



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS  
AMBIENTAIS**

**IANNE BATISTA NOGUEIRA**

**CONVERSÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL  
NA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR  
*Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 E APLICAÇÃO NA  
REMOÇÃO DE POLUENTE HIDROFÓBICO**

**Recife, 2019**

**IANNE BATISTA NOGUEIRA**

**CONVERSÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL  
NA PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR  
*Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 E APLICAÇÃO NA  
REMOÇÃO DE POLUENTE HIDROFÓBICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki

**Recife, 2019**

Nogueira, Ianne Batista

Conversão de resíduo agroindustrial na produção de bioemulsificante por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 e aplicação na remoção de poluente hidrofóbico, 2019.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

1. Bactéria gram-negativa. 2. Óleo soja pós-fritura. 3. Tensoativo. 4. Biossurfactante.
- Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais

Ianne Batista Nogueira

**CONVERSÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL NA PRODUÇÃO DE  
BIOEMULSIFICANTE POR *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 E  
APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE POLUENTE HIDROFÓBICO**

**Examinadores:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Galba Maria de Campos Takaki  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof. Dr Marcos Antônio Barbosa de Lima  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

---

Prof. Dr Roberto Albuquerque Lima  
Universidade São Miguel – UNISAOMIGUEL

Aprovada em 19 de fevereiro de 2019.

Coordenadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Dedico este trabalho:  
A Deus,  
Aos meus pais, e  
Evanize B. Ferreira, minha mãe de coração.  
Expresso toda minha gratidão pelo amor e  
ensinamentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de realizar os sonhos.

À Universidade Católica de Pernambuco, ao Magnífico Reitor Prof<sup>o</sup> Dr. Pe. Pedro Rubem de Ferreira, pela oportunidade para a realização do curso.

À CAPES ( Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Galba Maria de Campos Takaki, minha orientadora, pela oportunidade e confiança, pelos ensinamentos que foram fundamentais para a realização desta dissertação.

Às Dr<sup>a</sup> Dayana Montero Rodriguez e Dr<sup>a</sup> Rosileide Andrade Fontenele, por todo auxílio dispensados na realização desta Dissertação.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco, pelo uso dos laboratórios e de diversos recursos que gentilmente disponibilizou.

Aos colegas do laboratório, Ana Paula Bione, Amanda Barbosa Lins, Marcos Antônio Cavalcanti Luna, Adriana Ferreira, Daylin Rubio Ribeaux, Israel Gonçalves, Davi Lima, Nadielly Regina Andrade, Daniele Souza, e todos do laboratório do NPCIAMB, pelo apoio, companherismo conhecimentos e experiências partilhadas.

Aos técnicos dos laboratórios do NPCIAMB, Severino Humberto de Almeida pela atenção e apoio prontamente prestados e em especial, a André Felipe pela amizade e companherismo. Aos funcionários do NPCIAMB, em especial à Sônia Maria de Souza.

Aos órgãos de fomento à pesquisa, CAPES, FACEPE e CNPq.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1.Introdução</b> .....	8
<b>2. Objetivos e Metas</b> .....	12
<b>3 Revisão De Literatura</b> .....	13
3.1 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	13
3.1.1 Potencial biotecnológico da <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	14
3.2 Surfactantes .....	15
3.3 Biossurfactantes .....	16
3.3.1 Classificação dos biossurfactantes .....	17
3.3.2 Propriedades dos biossurfactantes .....	19
3.3.2.1 Tensão superficial e interfacial .....	19
3.3.2.2 Concentração Micelar Crítica (CMC).....	20
3.3.2.3 Formação de emulsões .....	20
3.3.3 Capacidade molhante, solubilizante e dispersante de petroderivados .....	21
3.3.4 Influência da fonte de carbono e nitrogenio na produção de biossurfactantes .....	21
3.3.5 Fatores físico-quimico que influenciam a produção.....	21
3.3.6 Vantagens dos biossurfactantes.....	21
3.3.7 Aplicações industriais dos biossurfactantes.....	22
3.3.7.1 Biorremediação de derivados do petróleo.....	23
3.4 Emulsificantes .....	23
3.5 Bioemulsificantes .....	25

3.5.1	Produção de bioemulsificante.....	26
3.5.1.1	Fatores que influenciam a produção de bioemulsificante.....	26
3.5.2	Bioemulsificante produzidos por <i>S. maltophilia</i> UCP 1601.....	27
3.5.3	Produção de bioemulsificante por substratos renováveis .....	27
3.5.4	Aplicações dos bioemulsificantes .....	27
3.5.4.1	Aplicação nos bioprocessos .....	28
3.5.4.2	Aplicação na indústria farmacêutica.....	28
3.5.4.3	Aplicação na indústria petroquímica.....	28
3.5.4.4	Aplicação na indústria alimentícia .....	28
3.6	Resíduos agroindustriais.....	29
3.6.1	Óleo de soja residual .....	30
<b>4</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>– Artigo Científico.....</b>	<b>43</b>
	Conversão de resíduo agroindustrial na produção de emulsificante por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> UCP 1601 e aplicação em processo de biorremediação.....	43
	Resumo.....	44
	1.Introdução.....	45
	2. Materiais e métodos .....	46
	3. Resultados e discussão .....	50
	4. Conclusão.....	59
	Referências bibliográficas .....	60
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>.....</b>	<b>68</b>
	<b>Conclusões Gerais .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

Figura 1 - Características macroscópicas de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> em meio sólido.....	13
Figura 2- Molécula de tensoativo (Surfactante).....	15
Figura 3- A influência do biossurfactante na tensão superficial.....	20
Figura 4 - Monômeros formando micelas. ....	20
Figura 5- Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias.....	23
Figura 6 Esquema de possíveis mecanismos de desestabilização da emulsão.....	58
Figura 7. Característica hidrofílica e hidrofóbica do emulsificante.....	58

### Capítulo II

Figura 1. Índice de emulsificação do biossurfactante bruto produzido por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> UCP 1601 produzido nas condições 4 e 6 do planejamento fatorial completo 2 <sup>4</sup> , utilizando diferentes substratos hidrofóbicos.....	53
Figura 2. Estabilidade do bioemulsificante produzido por <i>S. maltophilia</i> UCP 1601 frente a diferentes valores de pH (A), temperatura (B) e concentrações de NaCl (C).....	56
Figura 3. Área de dispersão do óleo motor queimado, de acordo com o composto dispersante utilizado: água destilada (A), detergente comercial (B), Tween 80 (C) e biossurfactante bruto produzido por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> UCP 1601 (D).....	58
Figura 4 Teste de antibiograma por <i>S.maltophilia</i> UCP 1601.....	58
Figura 5 A bactéria <i>S.maltophilia</i> UCP 1601 apresentou mobilidade após período de 24h.....	58

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por bactérias. ....	16
--	----

### Capítulo II

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo $2^4$ para a produção de tensoativos por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> UCP 1601. ....	48
---	----

Tabela 2. Planejamento fatorial completo $2^4$ utilizado para a produção de biotensoativos por <i>S. maltophilia</i> UCP 1601 após 96 h de cultivo no meio contendo 10% óleo de soja pós-fritura. Os ensaios foram realizados em triplicata e se mostram os valores médios de tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (ÍE), utilizadas como variáveis resposta. ....	52
--	----

## RESUMO

Biossurfactantes são moléculas de superfície ativa produzidas por micro-organismos e que têm recebido crescente interesse, considerando as vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH e temperatura e estabilidade. Estudos foram realizados avaliando o potencial de produção de biossurfactante, bem como emulsificante pela bactéria móvel *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601, isolada de solo argiloso das margens do rio Capibaribe (PE, Brasil), com sensibilidade aos antibióticos ceftazidina, levofloxacina, minociclina, clorofenicol, norfloxacina, eritromicina e nitrofurantoína; e demonstrou resistência a clindamicina, cefdoxacina e amoxicilina. Neste sentido, foi utilizado o teste de hemólise em ágar adicionado de sangue de carneiro para avaliar a produção de biossurfactante por *S. maltophilia*, sendo observado um halo de 9 mm. A partir da confirmação da produção de biossurfactante, investigações foram realizadas com fermentação submersa em meio mineral salino suplementado com 10% de óleo de soja pós-fritura (OSPF), diferentes concentrações de glicose, peptona, ZnCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub>, de acordo a um planejamento fatorial completo de 2<sup>4</sup>. Os resultados obtidos demonstraram que na mesma condição 6 (4% de glicose, 1% de peptona, 2,72% de ZnCl<sub>2</sub> e 2,46% de MgSO<sub>4</sub>) observou-se um elevado índice de emulsificação de 82,74%, com óleo motor queimado. Novos estudos foram realizados com o bioemulsificante para avaliar a estabilidade, caracterização e aplicação ambiental. O bioemulsificante produzido demonstrou ser estável nas condições testadas de diferentes temperaturas, pH e concentrações de cloreto de sódio, confirmado pelo índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>) de 78.57, 54.07 e 58.62%, utilizando os óleos de soja, milho e diesel, respectivamente. O rendimento do bioemulsificante produzido por fermentação submersa foi de 2,8g/L, demonstrando caráter aniônico, com molécula constituída por proteínas (28,2%), carboidratos (14,7%) e lipídeos (37,6%), indicando ser uma biomolécula polimérica. O novo bioemulsificante demonstrou potencial promissor para áreas contaminadas com compostos hidrofóbicos, exibindo habilidade para reduzir a viscosidade de óleo de soja residual e do óleo motor queimado, bem como excelente capacidade de dispersão de óleo motor queimado em água, com 69,94 cm<sup>2</sup> de área de deslocamento de óleo (ODA), além de remover 71,7% de derivado do petróleo a partir de solo arenoso. Os resultados obtidos com o bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* indicam sua aplicabilidade em processos promissores de biorremediação de áreas contaminadas com compostos hidrofóbicos.

Palavras-chave: Bactéria gram-negativa, contaminantes hidrofóbicos, bioemulsificante.

## ABSTRACT

Biosurfactants are active surface molecules produced by microorganisms that have received increasing interest considering the advantages they have over chemical surfactants, such as biodegradability, low toxicity, production from renewable sources, and functionality under extreme conditions of pH, temperature and stability. The studies were carried out evaluating the potential of biosurfactant and emulsifier by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601, isolated from clay soil on the banks of the Capibaribe River (PE, Brazil), with sensitivity to the antibiotics ceftazidime, levofloxacin, minocycline, chlorofenicol, norfloxacin, erythromycin and nitrofurantoin ; and demonstrated resistance to clindamycin, cefdoxacin and amoxicillin. In this sense, the hemolysis test was used in sheep blood agar to evaluate the production of biosurfactant by *S. maltophilia*, with halo of 9 mm. After the confirmation of the biosurfactant production, investigations were carried out with submerged fermentation in saline mineral medium supplemented with 10% post-fry soybean oil (PFSO), different concentrations of glucose, peptone, ZnCl<sub>2</sub> and MgSO<sub>4</sub>, according to a % glucose, 1% Peptone, 2.72% ZnCl<sub>2</sub> and 2.46% MgSO<sub>4</sub>) had a high emulsification rate of 82.74% with burned engine oil. Other studies were carried out with the bioemulsifier to evaluate stability, characterization and environmental application. The bioemulsifier was stable under the tested conditions of different temperatures, pH and sodium chloride concentrations and confirmed by the emulsification index (IE<sub>24</sub>) of 78.57, 54.07 and 58.62%, using soybean, corn and diesel, respectively. The yield of the bioemulsifier produced by the submerged fermentation was 2.8 g / l, presenting an anionic character, with a molecule constituted by proteins (28.2%), carbohydrates (14.7%) and lipids (37.6%), indicating a polymeric biomolecule. The new bioemulsifier demonstrated promising potential for areas contaminated with hydrophobic compounds, exhibiting the ability to reduce the viscosity of residual soybean oil and burned engine oil, as well as excellent dispersion capacity of burnt-out engine oil with an area of 69.94 cm<sup>2</sup> oil displacement (ODA), in addition to removing 71.7% of the oil derivative from the sandy soil. The results obtained with the bioemulsifier produced by *S. maltophilia* indicate its applicability in promising processes of bioremediation of areas contaminated with hydrophobic compounds.

Key words: Gram-negative bacteria, hydrophobic contaminants, bioemulsifiers.

# **CAPÍTULO I**

## 1. Introdução

Os surfactantes são compostos de superfície ativa, que apresentam duas porções, uma polar (cabeça) e uma apolar (cauda) e com propriedade de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos ou entre uma fase líquida e uma fase sólida. Os surfactantes são classificados em dois grupos: sintético e surfactante natural (biosurfactante) (SHARMA et al., 2017). Compostos tensoativos possuem a capacidade de misturar fases e polaridades distintas formando agregados moleculares ou micelas (RODRIGUES et al., 2010; MAHJOURI et al., 2013; FERNANDES et al., 2017).

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas, que apresentam em sua molécula uma porção apolar, um hidrocarboneto, solúvel em óleo e uma extremidade polar solúvel em água que aumentam a estabilidade cinética das emulsões (SHAW, 1975; CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; OLIVEIRA et al., 2004; FRANGE; GARCIA, 2009; CAMPOS et al., 2013 ; INÈS- DHOUBA, 2015; UZOIGWE, 2015; KALE, 2017). Os bioemulsificantes, produzidos por micro-organismos, são biopolímeros capazes de estabilizar emulsões aumentando sua estabilidade cinética em função de sua composição química (CALVO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; UZOIGWE, et al., 2015). Assim como os biosurfactantes, os bioemulsificantes apresentam propriedades e funções fisiológicas distintas, apresentando estabilidade frente a amplas faixas de pH, temperatura e salinidade, baixa toxicidade e elevada biodegradabilidade, que os tornam promissores frente aos surfactantes químicos em aplicações ambientais (NOOMAN et al., 2017). Destaca-se o uso de biosurfactantes na produção de substratos renováveis (VESHAREH et al., 2018).

Neste sentido, investigações com a produção de bioemulsificantes são fortalecidas considerando sua ampla aplicabilidade em diversas áreas, principalmente farmacêutica, biomédica e na indústria de alimentos; contudo, a sua maior aplicação vem sendo na indústria do petróleo (ALMATAWAH et al., 2017).

A produção industrial e a comercialização em grande escala dos biosurfactantes ainda é limitada, devido aos elevados custos dos substratos utilizados para sua produção, podendo levar até 30%. Assim, a busca de um custo competitivo, torna-se uma estratégia fundamental para redução do custo da produção. Os substratos renováveis, em especial, resíduos agroindustriais, vem sendo aplicados na produção de bioprodutos como os biosurfactantes. Adicionalmente, ressalta-se que os substratos agroindustriais contêm elevados níveis de carboidratos

ou de lipídeos que suprem a necessidade de fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (ROVINA ; EHRHARDT, 2018).

Os hidrocarbonetos de petróleo (PHs) são considerados os principais fonte e materiais para diferentes indústrias. Muitas ameaças existem no ambiente quando os PHs são usados como fontes de energia. Os PHs são importantes poluentes ambientais produção em larga escala, transporte, refino de petróleo costeiro, produção de petróleo offshore. Atividades humanas causam poluição por hidrocarbonetos de petróleo que impacta o meio ambiente e representa um risco de saúde direto ou indireto às formas de vida. O tratamento biológico é um método alternativo de remoção de poluentes não causando efeitos deletérios ao meio ambiente, além de ser menos oneroso que outras técnicas. Biorremediação é um ramo da biotecnologia ambiental considerada um dos processos mais promissores, fundamentado na capacidade de micro-organismos ou plantas para degradar ou remover contaminantes ambientais, transformando e removendo poluentes orgânicos e inorgânicos (HLIHOR,et al., 2017). O sucesso da biorremediação depende integralmente da biodegradação de poluentes, acessibilidade do organismo poluidor-degradante e atividade biológica otimização. Portanto, a biorremediação é o método mais eficiente e aceito de tecnologias que possibilitam a remoção de contaminantes ou redução do número de contaminantes menos prejudiciais ( LUNA et al., 2018).

Bactérias, leveduras e fungos podem degradar ou remover os PHs. Bactéria como a *Stenotrophomona maltophilia* é um microrganismos que podem degradar persistentes poluentes,apesar do potencial patogênico (VARJANI; UPASANI, 2016; HASANUZZAMAN et al., 2007; ARULAZHAGAN et al., 2010; COSTA et al., 2012; SAJNA et al., 2015).

Estudos com a *S. maltophilia* demosntrou o seu potencial biotecnológico na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como também na produção da enzima lipase e biossurfactante com evidência de que é capaz de produzir o biossurfactante do tipo ramnolípídeo e estudos vêm utilizados substratos hidrofóbicos, como óleo de soja pós-fritura, para a produção de biossurfactantes e/ou bioemulsificante, minimizando a geração de resíduos poluentes no ambiente (PELIZER et al., 2007; KIM et al., 2009; LANGANKE, 2011; SARUBBO et al., 2007, RUFINO et al., 2008, SOUZA et al., 2012, SANTOS et al., 2013; DEEPALI et al., 2014; LARIK et al., 2018).

Neste sentido, estudos são fundamentais para investigar novos micro-organismos, bem como substratos renováveis e estratégias científicas, tecnológicas e inovadoras na busca de novas moléculas com atividades surfactantes.



