



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

EMÍLIA MENDES DA SILVA SANTOS

**PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR *CANDIDA*
SPHAERICA UCP 0995 PARA APLICAÇÃO NA REMOÇÃO
DE POLUENTES AMBIENTAIS GERADOS PELA INDÚSTRIA
DE PETRÓLEO**

Recife, 29 de Novembro de 2019

EMÍLIA MENDES DA SILVA SANTOS

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *CANDIDA SPHAERICA* UCP 0995 PARA APLICAÇÃO NA REMOÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS GERADOS PELA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO

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: Profa. Dra. **Juliana Moura de Luna**

Co-orientadora: Profa. Dra. **Leonie Asfora Sarubbo**

Recife, 29 de Novembro de 2019

S237p

Santos, Emília Mendes da Silva.

Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo / Emília Mendes da Silva Santos, 2019.

106 f. : il.

Orientador: Juliana Moura de Luna

Coorientadora: Leonie Ásfora Sarubbo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2019.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos industriais. 3. Biotecnologia. 4. Poluentes. I. Título.

CDU 579.66

Pollyanna Alves - CRB 4/1002

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *CANDIDA*
SPHAERICA UCP 0995 PARA APLICAÇÃO NA
REMOÇÃO DE POLUENTES AMBIENTAIS GERADOS
PELA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO**

EMÍLIA MENDES DA SILVA SANTOS

Examinadores:

Profa. Dra. Juliana Moura de Luna (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

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

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Defendida em: 29/11/2019

Coordenador (a): Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa vencida, agora mudam-se as metas e as expectativas para novas conquistas, conhecimentos foram adquiridos e desafios foram superados.

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de crescimento, aprendizagem e proteção durante esta caminhada.

À Profa. Dra. Juliana Moura Luna, orientadora científica, pela excelente dedicação, incentivo e trabalho em grupo que proporcionou a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, pela co-orientação, apoio e incentivo.

Ao Prof. Ms. Edilson Alves, pela oportunidade de crescimento, aprendizagem e realização de um sonho na Universidade Católica de Pernambuco.

Ao Reitor da UNICAP, Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, S. J. pela oportunidade em desenvolver este trabalho nesta universidade.

À chefe de divisão pessoal Valdice Dantas e a assistente Tânia Maria pelo excelente trabalho administrativo e nas informações prestadas no decorrer do curso.

Ao técnico de laboratório Lucas Ferreira da Rocha pela paciência, colaboração e apoio conferido na realização dos experimentos.

Ao grupo Biossurfactantes, em especial Isabella Regina Alvares da Silva Lira, Iverson Amaro da Silva, Hugo M. Meira, Rita de Cássia Freire Soares da Silva, pela dedicação e colaboração nos experimentos do laboratório.

A minha família, em especial a minha mãe por sempre lutar, acreditar e incentivar os meus sonhos.

Ao meu esposo Rogério pelo amor, companheirismo, compreensão e confiança.

Aos meus amigos Janssem Antunes Correa de Sousa e Caio Franklin Vieira de Figueiredo por estarem presente nos bons e nos maus momentos de toda essa jornada.

A coordenadora do curso de Mestrado em desenvolvimento de Processos Ambientais – MDPA; Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki por exemplo a dedicação, bondade e orientação nesse caminho profissional.

A UNICAP pela oportunidade de trabalho e início a pesquisa.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE SIMBOLOS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
CAPÍTULO I	
1.1 Introdução	15
1.2 Objetivos	17
2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	17
1.3 Revisão da Literatura	18
1.3.1. Acidentes com derramamento de petróleo	18
1.3.2. Surfactantes	18
1.3.3. Biossurfactantes	21
1.3.3.1 Classificação	22
1.3.4. Micro-organismos Produtores	23
1.3.5. Propriedades	24
1.3.6. Aplicação dos biossurfactantes	26
1.3.7. Aplicação de biossurfactantes na biorremediação	27
1.3.8. Aplicação de biossurfactantes na limpeza de reservatórios de óleos	28
1.3.9. Aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo (MEOR)	29
1.3.10. Aplicação de biossurfactantes na dispersão de manchas de petróleo	30
1.3.11. Aplicação de biossurfactantes na indústria de alimentos	31

1.3.12. Aplicação de biossurfactantes na indústria farmacêutica	32
1.3.13. Aplicação de biossurfactantes na mineração	33
1.3.14. Aplicação de biossurfactantes na agricultura	35
1.3.15. Aplicação de biossurfactantes na medicina.....	36
1.4. Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes.....	37
1.5 Referências Bibliográficas	39

CAPÍTULO II

1. Introdução.....	51
2. Materiais e métodos.....	54
2.1. Materiais	54
2.2. Micro-organismo	54
2.3. Condição de cultivo.....	55
2.4. Otimização da produção do biossurfactante utilizando DCCR	55
2.5. Determinação da tensão superficial	56
2.6. Isolamento do biossurfactante	57
2.7. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	57
2.8. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	57
2.9. Cromatografia gasosa (GC)	57
2.10. Formulação do biossurfactante	58
2.11. Determinação da tensão superficial	58
2.12. Determinação da atividade de emulsificação	59
2.13. Teste de deslocamento de óleo (teste de dispersão).....	59
2.14. Efeito dos fatores ambientais sobre atividade do biossurfactante formulado.....	59
2.15. Avaliação citotóxica do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i>	60
2.16. Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio estático	60
2.17. Remoção do contaminante em areia pelos surfactantes em ensaio cinético.....	61

2.18. Aplicação do biossurfactantes na remediação do contaminante em água do mar.....	62
3.0. Resultados e discussão	63
3.1. Otimização da produção de biossurfactantes utilizando DCCR.....	63
3.2. Caracterização estrutural do biossurfactante	66
3.3. Estabilidade do biossurfactante formulado.....	68
3.4. Atividade de emulsificação com óleo de motor	70
3.5. Aplicação de biossurfactante como dispersante.....	71
3.6. Avaliação citotóxica do biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i>	73
3.7. Remoção de óleo de motor de colunas empacotadas através de ensaio estático.....	74
Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio cinético	76
3.9. Aplicação do biossurfactante na remediação do contaminante em água do mar	78
4.0. Conclusões	79
5.0. Referências.....	80
CAPÍTULO III	
Considerações Finais	105
Anexos	106

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1- Estrutura esquemática um surfactante.....	19
Figura 2 - Formação de Micelas.....	20
Figura 3 - Tensão superficial em função da concentração de surfactante.....	20
Figura 4 - MEOR de petróleo bruto.....	29
Figura 5 - Capacidade de dispersão do óleo de motor por um biossurfactante formulado.....	31
Figura 6 - Emulsificação das emulsões usando biossurfactantes.....	32
Figura 7 - Mecanismo de remoção de metais pesados de solo contaminado usando biossurfactantes.....	34
Figura 8 - Dessorção de fósforo pelo biossurfactante e sua disponibilidade como nutriente.....	35
Figura 9 - Atividade antimicrobiana do biossurfactante na membrana celular da <i>E. coli</i> . (a) amostras não tratadas e (b) tratadas.....	36

CAPÍTULO II

Figura 1 - Valores previstos versus valores observados para o modelo da tensão superficial de resposta.	94
Figura 2 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) agitação, (2) aeração e (3) tempo, utilizando tensão superficial como variável resposta.....	95
Figura 3 - Superfície de resposta da tensão superficial mostrando a interação entre a aeração e a agitação (A), tempo e agitação (B), tempo e aeração (C)	96
Figura 4 - Espectro FT-IR da transmissão do biossurfactante <i>C. sphaerica</i> obtido após purificação	97
Figura 5 - Espectro de ¹ H RMN do biossurfactante <i>C. sphaerica</i>	98
Figura 6 - Espectro de C RMN para o biossurfactante gravado em CDCl ₃	99
Figura 7 - Cromatografia Gasosa.....	99
Figura 8 – Tensão superficial do biossurfactante produzido por <i>C. sphaerica</i> durante 120 dias de armazenamento submetido aos métodos de conservação (A) sorbato de potássio a	

0,2%, (B) vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e (C) tindalização fracionada.....	100
Figura 9 - Capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>C. sphaerica</i> durante 120 dias de armazenamento submetido aos métodos de conservação (A) sorbato de potássio a 0,2%, (B) vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e (C) tindalização fracionada.....	101
Figura 10 - Capacidade de dispersão do óleo motor por biossurfactante durante 120 dias de armazenamento, submetido ao método de conservação (A) sorbato de potássio a 0,2%, (B) vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e (C) tindalização fracionada na proporção biossurfactante-óleo de 1:2 (v/v).....	101
Figura 11 - Remoção de óleo adsorvido em areia pelo processo de biorremediação utilizando o biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i>	102
Figura 12 - Remoção de óleo contaminante em água do mar pelo processo de biorremediação utilizando o biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i>	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Classificação dos biossurfactantes com base na sua composição bioquímica.....	22
Tabela 2 - Resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes.....	37

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Intervalos experimentais e níveis de variáveis independentes para o projeto rotacional composto central usado na otimização da produção de biossurfactante por <i>Candida sphaerica</i> (UCP 0995)	85
Tabela 2 - Misturas formuladas para os experimentos de biodegradação de óleo de motor em areia.....	86
Tabela 3 - Misturas formuladas para os experimentos de biodegradação de óleo de motor em água do mar.....	87
Tabela 4 - Matriz de projeto experimental para otimização de biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> (UCP 0995) de acordo com o DCCR	88
Tabela 5 - Análise de variância do modelo quadrático em relação à tensão superficial obtida com o biossurfactante produzido por <i>Candida sphaerica</i> (UCP 0995) ^a	89
Tabela 6 - Percentual de viabilidade celular de fibroblastos de camundongos (L929)	90
Tabela 7 - Remoção do contaminante hidrofóbico adsorvido em areia, através do ensaio estático com colunas de vidro.....	91

