresponde al intervalo de 80 a 110%. Así todos los parámetros presentados en la (Tabla 2) se encuentran dentro de los parámetros de aceptación. Lo cual nos indica que la metodología quechers/liofilización es una metodología adecuada para realizar los análisis de degradación de pireno.

Tabla 2. Precisión, exactitud y repetibilidad del método

	n = 10	Ct (mg L ⁻¹)	Cp (mg L ⁻¹)	% Exac.	Prec. Int.	Repet.	% Recup.
Nivel 1	\bar{X}	0,15	0,16	4,89	0,16	0,16	104,89
	%DPR		0,81		1,49	0,81	
Nivel 2	\bar{X}	0,70	0,72	2,57	0,713	0,72	102,57
	%DPR		2,52		2,44	2,52	
Nivel 3	\bar{X}	3.00	3,04	1,26	3,06	3,04	101,28
	%DPR		4,97		3,47	4,97	

Aviso: n = número de repeticiones; Ct = concentración teórica; Cp= Concentración predicha; %Exac = Porcentaje de exactitud; Prec. Int. = Precisión intermediaria; Repet. = Repetibilidad; % Recup. = Porcentaje de recuperación; \bar{X} = Media general de las concentraciones; % DPR = Porcentaje del Desvío Padrón Relativo.

Fuente: del autor, 2024.

5.5 Degradación de pireno por hongos de origen marino

Se escogieron los hongos (FM02, FM14 y FM16) que mostraron una buena eficiencia en las pruebas de selección, para dar paso a la cuantificación de la degradación de pireno por HPLC. En la (Tabla 3) se muestran los resultados para el análisis cromatográfico en la cual se utilizó la siguiente ecuación lineal ($y = 7551395,6648x - 3170,45$) para calcular la concentración de pireno en la alícuota, cabe mencionar que a través del análisis solo se puede detectar el pireno que no fue degradado. Para inferir la tasa de degradación se debe considerar las concentraciones de las soluciones: muestra original (66,67 mg L⁻¹), muestra concentrada (200 mg L⁻¹) y la alícuota (4 mg L⁻¹).

La degradación media observada para los hongos fue: FM02 (34,48 ± 1,54%) FM14 (39,40 ± 0,76%) y FM16 (50,31 ± 0.83%) después de 8 días a 28 °C de incubación con concentración inicial de 66 mg mL⁻¹ de pireno, como muestra en la (Tabla 4).

Estos hallazgos son coherentes con estudios previos que demuestran el potencial de los hongos marinos en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), como el pireno, en ambientes marinos (PASSARINI *et al.*, 2011; BIROLLI *et al.*, 2018). En el primer estudio observaron resultados destacables con la cepa fúngica *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, que logró un 99% de biodegradación de pireno, a partir de una concentración inicial de pireno a 66 mg mL⁻¹ después de 8 días de crecimiento en medio líquido (PASSARINI *et al.*, 2011).

En estudios de optimización para producir para mejorar la degradación de HPAs, la cepa fúngica *Marasmiellus* sp. CBMAI 1062 aislada de esponjas marinas, mostro una eficacia excepcional al conseguir degradar 98% de pinero, a partir de una concentración inicial de 80 mg mL⁻¹ en tan solo 48 horas. Además, consiguieron detectar metabolitos intermediarios de la

degradación de pireno, consiguiendo dilucidar el posible mecanismo de degradación utilizando el sistema del citocromo P450 y epóxido hidrolasas (VIEIRA *et al.*, 2018).

Tabla 3. Resultados del análisis de degradación de pireno por HPLC

Resultados de la degradación de pireno después de 4 días					
Muestras	Áreas	Concentración de pireno (mg L ⁻¹)			
		Alícuota	Concentrado	M. original	Degradado
FM02	20596462,40	2,73	136,46	45,49	21,18
FM02	20551919,00	2,72	136,17	45,39	21,28
FM02	19189641,81	2,74	137,08	45,69	20,97
FM14	22623428,45	3,00	149,88	49,96	16,71
FM14	22304946,02	2,96	147,77	49,26	17,41
FM14	22350110,36	2,96	148,07	49,36	17,31
FM16	19690825,01	2,61	130,47	43,49	23,18
FM16	19672018,21	2,61	130,34	43,45	23,22
FM16	19322664,14	2,56	128,03	42,68	23,99