## **2. Objetivos e Metas**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produzir e caracterizar o bioemulsificante isolado de *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601, utilizando substrato renovável e convencional e investigar a ação detergente na remoção de poluente hidrofóbico.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Investigar a produção de bioemulsificante por *S. maltophilia* utilizando resíduo agroindustrial;
- Avaliar a cinética de crescimento de *S. maltophilia* na presença de diferentes concentrações de resíduo selecionado na produção de biossurfactante;
- Observar a morfologia de *S. maltophilia* frente as concentrações do resíduo selecionado;
- Extrair e isolar o bioemulsificante;
- Caracterizar o bioemulsificante por métodos físicos, químicos e biológicos;
- Aplicar o bioemulsificante produzido na remoção de poluentes hidrofóbicos;
- Validar estatisticamente os resultados obtidos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

*Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria gram-negativa que possui forma de bacilo. *Stenotrophomonas maltophilia* é um bacilo aeróbio, móvel, não fermentador, oxidase negativo. Foi solada pela primeira vez em 1943 como *Pseudomonas maltophilia* e em 1981 foi reclassificada como *Xanthomonas maltophilia*. Finalmente, em 1993, propuseram a espécie *S. maltophilia* (PALLERONI; BRADBURY, 1993; SALDAR; ROLSTON, 2007).

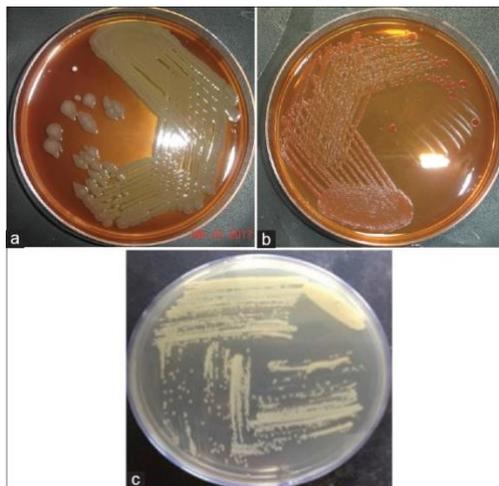
*S. maltophilia* cresce na maioria dos meios bacteriológicos, formando uma colônia pigmentada amarela e que pode ser identificada por métodos bioquímicos, tendo como potenciais fatores de virulência enzimas extracelulares, tais como, DNase, RNase, fibrinolizina, lipases, hialuronidases e proteases. Além disso, os flagelos e a adesina fimbriada permitem a fixação em superfície inerte, resultando na formação de biofilme que constitui vantagem adaptativa (VARTIVARIAN; ANAISSIE, 2000; OLIVEIRA-GARCIA et al., 2003).

A *S. maltophilia* tem dimensões em média de 0,5 a 1,5µm, de coloração branca, quando visualizadas macroscopicamente. Entre as condições de crescimento da bactéria, que são recomendadas, temperaturas entre 5 e 40 ° C (DENTON; KERR, 1998).

Atualmente, o gênero *Stenotrophomonas* abrange espécies reconhecidas como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Stenotrophomonas chelatiphaga*, *Shinella daejeonensis*, *Sphingomonas dokdonensis*, *Stenotrophomonas ginsengisoli*, *Stenotrophomonas humi*, *Stenotrophomonas koreensis*, *S. maltophilia*, *Stenotrophomonas nitroreducens*, *Stenotrophomonas pavanii*, *Stenotrophomonas rhizophila* e *Stenotrophomonas terrae*. LOONEY; NARITA; MUHLEMANN, 2009; KIM et al. 2009; GARAZI et al., 2012; CERQUEIRA et al., 2012; DEEPALI et al., 2014; SINGHAL et al., 2017; LARIK et al., 2018).

*S. maltophilia* é onipresente na natureza. Ela existe em vários tipos de ambientes e regiões geográficas extremas, como a Antártida, residindo em vários nichos ecológicos e biofilmes foram identificados em soluções para lentes de contato, nebulizadores para uso doméstico de pacientes, bebedouros com micro-filtração, planta rizosférica, água do rio e processo de tratamento de água (SINGHAL et al., 2017).

**Figura 1. Características macroscópicas de *Stenotrophomonas maltophilia* em meio sólido**



Fonte: SINGHAL et al., (2017)

### 3.1.1 Potencial biotecnológico da *Stenotrophomonas maltophilia*

*S. maltophilia* exerce uma extraordinária gama de atividades com relevância biotecnológica (MUKHERJEE; ROY, 2016), como a biorremediação (BERG; MARTINEZ, 2015), degradação de compostos tóxicos (LEE et al., 2002), biossíntese (ZONATO et al., 2015) e controle biológico na agricultura (ALAVI et al., 2013; LIRA; BERG; MARTÍNEZ, 2017). Estudos com a *S. maltophilia* demonstraram o seu potencial biotecnológico na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como também na produção da enzima lipase e biossurfactante (KIM et al., 2009; DEEPALI et al., 2014; LARIK et al., 2018). Há evidência de que *S. maltophilia* é capaz de produzir biossurfactante do tipo ramnolípido (DEEPALI; SNEHA; SUCHETA, 2014).

Na literatura, no seu metabólito há aplicações como atividade antimicrobiana, como um agente útil no controle de fungos, bactérias e também um importante agente inseticida. Sua capacidade de produzir várias enzimas para aplicações biotecnológicas, incluindo a degradação de queratina, atrazina, tricloroetileno, diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seu uso na biorremediação de metais e sua colonização de raízes de plantas (BROOKE et al., 2017).

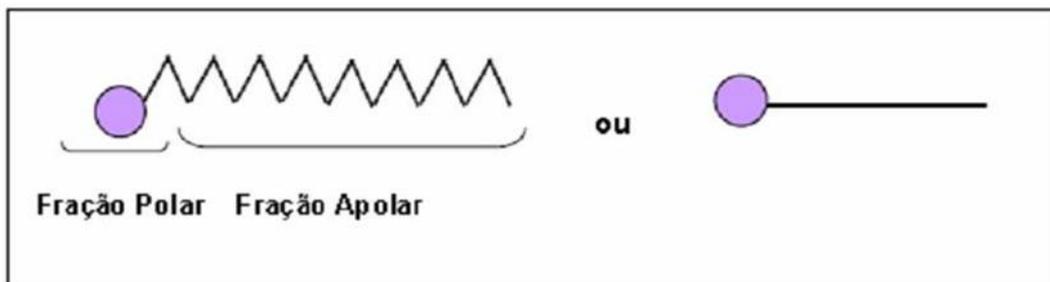
Relatos confirmam a utilização da *S. maltophilia* na otimização da produção de uma protease alcalina extracelular e sua importante aplicação na indústria de detergentes (KUDDUS; RAMTEKE, 2011), como também no setor agroindustrial, através da inibição do micro-organismo *Ralstonia solanacearum*, uma bactéria patogênica gram-negativa aeróbia, causadora da podridão da batata na indústria (MESSIHA, et al., 2007). Além disso, outra importante aplicação biotecnológica refere-se ao potencial de produção de uma espécie de lipase tolerante a solventes orgânicos (LI, et al., 2013).

### 3.2 Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfipáticas que possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e apresentam um grupamento hidrofílico polar e um grupamento hidrofóbico apolar. A região hidrofóbica ou “cauda” é constituída tipicamente por uma ou mais cadeias hidrocarbônicas lineares contendo de 8-18 átomos de carbono, podendo apresentar ou não ligações insaturadas enquanto a região hidrofílica ou “cabeça” é geralmente constituída por um grupo iônico (Figura 2). (TADROS, 2005; FEMI-OLA et al., 2015; ROVINA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2018).

São capazes de se distribuir nas interfaces entre fases imiscíveis tais como óleo/água ou ar/água, o que leva à redução da tensão superficial e interfacial entre fases destes sistemas. Além de reduzir a tensão superficial e interfacial, outras propriedades importantes inerentes à organização estrutural destas moléculas incluem a sua capacidade de solubilização, de emulsificação e demulsificação, de dispersão de fases, de detergência e lubrificante (DESAI; BANAT, 1997; FRACCHIA et al., 2015; MOUSSA et al., 2006; JAGTAP et al., 2010; FEMI-OLA et al., 2015).

**Figura 2.** Molécula de tensoativo (Surfactante).



Fonte: Bueno (2010)

Essa molécula tensoativos integra uma grande variedade de produtos de uso cotidiano do ser humano tais como: produtos de limpeza doméstica e higiene pessoal, cosméticos, herbicidas ou pesticidas, em processos de biorremediação, agricultura, indústrias de alimentos, farmacêutica, de papel, de petróleo, entre outros (BANAT, et al., 2014b; GUDIÑA et al., 2015; SHARMA et al., 2017; AGUIRRE et al., 2018; TAZDAÏT et al., 2018).

Os surfactantes podem ser de origem química, quando derivado do petróleo (surfactante químico ou sintético) e de origem natural, produzido por plantas, animais e micro-organismos (biossurfactantes) (SHARMA et al., 2017; AGUIRRE et al., 2018; TAZDAÏT et al., 2018).

A classificação do surfactante químico é realizada em função da carga presente na região hidrofílica da molécula. Assim, surfactantes que possuem a cabeça carregada negativamente e positivamente são chamados surfactantes aniônicos e catiônicos, respectivamente. Surfactantes não carregados são chamados surfactantes não iônicos e aqueles carregados com ambas as cargas negativa e positiva são denominados surfactantes anfóteros ou zwitteriônicos (SANTOS et al. , 2013).

### 3.3 Biosurfactantes

Os biosurfactantes são compostos anfílicos produzidos em superfícies de células microbianas ou excretadas extracelularmente. São produzidos , na maioria das vezes, pelo crescimento aeróbio de micro-organismos como leveduras, fungos filamentosos e por bactérias (TADROS, 2005; FEMI-OLA et al., 2015; ROVINA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2018).

A produção microbiológica de biosurfactantes é considerada promissora devido ao curto tempo de geração quando comparados ao crescimento de plantas e animais (PARTHASARATHI et al., 2014). O tipo de biosurfactante é muito específico podendo variar de espécie para espécie de micro-organismo (Tabela 1) (JARA et al., 2013).

As bactérias produtoras de biosurfactantes, por exemplo, precisam ser facilmente cultivadas e produzir elevado rendimento de biosurfactante para garantir uma comercialização econômica e sustentável (ZAINAL; OMAR; ASHAARI, 2017).

Bactérias como *Arthobacter*, *paraffineus*, *Bacillus licheniformes*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium* ,*Nocardia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhodococcus actinobacterial*, *Streptomyces sp.* e *Stenotrophomonas maltophilia* são micro-organismos que podem degradar poluentes e simultaneamente produzir biosurfactante acelerando o processo de degradação (HASANUZZAMAN et al., 2007; ARULAZHAGAN et al., 2010; KIM, et al. 2010; FRANZETT et al., 2010; GLICK et al., 2010; JANEK et al., 2010; COSTA et al., 2012; SAJNA et al., 2015; KUYUKINA et al., 2015; LIU et al., 2016; WAGNER e SYLDATK, 2017;VARJANI E UPASANI, 2016; RATLEDGE e BOULTON, 2017; ZAMBRY et al., 2017; AL-HAWASH et al., 2018).

**Tabela 1.** Tipos de biosurfactantes produzidos por bactérias.

Micro-organismos	Classe
------------------	--------

---

<i>Bacillus licheniformes</i>	Lipoproteína (LIU <i>et al.</i> , 2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina (KIM, <i>et al.</i> 2010)
<i>Corynebacterium</i>	Lipídeos (RATLEDGE; BOULTON 2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ramnolipídeo (GLICK <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipopeptídeos (JANEK <i>et al.</i> , 2010)
<i>Rhodococcus ctnobacterial</i>	Trealolipídeo (KUYUKINA <i>et al.</i> , 2015)
<i>Streptomyces</i>	Lipolipídeos (ZAMBRY <i>et al.</i> , 2017)
<i>Bacilo subtilis</i>	Ramnolipídeo ( CHRISTOVA <i>et al.</i> ,2004)
<i>Bacilo subtilis</i>	Surfactina (ARIMA <i>et al.</i> ,1968)
<i>Bacilo subtilis</i>	Subtilisina (BERNHEIMER <i>et al.</i> , 1970)
<i>Bacilo cereus</i>	Cerexina (SHOJI <i>et al.</i> , 1975)
<i>B. licheniformis</i>	Liquenisina (JAVAHERI <i>et al.</i> , 1985)
<i>Bacilo subtilis</i>	Fengicina (VANITTANAKOM.,1986)
<i>Bacilo coagulans</i>	Surfactina (HUSZCZA <i>et al.</i> , 2003)

---

### 3.3.1 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados com base em suas estruturas químicas que incluem glicolipídios, lipopeptídeos, complexos polissacarídeos-proteínas, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros e subdivididos entre os de alto e baixo peso molecular. Os de alto peso molecular incluem os polissacarídeos, as proteínas, as lipoproteínas e os lipopolissacarídeos e os de baixo peso são os glicolipídios, os fosfolipídios e os lipolipídios (DESAI; BANAT, 1997; BANAT *et al.*, 2000; GAUTAM; TYAGI, 2006; PACWA-PLOCINICZAK *et al.*, 2011; MULLIGAN *et al.*, 2014; MATVYEYEVA *et al.*, 2014; UZOIGWE *et al.*, 2015; ANTONIOU *et al.*, 2015; ROCHA, 2017; SILVA *et al.*, 2017; SANTOS, 2018).

#### - Glicolipídeos

Os glicolipídios constituem a classe mais comum de compostos tensoativos de baixo peso molecular. São produzidos por diversas espécies de bactérias e leveduras. Os quatro grupos biotecnologicamente mais importantes de glicolipídios são: raminolipídeos, soforolipídeos, trehalolipídeos, e manosileritritol-lipídeos (MATVYEYEVA; VASYLCHENKO; ALIIEVA, 2014; HAUSMANN; SYLDATK, 2015).

#### - Raminolipídeos

São produzidos por espécies de *Pseudomonas*, em particular por *Pseudomonas aeruginosa*. Classificam-se como mono- e di-raminolípidos. Algumas bactérias são conhecidas como sendo produtoras de apenas mono-raminolípidos, existindo algumas que produzem mono- e di-raminolípidos (MARCHANT; BANAT, 2012a; RANDHAWA; RAHMAN, 2014).

#### **- Soforolípidos**

Estas biomoléculas possuem na sua estrutura a sofrorose, um dissacarídeo de glicose. Os sofrorolípidos podem apresentar-se ou sob a forma lactônica ou forma acídica aberta. Na forma lactônica a extremidade carboxílica do ácido graxo está esterificado na posição-4' ou na posição 6' ou 6'' da sofrorose (MARCHANT; BANAT, 2012; HAUSMANN; SYLDATK, 2015).

#### **- Trehalolípidos**

Os trehalolípidos são glicolípidos associados com diversas espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Gordonia*. Sua estrutura possui a trehalose, que é formado por duas unidades de glicose. As cadeias hidrocarbonadas ligadas a trehalose variam no número, comprimento (FRANZETTI et al., 2010; KUGLER et al., 2014; VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

#### **- Lipopeptídeos**

A classe de lipopeptídeos engloba um vasto número de biossurfactantes de baixo peso molecular consistindo de estruturas cíclicas, destacando-se os membros dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* como os principais produtores de moléculas desta classe. Estruturalmente, consistem de uma cabeça hidrofílica composta por polipeptídeos, comumente entre 7 e 10 aminoácidos, ligada a uma estrutura hidrofóbica de um ácido graxo. A diferença entre eles reside no tipo de aminoácidos do anel peptídico, e também no comprimento e estrutura da cadeia hidrocarbonada. Geralmente, os lipopeptídeos ocorrem como misturas de compostos intimamente relacionados (GAUTAM ; TYAGI, 2006; CAMEOTRA et al., 2010 ; SINGH, 2012; SMYTH et al., 2010; PATHAK; KEHARIA, 2013; SHOEB et al., 2013; DHANARAJAN; SEN, 2014).

#### **- Ácidos graxos e fosfolípidos**

Os ácidos graxos e fosfolipídeos são produzidos por várias bactérias e leveduras durante o crescimento em n-alcenos. Alguns desses ácidos complexos, por exemplo, os ácidos corinomicólicos sintetizados por *Corynebacterium lepus*, exibem expressiva atividade surfactante (RAHMGAUTAM; TYAGI, 2006; RAHMAN; GAKPE, 2008).

#### **- Biossurfactantes Poliméricos**

Os biossurfactantes poliméricos são moléculas de elevado peso constituídos de lipoproteínas, proteínas, polissacarídeos, lipopolissacarídeos ou complexas misturas contendo vários destes biopolímeros. Biossurfactantes desta classe são produzidos por espécies bacterianas de diferentes gêneros, tais como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*. Os biossurfactantes poliméricos mais estudados incluem emulsan, liposan, e manoproteínas e outros complexos proteína-polissacarídeos (CIRIGLIANO; CARMAN, 1985; SINGH, 2012; FRACCHIA et al., 2012; SILVA et al., 2014 ; SOBRINHO et al., 2014).