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Celsius
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
ppm	Parte por milhão
Rpm	Rotação por minuto
Kg	Quilograma
v/v	Volume por volume
mL	Mililitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
%	Por cento
Cm	Centímetros
G	Gramas
Seg	Segundos
Min	Minutos
mN/m	Mili Newton por metro
YMA	Yeast mold Ágar
YMB	Yeast mold Broth
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
g/ml	Gramas por mililitro
g/L	Gramas por litro
µL	Microlitro
mg mL/L	Miligrama mililitro por litro
vvm	volume de ar por volume de efluente por minuto
M	Molar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana e apresentam inúmeras vantagens frente aos surfactantes sintéticos como diversidade estrutural, baixa toxicidade, biodegradabilidade, capacidade de ação em ambientes extremos, e de serem produzidos a partir de fontes renováveis. Portanto, o presente estudo tem como objetivo maximizar a produção de um agente surfactante a partir de *Candida sphaerica* UCP 0995 utilizando resíduos industriais 9% de óleo vegetal de soja, 9% de milhocina como substratos de baixo custo em um biorreator de 4 L a partir de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central. Os efeitos e interações da velocidade de agitação (150, 175, 200, 250 e 275rpm), aeração (0, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0vvm) e tempo de cultivo (96, 108, 120, 132 e 144h) sobre a tensão superficial e o rendimento foram avaliados. Os resultados mostraram que a melhor condição obtida foi através da agitação de 175 rpm, aeração de 1,5 vvm e tempo de cultivo de 132 horas, com uma redução da tensão superficial de 25,00 mN/m e com um rendimento em biossurfactante de 8,50 g/L e uma Concentração Micelar Crítica de 0,2 g/L. A capacidade tensoativa e emulsificante do biossurfactante foi investigada sob condições extremas de temperatura, salinidade e pH, demonstrando sua estabilidade. A investigação da composição química por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética e cromatografia gasosa revelou que o biossurfactante estudado é um glicolípido. Foram realizados testes de citotoxicidade através do método de MTT frente a linhagem celular L929 (fibroblasto de camundongos), onde observou-se que não apresentou citotoxicidade nas concentrações de biossurfactante testada. Em seguida, o biossurfactante foi submetido a diferentes metodologias para ser formulado como aditivo comercial. A biomolécula manteve-se estável ao longo de 120 dias à temperatura ambiente de 28°C após adição de sorbato de potássio como conservante. Testes de biorremediação foram realizados para analisar a eficácia do biossurfactante isolado e sua espécie microbiana produtora na remoção de óleo em solo e água do mar contaminada. O biossurfactante bruto ou isolado apresentou eficiência na remoção de 67% - 70% do óleo de motor em solo contaminado em condições estáticas. Já para os ensaios cinéticos 90% do óleo motor contido em solo foi removido no período de 90 dias. Enquanto que os testes realizados em água do mar foram obtidos 85% de remoção do óleo. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante de *C. sphaerica* UCP 0995 apresenta propriedades promissoras como agentes de remediação de compostos hidrofóbicos em águas e solos.

Palavras-Chave: Biossurfactantes. Resíduos Industriais. Contaminação por petróleo.

ABSTRACT

The biosurfactants are compounds of microbial origin and present numerous advantages over synthetic surfactants, such as structural diversity, low toxicity, biodegradability, ability to act in extreme environments, and to be produced from renewable sources. Therefore, the present study aims to maximize the production of a surfactant agent from *Candida sphaerica* UCP 0995 using industrial waste as low cost substrates in a 4 L bioreactor from a central point factorial design 23. The effects and interactions of the agitation speed (150, 175, 200, 250 and 275rpm), aeration (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0vm) and culture time (96, 108, 120, 132 and 144h) on surface tension and yield were evaluated. The results showed that the best obtained condition was, in medium containing shaking of 175 rpm, aeration of 1.5 vvm and culture time of 132 hours, with a reduction of the surface tension of 25.00 mN / m and a yield in biosurfactant of 8.50 g / L and a Critical Micellar Concentration of 0.2 g / L. The tensioactive and emulsifying capacity of the biosurfactant was investigated under extreme conditions of temperature, salinity and pH, indicating their stability. The investigation of the chemical composition by infrared spectroscopy, magnetic resonance and gas chromatography revealed that the biosurfactant studied is a glycolipid. MTT Cytotoxicity tests were performed by the MTT method against the cell line L929 (mouse fibroblast), where it was observed that it did not present cytotoxicity in the biosurfactant concentrations tested. The biosurfactant was subjected to different methodologies to be formulated as a commercial additive. The biomolecule was stable for 120 days at room temperature 28°C after addition of potassium sorbate as a preservative. Bioremediation tests were performed to analyze the efficacy of the isolated biosurfactant and its microbial producer producing oil in soil and contaminated sea water. The crude or isolated biosurfactant showed efficiency in the removal of 67% - 70% of the motor oil in contaminated soil under static conditions. Already for the kinetic tests removal of 90% of the motor oil contained in soil was removed in the period of 90 days. While the tests performed on sea water were obtained 85% oil removal. According to the results obtained, the biosurfactant of *C. sphaerica* UCP 0995 presents promising properties as remediation agents of hydrophobic compounds in waters and soils.

Key words: Biosurfactants. Industrial. Industrial. Contamination by oil.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Com os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas, as refinarias de petróleo aumentaram significativamente a produção de hidrocarbonetos e seus derivados, no entanto, uma vez que suas matérias primas são aplicadas como fontes de energias para a economia de uma sociedade, também produzem elevadas quantidades de resíduos petrolíferos originados dos transportes, operações de perfuração e derramamentos que contaminam e interferem no meio ambiente (ALMEIDA et al., 2016; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018).

As refinarias são grandes geradoras de poluição, pois consomem enormes quantidades de água e de energia, e produzem muitos rejeitos líquidos, liberam diversos gases poluentes para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição. Em decorrência de tais fatos, a indústria de refino de petróleo, é considerada, uma grande degradadora do meio ambiente, pois possui potencial para afetar todos os níveis presentes na biosfera: ar, água e solo (GONZINI et al., 2010; SANTOS et al., 2016).

Diante dessa realidade, a possibilidade de contaminação ambiental é real e iminente, havendo necessidade urgente do desenvolvimento de novas tecnologias que possam conter possíveis contaminações (SILVA et al., 2009). A contaminação por petróleo e derivados, incluindo os metais pesados, normalmente é tratada através de metodologias físicas, químicas ou biológicas. Entretanto, as novas diretrizes de recuperação de águas e solos têm restringido a utilização de produtos químicos (MUTHUSAMY et al., 2008; SARUBBO et al., 2015).

Dentre as técnicas de tratamento de petroderivados disponíveis, a tecnologia de biorremediação tem se destacado, dentre as diferentes tecnologias utilizadas para a limpeza dos solos e de águas contaminadas. Levando-se em consideração que é a ferramenta de gerenciamento mais econômica e ecoeficiente fundamentada em métodos naturais, menos agressivos e mais adequados para manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados às alternativas físicas e físico-químicas utilizadas (BRITO et al., 2010; KARLAPUDI et al., 2018a).

Os obstáculos associados à biodegradação dos hidrocarbonetos surgem em função da ligação desses compostos hidrofóbicos às partículas do solo e à solubilidade reduzida em água, resultando em baixa biodisponibilidade para os micro-organismos e na consequente paralisação do processo (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007; SANTOS et al., 2016, XU et al., 2018).

Nesse contexto, a utilização de compostos biossurfactantes surge como uma alternativa ecológica em relação aos surfactantes químicos possuindo muitos atributos desejáveis como: produção por micro-organismos através de materiais renováveis; inúmeras variedades

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

químicas, ampla gama de aplicações e compatibilidade com o lançamento no meio ambiente (SANTOS et al., 2016; PERFUMO, BANAT, MARCHANT, 2017; KARLAPUDI et al., 2018).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros, como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, permitem a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com seus similares sintéticos (SILVA et al., 2010; MIR et al., 2017).

Nesse sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a produção e consequente aplicação dos biossurfactantes em escala industrial. Os substratos de baixo custo, a seleção de micro-organismos produtores e o aprimoramento dos processos de purificação têm sido utilizados com essa finalidade (MARCHANT; BANAT, 2012).

Portanto, o presente estudo tem como objetivo maximizar a produção de um agente surfactante por *Candida sphaerica* utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo, bem como estudar as propriedades do biossurfactante obtido, seu isolamento, caracterização, formulação comercial e sua aplicação na remoção de derivados de petróleo em ambientes terrestres e marinhos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Otimizar a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 com potencial de aplicação na descontaminação ambiental de petróleo e derivados.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Utilizar um planejamento fatorial como ferramenta para otimização da produção de biossurfactante em biorreator;
- Isolar o biossurfactante e determinar o rendimento de produção no biorreator;
- Caracterizar estruturalmente o biossurfactante utilizando, cromatografia gasosa, espectroscopia no infravermelho e análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Realizar estudos de estabilidade do biossurfactante frente à adição de sorbato de potássio, esterilização a vapor fluente e adição de sorbato e tinalização fracionada;
- Determinar a tensão superficial e atividade emulsificante do biossurfactante formulado frente a condições específicas de pH, temperatura e adição de NaCl;
- Avaliar a citotoxicidade do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* UCP 0995;
- Determinar a remoção do poluente hidrofóbico pelo biossurfactante em colunas empacotadas através de ensaio estático;
- Avaliar a remoção do contaminante hidrofóbico em solo arenoso pelos surfactantes em ensaio cinético;
- Avaliar a aplicação do biossurfactante na remediação do contaminante em água do mar.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

1.3.1 Acidentes com derramamento de petróleo

Derramamentos de óleos ocorridos durante o seu transporte, armazenamento e perfurações de poços afeta drasticamente as regiões costeiras, sendo uma das maiores causas de catástrofes ecológicas e sociais no mundo (MUTHUSAMY et al., 2008).

Um dos maiores acidentes registrados na história, foi o desastre do Golfo do México, na plataforma da British Petroleum Deepwater Horizon, nos Estados Unidos, lançando mais de 750 mil toneladas de petróleo em alto mar, este derramamento de petróleo gerou fortes impactos econômicos, quanto ecológicos para o meio ambiente e sociedade (PU LI et al., 2016).

O derramamento de óleo Exxon Valdez (EVOS) ocorrido em 1989 em Prince William Sound, no Alasca, continua sendo um dos maiores derramamentos na história dos Estados Unidos após o Deepwater Horizon (LINDEBERG et al., 2018).

Na Baía de Campos, no estado do Rio de Janeiro, Brasil, em 2011 a perfuração de um poço de petróleo liberou aproximadamente 140 mil litros de óleo (ALMEIDA et al., 2017a), no Nordeste do Brasil em 2019, um derrame de petróleo cru atingiu mais de 2 mil quilômetros de extensão, tratando-se do maior desastre ambiental já registrado no litoral brasileiro.

Entre os inúmeros impactos ambientais que o mundo enfrenta atualmente, os derramamentos de óleo ocorrem com bastante frequência, causando efeitos devastadores principalmente no ambiente marinho (OSTENDORF et al., 2019).

Diante dessa realidade, a possibilidade de contaminação ambiental é real e iminente, havendo necessidade urgente de desenvolvimento de novas tecnologias que possam conter possíveis contaminações (SILVA et al., 2009).