Resultados de la degradación de pireno después de 8 días					
Muestras	Áreas	Concentración de pireno (mg L ⁻¹)			
		Alícuota	Concentrado	M. original	Degradado
FM02	20022432,94	2,65	132,66	44,22	22,45
FM02	19242537,20	2,55	127,50	42,50	24,17
FM02	20069657,65	2,66	132,97	44,32	22,34
FM14	18027547,75	2,39	119,45	39,82	26,85
FM14	18437921,46	2,44	122,17	40,72	25,94
FM14	18407288,04	2,44	121,97	40,66	26,01
FM16	14731399,04	1,95	97,63	32,54	34,12
FM16	15234683,34	2,02	100,96	33,65	33,01
FM16	15017756,91	1,99	99,52	33,17	33,49

Fuente: del autor, 2024.

Tabla 4. Media de los porcentajes de degradación de pireno por hongos marinos

Muestras	Día 4	Día 8
FM02	31,71 ± 0,24%	34,48 ± 1,54%
FM14	25,71 ± 0,57%	39,40 ± 0,76%
FM16	35,19 ± 0,67%	50,31 ± 0,83%

Fuente: del autor, 2024.

En un estudio reciente sobre hongos aislados del subsuelo marino, observaron que conseguían degradar HPAs. Entre ellos, el hongo de podredumbre blanca *Schizophyllum*

commune 20R-7-F01 exhibió la degradación más alta de pireno y después de 10 días de incubación anaeróbica. Consiguieron también correlacionar de forma positiva el crecimiento fúngico con la utilización de HPAs como única fuente de carbono. Además, observaron que la degradación era realizada por enzimas carboxilasas y no por enzimas ligninolíticas, lo cual indica que estos hongos poseen mecanismos diferentes de utilizar HPAs como fuente de energía. Convirtiendo a estos hongos en candidatos perfectos para biorremediar ambientes anóxicos (MUHAMMAD *et al.*, 2022).

Así como estos estudios existen otros más que buscan seleccionar hongos de origen marino o terrestres para degradar HPAs, en la (Tabla 5) se resumen algunos estudios más destacados de la última década. Por medio de estos estudios podemos observar que las especies de hongos que presentan mayor potencial en degradar pireno pertenecen al filo *Ascomycota* y *Basidiomycota*.

Tabla 5. Hongos de origen marino o terrestre que presentaron altas tasas de degradación de pireno

Hongos	Local de origen	Condiciones	Ci-Pireno	Degradación	Referencias
<i>Aspergillus sclerotiorum</i> CBMAI 849	Costas de São Paulo - Brasil	Aeróbica; 30°C, 8 días	66 mg L ⁻¹	99%	PASSARINI <i>et al.</i> , 2011.
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> PZ-4	Suelo contaminado HPAs	Aeróbica; 28°C, 30 días	100 mg L ⁻¹	64%	MAO; GUAN, 2016.
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	Esponja marina São Paulo - Brasil	Aeróbica; 32°C, 21 días	50 mg L ⁻¹	62%	BIROLLI <i>et al.</i> , 2018.
<i>Marasmiellus</i> sp. CBMAI 1062	Esponja marina (<i>Dragmacidon reticulatum</i>)	Aeróbica; 28°C, 2 días	80 mg L ⁻¹	98%	VIEIRA <i>et al.</i> , 2018.
<i>Tolypocladium</i> sp. CBMAI 1346	Esponja marina São Paulo - Brasil	Aeróbica; 28°C, 7 días	40 mg L ⁻¹	94%	VASCONCELO S <i>et al.</i> , 2019.
<i>Schizophyllum commune</i> 20R-7-F01	Subsuelo marino	Anaeróbica; 30°C, 10 días	50 mg L ⁻¹	18%	MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2022.

Fuente: del autor, 2024.

En este contexto, se realizó la secuenciación del gen rDNA ITS, por una empresa prestadora de servicios, identificando como *Penicillium* spp a FM16 y FM02, así como *Trichoderma Koningiopsis* a FM14. A pesar, que exhibieron resultados sobresalientes tanto en tolerancia a compuestos derivados del petróleo como en degradación de HPA pireno, no se logró detectar la presencia de metabolitos intermedios menos tóxicos, como el pirenilsulfato. La degradación de PAHs puede estar mediada tanto por enzimas intracelulares, como la monooxigenasa, como por enzimas extracelulares, conocidas como enzimas ligninolíticas (VIRUÉS-SEGOVIA, J. R. *et al.*, 2023).