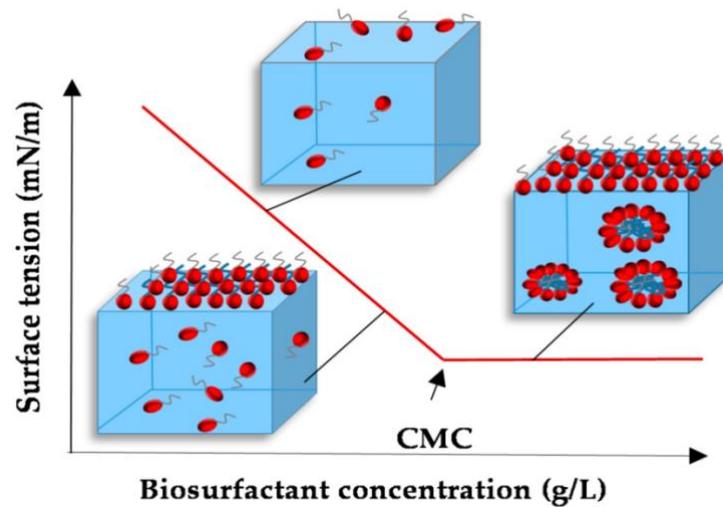
### **3.3.2 Propriedades dos biossurfactantes**

Devido a característica anfipática, os biossurfactantes são capazes de se distribuir nas interfaces entre fases imiscíveis tais como óleo/água ou ar/água (DESAI; BANAT, 1997; FRACCHIA et al., 2015). Estas moléculas favorecem a diminuição da tensão superficial e interfacial, aumento de solubilização, de emulsificação e demulsificação, de detergência e da capacidade lubrificante (MOUSSA et al., 2006; JAGTAP et al., 2010; FEMI-OLA et al., 2015).

#### **3.3.2.1 Tensão superficial e interfacial**

Tensão superficial é a força que atua sobre a superfície de um líquido levando a minimização da área desta superfície, medindo a diferença da natureza entre duas fases na interface. Também ser definida como uma medida de energia livre por unidade da área associada com uma superfície ou interface (ROSEN, 2004; AL-ARAJII et al.2007, MNIF; GHRIBI, 2015).

O método de anel de Du Nouy é o mais utilizado na pesquisa de biossurfactantes (KIM et al., 1997; ABOUSEOUD et al., 2007; PEREIRA et al., 2013; SARI et al., 2014). Assim, quanto maior for a dissimilaridade da natureza das fases do sistema, maior a tensão interfacial (ou superficial) entre eles (ROSEN, 2004; AL-ARAJII et al.2007, MNIF; GHRIBI, 2015).

**Figura 3- A influência do biossurfactante na tensão superficial**

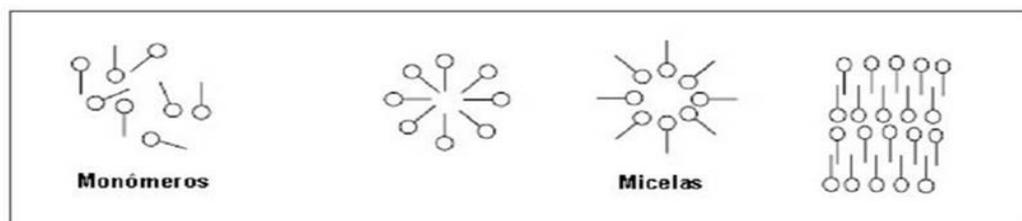
Fonte: SANTOS et al., 2016

### 3.3.2.2 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (CMC) é a concentração de biossurfactantes, na qual a termodinâmica do sistema tensoativo-solvente favorece a formação de micelas e possui um papel determinante em relação a muitas propriedades físico-químicas usadas para caracterizar os biossurfactantes (URUM; PEKDEMIR, 2004).

Em concentrações acima da CMC, o biossurfactante consegue aumentar a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa, uma vez que o composto orgânico é incorporado no interior da micela (MESQUITA, 2004; MULLIGAN, 2005; MARINHO, 2015).

Um dos principais pontos de investigação é a CMC que quantifica a capacidade do biossurfactante em formar as micelas (Figura 4).

**Figura 4 - Monômeros formando micelas.**

Fonte: Bueno (2008)

### 3.3.2.3 Formação de emulsões

Uma emulsão é um sistema coloidal de dois líquidos imiscíveis (FRANGE; GARCIA, 2009; CAMPOS et al., 2013). O equilíbrio hidrofílico-lipofílico indica a capacidade de um biossurfactante promover a formação de emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo (MULLIGAN, 2005).

### **3.3.3 Capacidade molhante, solubilizante e dispersante de petroderivados**

Essas moléculas apresentam importância na indústria de petróleo, uma vez que são adicionadas a óleos residuais com a finalidade de aumentar sua mobilidade pela influência na redução da tensão superficial em relação ao óleo e a água, permitindo que o petróleo presente nos reservatórios de petroderivados sejam recuperados (CAMPOS et al., 2015).

A propriedade dispersante de biossurfactantes reside na sua capacidade de reduzir as forças coesivas entre partículas similares de um composto hidrofóbico (KLEINDIENS et al., 2015; MNIF; GHRIBI, 2015).

### **3.3.4 Influência da fonte de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactantes**

Os melhores substratos para o crescimento microbiano são os resíduos ricos em carboidratos ou lipídeos, com adequada relação carbono/nitrogênio e que apresentem altas concentrações de micronutrientes importantes para o metabolismo microbiano (NITSCHKE; PASTORE, 2006; ROVINA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2018).

### **3.3.5 Fatores físico-químico que influenciam a produção**

Fatores ambientais tais como pH, salinidade e temperatura também afetam a atividade e estabilidade dos biossurfactantes. Por isso, é importante estudar a influência destes parâmetros quando se considera aplicações específicas para estes compostos (MULLIGAN, 2005).

### **3.3.6 Vantagens dos biossurfactantes**

Em função da estrutura molecular, os surfactantes tendem a alterar as propriedades interfaciais e superficiais dos fluidos ocasionando a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante e solubilização (ROVINA; EHRHARDT; TAMBOURGI, 2018).

Os biossurfactantes apresentam vantagens aos surfactantes sintéticos, devido a sua baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade, eficiência em condições ambientais extremas de pH, temperatura e salinidade e podem ser obtidos a partir de recursos renováveis e de baixo custo, como também a possibilidade de modificação de sua estrutura e de propriedades físico-químicas, permitindo obter produtos industriais para utilização específica (MOUSSA et al. 2006; SARUBBO et al., 2007; VECINO et al., 2015). Além disso, possuem melhor compatibilidade com o ambiente, alta capacidade de espuma, maior seletividade, comparadas aos compostos sintéticos semelhantes e aplicações melhoradas na biorremediação, emulsão alimentar e em cosméticos (HEMLATA; SELVIN; TUKARAM., 2015).

### **3.3.7 Aplicações industriais dos biossurfactantes**

As aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais entre elas, à indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, devido sua atuação como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos com baixa solubilidade em água (NWINYI et al., 2018).

Os biossurfactantes, além de seu papel natural no aumento da biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos, têm aplicações industriais na recuperação avançada de óleo, biorremediação, eliminação de metais, excelente detergência, substituição de solventes de limpeza clorados, indústrias de detergentes, pesticidas e herbicidas e em alimentos e indústrias cosméticas (NWINYI et al., 2018).

O uso de biossurfactantes na indústria cosmética é o fato de evitar irritações da pele e reações alérgicas devido à sua aplicação (VECINO et al., 2017; SPINA et al., 2018).

Há evidência de que o biossurfactante produzido por *S. maltophilia* é caracterizado como ramnolípídeo com propriedades larvicidas e/ou pesticida no controle efetivo de atividades larvicidas eficientes e ecológicas (SALDAR; ROLSTON, 2007; LOONEY; NARITA; MUHLEMANN, 2009; KIM et al.2009; GARAZI et al., 2012; CERQUEIRA et al., 2012; DEEPALI et al., 2014; LARIK et al., 2018). Contudo, a maior área de aplicação dos biossurfactantes é a indústria do petróleo, tanto para a produção deste como para incorporação nas formulações de óleo, remoção de lodo de óleo dos tanques de estocagem, dispersão de derramamento de óleo no mar e no solo, na recuperação melhorada de petróleo e na descontaminação ambiental por meio da biorremediação, utilizando microorganismos, que devido à sua fisiologia extremamente

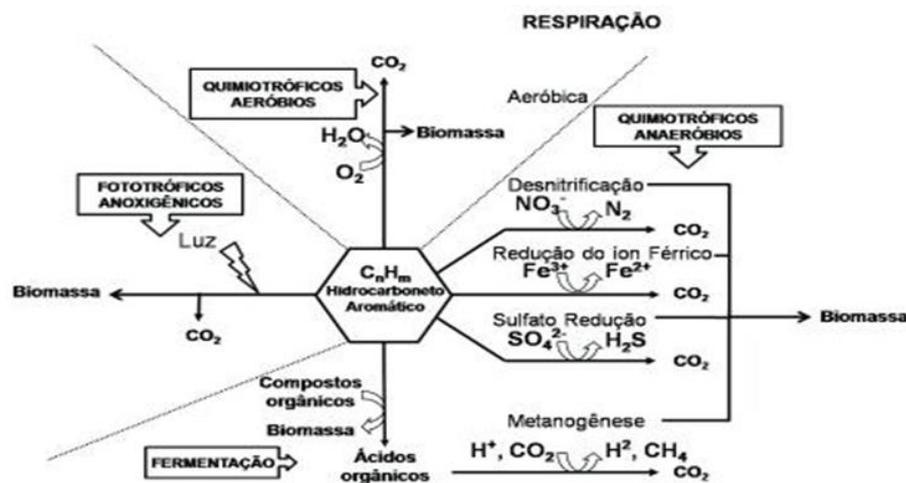
flexível e o metabolismo pode facilmente colonizar contaminados habitats seguidos de limpeza subsequente (DECESARO et al., 2013; YADAV et al., 2016).

### 3.3.7.1 Biorremediação de derivados do petróleo

A biorremediação é definida como um processo que usa micro-organismos, plantas ou enzimas para transformar contaminantes em espécies menos tóxicas, é muito atraente método devido aos seus custos e benefícios (OKOH; TREJO-HERNANDEZ, 2006).

Com o aumento da preocupação com as questões ambientais, outras funções que podem ser exercidas por bactérias são percebidas e estudadas com o intuito de amenizar problemas de poluição e degradação do meio ambiente assim como melhorar a qualidade dos processos e produtos agrícolas. Existem muitos estudos que sugerem a aplicação de bactérias nessas áreas como estratégia de descontaminação. Este processo pode ser aplicado em diversas situações visando à melhoria de áreas contaminadas por uma enorme gama de agentes poluidores contaminantes de solos, sedimentos, água e ar em substâncias benignas (MERICI et al., 2018).

Figura 5- Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias.



Fonte : TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010.

### 3.4 Emulsificantes

Os agentes emulsificantes são moléculas anfifílicas, que apresentam em sua molécula uma porção apolar, um hidrocarboneto, solúvel em óleo e uma extremidade polar solúvel em água que aumentam a estabilidade cinética das emulsões, tornando-as aceitavelmente estáveis e homogêneas, formando um sistema coloidal no qual as

fases são líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, possuindo uma fase contínua, composta pela água, e fase dispersa, composta pelo óleo, apresentando diâmetros entre 0.1  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  (SHAW, 1975; CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; OLIVEIRA et al., 2004; FRANGE; GARCIA, 2009; CAMPOS et al., 2013 ; INÈS- DHOUHA, 2015; UZOIGWE, 2015; KALE, 2017).

A propriedade mais importante de uma emulsão é a sua estabilidade, sendo esta dependente de vários fatores como: diferença de densidade entre as fases, viscosidade do sistema, dimensões do dispersóide, relação entre os volumes das fases, existência e valor das cargas elétricas, presença de substâncias tensoativas e da tensão superficial e fornecimento de energia para formá-las através de processos físico-químicos como: agitação e a utilização de substâncias homogenizadoras (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; JANEK et al., 2012; UZOIGWE et al., 2015; SOUZA, 2016).

Estas substâncias são capazes de se solubilizar em água e em óleo, que através da cadeia carbônica e o grupo polar, por sua afinidade com a água, é capaz de formar uma cadeia carbônica e produzir uma solução aquosa, por isso reduzem a tensão superficial na interface das fases imiscíveis, permitindo, portanto, que elas se misturem, formando a emulsão (CIRIGLIANO & CARMAN, 1985; INÈS- DHOUHA, 2015; UZOIGWE, 2015; SHARMA et al., 2016).

A estrutura das emulsões são classificadas de acordo com o diâmetro e características físicas e podem ser: Macro-emulsões ( possuem uma faixa de tamanho de 0,1 - 5 $\mu\text{m}$ ) ; Nano-emulsões e micro-emulsões (20-100 nm); Emulsões ou micro-emulsões micelares ( estes geralmente possuem uma faixa de tamanho de 5-50 nm e são termodinamicamente estáveis) (TADROS et al., 2013).

### **3.4.1 Estabilidade dos emulsificantes**

A estabilidade coloidal da emulsão considera que as partículas dispersas estão submetidas a ação de duas forças: Força de Van der Waals (força atrativa se origina nas flutuações da densidade eletrônica em um átomo neutro, cujo potencial atrativo entre as partículas é igual a soma de todas as forças sobre todos os átomos, aumenta com o tamanho das partículas e diminui com a distância entre elas) e a Repulsão eletrostática ( uma partícula com uma superfície carregada causando uma distribuição desigual dos íons da solução, fazendo com que íons com carga oposta a da partícula se acumulem em torno da superfície)( WONG, 1995).

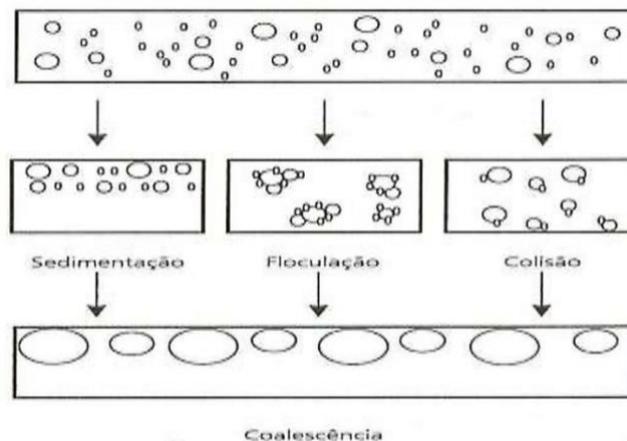
#### **3.4.1.1 Mecanismos que favorecem a estabilidade das emulsões**

Separação das fases por sedimentação (processo no qual as gotas dispersas têm densidade diferente da fase dispersante, podendo haver sedimentação e separação das fases devido à força da gravidade); Floculação das gotas (As gotas se unem umas as outras, ficando separadas por uma camada finíssima da fase contínua); Coalescência das gotas (Aumenta-se seu tamanho real, podendo-se chegar à separação das duas fases em duas camadas por uma interface de superfície mínima) (ORDÓÑEZ, 2005).

#### 3.4.1.2 Emulsificantes que auxiliam na estabilidade de emulsões

Eletrólitos minerais: proporcionam cargas eletrostáticas às gotas dispersas para elevar a repulsão; Moléculas tensoativas: proteínas, que se orientam de tal forma que seus extremos hidrofóbicos e hidrofílicos se colocam nas superfícies da interface óleo/água; Macromoléculas dissolvidas na fase contínua: aumentando a viscosidade dessa fase (polissacarídeos espessantes) ou se adsorvendo na interface (proteínas solúveis em água), formando uma barreira na fase da coalescência (ORDÓÑEZ, 2005).

Figura 6 Esquema de possíveis mecanismos de desestabilização da emulsão



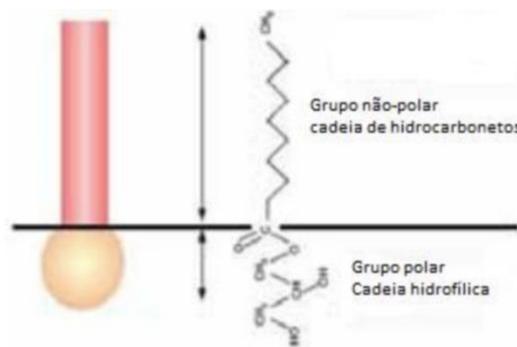
Fonte: ORDÓÑEZ, 2005.

### 3.5 Bioemulsificantes

Os bioemulsificantes são biopolímeros de alto peso molecular ou exopolissacarídeos se assemelham aos biossurfactantes ao emulsionar dois líquidos imiscíveis, tais como hidrocarbonetos ou outros substratos hidrofóbicos, mesmo em baixas concentrações, mas em contraste são menos eficazes na redução da tensão superficial. Essas misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas possuem maior peso molecular do que os biossurfactantes (PERFUMO et al., 2009; SMYTH et al., 2010a; SEKHON-RANDHAWA, 2014 MUTHUSAMY et al., 2008; UZOIGWE, et al., 2015). São capazes de estabilizar

emulsões aumentando sua estabilidade cinética em função de sua composição química (CALVO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; UZOIGWE, et al., 2015). Também podem ser definidas como moléculas anfifílicas que tem a capacidade de formação de emulsões estáveis, além de peso molecular e baixo poder de redução da tensão superficial com capacidade de formar emulsões estáveis em água / óleo ou óleo / água, além de desemulsificar e solubilizar (SOUZA, 2016; PUNNIYAKOTTI, 2017; SATPUTE, 2017).

Figura 7. Característica hidrofílica e hidrofóbica do emulsificante



Fonte: FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013

### 3.5.1 Produção de bioemulsificante

A produção de emulsificantes naturais por via microbiana apresenta vantagens em relação aos seus sintéticos, como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e biocompatibilidade (DIAZ DE RIENZO et al., 2016; ZHAO, 2016; BISWAS et al., 2017; PUNNIYAKOTTI, 2017). Os bioemulsificantes são surfactantes naturais, diferenciados pela natureza química da biomolécula e pela espécie microbiana produtora, enquanto os surfactantes sintéticos são classificados pela natureza do seu grupo polar (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008). Os termos biosurfactantes e bioemulsificantes são referidos como biomoléculas tensoativas, contudo, há distintas características físico-químicas entre elas, por isso são descritas como moléculas diferentes, pois os biosurfactantes apresentam baixo peso molecular, sendo classificados por lipopeptídeos, glicolípídeos e os bioemulsificantes são moléculas de elevado peso molecular, como exopolissacarídeos, podendo ser misturas complexas de heteropolissacarídeos e lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; SMYTH et al. 2010; JAGTAP et al., 2010 FRANZETTI et al. 2012; PEREZ et al., 2017; SILVA, et al., 2017).