1.3.2 Surfactantes

Os surfactantes são compostos anfífilos que possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface líquida com diferentes graus de polaridade através de pontes de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou ar/água (SINGH, GLICK, RATHORE, 2018; OSTENDORF et al., 2019). A porção apolar é continuamente constituída de uma cadeia de hidrocarbonetos ao mesmo tempo que a porção

polar é iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (SANTOS et al., 2017a) como ilustrado na Figura 1.

Essas características possibilitam aos surfactantes reduzirem a tensão superficial e interfacial e conseqüentemente formarem microemulsões, onde hidrocarbonetos solubilizam em água ou a água se solubiliza em hidrocarbonetos (KARLAPUDI et al., 2018). Tais propriedades propiciam um amplo espectro de potenciais aplicações industriais envolvendo emulsificação, detergência, lubrificação, umectação, formação de espuma, dispersões ou solubilização de diferentes fases (SANTOS et al., 2017a).

Figura 1 - Estrutura esquemática de um surfactante



Fonte: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/>

Contudo, nos últimos anos a crescente preocupação com o controle e a preservação do meio ambiente, tem incentivado as pesquisas para utilização de novos compostos tensoativos, como uma alternativa aos produtos já existentes. Nesse contexto, a utilização de compostos surfactantes surge como um dos métodos promissores para a resolução destes problemas (BANAT, 2010; SANTOS et al., 2016; SANTOS et al., 2017b).

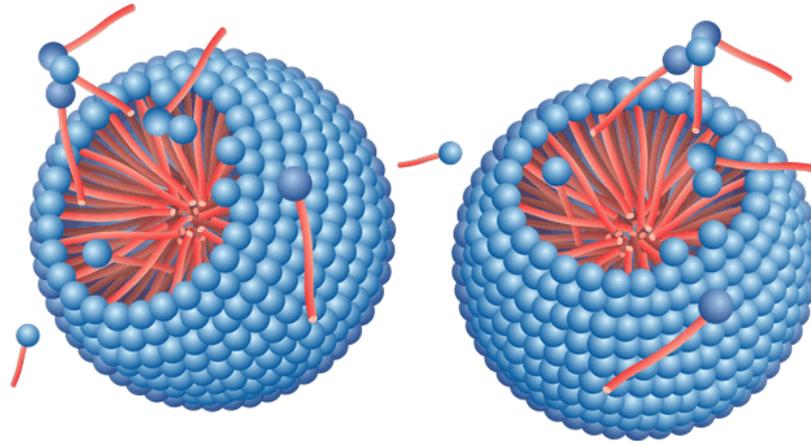
Os surfactantes possuem duas características principais, a tensão superficial e a capacidade de formar micelas em soluções. A tensão superficial é minimizada quando aumenta a concentração do surfactante no meio aquoso, havendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas onde as partes hidrofóbicas de surfactante são posicionadas na parte interna da micela, e as e as hidrofóbicas em direção à fase aquosa (BURGHOFF, 2012; VARJANI, UPASANI, 2017; HAQ et al., 2017) (Figura 2).

A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC). Esta concentração representa à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ou eliminada através do aumento adicional do surfactante (Figura 3). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (HELD, 2014). Além disso, os

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

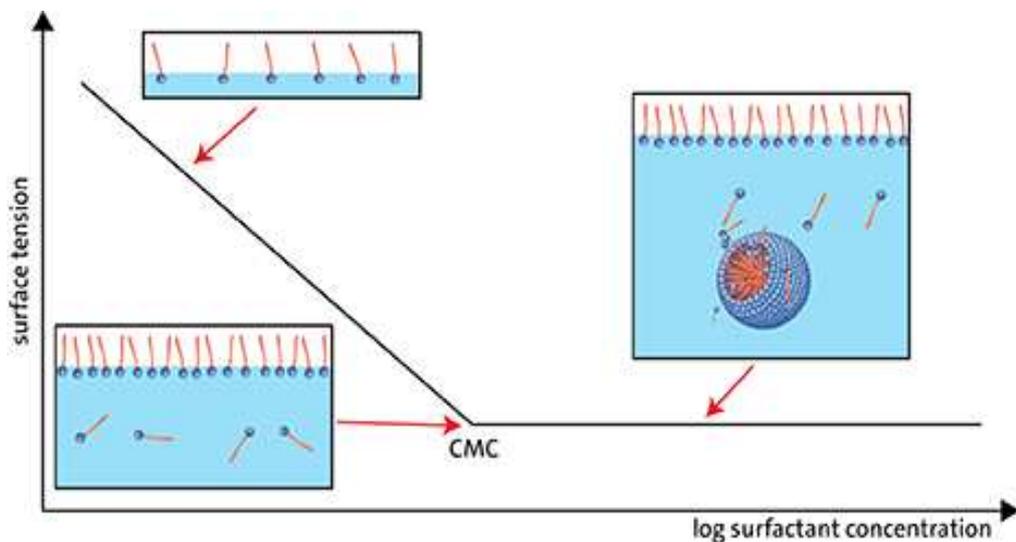
surfactantes, ao modificar a hidrofobicidade da superfície celular, aumentam a afinidade do substrato celular (DELL'ANNO et al., 2018).

Figura 2 - Formação de micelas



Fonte: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/>

Figura 3 - Tensão superficial em função da concentração de surfactante



Fonte: <https://www.dataphysics-instruments.com/knowledge/understanding-interfaces/surfactants-cmc/>

1.3.3 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana produzidos principalmente por bactérias e leveduras. Estes compostos são formados por estruturas moleculares com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica porção esta que tendem a particionar nas interfaces entre as fases líquidas com diferentes graus de polaridade (óleo / água e água / óleo), promovendo uma redução nas tensões superficiais e interfaciais, que confere a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (CHAPRÃO et al., 2018; AKBARI et al., 2018).

Em sua constituição anfifílica, a porção hidrofóbica pode ser tanto um ácido graxo de cadeia longa, quanto um hidróxi-ácido graxo ou um α -alquil- β -hidroxi e a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (RUFINO et al., 2013).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo (NITSCHKE, PASTORE, 2002). No entanto, vários compostos com propriedades tensoativas são produzidos por alguns organismos vivos como plantas (saponinas), mas principalmente por micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras (glicolípideos), este surfactante natural, biodegradável obtido de micro-organismos pode ser uma alternativa atraente em relação aos surfactantes sintéticos (ROCHA E SILVA et al., 2018; SINGH, GLICK, RATHORE, 2018).

Nos últimos anos, esses compostos de origem microbiana têm despertado o interesse da comunidade científica em encontrar alternativas aos surfactantes sintéticos. O motivo para esta notoriedade está relacionado às suas propriedades como diversidade estruturais, baixa toxicidade, biodegradabilidade, capacidade de ação em ambientes extremos, (pH, temperatura e salinidade), seletividade, redução da tensão superficial e a capacidade de ser produzidos a partir de fontes renováveis, resíduos e subprodutos com ampla gama de aplicações industriais (ROCHA E SILVA et al., 2018; OLASANMI, THRING, 2018).

Uma das grandes vantagens do uso de biossurfactantes é a possibilidade de produzir esses compostos naturais a partir de diferentes substratos, principalmente de fontes renováveis, como óleos vegetais, resíduos de destilaria de petróleo e resíduos de produtos lácteos. A escolha de substratos de baixo custo é importante para a economia global do processo, pois os substratos representam 50% do custo final do produto. A produção bem sucedida de biossurfactantes depende da escolha de substratos renováveis que levam a alta produtividade e qualidade para biossurfactantes específicos (SILVA et al., 2018; LUNA et al., 2015).

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Embora os biossurfactantes apresentem características superiores em relação aos surfactantes químicos, as aplicações industriais difundidas são bastante limitadas - principalmente devido à competitividade de custos (RUFINO et al., 2014; CHAPRÃO et al., 2015).

Esses custos operacionais e de produção podem ser reduzidos por diferentes abordagens que podem aumentar o rendimento ou reduzir o custo total, tais como: a utilização de substratos renováveis, como resíduos de subprodutos agroindustriais, mutação de cepas produtoras; aplicação de modelos matemáticos e estatísticos para otimização de processos e elevação do rendimento de produção; síntese química ou modificação estrutural de biossurfactantes (GEETHA, BANAT, JOSHI, 2018).

1.3.3.1 Classificação

Os surfactantes são classificados como aniônicos, catiônicos, neutros ou anfotéricos, dependendo da porção polar presente em função da presença ou ausência de cargas elétricas (BEZERRA et al., 2018).

A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra, enquanto aqueles que contêm grupos amina são catiônicos. A porção hidrofóbica possui ácidos graxos de cadeia longa e a porção hidrofílica pode ser um hidrato de carbono, peptídeos cíclicos, aminoácidos, fosfato ácido carboxílico ou álcoois (SANTOS et al., 2016).

A classificação dos biossurfactantes baseia-se principalmente na sua origem microbiana e sua composição bioquímica (tabela 1). Quanto à estrutura, são amplamente categorizados em cinco grupos principais: (KARLAPUDI et al., 2018; GEETHA, BANAT, JOSHI, 2018; SOBRINHO, et al., 2013).

Tabela 1- Classificação dos biossurfactantes com base na sua composição bioquímica.

Glicolipídeos	Cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos. São exemplos os raminolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , e os sofrorolipídeos produzidos por espécies de <i>Candida</i> .
Lipossacarídeos	Os quais normalmente possuem massa molar elevada e são solúveis em água, como o

	conhecido Emulsan, emulsificante extracelular produzido por hidrocarbonetos a partir da bactéria <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .
Lipopeptídeos	Como a surfactina, produzida por <i>Bacillus subtilis</i> , um dos biossurfactantes mais poderosos já relatados na literatura.
Fosfolipídeos	Estruturas comuns a muitos microrganismos, como o biossurfactante de <i>Corynebacterium lepus</i> .
Ácidos graxos e lipídeos neutros	(Alguns classificados como glicolipídeos) e proteínas hidrofóbicas.

Fonte: Adaptado de (KARLPUDI et al., 2018).

1.3.4 Micro-organismos Produtores

Uma variedade de micro-organismos, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (SANTOS et al., 2016). Dentre as principais espécies e gêneros investigados, destacam-se: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Candida bombicola*, dentre outras (CAMPOS et al., 2015).

Alguns micro-organismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (ALMEIDA et al., 2016; SARMA, BUSTAMANTE, PRASAD, 2019).