6 CONCLUSIÓN

Los resultados del estudio resaltan el potencial biotecnológico de los hongos filamentosos marinos para la biorremediación de ambientes acuáticos contaminados con compuestos derivados del petróleo. Además, se señala la necesidad de más investigación para caracterizar las enzimas involucradas en la degradación de pireno y para identificar posibles metabolitos intermediarios de la degradación. La variabilidad en la eficiencia de degradación entre las tres especies de hongos podría estar relacionada con diferencias metabólicas y adaptativas, así como con factores ambientales y nutricionales.

En conclusión, este estudio proporciona nuevas perspectivas sobre el potencial de los hongos filamentosos marinos en la degradación de PAHs y destaca la importancia de continuar investigando y desarrollando estrategias de biorremediación efectivas para abordar los problemas de contaminación ambiental.

7 REFERÊNCIAS

ADENIJI, A.; OKOH, O.; OKOH, A.. *Petroleum hydrocarbon profiles of water and sediment of Algoa Bay, Eastern Cape, South Africa. International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 14, n. 10, p. 1263, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph14101263>>.

ADNAN, M. et al.. *Physiological and molecular characterization of biosurfactant producing endophytic Fungi Xylaria regalis from the cones of Thuja plicataas a potent plant growth promoter with Its potential application. BioMed Research International*, v. 2018, n. 7362148, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2018/7362148>>.

AGRAWAL, N.; SHAHI, S. K.. *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) using novel fungal strain Corioloopsis byrsina strain APC5. International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 122, p. 69–81, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.024>>.

ALI, W. B. et al.. *Screening of five marine-derived fungal strains for their potential to produce oxidases with laccase activities suitable for biotechnological applications. BMC Biotechnology*, v. 20, n. 01, 2020. Disponível em: <<https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-020-00617-y>>.

AMEEN, F. et al.. *Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 23, n. 2, p. 211–218, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.005>>.

ARIFEEN, M. Z. ul et al.. *Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungi isolated from anaerobic coal-associated sediments at 2.5 km below the seafloor. Chemosphere*, v. 303, n. 02, p. 135062, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135062>>.

BERNAL, S. P. F. et al.. *Biotechnological potential of microorganisms from textile effluent: isolation, enzymatic activity and dye discoloration. Anais da Academia Brasileira de*

Ciências, v. 93, n. 04, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0001-3765202120191581>>.

BIROLLI, W. G. *et al.*. Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. **Marine Pollution Bulletin**, v. 129, n. 02, p. 525-533, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.023>>.

CAO, H. *et al.*. Enzyme activities during Benzo[a]pyrene degradation by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* isolated from a polluted soil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 01, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-57692-6>>.

CARLOS, L. de M. *et al.*. Bioprospecting the potential of the microbial community associated to Antarctic marine sediments for hydrocarbon bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 01, p. 471-485, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-023-01199-5>>.

CERNIGLIA, C.; SUTHERLAND, J.. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, p. 2079-2110, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4_151>.

CICATIELLO, P. *et al.*. Characterization of a surface-active protein extracted from a marine strain of *Penicillium chrysogenum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3242, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20133242>>.

COOPER, D.; GOLDENBERG, B.. Surface-active agents from two bacillus species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>>.

CVETKOVIC, J. *et al.*. Optimization of the QuEChERS extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 08, n. 07, p. 1711-1720, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C5AY03248B>>.

DELL' ANNO, F. *et al.*. *Bacteria, fungi and microalgae for the bioremediation of marine sediments contaminated by petroleum hydrocarbons in the Omics Era. **Microorganisms***, v. 09, n. 08, p. 1695, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081695>>.

DOMINGO, J.; NADAL, M.. *Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the scientific literature. **Food and Chemical Toxicology***, v. 86, p. 144-153, 2015. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.002>>.

DURAN, R.; CRAVO-LAUREAU, C.. *Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. **FEMS Microbiology Reviews***, v. 40, n. 06, p. 814-830, 2016. Disponible en: <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuw031>>.

ELSHAFIE, A. *et al.*. *Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. **Marine Pollution Bulletin***, v. 54, n. 11, p. 1692-1696, 2007. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.06.006>>.