#### 3.5.1.1 Fatores que influenciam a produção de bioemulsificante

Fatores como a fonte de carbono, nitrogênio, sais, concentração de NaCl, pH, temperatura, agitação, aeração são importantes na produção do bioemulsificante (ROSETO et al., 2003; SYAHRIANSYAH; HAMZAH, 2016).

A fonte de carbono é considerada um dos fatores que mais influenciam na síntese, uma vez que pode promover o crescimento do micro-organismo. Este tipo de produção necessita, concomitantemente, de fontes de carbono hidrofílica como a glicose a lactose e hidrofóbica como o óleo de soja e azeite de oliva (SAJNA et al., 2013; RUFINO et al., 2014). As fontes nitrogênio são também influência na produção de bioemulsificantes (BAJAJ; TILAY; ANNAPURE, 2012). A agitação e a aeração possuem efeitos combinados, pois ambos facilitam a transferência de oxigênio no meio de fermentação que também auxiliam a produção de biosurfactantes, pois possibilitam a solubilização de substratos insolúveis em água e conseqüentemente o transporte de nutrientes no meio de fermentação para o microrganismo (AQUARONE, 2001; RAMKRISHNA et al., 2010).

### **3.5.2 Bioemulsificante produzidos por *S. maltophilia* UCP 1601**

Os surfactantes microbianos são moléculas complexas com grande diversidade de estruturas químicas (BENTO; CAMARGO; GAYLARDE, 2008). O bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 é estável frente a variação de pH, apresentando bons índices de emulsificação em óleo de motor.

### **3.5.3 Produção de bioemulsificante por substratos renováveis**

A produção de bioemulsificantes a partir de substratos renováveis vem promovendo um interesse considerável nos últimos anos (MORAIS; ABUD, 2011; MARTI et al., 2015). Como estratégia para viabilizar a produção de metabólitos microbianos utiliza-se substratos alternativos, minimizando os custos relacionados à produção como também permite a valorização econômica de sua utilização. Além de considerar o potencial enzimático de vários micro-organismos de sintetizar biomoléculas em diversos substratos imiscíveis em água, como os recursos renováveis de efluentes da produção agrícola, óleos vegetais e resíduos de destilarias e laticínios, entre outros (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; MORAIS; ABUD, 2011).

### **3.5.4 Aplicações dos bioemulsificantes**

As propriedades funcionais que os biossurfactantes apresentam fazem com que sejam compostos atrativos para sua utilização em uma variedade de processos e operações industriais e ambientais (THAVASI et al., 2011; FRACCHIA et al., 2014; WAGHMODE et al., 2014).

#### **3.5.4.1 Aplicação nos bioprocessos**

Os bioemulsificantes possuem compatibilidade com o meio ambiente e são biomoléculas com potencial para serem utilizados na remoção de agentes contaminantes em ambientes terrestres como também em aquáticos sem colaborarem com riscos de contaminação secundária quando comparados aos emulsificantes sintéticos (LAI et al., 2009; SINGH ; CAMEOTRA, 2013). Os bioemulsificantes também têm sido eficientes na biorremediação de metais pesados, que tendem a ser fortemente absorvidos na matriz de solos e sedimentos, limitando sua solubilidade e dificultando a sua remoção subsequente. O método de lavagem com bioemulsificantes aumenta a dessorção de metais em solos e sedimentos, tornando esses poluentes para a captação microbiana, que são degradados em produtos inócuos (GUTIERREZ et al., 2008; ANISZEWSKI et al., 2010; BANAT et al., 2010; AÇIKEL 2011, COLIN et al., 2013)

#### **3.5.4.2 Aplicação na indústria farmacêutica**

Para uso farmacêutico e cosmético, os soforolípídeo são utilizados comercialmente como umectantes e os ramnolípídeos são apontados como biocompatíveis e ideais para uso cosmético, como também os lipopeptídeos (IRFAN-MAQSOOD; SEDDIQ-SHAMS, 2014; VARVARESOU; IAKOVOU, 2015). Os bioemulsificantes e suas potenciais aplicações medicinais são devido às propriedades bioativas (GHARAEI-FATHABAD, 2011; RUFINO et al., 2012; SAMBANTHAMOORTHY et al., 2014; MEENA; KANWAR, 2015).

#### **3.5.4.3 Aplicação na indústria petroquímica**

A aplicação no campo de biorremediação mostra-se ser promissora, devido a capacidade do bioemulsificante de formar e estabilizar emulsões compostas por hidrocarbonetos e água, promovendo a disponibilidade desses contaminantes no ambiente aquático para os micro-organismos que metabolizam esses compostos hidrofóbicos e são eficientes pelo método de lavagem na remoção de hidrocarbonetos em solos e sedimentos contaminados (FRANZETTI et al., 2012, SOUZA et al., 2012; MONTAGNOLLI, 2015; INÈS, SAHNOUN, GHRIBI. 2017).

#### **3.5.4.4 Aplicação na indústria alimentícia**

Na indústria alimentícia, os bioemulsificantes apresentam-se como agentes emulsificantes, solubilizantes, umectantes e patógeno microbiano (NITSCHKE; COSTA, 2007; CAMPOS et al., 2013; RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014) . A emulsificação tem elevada importância na consistência e textura dos alimentos, dispersão de fase e a solubilização de aromas (CAMPOS et al., 2013; SANTOS et al., 2016). Os bioemulsificantes, como aditivo alimentício, contribuem para: Equilibrar as variações na qualidade das farinhas; Melhorar a consistência dos ingredientes; Aumentar a velocidade de transformação; Melhorar a estabilidade das massas; Promover a aeração e o ganho de volume de pães e bolos; Diminuir o consumo de ovos e gorduras; Aumentar o rendimento do processo (CASTRO et al., 2012; NETA et al., 2012; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013; HEYMAN et al., 2014; CAMPOS et al., 2015)

### **3.6 Resíduos agroindustriais**

Como estratégia para a redução dos altos custos da produção industrial de biossurfactante, os subprodutos agroindustriais vêm sendo avaliados como fonte de carbono alternativa, favorecendo, também, a minimização do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses rejeitos no ambiente (MORAIS ; ABUD, 2012).

Dentre os problemas relacionados ao uso de biossurfactantes está o seu elevado custo de produção, associado ao uso de substratos caros e a métodos ineficientes de recuperação do produto. A diminuição dos custos de produção pode ser realizados a partir da otimização dos processos e dos meios de cultivo utilizados (DECESARO et al., 2013). Com o passar dos anos, houve um aumento nas atenções voltadas na produção de biossurfactantes por causa de sua biodegradabilidade, toxicidade reduzida, melhor compatibilidade com o ambiente, alta capacidade de espuma, maior seletividade, estabilidade em meios extremos de pH, salinidade e temperatura comparadas aos compostos sintéticos semelhantes e aplicações melhoradas na biorremediação, emulsão alimentar e em cosméticos (ROSENBERG, 2001; HEMLATA; SELVIN ; TUKARAM., 2015).

São de baixo custo como fontes nutricionais e apresentam composição rica em material orgânico. Podem ser produzidos a partir de vários substratos, principalmente recursos renováveis, como óleos vegetais, destilarias e resíduos lácteos. A escolha de substratos de baixo custo é importante para a economia geral do processo porque eles respondem por 50% do custo final do produto. O óleo de soja residual, obtido do comercio informal; A milhocina, resíduo proveniente da maceração do milho; A

manipueira, água gerada na prensagem da mandioca e o soro de leite são exemplos resíduos que demonstram ser uma fonte promissora para o crescimento de micro-organismos, tendo sido incluída em meios de produção de bioemulsificante/biossurfactante e são considerados promissores nos processos fermentativos (MAKKAR; CAMMEOTRA, 2002; NYSTROEM, 2003; PELIZER et al., 2007; LAUFEMBERG et al., 2011; LUNA et al., 2011; SANTOS et al., 2012; ANDRADE et al., 2015; SANTOS et al., 2013; RUFINO et al., 2014).

Devido ao crescimento da população e os recentes padrões de consumo, cada vez mais enfáticos, observou-se um aumento da produção dos sistemas agroindustriais e agropecuários. Uma enorme quantidade de resíduos é gerada em decorrência do aumento desacerbado da produtividade, acarretando em sérios danos ambientais, quando disponibilizados inadequadamente, criando danos desastrosos de ordem econômica, social e ambiental (SILVA, et al., 2017).

O uso de substratos alternativos para formulação de meios de cultura para produzir biossurfactantes fornecem elevados níveis de carboidratos e/ou lipídios requeridos para suportar o crescimento e a biossíntese do surfactante favorecendo um ótimo crescimento do micro-organismo e produção do metabólito. A seleção de um resíduo que contenha altos níveis de carboidratos, nitrogênio e lipídios cumpre as exigências para ser usado como substrato para produção de surfactantes microbianos (NITSCHKE et al., 2004; NITSCHKE et al., 2005; THAVASI et al., 2008; HELMY et al., 2011; SHARMA et al., 2014).

### **3.6.1 Óleo de soja residual**

Os óleos vegetais são uma fonte de carbono e constituído por ácidos saturados ou insaturados (MAROTTI, 2017). Pesquisadores têm usado variedade de óleos vegetais de canola, milho, girassol, cártamo, oliva, colza, semente de uva, palmito, coco, peixe e soja.

Os enormes custos associados ao tratamento destes resíduos e os nutrientes nesses resíduos os tornam matérias-primas de baixo custo para a produção de metabólitos secundários. A utilização substrato renováveis na produção de biossurfactantes com alto rendimento trazem o avanço necessário para redução de custos no processo de produção (BANAT et al.2010; MAKKAR et al., 2011).

A maioria das indústrias de alimentos utilizam gorduras e óleos o que gera grandes quantidades de resíduos hidrofóbicos. Diante das alterações físico-químicas, é

importante que o óleo de soja residual de fritura seja imediatamente descartado após o processo de fritura, pois entre os principais riscos à saúde envolvidos no consumo dessas substâncias pode-se citar a pré-disposição à arteriosclerose e a ação mutagênica ou carcinogênica (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; PAPANIKOLAOU 2002b; JORGE, et al., 2005).

Devido a isso, é interessante direcionar o descarte correto desse óleo. Com o acúmulo desses resíduos, tem aumentado o interesse da utilização desses materiais como fonte de nutrientes para transformação microbiana (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; PAPANIKOLAOU 2002b; JORGE, et al., 2005). Vários estudos vêm utilizados substratos hidrofóbicos, como óleo de soja pós-fritura, para a produção de biossurfactantes e/ou bioemulsificante (PELIZER et al., 2007; LANGANKE, 2011; SARUBBO et al., 2007, RUFINO et al., 2008, SOUZA et al., 2012, SANTOS et al., 2013) e lipídeos (PAPANIKOLAOU et al., 2002b, SABIROVA et al., 2010, BEOPOULOS et al., 2011).

#### 4 Referências

AGUIAR, G. P. et al. Influência do meio mineral na produção de biosurfactantes. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 7, n. 1, p. 115-122, 2015.

AGUIRRE, Vladimir et al. A partir de hidrocarburos de petróleo con enlaces dobles obtención de surfactantes, colorantes y solventes. **Ciencia**, v. 17, n. 1, 2018.

ALAVI, Peyman et al. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e 67103, 2013.

AL-HAWASH, Adnan B. et al. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, 44 (2018) 71–76. 2018.

ALMATAWAH, Q. An Indigenous Biosurfactant Producing *Burkholderia cepacia* with High Emulsification Potential towards Crude Oil. **J Environ Anal Toxicol**, v. 7, n. 528, p. 2161, 2017.

ANDRADE, Juliano A. ; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química Journal**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2018.

ANDRADE, R. F. et al. Enhanced production of a glycolipid biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for application in dispersion and removal of petroderivatives. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci**, v. 4, p. 563-576, 2015.

ANDRADE, R.F.S. et. al. Enhanced Production of an Glycolipid Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP/WFCC1556 for Application in Dispersion and Removal of Petroderivatives. **Int. J. Cur. Microbiology Appl. Science**. 2015,4, 563–576.

ARULAZHAGAN, P., VASUDEVAN, N., YEOM, I., 2010. Biodegradation of polycyclicaromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. **Int. Journal Environ. Sci. Te**. 7 (4), 639–652, 2010.

BARROS, Francisco Fábio Cavalcante; QUADROS, Cedenir Pereira de; PASTORE, Gláucia Maria. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

BERG, Gabriele; MARTINEZ, Jose L. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 241, 2015.

BROOKE, Joanna S. et al. A multidisciplinary look at *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging multi-drug-resistant global opportunistic pathogen. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1511, 2017.

CALVO, C. et al. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the total environment**, v. 407, n. 12, p. 3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, Swaranjit Singh *et al.* Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. In: **Biosurfactants**. Springer, New York, NY, p. 261-280, 2010.

CAMEOTRA, Swaranjit Singh; MAKKAR, Randhir S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 97-116, 2010.

CAMPOS, A. F.; FERRERIA, A. R.; CARDOSO, D. ET. AL. Síntese e propriedades de sílicas híbridas contendo surfactantes cetiltrialquilamônio. **Química Nova**, v. XY, n. 0, p. 1-7, 2015.

CAMPOS, J. M. *et al.* Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097-1108, 2013.

CASTRO, Marcela P. *et al.* Influence of several gums on the growth and the production of a bacteriocin like substance from *Lactobacillus curvatus/sakei* ACU1. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 52-54, 2012.

CERQUEIRA, Vanessa S. *et al.* Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 1203-1222, 2012.

CHRONOPOULOU, Panagiota-Myrsini *et al.* Generalist hydrocarbon-degrading bacterial communities in the oil-polluted water column of the North Sea. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 434-447, 2015.

CIRIGLIANO, Michael C.; CARMAN, George M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 747-750, 1984.

CIRIGLIANO, MICHAEL C.; CARMAN, GEORGE M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 846-850, 1985.

COENYE T., VANLAERE E., FALSEN E., VANDAMME P. *Stenotrophomonas africana* Drancourt *et al.* 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. **Int J Syst Evol Microbiol** . 54:1235-7, 2004.

CORRÊA, P. F. *et al.* Utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2847-2854, 2015.

COSTA, A.S. *et al.* Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. **Bioresource Technology** 105,31-39, 2012 .

CRAVO-LAUREAU, Cristiana; DURAN, Robert. Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: contribution of experimental ecology in the omics' era. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 39, 2014.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K.. Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. **Acta Tropical.**, v.97, p.168-173, 2006.

DECESARO, Andressa et al. Biosurfactants during in situ bioremediation: factors that influence the production and challenges in evaluation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 26, p. 20831-20843, 2017.

DECESARO, Andressa et al. Production of biosurfactants by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-954, 2013.

DEEPALI, Korade; SNEHA, Puranik; SUCHETA, Patil. Larvicidal activity of rhamnolipid biosurfactant produced by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Int J Sci Eng Res**, p. 60-63, 2014.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DESAI, J. D.; BANAT, Ibrahim. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47, 1997.

DENTON, M., KERR, K. G. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clinical microbiology reviews**, 11(1).

DE RIENZO, MA Diaz et al. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5773-5779, 2016.

DOS SANTOS, Valdilene Maria et al. Efeitos dos surfactantes aniônicos LAS e LESS no desenvolvimento e na morfologia da cianobactéria *Planktothrix agardhii* CCIBt3125. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-5, 2016.

DRANCOUT M, BOLLET C, RAOULT D. *Stenotrophomonas africana* sp. Nov. an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:160-3.

DUA, M.; Singh A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Application Microbiology Biotechnology**, n.2-3, p.143, 2002.

FEMI-OLA, T. O., OLUWOLE, O. A., OLOWOMOFE, T. O. AND YAKUBU, H. Isolation and screening of biosurfactant-producing bacteria from soil contaminated with domestic waste water. **Department of Microbiology, Ekiti State University**, P.M.B. 5363 Ado-Ekiti, Nig. v. 3, n. 1, p. 58–63, 2015.

FONTES, Gizele Cardoso; AMARAL, Priscilla Filomena Fonseca; COELHO, Maria Alice Zarur. Biosurfactants production by yeasts. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008. *Food Sci. Technol.* 2008, 28, 979–985, 2008.

FRACCHIA, L. et al. **Industrial Applications of Biosurfactants**. p. 245–268, 2011.

FRANCISCO, Wellington Camilo; DE QUEIROZ, Tânia Márcia. BIORREMEDIAÇÃO. **Nucleus**, v. 15, n. 1, p. 249-256, 2018.

FRANGE, R. C. C. ; GARCIA, M. T. . Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva / água : avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 263–271, 2009.

FRANZETTI, Andrea et al. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 617-627, 2010.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Nº 25 – 2013. Disponível em: <http://www.revistafi.com/materias/324.pdf> . Acesso em: 11/05/2018

GARAZI, M. et al. Bloodstream infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a seven-year review. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 2, p. 114-118, 2012.

GLICK, Rivka et al. Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 2973-2980, 2010.

HASANUZZAMAN, M. et al. Degradation of long-chain n-alkanes (C 36 and C 40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59 (1), 40–43, 2007.

HEMLATA, B.; SELVIN, J.; TUKARAM, K. Optimization of iron chelating biosurfactant production by *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 135-143, 2015.