Diversos são os estudos realizados por vários autores utilizando espécies do gênero *Candida*, incluindo *Candida sphaerica* (LUNA et al., 2015; SOBRINHO et al., 2013) *Candida glabrata* (LIMA et al., 2017; LUNA et al., 2009), *Candida lipolytica* (RUFINO et al., 2014; SANTOS et al., 2013), *Candida utilis* (CAMPOS et al., 2015), *Candida guilliermondii* (MELO SANTOS et al., 2018), *Candida antarctica* (HUA et al., 2003) e *Candida tropicalis* (DAS et al., 2018; PRIJI et al., 2013; ALMEIDA et al., 2017) são conhecidos por produzir biossurfactantes. Dentre estas, *Candida bombicola* e *Candida lipolytica* estão entre as mais comumente estudadas para a produção de biossurfactantes (CAMPOS et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Os glicolípídeos mais comuns produzidos por este gênero são os soforolípídeos. Este biossurfactante é composto por um açúcar dissacarídeo (2'-O- β -D-glicopiranosil-1- β -D-glicopiranosose) unido por ligação β -glicosídica a um ácido graxo de cadeia longa. *Candida bombicola* se destaca dentre as leveduras utilizadas na produção deste biossurfactante, para o qual já foram registrados valores de tensão superficial de aproximadamente 33 mN/m e altos rendimentos (SANTOS et al., 2016). Outro biossurfactante bastante promissor são os lipídeos de manosileritritol, os quais são abundantemente produzidos pela levedura *Candida antarctica* a partir de óleos vegetais (AL-BAHRY et al., 2013).

A levedura *Candida tropicalis* tem sido amplamente estudada por vários pesquisadores como uma potente linhagem com capacidade para biodegradar hidrocarbonetos (ALMEIDA et al., 2017; DAS, CHANDRAN, 2011). Estudos mais recentes, no entanto, também têm revelado que esta espécie tem a capacidade metabólica para produzir biossurfactante quando cultivada em substratos imiscíveis em água (SAMAL, DAS, MOHANTY, 2017). Santos et al. (2017b) conseguiram uma redução para 25 mN/m na tensão superficial do meio, contendo licor de milho e gordura animal utilizado como substrato para a produção de biossurfactante de *C. lipolytica* UCP 0988. Em outro estudo, Rufino et al. (2014), obtiveram um rendimento de 8,0 g/L de biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em meio também contendo óleo de soja como substrato, reduzindo a tensão superficial para 25 mN/m.

1.3.5 Propriedades

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes, como redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidade emulsificante e estabilizante, concentrações micelares críticas baixas, solubilidade e poder detergente são muito importantes na avaliação de seu desempenho e na seleção de micro-organismos com potencial de produção destes agentes (DELEU, PAQUOT, 2004; KARLAPUDI et al., 2018a).

Biossurfactantes de glicolípídeos possuem várias propriedades funcionais (emulsionantes, espumantes, molhantes, anti-adesivos e anti-biofilmes) e propriedades biológicas (atividade antibacteriana), permitindo seu uso em indústrias de alimentos como aditivos e conservantes. Realmente, a melhoria da qualidade dos alimentos e sua preservação tornaram-se de grande interesse nas últimas décadas (MNIF; GHRIBI, 2016).

Muitas dessas características mencionadas acima representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (CHAPRÃO et al., 2015):

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações. A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente (SANTOS et al., 2016).
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O biossurfactante da levedura *Candida lipolytica* UCP 0988 mostrou-se estável após o tratamento com temperaturas chegando a 120 °C, e apresentou propriedades praticamente inalteradas a uma faixa de pH entre 2 e 12 (SANTOS et al., 2013). Os biossurfactantes suportam concentrações de NaCl de até 12 %, enquanto que uma concentração salina de 2 – 3 % já é suficiente para inativar a maioria dos surfactantes convencionais (CAMPOS et al., 2013)
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros micro-organismos microscópicos na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos (SANTOS et al., 2016).
- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, em cosméticos e em produtos farmacêuticos (CAMPOS et al., 2013).
- Disponibilidade: biossurfactantes podem ser produzidos a partir de matérias-primas largamente disponíveis, além da possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos industriais (SANTOS et al., 2016; SILVA et al., 2014).
- Especificidade: biossurfactantes, sendo moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos também serão específicos em suas ações. Essa propriedade pode ser de grande interesse na detoxificação de poluentes específicos ou em determinadas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética ou alimentícia.
- Biocompatibilidade e digestibilidade, o que garante a aplicação dessas biomoléculas nos mais diversos setores industriais, destacando as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

A despeito das vantagens, alguns pontos desfavoráveis devem ser citados, como (JOY; RAHMAN; SHARMA, 2017):

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

- A produção em grande escala de biossurfactantes pode ser dispendiosa. Esse problema, entretanto, pode ser resolvido pela combinação de substratos de baixo custo.
- A obtenção de produtos com elevado grau de pureza, que se torna difícil em virtude da necessidade de etapas consecutivas de purificação do líquido metabólico.
- A existência de espécies super produtoras é rara e as conhecidas não são capazes de produzir altos rendimentos em surfactantes, além de necessitarem de meios de cultivo complexos (SILVA et al., 2014).
- A regulação da síntese de biossurfactantes não está totalmente compreendida, uma vez que essas biomoléculas podem ser produzidas como metabólitos secundários ou em associação ao crescimento microbiano (ALMAEIDA et al., 2016).
- O aumento da produtividade é muitas vezes prejudicado pela formação de espuma, o que requer a utilização de meios diluídos.

1.3.6 Aplicação dos biossurfactantes

Diversos micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras são capazes de sintetizar biossurfactantes de fontes renováveis utilizando resíduos agroindustriais. Devido às inúmeras propriedades e diversidades estruturais. Os biossurfactantes apresentam diversas aplicações nas indústrias petroquímicas, farmacêuticas e de cosméticos além, de um importante papel na proteção ambiental, controle de derramamento de óleo, biodegradação e remediação de solos contaminados por metais pesados (GAUR et al., 2019).

As propriedades de detergência, umectação, emulsificação, dispersão de fases, solubilização, formação de espuma, desemulsificação e lubrificação, são imprescindíveis para aplicação dos biossurfactantes nas áreas acima citadas (SANTOS, SILVA, COSTA, 2016).

A demanda por biossurfactante tem aumentado constantemente, Elshafie et al. (2015) relataram o uso de cerca de 13 milhões de toneladas de produção de biossurfactante por ano, o que implica sua importância e demanda produção (ELSHAFIE et al., 2015; KAUR, SANGWAN, KAUR, 2017).

Atualmente, o principal mercado emergente de biossurfactantes tem sido as indústrias relacionadas a petróleo para permitir a exploração efetiva de petróleo pesado, oferecendo vantagens sobre os surfactantes químicos em processos envolvendo extração, transporte, armazenamento e refino (ALMEIDA et al., 2016).

1.3.7 Aplicação de biossurfactantes na biorremediação

Os derramamentos de petróleo ocorrem durante o transporte de carga ou na forma de derrames industriais de resíduos de óleo e derivados de petróleo. O petróleo é um hidrocarboneto hidrofóbico com efeitos negativos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares dos organismos vivos, oferecendo considerável risco de contaminação em ambos os ecossistemas marinhos e terrestres (SILVA et al. 2014; SOUZA et al. 2014).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2001) propõe diferentes tecnologias físicas, químicas e biológicas, para o tratamento de solos contaminados. Um dos métodos mais estudados é a biorremediação, que utiliza a capacidade de degradação natural de plantas e micro-organismos para converter parcialmente contaminantes em compostos menos tóxicos ou completamente converter tais substâncias em dióxido de carbono e água.

Quanto maior a população de micro-organismos degradadores, mais rápido e mais eficiente será o processo de biorremediação. Portanto, essa técnica pode ser efetuada por bioestimulação, que consiste na estimulação do crescimento de micro-organismos presentes no local contaminado. Este processo pode ser realizado através da introdução de oxigênio, nutrientes e receptores específicos de elétrons para a degradação do contaminante e substâncias, a fim de corrigir o pH. O estímulo também pode ser realizado através da bioaumentação, na qual os micro-organismos autóctones são adicionados ao ambiente contaminado para acelerar e completar o processo de degradação do poluente (SOUZA et al., 2014).

A biorremediação teve importante papel na limpeza do derramamento de 41 milhões de litros de petróleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989, dando início ao desenvolvimento dessa tecnologia, demonstrando que há boas razões para se acreditar na aplicação efetiva deste método no tratamento de futuros derramamentos de óleo em circunstâncias apropriadas (SOUZA et al., 2014).

No citado acidente com o Exxon Valdez, a primeira medida tomada foi a lavagem física com jatos de água a alta pressão. Subsequentemente, surfactantes químicos foram aplicados nas áreas poluídas para acelerar o crescimento e a atividade dos micro-organismos degradadores de petróleo. Duas ou três semanas depois, as regiões tratadas com os surfactantes estavam significativamente mais limpas do que as áreas controle. Contudo, foi difícil avaliar os efeitos de tratamento devido à heterogeneidade da contaminação. De qualquer forma, outros estudos demonstraram a importância do uso de surfactantes para aumentar a biodegradação do petróleo (SATPUTE et al., 2010; SOUZA et al., 2014).

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Enquanto a biorremediação é considerada um método eficaz e ambientalmente benéfico, o tempo e os custos envolvidos tornam este processo inviável para o tratamento de grandes quantidades de resíduos (SHAVANDI et al., 2011). Assim, a utilização de biossurfactantes, surge como uma alternativa para aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos, permitindo a dessorção e solubilização de hidrocarbonetos e facilitando a assimilação destes compostos por células microbianas (SANTOS et al., 2016).

A biodegradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo por biossurfactantes ocorre através de dois mecanismos: O primeiro inclui o aumento da disponibilidade biológica do substrato hidrofóbico para os micro-organismos, com consequente redução da tensão superficial do meio em torno da bactéria e redução da tensão interfacial entre as moléculas da parede celular bacteriana e dos hidrocarbonetos. O outro mecanismo envolve a interação entre o biotensoativo e a superfície celular, promovendo modificações na membrana, o que facilita a adesão do hidrocarboneto (aumento de hidrofobicidade) e a redução do índice de lipopolissacarídeos da parede celular, sem danificar a membrana. Assim, os biossurfactantes bloqueiam a formação de pontes de hidrogênio e permitem as interações hidrofóbicas-hidrofílicas, as quais causam um rearranjo molecular e reduzem a tensão superficial do líquido, aumentando a sua área superficial e promovendo a biodisponibilidade e consequente biodegradabilidade (APARNA et al., 2011; KARLAPUDI et al., 2018a).

1.3.8 Aplicação de biossurfactantes na limpeza de reservatórios de óleos

As aplicações industriais mais comuns para biossurfactantes estão relacionadas ao petróleo e indústrias de mineração, bem como processos de limpeza industrial (ROCHA E SILVA et al., 2018).