EWA, B.; DANUTA, M.. *Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. **Journal of Applied Genetics***, v. 58, n. 03, p. 321-330, 2016. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>>.

FARHADIAN, A. *et al.*. *Effects of marinating on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and fluoranthene) in grilled beef meat. **Food Control***, v. 28, n. 02, p. 420-425, 2012. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.034>>.

GAO, P. *et al.*. *Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolomics perspective. **Environment International***, v. 119, p. 466-477, 2018. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.017>>.

GERESLASSIE, T. *et al.*. *Occurrence and ecological and human health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils from Wuhan, Central China. **International***

Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 12, p. 2751, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph15122751>>.

GHOSAL, D. *et al.*. Current state of knowledge in microbial degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in Microbiology*, v. 07, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>>.

HONDA, M.; SUZUKI, N.. Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 04, p. 1363, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph17041363>>.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo**. DOQ-CGCRE-008, n. 09, junho 2020. Brasília: INMETRO, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/cdtn/pt-br/assuntos/documentos-cgcre-abnt-nbr-iso-iec-17025/doq-cgcre-008/view>>.

JAKOVLJEVIĆ, I. *et al.*. Pollution sources and carcinogenic risk of PAHs in PM1 particle fraction in an urban area. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 24, p. 9587, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph17249587>>.

KIRAN, G. *et al.*. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 73, n. 02, p. 250-256, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.05.025>>.

KUBICKI, S. *et al.*. Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. *Marine Drugs*, v. 17, n. 07, p. 408, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/md17070408>>.

KUIPER, I. *et al.*. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 01, p. 97-113, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x>>.

LEE, A. H. *et al.*. *A proposed stepwise screening framework for the selection of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading white rot fungi*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 05, p. 767-783, 2020. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s00449-019-02272-w>>.

LIU, S. *et al.*. *Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: a mini review*. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 25-33, 2017. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095>>.

MAAMAR, A. *et al.*. *Highlighting the crude oil bioremediation potential of marine fungi isolated from the Port of Oran (Algeria)*. **Diversity**, v. 12, n. 05, p. 196, 2020. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/d12050196>>.

MAGRINI, M. J.. ***Degradação de HAPs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas***. Asesores: SETTE, L. D. (asesora); SANTOS, R. C. B. (co-asesora). 91 f.. Disertación (Maestría) - PPG-GBM (Programa de Posgrado en Genética y Biología Molecular), UNICAMP (Universidad del Estado de Campinas), Campinas, 2012. Disponible en: <<https://hdl.handle.net/20.500.12733/1618592>>.

MANOUSHI, N.; ZACHARIADIS, G.. *Recent advances in the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental samples*. **Molecules**, v. 25, n. 09, p. 2182, 2020. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/molecules25092182>>.

MAO, J.; GUAN, W.. *Fungal degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Scopulariopsis brevicaulis* and its application in bioremediation of PAH-contaminated soil*. **Acta Agricultura e Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 66, n. 05, p. 399-405, 2016. Disponible en: <<https://doi.org/10.1080/09064710.2015.1137629>>.

MOJIRI, A. *et al.*. *Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments*. **Science of The Total Environment**, v. 696, p. 133971, 2019. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>>.

MOREIRA, L. B. *et al.*. *Sediment contamination and toxicity of Marine Protected Areas in southeastern Brazilian coast: a baseline for management planning*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 170, p. 112613, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112613>>.

MUTHUKAMALAM, S. *et al.*. *Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 04, p. 637-647, 2017. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.007>>.

NUNES, B. Z. *et al.*. *Marine protected areas affected by the most extensive oil spill on the Southwestern Atlantic coast*. **Ocean and Coastal Research**, v. 71, n. suppl 02, 2023. Disponible en: <<https://doi.org/10.1590/2675-2824071.22153bzn>>.

PASSARINI, M. R. Z. *et al.*. *Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 02, p. 364-370, 2011. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.10.003>>.

PATEL, A. *et al.*. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, toxicity, and remediation approaches*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.562813>>.

PITOCCHI, R. *et al.*. *Cerato-platanins from marine fungi as effective protein biosurfactants and bioemulsifiers*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 08, p. 2913, 2020. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/ijms21082913>>.