HLIHOR, Raluca Maria et al. Bioremediation: An Overview on Current Practices, Advances, and New Perspectives in Environmental Pollution Treatment. **BioMed research international**, v. 17, n.29, p192, 2017.

INÈS, Mnif; SAHNOUN, Rihab; GHRIBI, Dhouha. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, 2017.

JAGTAP, S. et al. Production of bioemulsifier by acinetobacter species isolated from healthy human skin. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 1, p. 70–76, 2010.

JANEK, Tomas *et al.* Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. **Bioresource technology**, v. 101, n. 15, p. 6118-6123, 2010.

JARA, A.M.A.T.; ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.101, p. 315-318, 2013.

JORGE, Neuza et al. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. **Química Nova**, p. 947-951, 2005.

KALYANI, A. L. T. et al. Isolation of bio-surfactant producing actinomycetes from terrestrial and marine soils. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 9, p. 4015, 2014.

KARLAPUDI, Abraham Peele et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. **Petroleum**, v 27, n.8, p. 131, 2018.

KIM, Pyoung Il et al. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **J Microbiology Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KUDDUS, Mohammed; RAMTEKE, Pramod W. Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 7, p. 809-816, 2011.

KUYUKINA, Maria S. et al. Trehalolipid biosurfactants from nonpathogenic *Rhodococcus actinobacteria* with diverse immunomodulatory activities. **New biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 559-568, 2015.

LARIK, I. A. et al strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-10, 2018.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B. e NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) **practical implementations**. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198. 2003.

LEE, Eun Young et al. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 52, n. 4, p. 400-406, 2002.

LI, Mu et al. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. **Bioresource technology**, v. 148, p. 114-120, 2013

LINS, Amanda B. et al. Biosurfactant Production by *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 Using Controlled Temperature Through of Arduino. **Int. J. Curr. Microbiology Applied Science**, v. 6, n. 12, p. 2708-2715, 2017.

LIRA, Felipe; BERG, Gabriele; MARTÍNEZ, José L. Double-face meets the bacterial world: the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2190, 2017.

LIU, Boqun et al. Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. **Marine pollution bulletin**, v. 107, n. 1, p. 46-51, 2016.

LOONEY, W. John; NARITA, Masashi; MÜHLEMANN, Kathrin. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 5, p. 312-323, 2009.

LUNA, Juliana M. et al. Application of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP 0996 Produced in Low-Cost Substrates for Hydrophobic Contaminants Removal. **CHEMICAL ENGINEERING**, v. 64, 2018.

LUNA, Juliana M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1527-1534, 2011.

MAKKAR RS, CAMEOTRA SS. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology** 58:428-34, 2002.

MAKKAR, Randhir S.; CAMEOTRA, Swaranjit S.; BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MAROTTI, Braz S. et al. Screening of species from the genus *penicillium* producing cell bound lipases to be applied in the vegetable oil hydrolysis. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 427-435, 2017.

MERICI, Thiago Alonso; SARAIVA, Victor Barbosa; DO CARMO, Alexandre Peixoto. Metodologia para identificação de bactérias do solo através da manipulação de cores primárias. **Revista Internacional de Ciências**, v. 7, n. 2, p. 180-201, 2018.

MESSIHA, N. A. S. et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot. **European journal of plant pathology**, v. 118, n. 3, p. 211-225, 2007.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Biopolymers**, v. 104, n. 3, p. 129–47, 2015.

MONTEIRO, A. S., BONFIM, M. R., DOMINGUES, V. S., CORREA, A. Jr., SIQUEIRA, E. P., ZANI, C. L., et al. (2010). Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, 2010.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D. et al.; Bioremediation of Petroleum Derivative Using Biosurfactant Produced by *Serratia marcescens* UCP / WFCC 1549 in **Low-Cost Medium**. v. 4, n. August, p. 550–562, 2015.

MOUSSA, T. A A; AHMED, G. M.; ABDEL-HAMID, S. M. Optimization of Cultural Conditions for Biosurfactant Production from *Nocardia amarae*. v. 2, n. 11, p. 844–850, 2006.

MUKHERJEE, Piyali; ROY, Pranab. Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 967, 2016.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MULLIGAN, C.N. Environmental application for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NETA, Nair do Amaral Sampaio et al. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 324-331, 2012.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater. **Bioresource Technology**. Jan;97(2):336-341, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova** , v.25, p.772-776, 2002.

NOOMAN, M. U. et al. Hypocholesterolemic impact of newly isolated sophorolipids produced by microbial conversion of safflower oil cake in rats fed high-fat and cholesterol diet. **Grasas y Aceites**, v. 68, n. 3, p. 212, 2017.

NWINYI, Obinna C.; AJOMIWE, Chisom G.; OLAWORE, Yemisi A. Morphological and Biochemical Characterization of Biosurfactants Producing Bacteria from Diesel Contaminated Soil. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2018.

OLIVERIA-GARCIA D, Dall'Agnol M, Rosales M, et al. Fimbria and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. **Cell Microbiology**. 2003;5:625-636.

OKOH AI., TREJO-HERNANDEZ M.R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. **African Journal Biotechnology** 5:2520–2525 (2006).

PALLERONI NJ, BRADBURY JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al.1983. **International Journal Syst Bacteriology** ;43:606-9, 1993.

PARREIRA, Adriano Guimaraes; ALVES, Stenio Nunes; TOTOLA, Marcos Rogerio. Avaliação dos efeitos de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* LBBMA 4914 e *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 4951E e surfactantes sintéticos sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 7, n. 2, p. 101-110, 2016.

PARTHASATATHI, R.; ELANGO, R.; JOICE, P.A. Isolation and identification of potential biosurfactant producers from mangrove ecosystems. **Golden Research Thoughts**, v. 3, n. 7, p. 1-6 , 2014.

PELIZER, L.H. ;PONTIERI, M.H.; MORAES, I.O. Utilização de Resíduos Agroindustriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**. Vol 2, 2007.

PEREIRA, Daniel David Franco; JÚNIOR, Sérgio Duvoisin; ALBUQUERQUE, Patrícia Melchionna. O Estudo da produção de biossurfactante por fungos amazônicos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 4, p. 0688-0695, 2017.

PERFUMO, A., SMYTH, T. J. P., MARCHANT, R., and BANAT, I. M (2009). "Production and roles of biosurfactant and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates," in

**Microbiology of Hydrocarbons**, Oils, Lipids and Derived Compounds, ed Kenneth N. Timmis (Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag), 1502–1512.

PINTO, M.H., MARTINS, R.G., COSTA, J.A.V. **Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos**. Quim. Nova, Vol. 32, No. 8, p. 2104-2108, 2009.

RATLEDGE, Colin; BOULTON, Christopher A. Biosynthesis of Lipid Precursors to Surfactant Production. In: **Biosurfactants and Biotechnology**. Routledge, p. 47-87, 2017.

ROCHA, Maria VP *et al.* Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295-1299, 2006.

ROVINA, Fernanda; EHRHARDT, Daniela Diniz; TAMBOURGI, Elias Basile. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, 2018.

ROVINA, Fernanda; EHRHARDT, Daniela Diniz; TAMBOURGI, Elias Basile. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, 2018.

ROVINA, Fernanda; EHRHARDT, Daniela Diniz; TAMBOURGI, Elias Basile. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 4, 2018.

RUFINO, Raquel D. *et al.* Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 907-914, 2008.

RUFINO, R. D. *et al.* Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, v. 84, n. 1, p. 1-5, 2011.

RUFINO, Raquel *et al.* Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 6-6, 2014.

SANTOS, A. P. P. *et al.* Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 2, 2018.

SANTOS, Danyelle *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SANTOS, Danyelle KF *et al.* Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43-50, 2013.

SANTOS, L.F., ISHII, P. L. Xilanases: Principais Metodologias e Parâmetros Cinéticos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. 2:7-15. 2012.

SANTOS, S.; MEDRONHO, B.; SANTOS, T.; ANTUNES, F. Amphiphilic Molecules. Drug Delivery Systems. Drug Delivery Treatment, Advances in Predictive, **Preventive and Personalised Medicine**, v. 4, 2013.

SARJNA, K.V., SUKUMARAN, R.K., GOTTUMUKKALA, L.D., PANDEY, A., 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. **Bioresource Technology** 191, 133–139.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 68–73, 2007.

SARUBBO, Leonie A. et al. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 59-67, 2001.

SEKHON-RANDHAWA, K. K. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: challenges and opportunities. Biosurfactants, ed. N. Kosaric and FV Sukan, **CRC Press**, Boca Raton, FL, p. 49-67, 2014.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Prog. Energ. Comb. Sci.** 2008, 34 , 714–724.

SHARMA, Deboja; KALITA, Swapna; DUARAH, Kondroshree. Isolation and Characterization of Bio Surfactant Producing Micro Organisms and to Determine it's in Vitro Antagonistic Activity against Phytopathogenic Fungi. **International Journal of Current Trends in Science and Technology**, v. 7, n. 10, p. 20355-20368, 2017.

SILVA, Francisco Sylvânio Ferreira et al. Produção de biossurfactantes por cepas bacterianas de origem marinha utilizando querosene como fonte de carbono. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 07-18, 2017.

SINGHAL, Lipika et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: From trivial to grievous. Indian journal of medical microbiology, v. 35, n. 4, p. 469, 2017.

SMYTH, T. J. P., PERFUMO, A., MARCHANT, R., and BANAT, I. M. (2010a). "Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids," in **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, ed K. N. Timmis (Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag), 3706–3723 (2010a).

SOBRINHO, H. B. S.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; PORTO, A. L. F.; SARUBBO. L. A. Application of Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 in Removal of Petroleum Derivative from Soil and Sea Water. **Journal of Life Sciences**, v.7, n.6, p.559-569, 2013.

SPINA, Federica et al. Screening of Anionic Biosurfactants Production among Fungi and Bacteria. **Chemical Enguneering Transactions**, v. 64, p. 493-498, 2018.

SWINGS J, De Vos P, Van den Mooter M, De Ley J. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981). **International Journal System Bacteriology** 33:409-13, 1983.

TAZDAÏT, D. *et al.* Preliminary evaluation of a new low-cost substrate (amurca) in production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fuel-contaminated soil, v.41, p.274-281, 2018.

TONINI, Rita Maria Costa Wetler; DE REZENDE, Carlos Eduardo; GRATIVOL, Adriana Daudt. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010.

UZOIGWE, Chibuzo *et al.* Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 245, 2015.

VARGAS, Josefina Pérez *et al.* Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 33, p. 105-114, 2017.

VARTIVARIAN S, Anaissie E. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: **Churchill Livingstone**; 2000. p. 2335-9.

VARJANI, S.J., UPASANI, V.N. Core flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo-and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**. 220, 175–182, 2016.

VECINO, X. *et al.* Bioremediation of Sewage Sludge Contaminated with Fluorene Using a Lipopeptide Biosurfactant. v. 9, n. 6, p. 739–742, 2015.

VESHAREH, Moein Jahanbani *et al.* Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, p. 1-13, 2018.

WAGNER, Fritz; SYLDATK, Christoph. Production of Biosurfactants. In: **Biosurfactants and Biotechnology**. Routledge, v.34, p. 89-120, 2017.

YADAV, Ankit Kumar *et al.* Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. **Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 56-62, 2016.

ZAINAL, Noor Shaidatul Lyana Mohamad; OMAR, Suhaila Mohd; ASHAARI, Mardiana Mohd. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria isolated from petroleum contaminated sites with the potential to be used in bioremediation. **Science**, v. 1, n. 2, p. 11-15, 2017.

ZAMBRY, Nor Syafirah *et al.* Production and partial characterization of biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. R1. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 40, n. 7, p. 1007-1016, 2017.

ZHAO, Xin *et al.* Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 5, p. 405-412, 2008.

ZHAO, Lina *et al.* <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. **Bioresource technology**, v. 197, p. 23-29, 2015.

ZONARO, Emanuele et al. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 584, 2015.

## **CAPÍTULO II**

### **Artigo I**

**Conversão de resíduo agroindustrial na produção de emulsificante por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 e aplicação em processo de biorremediação**

Manuscito submetido para publicação na revista:

**International Journal of Chemical Engineering**

(Qualis A2 para Engenharias II)

## **Conversão de resíduo agroindustrial na produção de emulsificante por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 e aplicação em processo de biorremediação**

**Ianne Batista Nogueira<sup>1</sup>, Dayana Montero-Rodríguez<sup>2</sup>, Rosileide Fontenele da Silva Andrade<sup>2</sup>, Amanda Barbosa Lins<sup>1</sup>, Ana Paula Bione<sup>1</sup>, Israel Gonçalves Sales da Silva<sup>1</sup>, Luciana de Oliveira Franco, Galba Maria de Campos-Takaki<sup>3,\*</sup>**

<sup>1</sup>Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil;

<sup>2</sup>Programa Nacional de Pós-Doutorado PNPd-CAPES, Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil;

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil;

<sup>4</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

\*e-mail do autor para correspondência: [galba\\_takaki@yahoo.com.br](mailto:galba_takaki@yahoo.com.br) ; Telef.: +51-81-21194044; Fax: +55-81-21194043.

### **Resumo**

O potencial de produção de uma biomolécula com propriedades surfactante e emulsificante por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 foi investigado pela determinação da atividade hemolítica, obtendo-se um halo de 9 mm em ágar sangue. A fermentação foi realizada em meio mineral salino suplementado com 10% de óleo de soja pós-fritura (OSPF) e diferentes concentrações de glicose, peptona, ZnCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub>, de acordo a um planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>. Os resultados mostraram que na condição 6 (meio constituído por 4% de glicose, 1% de peptona, 2,72% de ZnCl<sub>2</sub> e 2,46% de MgSO<sub>4</sub>), se obtiveram os melhores resultados, com excelente redução da tensão superficial a 27,1 mN/m e maior índice de emulsificação de 82,74%, com óleo motor queimado. A propriedade bioemulsificante do tensoativo produzido foi confirmada pelo índice de emulsificação de 78.57, 54.07 e 58.62% utilizando óleo de soja, óleo de milho e óleo diesel, respectivamente, e a estabilidade a diferentes valores de pH, temperatura e concentração de NaCl. Além disso, o tensoativo demonstrou potencial promissor para biorremediar contaminantes hidrofóbicos no meio ambiente, pois exibiu habilidade para diminuir a viscosidade de óleo de soja residual e óleo motor queimado, bem como excelente capacidade de dispersão de óleo motor queimado em água, com 69,94 cm<sup>2</sup> de área de deslocamento de óleo (ODA).

**Palavras-chave:** bactéria Gram-negativa, óleo de soja pós-fritura, tensoativo, bioemulsificante, dispersão.

## Abstract

The potential of producing a biomolecule with surfactant and emulsifying properties by *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 was investigated by determining the hemolytic activity, obtaining a halo of 9 mm in blood agar. Fermentation was carried out in saline mineral medium supplemented with 10% post-fry soybean oil (OSPF) and different concentrations of glucose, peptone,  $ZnCl_2$  and  $MgSO_4$ , according to a complete factorial design  $2^4$ . The results showed that in the 6% of glucose, 1% peptone, 2.72%  $ZnCl_2$  and 2.46%  $MgSO_4$ , the best results were obtained with excellent surface tension reduction to 27.1 mN / m and a higher emulsion index of 82.74% , with engine oil burnt. The bioemulsifying property of the surfactant produced was confirmed by the emulsification index of 78.57, 54.07 and 58.62%, using soybean oil, corn oil and diesel oil, respectively, and stability at different pH, temperature and concentration of NaCl. In addition, the surfactant presented a promising potential for bioremediation of hydrophobic contaminants in the environment as it had the ability to reduce the viscosity of the residual soybean oil and burned engine oil as well as excellent dispersion capacity of the burned oil in Water. , with 69.94 cm<sup>2</sup> of oil displacement area (ODA).

**Keywords:** Gram-negative bacteria, waste soybean oil residue, tensoactive, bioemulsifier, dispersion.

## 1. Introdução

Os bioemulsificantes são moléculas anfipáticas com porções hidrofóbicas e hidrofílicas que atuam entre fluidos de diferentes polaridades (óleo/água e água/óleo), permitindo o acesso a substratos hidrofóbicos, aumentando a área de contato de hidrocarbonetos, mobilidade, biodisponibilidade e biodegradação de tais compostos (Jagtap et al., 2010; Fracchia et al., 2015; Shama et al., 2017; Rahman et al., 2019). Eles tendem a alterar as propriedades físicas e químicas dos fluidos ocasionando a capacidade de detergência, lubrificação, espumante e solubilização, emulsificação e redução na viscosidade de líquidos (Santos et al., 2016; Rovina et al., 2018; Gaur et al., 2019).

Os bioemulsificantes são produzidos por uma extensa variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Quando comparados com os de origem sintética, os surfactantes microbianos apresentam diversas vantagens como estabilidade frente a amplas faixas de pH, temperatura e salinidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, as que os tornam promissores em diversas aplicações industriais (Nooman et al. 2017). Os bioemulsificantes têm sido amplamente utilizados na recuperação avançada de petróleo, biorremediação de ambientes poluídos por hidrocarbonetos, remoção de metais pesados e compostos solventes clorados, etc. (Nwinyi et al., 2018; Rocha e Silva, 2018).

Devido ao crescimento da população e os recentes padrões de consumo, observou-se um aumento da produção dos sistemas agroindustriais e agropecuários. Uma enorme quantidade de resíduos é gerada em decorrência do aumento desacerbado da produtividade, acarretando prejuízos de ordem econômica, social e ambiental (Silva et al., 2017). O uso de resíduos como substratos alternativos para formulação de meios de cultura para produzir bioemulsificantes fornecem níveis de carboidratos e/ou lipídios requeridos para suportar o crescimento e a biossíntese do surfactante, favorecendo crescimento do micro-organismo e produção do metabólito (Amaral et al., 2009; Sharma et al., 2014).