Grandes quantidades de petróleo bruto são movimentadas diariamente, distribuídas para as refinarias e colocadas em tanques de armazenamento. A manutenção destes tanques, entretanto requer lavagem periódica (SILVA et al., 2014).

No entanto, resíduos e frações de óleos pesados que acumulam na parte inferior e nas paredes dos tanques de armazenamento são altamente viscosos e tornam-se depósitos sólidos que não podem ser removidos com bombeamento convencional. A remoção desses resíduos requer lavagem com solventes e limpeza manuais, tornando-se uma tarefa perigosa, demorada e com custos elevados resultando na produção de grandes quantidades de material residual para eliminação (ALMEIDA et al., 2016).

A utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques de armazenamento de óleo é um procedimento alternativo para diminuição da viscosidade através da formação de

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

emulsões óleo-em-água facilitando o bombeamento de resíduos. Além disso, este processo permite a recuperação do óleo cru após a quebra da emulsão (SILVA et al., 2014).

1.3.9 Aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo (MEOR)

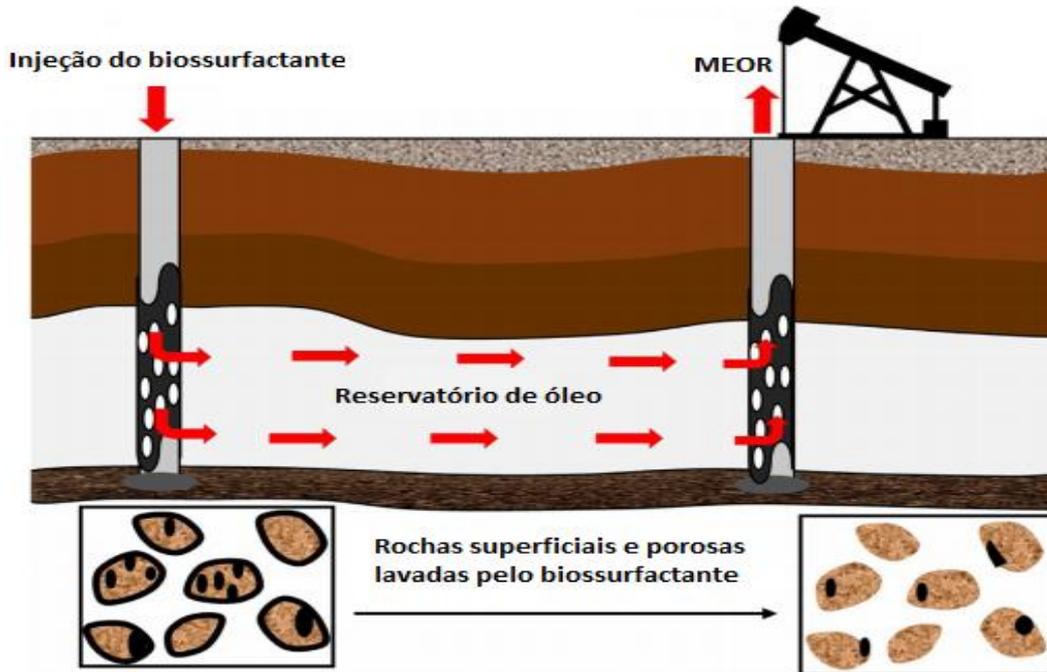
Atualmente, vários processos de recuperação avançada de óleo (EOR) são empregados nas indústrias de petróleo, como métodos térmicos, físicos e químicos. Os surfactantes químicos são amplamente utilizados nas indústrias de petróleo para diferentes fins, principalmente no EOR. No entanto, esses métodos são conhecidos como potencialmente caros e prejudiciais ao meio ambiente (AKBARI et al., 2018).

Entretanto o desenvolvimento de novas estratégias para substituir os produtos à base de petróleo, por energias renováveis, biodegradáveis e sustentáveis são os novos desafios para a sociedade (DAS et al., 2018).

Os biossurfactantes têm várias vantagens sobre os surfactantes químicos, como a concentração micelar crítica mais baixa (CMC), podem ser produzidos a partir de recursos renováveis, biodegradáveis, atividade sob ampla gama de condições ambientais adversas e toxicidade reduzida (GEETHA, BANAT, JOSHI, 2018).

Esses compostos de origem microbiana, possuem a capacidade de emulsionar o petróleo bruto e diminuir sua viscosidade o que o torna viável para operações aprimoradas de recuperação de petróleo, não perdendo as propriedades físico-químicas em temperaturas extremas, pH e salinidade (Figura 4). A utilização de micro-organismos para Recuperação Avançada de Óleo (EOR) é conhecido como recuperação de óleo aprimorada microbiana (MEOR) (DAS et al., 2018).

Figura 4 – MEOR de petróleo bruto



Fonte: AKBARI et al., 2018

1.3.10. Aplicação de biossurfactantes na dispersão de manchas de petróleo

O derramamento de óleos ocorridos durante o seu transporte ou na construção de oleodutos afeta drasticamente as regiões costeiras e praias, sendo hoje uma das maiores causas de catástrofes ecológicas e sociais no mundo (MUTHUSAMY et al., 2008; CARDONA et al., 2019).

Uma das técnicas de remediação de derramamentos de óleo é a aplicação de dispersantes de manchas de óleo. Os dispersantes utilizados para este fim são compostos de misturas complexas de surfactantes, solventes e aditivos que aumentam a taxa de dispersão natural do óleo e sua retirada da superfície contaminada (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018). Além disso, o uso de dispersantes minimiza o impacto de derramamento de óleo sobre os recursos sensíveis na orla costeira, reduzindo a quantidade de óleo derramado. O aumento da área superficial do petróleo como resultado da sua dispersão em pequenas gotículas facilita também sua biodegradação através da atividade de micro-organismos de ocorrência natural (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011) (Figura 5).

Uma das técnicas de remediação de derramamentos de óleo é a aplicação de dispersantes de manchas de óleo. Os dispersantes utilizados para este fim são compostos de misturas complexas de surfactantes, solventes e aditivos que aumentam a taxa de dispersão

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

natural do óleo e sua retirada da superfície contaminada (PERFUMO; BANAT; MARCHANT, 2018).

A aplicação de dispersantes minimiza o impacto do derramamento de óleo em aves e mamíferos marinhos, pois remove o óleo da superfície da água. Além disso, o uso de dispersantes minimiza o impacto de derramamento de óleo sobre os recursos sensíveis na orla costeira, reduzindo a quantidade de óleo derramado. O aumento da área superficial do petróleo como resultado da sua dispersão em pequenas gotículas facilita também sua biodegradação através da atividade de micro-organismos de ocorrência natural (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Os biossurfactantes exercem influência sobre os processos de remediação através de sua eficácia como agentes dispersantes. A literatura descreve o uso de biossurfactantes no aumento da dispersão e biodegradação de hidrocarbonetos no entanto, poucos estudos têm investigado na prática a aplicação de biossurfactantes como dispersantes de derramamento de óleo (SAEKI et al., 2009).

Figura 5 - Capacidade de dispersão do óleo de motor por um biossurfactante formulado



Fonte: SARUBBO et al., 2015

1.3.11. Aplicação de biossurfactantes na indústria de alimentos

Moléculas de surfactantes têm sido extensivamente utilizadas como emulsionantes em sistemas alimentares. Os sistemas de emulsão são importantes para a solubilização e dispersão das formulações, como também à firmeza, aparência e textura dos produtos alimentícios (NITSCHKE, SILVA, 2018) (Figura 6).

A principal função do emulsionante é a estabilização da emulsão controlando a aglomeração das fases. Os biossurfactantes aumentam esta estabilidade, reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre as duas fases prevenindo a coalescência das partículas através de forças eletrostáticas (NITSCHKE, COSTA, 2007).

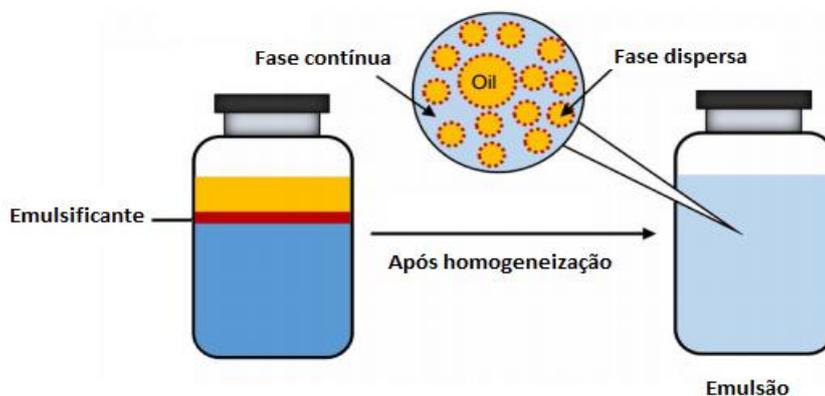
A produção de emulsionantes microbianos e biossurfactantes oferece uma alternativa aos aditivos existentes, alguns dos quais são mais adaptados aos alimentos modernos.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Exemplos de alimentos processados a partir de emulsões são maioneses, manteigas, cremes, margarinas, molhos para salada e chocolates (CAMPOS et al., 2013).

Devido às estas propriedades, os biossurfactantes apresentam maiores vantagens na fabricação de alimentos sintéticos. Podendo atuar em importantes funções como sistemas aerados, estabilização, melhoria da consistência, gestão do prazo de validade do produto e modificando propriedades reológicas (NITSCHKE, SILVA, 2018).

Figura 6 - Emulsificação das emulsões usando biossurfactantes



Fonte: AKBARI et al., 2018

1.3.12. Aplicação de biossurfactantes na indústria farmacêutica

Os surfactantes desempenham papéis importantes em formulações cosméticas devido a suas diversas propriedades, como umectante, solubilizante, emulsificante e habilidades de espuma, bem como detergência, entre outros. Atualmente, o mercado de produtos de beleza e higiene pessoais estão buscando componentes naturais como alternativas aos produtos químicos comumente usados (FERREIRA et al., 2017).

Nesse sentido, os surfactantes microbianos (também conhecidos como biossurfactantes) estão entre essas alternativas, dado que eles são mais biodegradáveis e menos citotóxico do que os surfactantes sintéticos com a vantagem que eles podem ser produzidos usando substratos renováveis (FERREIRA et al., 2017).

Atualmente, os avanços na pesquisa biotecnológica levaram à descoberta de novos ingredientes ativos, consolidando o desenvolvimento de uma nova classe de produtos conhecidos como biocosméticos. Os biossurfactantes desempenham um papel importante

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

nestes produtos, com suas propriedades físicas e atividades biológicas tornam estes compostos adequados para uso em aplicações cosméticas (BEZERRA et al. 2018).