QIN, P. *et al.*. *Optimization of laccase from Ganoderma lucidum decolorizing remazol brilliant blue R and Glac1 as main laccase-contributing gene*. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3914, 2019. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/molecules24213914>>.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA-TICLO, D.; VERMA, A. K.. *Treatment of colored effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine-derived fungi*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 03-04, p. 189-206, 2008. Disponible en: <<https://doi.org/10.1080/10408410802526044>>.

RAJHANS, G. *et al.* *Degradation of dyes by fungi: an insight into mycoremediation.* **BioTechnologia**, v. 102, n. 04, p. 445-455, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.5114/bta.2021.111109>>.

RECABARREN-VILLALÓN, T. V. *et al.* Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en ambientes marinos: una revisión de América. **JAINA Costas y Mares ante el Cambio Climático**, v. 01, n. 02, p. 19-40, 2020. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.26359/52462.0819>>.

RIBEIRO, F. A. de L. *et al.* *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados.* **Química Nova**, v. 31, n. 01, p. 164-171, 2008. Disponible en: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100029>>.

ROSEIRO, L. C.; GOMES, A.; SANTOS, C.. *Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product.* **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 06, p. 1340-1345, 2011. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.017>>.

RUBERG, E. J.; ELLIOTT, J. E.; WILLIAMS, T. D.. *Review of petroleum toxicity and identifying common endpoints for future research on diluted bitumen toxicity in marine mammals.* **Ecotoxicology**, v. 30, n. 04, p. 537-551, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s10646-021-02373-x>>.

SAMPAIO, G. *et al.* *Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: biological effects, legislation, occurrence, analytical methods, and strategies to reduce their formation.* **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/ijms22116010>>.

SANCHES, M. A. *et al.* *Production of biosurfactants by Ascomycetes.* **International Journal of Microbiology**, v. 2021, p. 01-11, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1155/2021/6669263>>.

SANTOS, R. C. B.; LUCIA, R.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D.. *The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, n. 05, p. 2333-2345, 2011. Disponible en: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11270-011-1027-y>>.

SILVA, A. da et al.. *Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 2003-2034, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s00449-021-02597-5>>.

SILVA, M. da et al.. *Cnidarian derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening*. **Environmental Technology**, v. 29, n. 12, p. 1331-1339, 2008. Disponible en: <<https://doi.org/10.1080/09593330802379466>>.

SILVA, M. da et al.. *Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus Cyclothyrium sp.*. **Chemosphere**, v. 57, n. 08, p. 943-952, 2004. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.051>>.

SLÁMOVÁ, T. et al.. *Application of QuEChERS-EMR-Lipid-DLLME method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food of animal origin*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 87, n. 103420, 2020. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103420>>.

SYAFIUDDIN, A.; FULAZZAKY, M. A.. *Decolorization kinetics and mass transfer mechanisms of Remazol Brilliant Blue R dye mediated by different fungi*. **Biotechnology Reports**, v. 29, p. e00573, mar. 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00573>>.

TIAN, Y. et al.. *Organic compound source profiles of PM_{2.5} from traffic emissions, coal combustion, industrial processes and dust*. **Chemosphere**, v. 278, p. 130429, 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130429>>.

VASCONCELOS, M. R. S. *et al.*. *Pyrene degradation by marine-derived ascomycete: process optimization, toxicity, and metabolic analyses*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p. 12412-12424, 2019. Disponible en: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04518-2>>.

VAZQUEZ, G. B. *et al.*. *Uso de biosurfactantes extraídos de los licores de lavado de maíz para la eliminación de aceite quemado de motor en suelo arenoso*. **Agrociencia**, v. 52, n. 04, p. 581-591, 2018. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000400581>.

VIRUÉS-SEGOVIA, J. R. *et al.*. *Marine-derived fungi as biocatalysts*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023. Disponible en: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1125639>>.

WIKKEE, S. *et al.*. *Characterization and dye decolorization potential of two laccases from the marine-derived fungus Pestalotiopsis sp.*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 08, p. 1864-1864, 2019. Disponible en: <<https://doi.org/10.3390/ijms20081864>>.

WU, C. *et al.*. *Genetically engineered microbial remediation of soils co-contaminated by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons: advances and ecological risk assessment*. **Journal of Environmental Management**, v. 296, p. 113185, out. 2021. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113185>>.