*Stenotrophomonas maltophilia* é uma bactéria Gram-negativa que habita em plantas, solo e água. Por causa de interações benéficas com plantas promovendo o crescimento, tornou-se importante para aplicações biotecnológicas em agricultura (Alavi et al., 2013; Lira et al. 2017). Além disso, há vários estudos na literatura sobre o potencial biotecnológico de *S. maltophilia* pela produção de enzimas como lipases e proteases (Kuddus e Ramteke, 2011; Li et al., 2013). Mais recentemente, alguns investigadores destacaram o potencial para produzir biossurfactantes/bioemulsificante, com efetivas propriedades larvicida e/ou pesticida, efetivo na degradação de diesel e óleo motor usado ou na solubilização de fenantreno (Deepali et al., 2014; Gargouri et al., 2017; Larik et al., 2018).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de tensoativos por *S. maltophilia* UCP 1601, usando óleo de soja pós-fritura como substrato de baixo custo, através de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>. Avaliou-se a estabilidade do biossurfactante, seu efeito na viscosidade de compostos hidrofóbicos e efetividade como agente dispersante.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Micro-organismo**

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601, isolada de solo argiloso da margem do Rio Capibaribe, Pernambuco, e identificada por Vilar Júnior (2016). A bactéria foi depositada no Banco de Culturas da Universidade Católica de Pernambuco, registrado na World Federation for Culture Collection (WFCC) e vem sendo mantida no meio ágar nutriente e em glicerol a 30%, sob temperatura de 5°C.

## 2.2 Materiais

O óleo de soja pós-fritura e detergente comercial utilizados neste estudo foram obtidos do comércio informal na cidade de Recife, Brasil. Os reagentes glicose, peptona,  $ZnCl_2$ ,  $MgSO_4$  e Tween 80 foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

## 2.3 Teste de hemólise

O potencial de *S. maltophilia* UCP 1601 na produção de biossurfactante foi investigado utilizando o teste de atividade hemolítica (Satpute et al. 2010). A bactéria foi inoculada na parte central da placa de ágar contendo 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado e incubado a 37 °C por 24 h. A atividade foi avaliada pelo aparecimento de zona clara ao redor da colônia de *S. maltophilia*.

## 2.4 Produção de biossurfactante por *S. maltophilia*

### 2.4.1 Preparação do inóculo

Uma colônia de *S. maltophilia* UCP 1601 crescida em ágar nutriente foi transferida para 50 ml de caldo nutriente e incubada a 37°C e 150 rpm em um agitador orbital, por 24 h. Em seguida, a densidade óptica do meio de cultivo foi conferida em espectrofotômetro UV/Vis Libra S32 (Biochrom Ltd.) a 600 nm. O cultivo com densidade óptica 0,8-1,0 a 600 nm foi utilizada como inóculo.

### 2.4.2 Produção de bioemulsificante

A produção de tensoativos foi realizada em frascos Erlenmeyers contendo 100 ml de meio mineral salino (MMS) [composição em g/l:  $(NH_4)_2SO_4$  (1,0),  $K_2HPO_4$  (2,0),  $KH_2PO_4$  (0,5),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (10,0), NaCl (5,0),  $FeSO_4$  (0,2) e  $CaCl_2$  (0,5)] (Hemlata et al. 2015), suplementado com 10% óleo de soja pós-fritura. O meio foi suplementado com glicose, peptona,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$ , de acordo a um planejamento fatorial completo  $2^4$ , com 16 experimentos em triplicata (seção 2.4.5). Os meios foram ajustados a pH 7 e esterilizados em autoclave por 15 min a 121°C. Em seguida, foram inoculados a 10% e incubados a 30°C sob rotação orbital (150 rpm), por 96 h. Passado esse período, os meios foram submetidos a centrifugação a 10000 rpm e 10°C, durante 15 min. Os líquidos metabólicos livres de células obtidos foram utilizados para avaliar a produção de biossurfactante e/ou bioemulsificante, a través da determinação da tensão superficial e o índice de emulsificação, respectivamente, como se descreve posteriormente (seção 2.4.4 e 2.4.5).

### 2.4.3 Planejamento fatorial

Neste estudo, se utilizou um planejamento fatorial completo  $2^4$  para avaliar a influência de quatro variáveis (glicose, peptona,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$ ). Cada variável independente foi investigada em dos níveis, mínimo (-1) e máximo (+1), segundo se mostra na Tabela 1. Foram realizados 16 ensaios experimentais em triplicata e a tensão superficial e o índice de emulsificação foram utilizados como variáveis resposta. Os dados experimentais obtidos foram analisados pelo software Statistica®, version 10.0 (StatSoft Inc., USA) e a significância dos resultados foi testada ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 1.** Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo  $2^4$  para a produção de tensoativos por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601.

Variáveis	Nível mínimo (-1)	Nível máximo (+1)
Glicose (% m/v)	1	2
Peptona (% m/v)	0,5	1
$ZnCl_2$ (mM)	50	100
$MgSO_4$ (mM)	50	100

### 2.5.3 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial foi determinada no líquido metabólico livre de células, utilizando um tensiômetro automático (modelo Sigma 70 KSV Ltd, Finlândia) e o método do anel Du Nouy, tal como descrito por Kuyukina et al. (2001). As medições foram realizadas em triplicata.

### 2.5.4 Determinação do índice de emulsificação ( $IE_{24}$ )

O índice de emulsificação ( $IE_{24}$ ) foi determinado de acordo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Brevemente, 1,0 ml de líquido metabólico livre de células e 1,0 ml de óleo motor queimado foram misturados em um tubo de ensaio e homogeneizados vigorosamente em vortex por 2 min à temperatura ambiente ( $25^\circ C$ ). As misturas foram mantidas em repouso durante 24 h e após esse tempo o índice foi determinado através da seguinte equação:

$$IE_{24} (\%) = He/Ht \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

onde He = altura da emulsão; Ht = altura total da mistura.

### 2.5.5 Determinação da estabilidade do bioemulsificante

A estabilidade do bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 na condição selecionada do planejamento foi determinada através do índice de emulsificação ( $EI_{24}$ ). O líquido metabólico livre de células foi submetido por separado a diferentes

temperaturas (0, 5, 30, 37, 50 e 100°C), ajustado a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12) ou concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8, 10 e 12 %). A continuação se determinou o EI<sub>24</sub> usando óleo motor queimado como substrato hidrofóbico, seguindo a metodologia descrita previamente na secção 2.5.4 (Souza et al., 2016; Maia et al., 2018).

### **2.5.6 Efeito na viscosidade de compostos hidrofóbicos**

O efeito do bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 na viscosidade de compostos hidrofóbicos (óleo de soja pós-fritura e óleo motor queimado) foi investigado usando a metodologia descrita por Andrade Silva et al. (2014) e Maia et al. (2018). A viscosidade dos compostos hidrofóbicos foi determinada em tubos de ensaio, antes e depois de adicionar 2 ml do líquido metabólico livre de células (bioemulsificante bruto) da condição selecionada do planejamento, e a mistura ser homogeneizada vigorosamente em vórtex por 1 min. A determinação foi feita usando um viscosímetro automático (Brookfield (Middleboro, MA, USA) TC 500) e os resultados foram expressados em centipoise (cP).

### **2.5.7 Ensaio de dispersão de óleo em água**

Para determinar a capacidade de dispersão do bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 foi realizado o teste de dispersão de óleo colocando 40 ml de água destilada em uma placa de Petri (10 cm de diâmetro), seguido de adição de 1,0 ml de óleo de motor queimado na superfície da camada de água. Em seguida, 0,5 ml do líquido metabólico livre de células (bioemulsificante bruto), detergente comercial, Tween 80 ou água destilada foram colocados no centro do filme de óleo (Ali Diab and El Din, 2013; Andrade Silva et al., 2014). A capacidade de dispersão do bioemulsificante foi comprovada pela dispersão do óleo, resultando na formação de área do óleo deslocado. Os ensaios foram realizados em triplicata, os diâmetros de zona clara foram medidos e as respectivas áreas de deslocamento de óleo (ODA) foram determinadas e expressas em cm<sup>2</sup>, usando a equação abaixo (Andrade Silva et al., 2014):

$$\text{ODA} = 3,14 \times r^2 \text{ (Eq. 2)}$$

### **2.5.8 Extração de Bioemulsificante**

O bioemulsificante produzidos por *S. maltophilia* UCP 1607 foi extraído do sobrenadante pelo método de precipitação com solvente orgânico com álcool 70% e acetona na proporção 1: 1 (v / v). A mistura foi deixada em repouso por 24 h a 4 °C, depois os materiais precipitados foram centrifugados a 5000g por 15 min, a 5 °C. O sobrenadante

foi descartado e o material isolado foi submetido à diálise contra água deionizada, que foi trocada a cada 3 h, por 96 h a 5 ° C (Andrade Silva et al., 2014).

### **2.5.9 Caracterização Bioquímica**

As concentrações de proteína no bioemulsificante foram determinadas usando o kit de teste de proteína total da Labtest Diagnóstica S.A., Brasil. Os teores totais de carboidratos foram estimados com o uso do método do ácido fenol-sulfúrico ( DuBois et al., 1956). O conteúdo lipídico determinado de acordo com Manocha et al. (1980).

#### **2.5.10 Determinação da carga iônica**

A carga iônica das biomoléculas foi determinada usando um potenciômetro Zeta modelo ZM3-D-G, Sistema Zeta Meter 3.0+, com imagens diretas para o vídeo do Zeta Meter, San Francisco, CA, EUA ( Andrade et al., 2015).

#### **2.5.11 Aplicação do bioemulsificante**

O teste do bioemulsificante para o processo de biorremediação foi realizado utilizando-se 60 g de areia de praia com 5 mL de óleo de motor queimado. O biossurfactante produzido por *S. maltophilia* cultivado em melhor condição de planejamento fatorial foi utilizado nos testes de remoção. Frações de 20 g da areia foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, os quais foram submetidos aos seguintes tratamentos: adição de 40 mL do líquido metabólico isento de células e adição de 40 mL de água destilada (controle). Os testes foram realizados em triplicata e as amostras foram incubadas em um agitador rotativo (150 rpm) por 48 horas a 28 ° C. Em seguida, eles foram centrifugados a 5.000 g por 10 min para separação da solução de lavagem e do sedimento de areia. A quantidade de óleo que permaneceu foi determinada gravimetricamente usando hexano (Luna et al., 2011).

## **3. Resultados e discussão**

### **3.1 Caracterização e atividade hemolítica de *S. maltophilia* UCP 1601**

A Bactéria *S. maltophilia* UCP 1601 apresentou mobilidade flagelar após período de incubação de 24 horas a 37 °C. A motilidade bacteriana foi detectada a partir da

turbidez (observação de uma zona de crescimento difuso) que partiu de uma linha de inoculação feita com agulha de platina.



Figura 4 A bactéria *S.maltophilia* UCP 1601 apresentou mobilidade após período de 24h.

A bactéria *S. maltophilia* UCP 1601 apresentou sensibilidade aos antibióticos ceftazidina, levofloxacina, minociclina, clorofenicol, norfloxacina, eritromicina e nitrofurantoína; e demonstrou resistência a clindamicina, cefdoxacina e amoxicilina.



Figura 5 Teste de antibiograma por *S.maltophilia* UCP 1601

A atividade hemolítica tem sido utilizada por vários pesquisadores como um dos critérios para selecionar micro-organismos produtores de tensoativos (Satpute et al. 2010; Hemlata et al., 2015; Pele et al., 2018; Gaur et al., 2019). Os micro-organismos com atividade hemolítica positiva mostram uma zona clara nas placas de ágar sangue, o que se comprovou para *S. maltophilia* UCP 1601. Durante seu crescimento radial no meio a bactéria formou um halo de 9 mm de diâmetro, após 24 h de incubação. Similarmente, Hemlata et al. (2015) informaram a formação de um halo de 13,00 mm por *S. maltophilia* NBS-11. Previamente, outros pesquisadores comprovaram a atividade hemolítica positiva de cepas de *Stenotrophomonas* sp. produtoras de biossurfactantes (Patil et al., 2012; Deepali et al., 2014).

### 3.2 Produção de bioemulsificante por *S. maltophilia* UCP 1601

A medição da tensão superficial tem sido frequentemente utilizada como um método rápido para detectar agentes tensoativos no meio de cultura, mas apenas permite identificar compostos que possuem capacidade significativa na redução da tensão superficial. Assim, o índice de emulsificação é visto como um método adequado para identificar emulsificantes que são marcadamente caracterizados pela sua excelente

capacidade de estabilização da emulsão sem necessariamente reduzir a tensão superficial. Por isso, ambas as técnicas têm sido utilizadas para a detecção adicional de tensoativos em meios de cultura (Uzoigwe et al., 2015; Pele et al., 2018; Rahman et al., 2019).

Assim, a Tabela 2 apresenta os resultados de tensão superficial e índice de emulsificação do líquido metabólico livre de células, produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 após cultivo nas 16 condições do planejamento (Tabela 1). Como se mostra, na condição 6 (4% de glucose, 1% de peptona, 100 mM de ZnCl<sub>2</sub> e 50 mM de MgSO<sub>4</sub>) foi constatada a melhor atividade tensoativa, pelo menor valor de tensão superficial (27,1 mN/m) e o maior índice de emulsificação (82,74%) usando óleo motor queimado.

**Tabela 2.** Planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> utilizado para a produção de biotensoativos por *S. maltophilia* UCP 1601 após 96 h de cultivo no meio contendo 10% óleo de soja pós-fritura. Os ensaios foram realizados em triplicata e se mostram os valores médios de tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (ÍE), utilizadas como variáveis resposta.

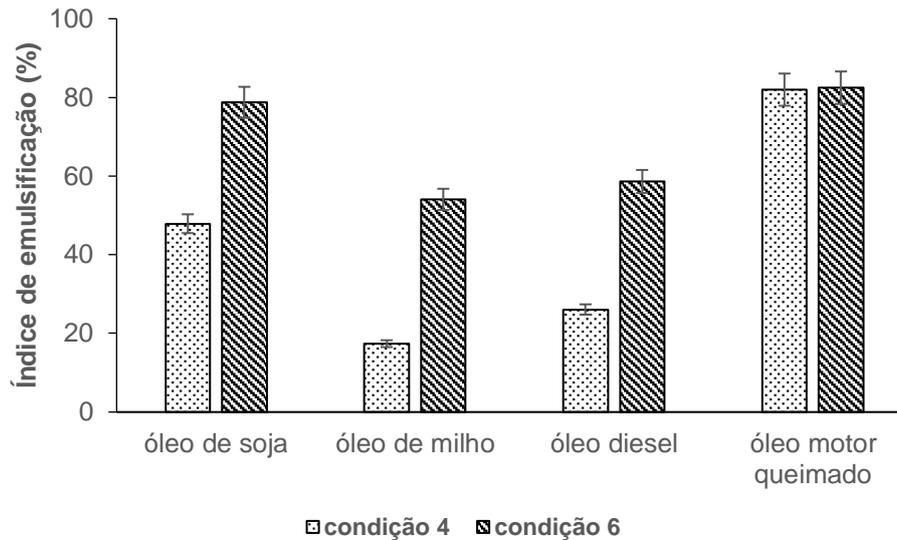
Ensaio	Glicose	Peptona	Zncl <sub>2</sub>	Mgso <sub>4</sub>	TS (mn/m)	ÍE (%)
1	-1	-1	-1	-1	37,2	53,84
2	+1	-1	-1	-1	34,2	60,71
3	-1	+1	-1	-1	41,7	61,90
4	+1	+1	-1	-1	28,4	81,97
5	-1	-1	+1	-1	37,6	68,00
6	+1	-1	+1	-1	27,1	82,74
7	-1	+1	+1	-1	35,8	76,42
8	+1	+1	+1	-1	36,4	40,62
9	-1	-1	-1	+1	36,9	72,41
10	+1	-1	-1	+1	47,6	59,09
11	-1	+1	-1	+1	41,7	63,81
12	+1	+1	-1	+1	33,8	78,94
13	-1	-1	+1	+1	33,1	42,85
14	+1	-1	+1	+1	47,3	79,44
15	-1	+1	+1	+1	34,9	59,09
16	+1	+1	+1	+1	43,7	65,62

Micro-organismos produtores de biossurfactante são aqueles que excretam no líquido metabólico biomoléculas com capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 40 mN/m, ou pelo menos, conseguir uma redução  $\geq 20$  mN/m (Rahman et al., 2019). Segundo a literatura, os biossurfactantes bacterianos são mais eficazes na redução da tensão superficial. Particularmente, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

tem sido o micro-organismo mais estudado por produzir biossurfactante, com a capacidade de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 28-27 mN/m (Sekhon e Rahma, 2016; Varjani e Upasan, 2017; Liu et al., 2018). Contudo, nas últimas décadas outras bactérias vêm sendo exploradas nesse sentido, como para *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Gargouri et al., 2017; Maia et al., 2018; Araújo et al., 2019). Os resultados obtidos com *S. maltophilia* UCP 1601 indicaram uma redução da água para 27,1 mN/m, sendo valor de tensão superficial promissor para biossurfactantes, quando comparado aos estudos realizados por Hemlata et al. (2015) e Larik et al. (2018). Os investigadores descrevem valores inferiores para a tensão superficial a 29,3 mN/m e 33,9 mN/m, respectivamente, para biossurfactantes produzidos por *S. maltophilia* NBS-11 e *S. maltophilia* 5DMD (Belcher et al., 2012; Cerqueira et al., 2012; Deepali et al., 2014; Hemlata et al., 2015).