Ao contrário dos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são compostos contendo açúcares, lipídios e proteínas, estruturas estas que se assemelham aquelas encontradas nas membranas celulares da pele. Sendo assim a eficiência de tais formulações são baseadas na sua capacidade de penetração. A utilização de biossurfactantes em formulações cosméticas pode ser eficiente para auxiliar a permeação de princípios ativos cosméticos nessa barreira principal que é pele (VECINO et al., 2017).

1.3.13. Aplicação de biossurfactantes na mineração

Os metais ocorrem em diferentes formas na natureza: como íons dissolvidos em água, vapor, ou sais minerais em rochas, areia e solo. Eles podem também estar ligados a moléculas orgânicas e inorgânicas ou atrelados por partículas no ar. Ambos os processos naturais e antropogênicos liberam metais para o ar e água (AGUIAR, NOVAES, GUARINO, 2002; MAO et al., 2015).

A contaminação dos solos por metais pesados surge como resultado das diversas atividades industriais, incluindo mineração, fundição de metais, produção de baterias automobilísticas, emissão de veículos e depósitos de resíduos industriais e a dispersão de cinzas provenientes dos processos de incineração (MULLIGAN, 2009). A presença de metais pesados nos solos provoca sérios problemas, uma vez que os mesmos não podem ser degradados, levando à contaminação dos sistemas biológicos e do subsolo pelo processo de lixiviação.

Para a remoção adequada dos metais em um ambiente contaminado, é necessário um bom agente complexante metálico, possuindo propriedades de solubilidade, estabilidade ambiental e bom potencial de complexação para metais. Os biossurfactantes são agentes complexantes de metais que têm sido relatados como eficazes na remediação de ambientes contaminados com metais pesados (SHAMI, SHOJAEI, KHOSHDAST, 2019) (Figura 7).

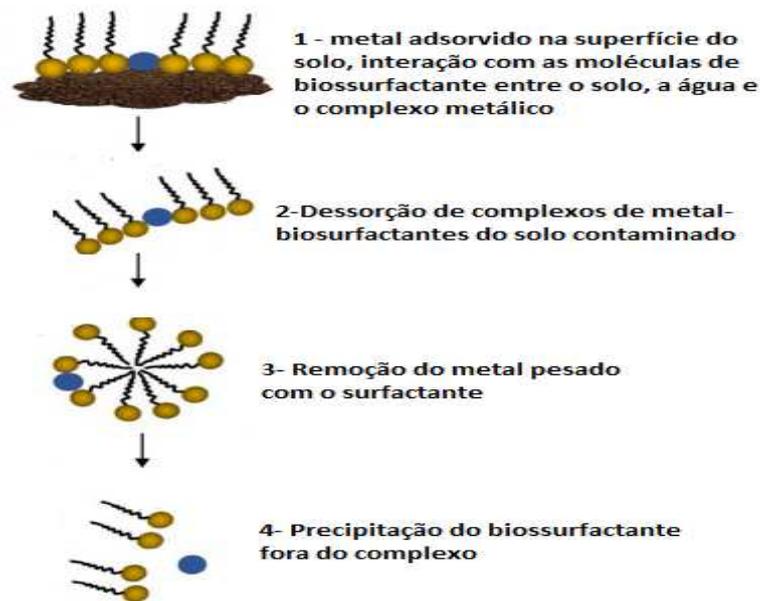
Biossurfactantes produzidos por amostras de *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram utilizados para flotação e separação de formações de minerais de calcita e scheelita, alcançando percentuais de recuperação em torno de 95% para CaWO_4 (tungstato de cálcio) e de 30% para CaCO_3 , (Carbonato de cálcio) respectivamente, ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais (SARUBBO et al., 2015).

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

O biodispersan, um polissacarídeo aniônico produzido por *A. calcoaceticus*, foi avaliado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcária e água. Já os biossurfactantes de *C. bombicola* demonstraram eficiência na solubilização de carvão (SARUBBO et al., 2015).

Luna et al. (2016) obtiveram em seus resultados taxas de remoção de 95, 90 e 79% para Fe, Zn e Pb, respectivamente com o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* para remoção de poluentes orgânicos. Outros micro-organismos como *Bacillus* e *Pseudomonas* sp. têm sido amplamente utilizados para a remoção de metais pesados de efluentes e solo devido às suas altas afinidades de ligação a metais, esses micro-organismos podem absorver uma quantidade substancial de íons de metais pesados, resultando na transferência de metais para uma matriz de biomassa contaminada (JACOB et al., 2018).

Figura 7 - Mecanismo de remoção de metais pesados de solo contaminado usando biossurfactantes



Fonte: Adaptado de (AHMAD et al., 2018)

1.3.14. Aplicação de biossurfactantes na agricultura

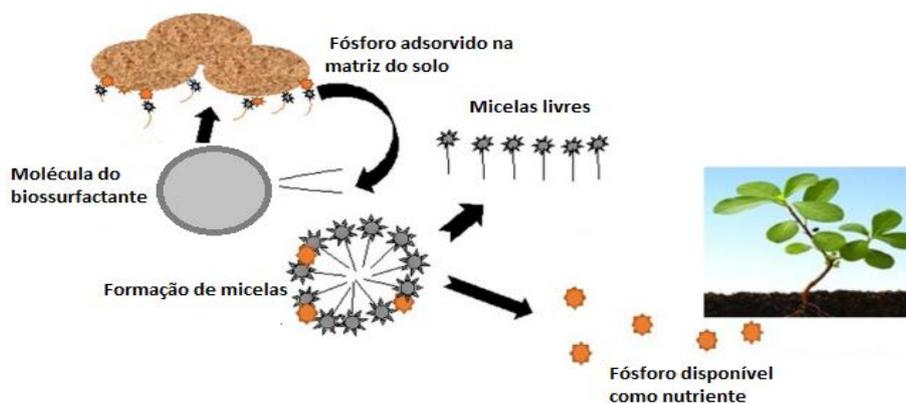
Os biossurfactantes são utilizados na agricultura especialmente em formulações de herbicidas e pesticidas. Os compostos ativos destas formulações são geralmente hidrofóbicos, sendo necessário o uso de agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosas. Os biossurfactantes obtidos de *Bacillus* têm sido utilizados para emulsificar as formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis. Já os raminolipídeos possuem potencial para o controle biológico de fitopatógenos que produzem zoósporos (SACHDEV, CAMEOTRA, 2013).

A utilização de biossurfactantes, também mostra-se eficiente na contemplação e disponibilidade de nutrientes aumentando significativamente a dessorção de fósforo através da solubilização, formação de micelas e precipitação, permitindo que as plantas sobrevivam em solos deficientes desse composto orgânico (AHMAD et al., 2018) (Figura 8).

Os biossurfactantes de vários isolados foram considerados pelo seu potencial papel na promoção do crescimento de plantas e outras aplicações relacionadas com a melhoria da eficácia dos solos agrícolas (SINGH, GLICK, RATHORE, 2018). Recentemente, os biossurfactantes têm sido aplicados em solos como agentes emulsionantes para o tratamento de solos contaminados com pesticidas (HASSEN et al., 2018).

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos do solo podem emulsionar contaminantes líquidos na fase não aquosa, aumentando a solubilidade aparente dos poluentes e facilitando o transporte destes da fase sólida para a solução. Contudo a biodisponibilidade de pesticidas para degradar micro-organismos pode ser melhorada no solo e na água através do uso de biossurfactantes (AHMAD et al., 2018).

Figura 8 – Dessorção de fósforo pelo biossurfactante e sua disponibilidade como nutriente.



Fonte: adaptado de (AHMAD et al., 2018)

1.3.15. Aplicação de biossurfactantes na medicina

Os biossurfactantes são bem conhecidos pelas suas atividades antimicrobiana, hemolítica, antiviral e antitumoral. Essas atividades possibilitam a aplicação de biossurfactantes em diversos campos, especialmente na medicina no combate de bactérias antipatogênicas; antivirais e como inibidores da formação de coágulos de fibrina (INÈS, DHOUHA, 2015).

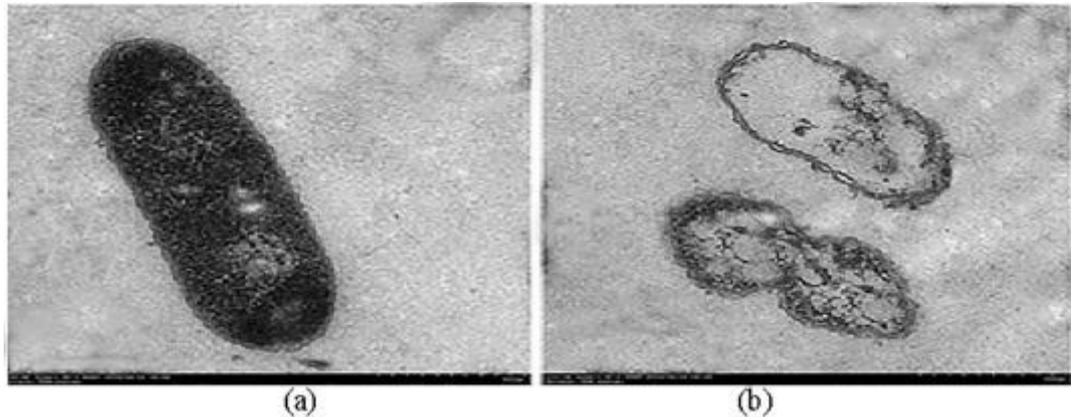
Glicolipídios e lipopeptídeos constituem os grupos mais amplamente estudados de compostos biossurfactantes que apresentam atividade antimicrobiana de amplo espectro. Eles incluem ramnolipídios liberados por *Pseudomonas aeruginosa*, sophorolipídeos de espécies de *Candida*, bem como surfactina e iturina produzidos por cepas de *Bacillus subtilis* (RUFINO et al., 2011).

Vários biossurfactantes exibem atividades antibacterianas tornando-se assim de grande interesse para diversas aplicações no combate a muitas doenças e infecções, representando uma alternativa em potencial aos produtos antimicrobianos sintéticos. Podendo ser utilizados como agentes terapêuticos (LUNA et al., 2011; NDLOVU et al., 2017; KARLAPUDI et al., 2018b).

O mecanismo de ação para atividade antimicrobiana dos biossurfactantes depende de diferentes mecanismos para destruir organismos alvos em comparação com os antibióticos convencionais, este mecanismo é caracterizado por mudanças ou rupturas na membrana, induzindo o derramamento de seus conteúdos citoplasmáticos ao romper diretamente a integridade da membrana plasmática ou parede celular (NDLOVU et al., 2017, SILVEIRA, FREITAS, CELLIGOI, 2018) (Figura 9).

Como resultado, essas biomoléculas têm despertado um grande interesse em ambos os setores médicos e biotecnológicos devido ao seu potencial para eliminar micro-organismos e dispersar biofilmes microbianos (SANTOS, DRUMMOND, DIAS-SOUZA, 2017).

Figura 9 – Atividade antimicrobiana do biossurfactante na membrana celular da *E. coli*.
(a) amostras não tratadas e (b) tratadas.



Fonte: KARLAPUDI et al., 2018b

1.4. Utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis (SINGH et al., 2007; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; FLORIS, RIZZO, GIUDICE, 2018). A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 % a 30 % da matéria-prima represente o custo total de um produto biotecnológico (MUKHERJEE et al., 2006).

Por outro lado, uma grande quantidade em resíduos poluentes são jogados a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam um alto custo para várias indústrias (MARCHANT; BANAT, 2012; DHAR et al., 2017). Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melaço de cana e glicerina têm sido citados na literatura (SILVA et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

A seleção do substrato, entretanto, depende da escolha de um resíduo com um certo balanço de nutrientes para crescimento e produção. Os resíduos industriais com elevado valor de carboidratos ou lipídios, são encontrados como elementos necessários para o uso como substratos para produção de biossurfactantes (BARROS et al., 2007).

A seleção de subprodutos, entretanto, deve garantir o equilíbrio adequado de nutrientes para permitir o crescimento microbiano e a consequente produção de biossurfactante. Os

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

resíduos industriais com elevado teor de hidratos de carbono ou lipídeos é ideal para uso como substrato (BANAT et al., 2014).

De acordo com Barros et al. (2007), a utilização de resíduos agroindustriais é um dos primeiros passos para a viabilidade de implantação da produção de biossurfactantes em escala industrial, diante da qual os estudos sobre as diferentes variáveis envolvidas são necessários para otimizar o processo.

A literatura descreve uma série de resíduos de produtos utilizados na produção de biossurfactantes descritos abaixo na Tabela 2.

Tabela 2 - Resíduos de produtos utilizados na produção de biossurfactantes

Resíduos	Referências
Efluentes oleosos	BATISTA et al., 2010; MERCADÉ et al., 1993; SARUBBO et al., 2007; SILVA et al., 2018
Efluentes ricos em amido	FOX; BALA, 2000; THOMPSON et al., 2000
Gordura animal	SANTOS et al., 2013; 2014
Gordura vegetal	GUSMÃO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2015
Óleo vegetal residual de cozinha	ALCANTARA et al., 2000;. CVENGROS; CVENGROSOVA, 2004; HABA et al., 2000
Borra	BENINCASA et al., 2002;. MANEERAT, 2005
Melaço	HIPPOLYTE et al, 2018; RODRIGUES et al., 2017; RAZA et al., 2016
Soro de leite	VERA et al., 2018
Milhocina	OSTENDORF et al., 2019; LUNA et al., 2011; RUFINO et al., 2007; 2011; SOBRINHO et al., 2008
Farinha de mandioca	FAI et al., 2015
Resíduos de destilaria de petróleo	LUNA et al., 2011; 2013; RUFINO et al., 2007
Glicerol	SILVA et al., 2010

Fonte: Autória própria (2019).

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

1.5 REFERÊNCIAS

ALCANTARA, R. et al. Catalytic production of biodiesel from soy-bean oil, used frying oil and tallow. **Biomass and bioenergy**, v. 18, n. 6, p. 515-527, 2000.

AL-BAHRY, S. N. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 141-146, 2013.

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6/B, p. 1145-1154, 2002.

ALMEIDA, D.G. et al. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1718, 2016.

ALMEIDA, D.G. et al. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 157, 2017.

ALMEIDA, D. G. et al. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 73-82, 2017a.

ALMEIDA, F. C. G. et al. Optimization and evaluation of biosurfactant produced by *Pantoea sp.* using pineapple peel residue, vegetable fat and corn steep liquor. **J. Chem. Chem. Eng.**, v. 9, n. 2015, p. 269-279, 2015.

AHMAD, Z. et al. Biosurfactants for Sustainable Soil Management. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, 2018. p. 81-130.

AKBARI, S. et al. Biosurfactants - a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, 2018.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23-29, 2012.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songlanakarin **J. Sci Technol**, v. 27, p. 675-6, 2005.

BANAT, I.M. et al. Microbial biosurfactants production, applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BANAT, I. M.; DE RIENZO, M. A. D; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9915-9929, 2014.

BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, 2007.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current microbiology**, v. 54, n. 6, p. 445-449, 2007.

BEZERRA, Káren Gercyane O. et al. Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology progress**, v. 34, n. 6, p. 1482-1493, 2018.

BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **Journal of Biotechnology**, v. 161, n. 2, p. 126-137, 2012.

BRITO, G.C.B et al. A Importância da bioprospecção de microrganismos em áreas contaminadas com produtos derivados do Petróleo, **Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, n. 3, p. 291-310, 2010.

CARDONA, D. S. et al. A comparison study of cleanup techniques for oil spill treatment using magnetic nanomaterials. **Journal of environmental management**, v. 242, p. 362-371, 2019.

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

CAMPOS, J. M. et al. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. **Toxicology reports**, v. 2, p. 1164-1170, 2015.

CORTIS, A.; GHEZZEHEI, T.A. On the transport of emulsions in porous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, p. 1-4, 2007.

CHAPRÃO, M. J. et al. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 471-479, 2015.

CHAPRÃO, Marcos José et al. Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 15-22, 2018.

CVENGROŠ, J; CVENGROŠOVÁ, Z. Used frying oils and fats and their utilization in the production of methyl esters of higher fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 27, n. 2, p. 173-181, 2004.

DAS, N; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011.

DAS, M. D. et al. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C. tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, p. 40-48, 2018.

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.

DELEU, M; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, n. 6-7, p. 641-646, 2004.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

DELL'ANNO, F. et al. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. **Marine environmental research**, v. 137, p. 196-205, 2018.

DHAR, H; KUMAR, S; KUMAR, R. A review on organic waste to energy systems in India. **Bioresource technology**, v. 245, p. 1229-1237, 2017.

ELSHAFIE, A. E. et al. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1324, 2015.

FAI, A. E. C. et al. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p.535-542, 2015.

FERREIRA, A. et al. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 522-529, 2017.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource technology**, v. 75, n. 3, p. 235-240, 2000.

FLORIS, R; RIZZO, C; GIUDICE, A. L. Biosurfactants from marine microorganisms. In: *Bacteriology*. IntechOpen, 2018.

GAUR, V. K. et al. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. **Bioresource Technology**, p. 121314, 2019.

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23-32, 2018.

GONZINI, O. et al. Electrokinetic remediation of gasoil contaminated soil enhanced by rhamnolipids. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, p. 1239-1248, 2010.

GUSMAO, C.A.B; RUFINO, R.D; SARUBBO, L.A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1683-1692, 2010.

HABA, E. et al. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379-387, 2000.

HASSEN, W. et al. *Pseudomonas rhizophila* S211, a new plant growth-promoting rhizobacterium with potential in pesticide-bioremediation. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 34, 2018.

HAQ, Z.U.I et al. Physico-chemical properties of cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide in the presence of electrolyte. **Journal of Materials**, v. 8, n. 3, p. 1029-1038, 2017.

HELD, P. Rapid critical micelle concentration (CMC) determination using fluorescence polarization. **BioTek Application Note**, 2014.

Santos, E. M. S. Produção de biosurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

HIPPOLYTE, M. T. et al. Application of response surface methodology to improve the production of antimicrobial biosurfactants by *Lactobacillus paracasei* sub sp. tolerans N2 using sugar cane molasses as substrate. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 48, 2018.

HUA, Z. et al. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water research**, v. 37, n. 17, p. 4143-4150, 2003.

INÈS, M. DHOUHA, G. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. **Carbohydrate research**, v. 416, p. 59-69, 2015.

JACOB, J. M. et al. Biological approaches to tackle heavy metal pollution: A survey of literature. **Journal of environmental management**, v. 217, p. 56-70, 2018.

JOY, S; RAHMAN, P. K; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**, v. 317, p. 232-241, 2017.

KAUR, K; SANGWAN, S; KAUR, H. Biosurfactant production by yeasts isolated from hydrocarbon polluted environments. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n. 12, p. 603, 2017.

KARLAPUDI, A. P. et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review, **Petroleum**, p. 1-9, 2018a

KARLAPUDI, A. P. et al. Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from an *Acinetobacter* M6 strain. **Journal of King Saud University-Science**, 2018b.

LIMA, R. A. et al. Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 6, p. 237-244, 2017.

LINDEBERG, M. R. et al. Conditions of persistent oil on beaches in Prince William Sound 26 years after the Exxon Valdez spill. **Deep Sea research part II: Topical studies in Oceanography**, v. 147, p. 9-19, 2018.

LUNA, J. M. et al. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2015.

LUNA, J. M; RUFINO, R. D; SARUBBO, L. A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558-566, 2016.

LUNA, J. M; SARUBBO, L; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

LUNA, J. M. et al. Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 4, p. 2463-2476, 2011.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202-209, 2013.

MAITY, J. P. et al. Removal of Cu, Pb and Zn by foam fractionation and a soil washing process from contaminated industrial soils using soapberry-derived saponin: a comparative effectiveness assessment. **Chemosphere**, v. 92, n. 10, p. 1286-1293, 2013.

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. **Journal of hazardous materials**, v. 285, p. 419-435, 2015.

MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 558-565, 2012.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MELO SANTOS, S. F. et al. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, n. 2, p. 413-425, 2018.

MERCADE, M. E. et al. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 43, n. 1, p. 1-6, 1993.

MINIF, I; GHRIBI, D. Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 13, p. 4310-4320, 2016.

MIR, S. et al. Microbial surface tensio-active compounds: production and industrial application perspectives: a review. **Int J Biotech & Bioeng**, v. 3, n. 8, p. 282-301, 2017.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 372-378, 2009.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.

MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science (00113891)**, v. 94, n. 6, 2008.

NITSCHKE M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; SILVA, S.S. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631-638, 2018.

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

NDLOVU, T. et al. Characterization and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 108, 2017.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

OLASANMI, Ibukun; THRING, Ronald. The Role of Biosurfactants in the Continued Drive for Environmental Sustainability. **Sustainability**, v. 10, n. 12, p. 4817, 2018.

OSTENDORF, Thaís A. et al. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **Journal of biotechnology**, 2019.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000

PERFUMO, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R. Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications, **Trends in Biotechnology**, p. 1-13, 2017.