A propriedade de estabilização de emulsão pode ser avaliada pela capacidade de manter pelo menos 50% do volume original da emulsão após 24 horas de formação (Lima et al., 2017). Assim, estudos realizados demonstram que tensoativo produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 apresenta propriedade emulsificante, quando utilizado óleo motor queimado, com  $IE_{24}$  de 82,74%, como também com óleo de soja, óleo de milho e diesel  $IE_{24}$  de 78.57, 54.07 e 58.62 %, respectivamente, na condição 6 do planejamento (4% de glicose, 1% de peptona, 100 mM de  $ZnCl_2$  e 50 mM de  $MgSO_4$ ) (Tabela 2). Desta forma, se escolheu a condição 6 do planejamento para os estudos seguintes.

**Figura 1.** Índice de emulsificação do biossurfactante bruto produzido por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 produzido nas condições 4 e 6 do planejamento fatorial completo  $2^4$ , utilizando diferentes substratos hidrofóbicos.



### 3.3 Análise estatística

#### 3.3.1 Tensão superficial

Neste estudo, se utilizou um planejamento fatorial completo  $2^4$  para analisar a influência de 4 componentes do meio de cultura (glucose, peptona,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$ ) para a produção de biossurfactante/bioemulsificante por *S. maltophilia* UCP 1601. Uma das variáveis resposta ou dependente utilizadas foi a tensão superficial e a seguinte equação foi usada para estabelecer sua relação com as variáveis independentes:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{234}X_2X_3X_4 \quad (\text{Eq. 3})$$

onde  $Y$  é a variável resposta (tensão superficial);  $b_0$  é uma constante;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$  são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares e  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{14}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{24}$ ,  $b_{34}$ ,  $b_{123}$ ,  $b_{124}$ ,  $b_{134}$  e  $b_{234}$  são os coeficientes de interação.

Para analisar o modelo matemático, ajustes foram feitos pelos métodos de regressão no linear e na Tabela 1 do Material suplementar se mostram os valores obtidos experimentalmente e os preditos pelo modelo, para obter o menor valor de tensão superficial. A Tabela 2 do Material suplementar mostra o análise de variância (ANOVA) dos efeitos das variáveis independentes e as interações entre elas sobre a tensão superficial e demonstra que os dados experimentais obtidos não foram estatisticamente significativos, quando analisados no nível de confiança de 95%. Embora o coeficiente de determinação deu acima de 0,90 ( $R^2=0,9919$ ), nem as variáveis testadas nem a interação dentre elas demonstraram efeito significativo sobre a tensão superficial, nas concentrações utilizadas para cada nível. Sugere-se então, que um outro planejamento fatorial seja desenhado, com novas concentrações de glicose, peptona,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$ ,

para analisar a influência destes componentes do meio. Outros parâmetros como o pH, temperatura, agitação ou período de incubação podem influenciar também na tensão superficial, segundo informado por Santos et al. (2014), Silva et al. (2018) e Rahman et al. (2019).

### 3.3.2 Índice de emulsificação

O planejamento fatorial completo  $2^4$  ilustrado na Tabela 1 também permitiu analisar a influência de 4 componentes do meio de cultura (glicose, peptona,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$ ) no índice de emulsificação, como variável resposta. A seguinte equação foi usada para estabelecer sua relação com as variáveis independentes:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{123}X_1X_2X_3 + b_{124}X_1X_2X_4 + b_{134}X_1X_3X_4 + b_{234}X_2X_3X_4 \text{ (Eq. 4)}$$

onde  $Y$  é a variável resposta (índice de emulsificação);  $b_0$  é uma constante;  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  e  $b_4$  são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares e  $b_{12}$ ,  $b_{13}$ ,  $b_{14}$ ,  $b_{23}$ ,  $b_{24}$ ,  $b_{34}$ ,  $b_{123}$ ,  $b_{124}$ ,  $b_{134}$  e  $b_{234}$  são os coeficientes de interação.

Para analisar o modelo matemático, ajustes foram feitos pelos métodos de regressão no linear e na Tabela 1 do Material suplementar se mostram os valores obtidos experimentalmente e os preditos pelo modelo, para obter o maior valor do índice de emulsificação. A Figura 1 do Material suplementar representa a relação dentre estes valores, mostrando sua distribuição perto da linha, o que indica que a Equação 5 proposta pelo modelo matemático explica os valores de índice de emulsificação obtidos. Isto foi comprovado pelo elevado coeficiente de determinação ( $R^2=0,9993$ ) obtido na análise de variância (ANOVA) representado na Tabela 3 do Material suplementar. O ajuste do modelo foi de 98,98% ( $R^2$  ajustado=0,9898), demonstrando que o modelo matemático descrito está de acordo aos dados experimentais.

$$Y = 65,46562 + 3,17562X_1 + 0,58062X_2 - 1,11813X_3 - 0,30937X_4 - 2,43438X_1X_2 - 0,41813X_1X_3 + 2,44063X_1X_4 - 4,49062X_2X_3 + 1,12813X_2X_4 - 2,28812X_3X_4 - 7,64062X_1X_2X_3 + 2,23312X_1X_2X_4 + 5,58188X_1X_3X_4 + 3,38688X_2X_3X_4 \text{ (Eq. 5)}$$

A ANOVA indicou ainda que para os dados experimentais obtidos, apenas as interações de glicose, peptona e  $ZnCl_2$  ( $1*2*3$ ); glicose,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$  ( $1*3*4$ ); e peptona e  $ZnCl_2$  ( $2*3$ ), foram estatisticamente significativas sobre o índice de emulsificação, quando analisados no nível de confiança de 95%. Apenas a interação de glicose,  $ZnCl_2$  e  $MgSO_4$  ( $1*3*4$ ) mostrou efeito positivo no índice de emulsificação.

### 3.4 Estabilidade do bioemulsificante

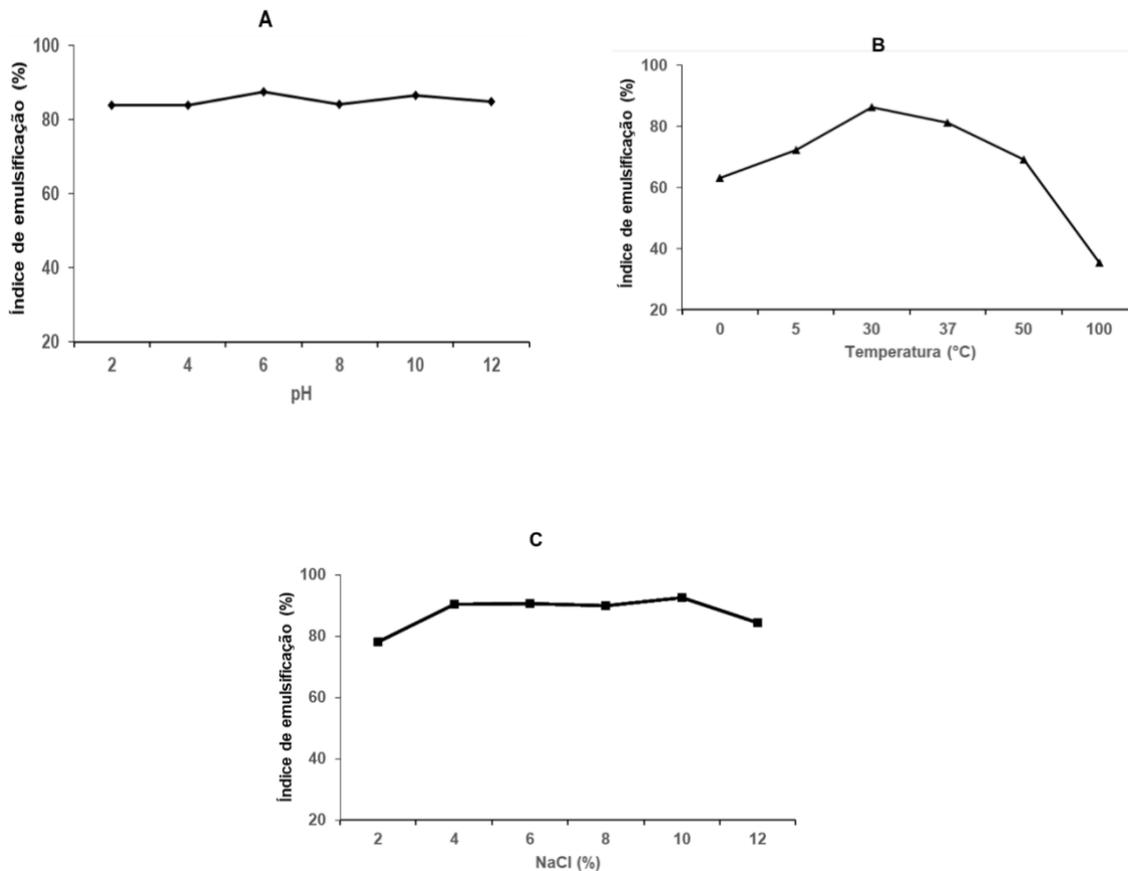
O uso dos tensoativos microbianos nas diversas áreas industriais depende de sua estabilidade em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade (Jain et al., 2013; Perfumo et al., 2018). A Figura 2 ilustra os efeitos destes fatores no bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601.

Os resultados obtidos demonstram que o índice de emulsificação se manteve praticamente inalterável (acima de 80%) frente aos diferentes valores de pH e salinidade testados, com apenas uma pequena diminuição a 2% de NaCl. No entanto, no caso da temperatura, os valores extremos (0 e 100°C) afetaram a emulsificação, o que provavelmente esteja causado pela precipitação parcial do bioemulsificante (Abouseoud et al., 2008; Khopade et al., 2012). Resultados similares foram informados por Gargouri et al. (2017) quando avaliaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Stenotrophomonas* sp. B-2.

### 3.6 Efeito do bioemulsificante na viscosidade

Neste estudo, foi avaliado o efeito do biossurfactante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 na viscosidade de óleo de soja e óleo motor queimado. Os resultados mostraram uma diminuição da viscosidade dos compostos hidrofóbicos testados, de 380,1 a 21,6 cP, para o óleo de soja, e de 148,9 para 46,9 cP para o óleo motor queimado. Similarmente, o biossurfactante produzido por *Candida glabrata* UCP 1556 diminuiu a viscosidade de óleo de soja a 18,5 cP (Lima et al., 2017) e os autores sugeriram sua aplicação na formulação de cosméticos. Recentemente, Maia et al. (2018) reportaram a diminuição da viscosidade de óleo motor queimado pelo bioemulsificante produzido por *Bacillus subtilis* UCP 0146. Esta propriedade de redução de viscosidade é desejável nos tensoativos com potencial de aplicação na indústria petroleira, pois contribui na recuperação melhorada de petróleo, na transportação de óleos pesados ou na limpeza de locais contaminados (Silva et al., 2014; Maia et al., 2018).

**Figura 2.** Estabilidade do bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 frente a diferentes valores de pH (A), temperatura (B) e concentrações de NaCl (C).



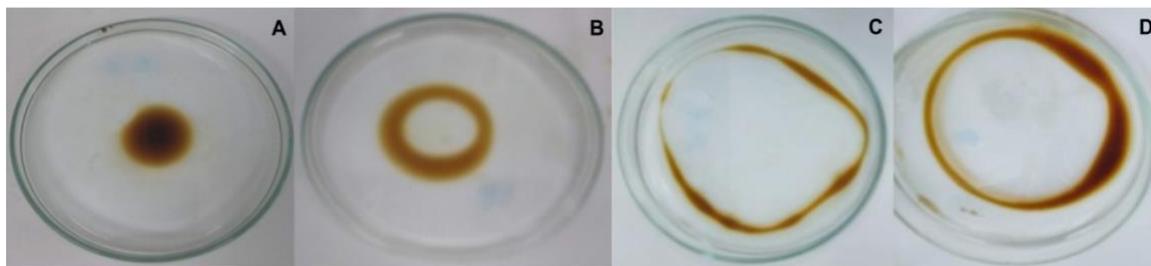
### 3.7 Capacidade de dispersão do bioemulsificante produzidos por *S. maltophilia*

Os dispersantes químicos são amplamente utilizados em diversas aplicações industriais, tais como tintas e revestimentos, petróleo e gás, construção, produtos farmacêuticos, papel e celulose, produtos agrícolas, detergentes e outros (Song et al., 2013). No entanto, seu uso constante pode causar elevado impacto ambiental devido à toxicidade e não-biodegradabilidade de alguns componentes da sua formulação (Kleindienst et al., 2015; Lv et al., 2016). Portanto, há uma demanda crescente por dispersantes compatíveis com o ambiente e de baixo custo e, neste contexto, os tensoativos microbianos são considerados candidatos promissores (Rongsayamanont et al., 2017; Tripathi et al., 2018).

Neste estudo, a capacidade de dispersão do biossurfactante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 foi investigada através do teste de dispersão de óleo, usando motor queimado. Como se evidencia na Figura 3, o tensoativo demonstrou excelente potencial de dispersão com 69,94 cm<sup>2</sup> de área de deslocamento de óleo (ODA), valor similar ao Tween 80 (73,38 cm<sup>2</sup>) e superior ao do detergente comercial (24,49 cm<sup>2</sup>). A atividade de dispersão dos bioemulsificantes está diretamente relacionada com a

capacidade de diminuir a tensão superficial, uma vez que quanto menor a tensão superficial, maior a ODA (Sari et al. 2014; Rahman et al., 2018).

**Figura 3.** Área de dispersão do óleo motor queimado, de acordo com o composto dispersante utilizado: água destilada (A), detergente comercial (B), Tween 80 (C) e biossurfactante bruto produzido por *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 (D).



O resultado obtido pelo biossurfactante produzido por *S. maltophilia* UCP 1601 foi superior aos de outras linhagens de esta espécie (Hemlata et al., 2015; Larik et al., 2018). Recentemente, Gargouri et al. (2017) informaram a formação de halo de dispersão de óleo de 6 cm de diâmetro pelo biossurfactante produzido por *Stenotrophomonas* sp. B-2, o que corresponde a uma ODA de 28,27 cm<sup>2</sup>. Incluso, biossurfactantes produzidos por bactérias de outros gêneros obtiveram valores inferiores de ODA, de acordo ao reportado por Diab e El Din (2013) para *Pseudomonas aeruginosa* SH29 (63,0 cm<sup>2</sup>) e mais recentemente, por Brumano et al. (2017) e Maia et al. (2018) para os biossurfactantes produzidos por *Aureobasidium pullulans* LB83 (50,90 cm<sup>2</sup>) e *Bacillus subtilis* UCP 0146 (55,38 cm<sup>2</sup>), respectivamente. Assim, o biossurfactante produzido neste estudo mostra sua potencial aplicação como agente dispersante em derramamentos de óleo ou formulações industriais.

### 3.8 Carga Iônica e Composição Bioquímica do Bioemulsificante

A biomolécula produzidas por *S. maltophilia* UCP 1601 demonstra um caráter aniônico pelo medidor Zeta. O bioemulsificante com  $-33,97 \pm 0,23$  ZPmv, 138  $\mu$ S / cm a 28,3 °C, escala completa e cabeças bioemulsionantes têm carga negativa e apresentaram perfil aniônico quando submetidos à análise do Zeta meter. O bioemulsificante isolado do sobrenadante livre de células obteve melhor rendimento após a extração do etanol (2,8 g/L), acetona (1,7 g/L) e HCl (0,9g/L). Sigt et al., 2015, obtiveram 2,2 g/L extraído o líquido metabólico com HCl. As caracterizações bioquímicas preliminares demonstraram que o bioemulsificante apresentou uma estrutura polimérica composta por proteínas (28,2%), lipídios (37,6%) e carboidratos (14,7 %). O biopolímero de *Serratia marcescens* UCP 1549 apresentou lipídeos (43%), proteínas (32%), carboidratos(11%) (Araújo et al., 2019).

### **3.9 Teste de biorremediação em solo arenoso**

Os resultados obtidos para a remoção do óleo de motor queimado adsorvido em amostras de solo arenoso por biossurfactante bruto de *S. maltophilia* UCP 1601. Em comparação com a água destilada (controle), resultados promissores foram obtidos pelo bioemulsificante bruto de *S. maltophilia* com remoção de 71,64%. Os resultados descritos na literatura mostram que os biossurfactantes produzidos por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* retiraram de 49 a 54% do óleo cru adsorvido na areia (Bordoloi e Konwar, 2008). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram um potencial considerável de bioemulsificante bruto de *S. maltophilia* UCP 1601 para uso em processos de biorremediação de óleo.

## **4. Conclusão**

*Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 demonstrou seu potencial na produção de bioemulsificante com excelentes propriedades emulsificante e dispersante, bem como eficaz na redução da viscosidade de compostos hidrofóbicos, o que sugere seu potencial biotecnológico na biorremediação de ecossistemas contaminados. *S. maltophilia* UCP 1601 foi capaz de produzir um bioemulsificante de caráter aniônico com boa estabilidade térmica, iônica e do pH a partir da bioconversão de óleo de soja residual como único componente do meio de cultivo. Além disso, o bioemulsificante foi capaz de reduzir a viscosidade de petroderivado. A utilização de óleo de soja para a produção de bioemulsificante por *S. maltophilia* UCP 1601 é uma metodologia ambientalmente adequada, uma vez que promove o aproveitamento de um resíduo gerado pela indústria de alimentos. O bioemulsificante é uma biomolécula que apresenta propriedades importantes com maior potencial biotecnológico para biorremediação de poluentes.

## **Agradecimentos**

Este trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Os autores agradecem ao Núcleo de Pesquisa em Ciências do Ambiente e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, pelo uso de laboratórios.

## Referências bibliográficas

- Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**. 2008; 223:143–151.
- Alavi, Peyman et al. The DSF quorum sensing system controls the positive influence of *Stenotrophomonas maltophilia* on plants. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 67 - 103, 2013.
- Ali Diab and Shereen Gamal El Din. Production and Characterization of Biosurfactants Produced by *Bacillus* spp and *Pseudomonas* spp Isolated from the Rhizosphere Soil of an Egyptian Salt Marsh Plant. **Nat Sci** 2013;11(5):103-112
- Amaral, Priscilla F. Fonseca et al. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 3, p. 179-186, 2009.
- Andrade Silva NR, Luna MAC, Santiago ALCMA, Franco LO; Silva GKB, Souza, PM, Campos-Takaki, GM. 2014. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the Northeast of Brazil. **Inter. J. Mol. Sci.** 15:15377–15395.
- R. F. S. Andrade, A. A. Antunes, R. A. Lima, H. W. C. Araújo, M. A. Resende-Stoianoff, L. O. Franco, and G. M. Campos-Takaki, “Enhanced Production of an Glycolipid Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP / WFCC1556 for Application in Dispersion and Removal of Petroderivatives,” **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.**, vol. 4, no. 7, pp. 563–576, 2015.
- Araújo, H. W., Andrade, R. F., Montero-Rodríguez, D., Rubio-Ribeaux, D., da Silva, C. A. A., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, 18(1), 2.
- Belcher, R. W., Huynh, K. V., Hoang, T. V., & Crowley, D. E. (2012). Isolation of biosurfactant-producing bacteria from the Rancho La Brea Tar Pits. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(12), 3261-3267.
- Brumano, L. P., Antunes, F. A. F., Souto, S. G., dos Santos, J. C., Venus, J., Schneider, R., & da Silva, S. S. (2017). Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process. **Bioresource Technology**, 243, 264-272.
- Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Camargo, F. A., Maria do Carmo, R. P., & Bento, F. M. (2012). Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(3), 1203-1222.

- Cooper D. G. and Goldenberg B. G., "Surface-active agents from two *Bacillus* species," **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 53, no. 2, pp. 224–229, 1987.
- Deepali, K., Sneha, P., & Sucheta, P. (2014). Larvicidal activity of rhamnolipid biosurfactant produced by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Int J Sci Eng Res**, 60-63.
- M. DuBois, K. a. Gilles, J. K. Hamilton, P. a. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," **Anal. Chem.**, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- Fracchia, L. et al. Industrial Applications of Biosurfactants. p. 245–268, 2011.
- Gargouri, B., del Mar Contreras, M., Ammar, S., Segura-Carretero, A., & Bouaziz, M. (2017). Biosurfactant production by the crude oil degrading *Stenotrophomonas* sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(4), 3769-3779.
- Gaur, V. K., Bajaj, A., Regar, R. K., Kamthan, M., Jha, R. R., Srivastava, J. K., & Manickam, N. (2019). Rhamnolipid from a *Lysinibacillus sphaericus* strain ITR51 and its potential application for dissolution of hydrophobic pesticides. **Bioresource technology**, 272, 19-25.
- Hemlata, B.; Selvin, J.; Tukaram, K. Optimization of iron chelating biosurfactant production by *Stenotrophomonas maltophilia* NBS-11. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 135-143, 2015.
- Jagtap, S. et al. Production of bioemulsifier by acinetobacter species isolated from healthy human skin. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 1, p. 70–76, 2010.
- Jain, R.M., K., Mody, N. Joshi, A. Mishra and Jha, B. 2013. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. **International Journal of Biological Macromolecules** 62, 52-58.
- Khopade A., Biao R., Liu X., Mahadik K., Zhang L., Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. **Desalination**. 2012;3:198
- Kleindienst, S., Seidel, M., Ziervogel, K., Grim, S., Loftis, K., Harrison, S., ... & Dittmar, T. (2015). Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(48), 14900-14905.
- Kuddus, Mohammed; Ramteke, Pramod W. Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 7, p. 809-816, 2011.

- Kuyukina MS, Ivshina IB, Philp JC, Christofi N, Dunbar SA, Ritchkova MI. 2001. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal Microbiology**. Meth. 46:149–156.
- Larik, I. A., Qazi, M. A., Phulpoto, A. H., Haleem, A., Ahmed, S., & Kanhar, N. A. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 1-10.
- Li, Mu et al. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. **Bioresource technology**, v. 148, p. 114-120, 2013.
- Lima, R. A., Andrade, R. F., Rodríguez, D. M., Araujo, H. W., Santos, V. P., & Campos-Takaki, G. M. (2017). Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, 11(6), 237-244.
- Lira, Felipe; BERG, Gabriele; MARTÍNEZ, José L. Double-face meets the bacterial world: the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2190, 2017.
- Liu G, Zhong H, Yang X, Liu Y, Shao B, Liu Z. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review. **Biotechnology Bioeng.** 2018. <https://doi.org/10.1002/bit.26517>.
- Lv, Z., Cai, Q., Zhang, B., & Chen, B. (2016). ENV-624: A new high-yielding bio-dispersant producer mutated from *Rhodococcus erythropolis* strain P6-4P.
- Maia, P., Santos, V., Ferreira, A., Luna, M., Silva, T., Andrade, R., & Campos-Takaki, G. (2018). An Efficient Bioemulsifier-Producing *Bacillus subtilis* UCP 0146 Isolated from Mangrove Sediments. **Colloids and Interfaces**, 2(4), 58.
- M. S. Manocha, G. San-Blas, and S. Centeno, "Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains.," **J. Gen. Microbiology**, vol. 117, no. 1, pp. 147–154, 1980.
- Nooman, M. U. et al. Hypocholesterolemic impact of newly isolated sophorolipids produced by microbial conversion of safflower oil cake in rats fed high-fat and cholesterol diet. **Grasas y Aceites**, v. 68, n. 3, p. 212, 2017.
- Nwinyi, Obinna C.; Ajomiwe, Chisom G.; Olawore, Yemisi A. Morphological and Biochemical Characterization of Biosurfactants Producing Bacteria from Diesel Contaminated Soil. **International journal of agriculture and biology**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2018.
- Patil, S. N., Aglave, B. A., Pethkar, A. V., & Gaikwad, V. B. (2012). *Stenotrophomonas koreensis* a novel biosurfactant producer for abatement of heavy metals from the environment. **African Journal of Microbiology Research**, 6(24), 5173-5178.

- Pele, M. A., Montero-Rodriguez, D., Rubio-Ribeaux, D., Souza, A. F., Luna, M. A., Santiago, M. F., ... & Campos-Takaki, G. M. (2018). Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. ***African Journal of Biotechnology***, 17(6), 150-157.
- Perfumo, A., Banat, I. M., & Marchant, R. (2018). Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. ***Trends in biotechnology***.
- Rahman, P. K. S. M., Mayat, A., Harvey, J. G. H., Randhawa, K. S., Relph, L. E., & Armstrong, M. C. (2019). Biosurfactants and Bioemulsifiers from Marine Algae. ***The Role of Microalgae in Wastewater Treatment***, 169–188. doi:10.1007/978-981-13-1586-2\_13
- Rocha e Silva, Nathalia Maria P. et al. Natural Surfactants and Their Applications for Heavy Oil Removal in Industry. ***Separation & Purification Reviews***, p. 1-15, 2018.
- Rongsayamanont, W., Soonglerdsongpha, S., Khondee, N., Pinyakong, O., Tongcumpou, C., Sabatini, D. A., & Luepromchai, E. (2017). Formulation of crude oil spill dispersants based on the HLD concept and using a lipopeptide biosurfactant. ***Journal of Hazardous Materials***, 334, 168-177.
- Rovina, Fernanda; Ehrhardt, Daniela Diniz; Tambourgi, Elias Basile. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. ***Scientia Plena***, v. 14, n. 4, 2018.
- Santos, D. K., Brandão, Y. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., Salgueiro, A. A., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2014). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, 3(3), 48-57.
- Santos, Danyelle et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. ***International journal of molecular sciences***, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.
- Sari M, Kusharyoto W, Artika IM. 2014. Screening for biosurfactant-producing yeast: Confirmation of biosurfactant production. ***Biotechnology***. 13:106–111.
- Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade BA. 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. ***Crit. Review. Biotechnology***. 30:127–144.
- Sekhon Randhawa KK, Rahman PK. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. ***Frontier Microbiology***. 2014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00454>.
- Sharma, Deboja; Kalita, Swapna; Duarah, Kondroshree. Isolation and Characterization of Bio Surfactant Producing Micro Organisms and to Determine it's in Vitro Antagonistic Activity against Phytopathogenic Fungi. ***International***

**Journal of Current Trends in Science and Technology**, v. 7, n. 10, p. 20355-20368, 2017.

Sharma, Sanjay K.; Mulligan, Catherine N.; Mudhoo, Ackmez. Biosurfactants: research trends and applications. **CRC press**, 2014.

Silva, A. C. S. D., Santos, P. N. D., Andrade, R. F. S., & Campos-Takaki, G. M. (2018). Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, 85.

Silva, R. C. F. S., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., Sarubbo, L. A., 2014, Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, **Internacional Journal Molecular Science** 15, 12523–12542.

Song D., S. Liang, Q. Zhang, J. Wang, L. Yan, Development of High Efficient and Low Toxic Oil Spill Dispersants based on Sorbitol Derivants Nonionic Surfactants and Glycolipid Biosurfactants, **Journal Environ Prot**, 04 (2013) 16-22.

Souza, A. F., Rodriguez, D. M., Ribeaux, D. R., Luna, M. A., Lima e Silva, T. A., Andrade, R. F. S., ... & Campos-Takaki, G. M. (2016). Waste soybean oil and corn steep liquor as economic substrates for bioemulsifier and biodiesel production by *Candida lipolytica* UCP 0998. **International journal of molecular sciences**, 17(10), 1608.

Tripathi, Lakshmi et al. Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource. **Biotechnology letters**, p. 1-17, 2018.

Uzoigwe, J. G. Burgess, C. J. Ennis, and P. K. S. M. Rahman, "Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches," **Frontier Microbiology**, vol. 6, no. APR, pp. 1–6, 2015.

Varjani SJ, Upasani VN. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**.02-047. 2017

Vilar junior, José Carlos et al. Physicochemical and antibacterial properties of chitosan extracted from waste shrimp shells. **International journal of microbiology**, v. 2016, 2016.

## Material suplementar

**Tabela 1.** Valores de tensão superficial e índice de emulsificação obtidos experimentalmente e preditos pelo modelo estatístico utilizado para analisar o planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup>.

Ensaio	Tensão superficial (mN/m)		Índice de emulsificação (%)	
	Experimental	Predito	Experimental	Predito
1	37,2	32,71	53,84	53,51
2	34,2	33,69	60,71	61,04
3	41,7	41,19	61,9	62,23
4	28,4	28,91	81,97	81,64
5	37,6	37,09	68	68,33
6	27,1	27,61	82,74	82,41
7	35,8	36,31	76,42	76,09
8	36,4	35,89	40,62	40,95
9	36,9	36,39	72,41	72,74
10	47,6	48,11	59,09	58,76
11	41,7	42,21	63,81	63,48
12	33,8	33,29	78,94	79,27
13	33,1	33,61	42,85	42,52
14	47,3	46,79	79,44	79,77
15	34,9	34,39	59,09	59,42
16	43,7	44,21	65,62	65,29

**Tabela 2.** ANOVA obtida a partir do planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para analisar a influência das variáveis independentes (glucose, peptona, ZnCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub>) na variável dependente (tensão superficial).

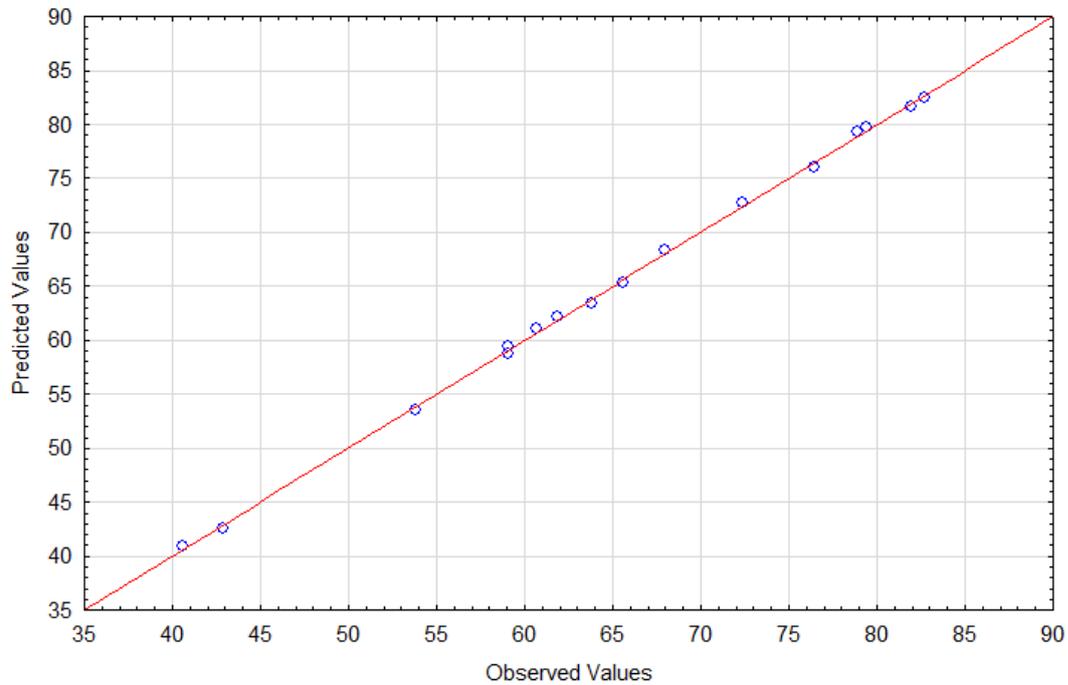
Efeito	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
(1) Glucose	0,0100	1	0,0100	0,00238	0,968970
(2) Peptona	1,3225	1	1,3225	0,31469	0,674540
(3) ZnCl <sub>2</sub>	1,9600	1	1,9600	0,46639	0,618553
(4) MgSO <sub>4</sub>	103,0225	1	103,0225	24,51457	0,126872
1x2	33,6400	1	33,6400	8,00476	0,216287
1x3	44,2225	1	44,2225	10,52290	0,190367
1x4	169,0000	1	169,0000	40,21416	0,099570
2x3	16,0000	1	16,0000	3,80726	0,301502
2x4	18,0625	1	18,0625	4,29804	0,286116
3x4	0,8100	1	0,8100	0,19274	0,736637
1x2x3	74,8225	1	74,8225	17,80428	0,148142
1x2x4	38,4400	1	38,4400	9,14694	0,203291
1x3x4	11,9025	1	11,9025	2,83224	0,341321
2x3x4	0,1600	1	0,1600	0,03807	0,877323
Erro	4,2025	1	4,2025		
Total	517,5775	15			

ANOVA; Var.: Biomassa; R<sup>2</sup>=0,99188; Adj.:0,87821; Média quadrática Erro residual= 4,2025**Tabela 3.** ANOVA obtida a partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> para analisar a influência das variáveis independentes (glucose, peptona, ZnCl<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub>) na variável dependente (índice de emulsificação).

Efeito	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
(1) Glucose	161,354	1	161,3535	94,3833	0,065299
(2) Peptona	5,394	1	5,3940	3,1552	0,326425
(3) ZnCl <sub>2</sub>	20,003	1	20,0033	11,7008	0,181065
(4) MgSO <sub>4</sub>	1,531	1	1,5314	0,8958	0,517506
1x2	94,819	1	94,8189	55,4640	0,084974
1x3	2,797	1	2,7973	1,6362	0,422411
1x4	95,306	1	95,3064	55,7492	0,084759
2x3	322,651	1	322,6514	188,7340	0,046258
2x4	20,363	1	20,3627	11,9111	0,179544
3x4	83,768	1	83,7683	49,0000	0,090334
1x2x3	934,066	1	934,0664	546,3795	0,027219
1x2x4	79,790	1	79,7896	46,6727	0,092528
1x3x4	498,517	1	498,5173	291,6062	0,037238
2x3x4	183,535	1	183,5348	107,3581	0,061252
Erro	1,710	1	1,7096		
Total	2505,605	15			

ANOVA; Var.: Biomassa;  $R^2=0,99932$ ; Adj.:0,98977; Média quadrática Erro residual=1,709556

**Figura 1.** Valores preditos vs. valores observados para a variável resposta (índice de emulsificação) a partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial completo  $2^4$ .



## **CAPÍTULO III**

## CONCLUSÕES GERAIS

- *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 demonstra perfil de sensibilidade aos maioria dos antimicrobianos utilizados na prática médica ;
- *Stenotrophomonas maltophilia* UCP 1601 apresenta potencial biotecnológico na produção de bioemulsificante, a partir da bioconversão de óleo de soja residual como único componente do meio de cultivo;
- O bioemulsificante produzido por *S. maltophilia* demonstra excelente propriedades emulsificante e dispersante;
- O bioemulsificante apresenta caráter aniônico com estabilidade térmica, iônica e do pH;
- O bioemulsificante é eficaz na redução da viscosidade de compostos hidrofóbicos, o que sugere seu potencial biotecnológico na biorremediação de ecossistemas contaminados.