PERFUMO, A; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277-289, 2018.

PU LI, Q.C.; WEIYUN L.B.C.; BAIYU Z. Offshore oil spill response practices and emerging challenges. **Marine Pollution Bulletin**, p. 2-22, 2016.

PRIJI, P. et al. *Candida tropicalis* BPU1, a novel isolate from the rumen of the Malabari goat, is a dual producer of biosurfactant and polyhydroxybutyrate. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 103-110, 2013.

RAZA, Z.A. et al. Response surface optimization in biosurfactant production by using a renewable growth substrate. 2016.

ROCHA E SILVA, N. M.P. et al. Natural Surfactants and Their Applications for Heavy Oil Removal in Industry. **Separation & Purification Reviews**, p. 1-15, 2018.

RODRIGUES, M. S. et al. Soy molasses as a fermentation substrate for the production of biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18699-18709, 2017.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Z. Naturforsch**, [S.l.], v. 3, p. 229- 236, 2001.

RUFINO, R. D. et al. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **J. Petr. Sci. Engv**, v. 109, p. 117–122, 2013.

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, R. 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.

RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Enhancement of stability of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using industrial residue as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 729-734, 2007.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

SAEKI, H. et al. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia sp.* strain JE-1058. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 572-577, 2009.

SACHDEV, Dhara P.; CAMEOTRA, Swaranjit S. Biosurfactants in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005-1016, 2013.

SAMAL, K; DAS, C; MOHANTY, K. Application of saponin biosurfactant and its recovery in the MEUF process for removal of methyl violet from wastewater. **Journal of environmental management**, v. 203, p. 8-16, 2017.

SANTOS, D. K.F et al. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 767, 2017a.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process biochemistry**, v. 54, p. 20-27, 2017b.

SANTOS, D.K.F. et al., Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.401, 2016.

SANTOS, D. K.F 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, Danyelle KF et al. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 48-57, 2014.

SANTOS, A. P. P; SILVA, M.D. S; COSTA, E.V.L. Biossurfactantes: uma alternativa para o mercado industrial. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 5, n. 1, p. 88-103, 2016.

SANTOS, V. L.; DRUMMOND, RM Nardi; DIAS-SOUZA, M. V. Biosurfactants as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications**, p. 371, 2016.

SARUBBO, L. A. et al. Construção de um Protótipo Móvel para Aplicação de Biossurfactantes em Escala Piloto para Tratamento de Água do Mar Contaminada por Derramamento de Derivado de Petróleo.

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, L.A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p.707-723, 2015.

SARMA, H; BUSTAMANTE, K. L. T; PRASAD, M. N. V. Biosurfactants for oil recovery from refinery sludge: Magnetic nanoparticles assisted purification. In: *Industrial and Municipal Sludge*. Butterworth-Heinemann. p. 107-132, 2019.

SATPUTE, S. K. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 4, p. 436-450, 2010.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

SILVA, S. N. R. L. et al., Glicerina como substrato alternativo para produção de biossurfactantes In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Rio Claro, SP. **Holos Environment**, 2009.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v.79, p.174-183, 2010

SILVA, Elias J. et al. Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 127-135, 2018.

SILVA, R. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014a.

SILVA, Rita et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523-12542, 2014b.

SILVEIRA, V. A. I; FREITAS, C. A. U. Q; CELLIGOI, M. A. P. C. Antimicrobial applications of sophorolipid from *Candida bombicola*: A promising alternative to conventional drugs. **Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol**, v. 6, n. 06, p. 87-90, 2018.

SINGH, R; GLICK, B.R.; RATHORE, Dheeraj. Biosurfactants as a Biological Tool to Increase Micronutrient Availability in Soil: A Review. **Pedosphere**, v. 28, n. 2, p. 170-189, 2018.

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology**, v. 25, p. 99-121, 2007.

SHAVANDI, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 2, p. 477-482, 2011.

SOBRINHO, H. B. et al. Biosurfactants: classification, properties and environmental applications. **Recent Developments in Biotechnology**, v. 11, p. 1-29, 2013.

SOBRINHO, H.B.S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2008.

SOUZA, E. C; VESSONI-PENNA, T.C; DE SOUZA OLIVEIRA, R.P. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 89, p. 88-94, 2014.

SHAMI, R. B; SHOJAEI, V; KHOSHDAST. Efficient cadmium removal from aqueous solutions using a sample coal waste activated by rhamnolipid biosurfactant. **Journal of environmental management**, v. 231, p. 1182-1192, 2019.

THOMPSON, D.N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. In: **Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. p. 917-930.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource technology**, v. 232, p. 389-397, 2017.

VECINO, Xanel et al. Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 911-923, 2017.

VERA, E. C. S. et al. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical engineering journal**, v. 133, p. 168-178, 2018.

XU, X. et al. Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2885, 2018.

CAPÍTULO II

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Artigo submetido para Publicação à Revista Process Biochemistry

Remoção aprimorada de óleo por uma formulação de biossurfactante não tóxico

Enhanced oil removal by a non-toxic biosurfactant formulation

E.M.S. Santos^a, I.R.A.S. Lira^a, H.M. Meira^c, D.G. Almeida^c, J. S. Aguiar^d, L.A. Sarubbo^{c,d}, J.M. Luna^{c,d}*

^a*Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^b*Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^c*Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Joaquim de Brito, n.216, Boa Vista, CEP: 50070-280, Recife, Pernambuco, Brasil.*

^d*Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, n. 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil*

* *Corresponding author. Tel.: +55 81 21194084; fax: +55 81 21194000.*

E-mail address: *Juliana.luna@unicap.br*

Resumo

Neste estudo, um biossurfactante foi produzido por *Candida sphaerica* UCP 0995 em biorreator em meio contendo resíduos industriais e foi utilizado um delineamento composto central rotacional. Os melhores resultados foram alcançados com agitação a 175 rpm, aeração de 1,5 vvm e tempo de cultura de 132 horas, com redução da tensão superficial para 25,22 mN/m, rendimento de biossurfactante de 8,50 g / L e concentração crítica de micelas de 0,2 g/L. As capacidades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante foram investigadas sob condições extremas de temperatura, salinidade e pH, cujos resultados indicaram a estabilidade do biossurfactante. A composição química revelou que o biossurfactante produzido é um glicolípido. O teste de citotoxicidade foi realizado pelo método MTT e o biossurfactante não exibiu citotoxicidade nas concentrações testadas. Em seguida, o biossurfactante foi submetido a diferentes métodos de formulação como aditivo comercial. A biomolécula permaneceu estável por 120 dias em temperatura ambiente nos ensaios de conservação. Testes de biorremediação foram realizados para analisar a eficácia do biossurfactante isolado e das espécies produtoras microbianas na remoção de óleo do solo. Os resultados demonstram que o biossurfactante produzido possui propriedades promissoras como agente de biorremediação para solo e água contaminados com compostos hidrofóbicos.

Palavras-Chave: Biossurfactantes; Resíduos Industriais; Contaminação por petróleo.

1. Introdução

Com os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas, as refinarias de petróleo aumentaram significativamente a produção de hidrocarbonetos e seus derivados, e conseqüentemente resultando em grandes derramamentos de óleo que decorrem durante processamento de extração, transporte e transferência do óleo entre os navios, levando a poluição ambiental e outros riscos ambientais de forte impacto para sociedade [1–3].

Compostos à base de petróleo são altamente poluentes quando liberados no meio ambiente tornando-se um problema de saúde pública e ambiental devido à potencial contaminação dos solos e águas [3,4]. A necessidade de remediar áreas contaminadas levou ao desenvolvimento de novas tecnologias para a desintoxicação desses contaminantes, sendo conhecida como biorremediação, que envolve a utilização de micro-organismos ou seus metabólitos microbianos para degradação dos poluentes [5].

Embora as técnicas baseadas em estratégias químicas, eletroquímicas e térmicas possam ser eficazes para o tratamento *ex-situ* de sedimentos contaminados, as técnicas baseadas na biorremediação representam um método promissor, baseando-se em uma tecnologia de baixo custo com menos impacto ambiental [6].

Assim os compostos surfactantes podem ser utilizados para aumentar a solubilidade do óleo e viabilizar a biorremediação [7]. Os biossurfactantes são moléculas de superfície ativa anfipáticas, podendo ser produzidos por uma grande variedade de micro-organismos que têm a capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais das soluções [7].

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Características como detergência, emulsificação, dispersão, ação umectante e solubilização atribuem grande versatilidade a essas biomoléculas, tornando-as candidatas em potencial na substituição dos surfactantes sintéticos [8].

Apesar das vantagens, os biossurfactantes ainda não são competitivos com os surfactantes sintéticos, devido aos altos custos de produção. Portanto, a maioria dos surfactantes comercialmente disponíveis é sintetizada a partir da indústria petroquímica, que atualmente representa 70-75% de todos os surfactantes utilizados em nações industrializadas [9].

No entanto o desenvolvimento de processos econômicos para a produção de biossurfactantes tornou-se o fator chave para reduzir custos e aumentar a competitividade. Os resíduos industriais têm atraído considerável interesse dos pesquisadores como substratos de baixo custo, pois o substrato geralmente corresponde por até 50% do custo final de produção [4].

As técnicas estatísticas comumente referidas como Metodologia da Superfície de Resposta e Curva de Contorno são poderosas ferramentas experimentais para melhorar a produção e otimizar o meio de crescimento e as condições de cultivo para obter o máximo em sua produção [10]. A utilização de biorreatores também torna-se uma alternativa ainda mais atraente e promissora quando associada à otimização prévia da condição de cultura utilizando frascos agitados para reduzir o custo e o tempo de processo. A produção em larga escala de biossurfactantes parece ser uma estratégia eficaz para superar a competitividade com seus equivalentes sintéticos [4].

Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura para obtenção de altos rendimentos de surfactantes [23,24]. A maximização da produção de metabólitos

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

de interesse industrial a partir de processos fermentativos, como os biossurfactantes, entretanto, requer a padronização do meio e das condições de cultivo [10].

Portanto, o emprego da modelagem estatística consiste em uma importante ferramenta que pode ser usada para explicar não só a influência mais relevante, como também, a interação entre as influências dos parâmetros fermentativos envolvidos no desempenho de um determinado processo [25]. Ainda, segundo Almeida et al. [4], consiste em um modo eficiente de gerar informação a partir de poucos ensaios experimentais, reduzindo, conseqüentemente, os custos e o tempo necessários para o desenvolvimento de processos experimentais.

Nesse sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de estratégias que permitam a produção e conseqüente aplicação dos biossurfactantes em escala industrial. Os substratos de baixo custo, a seleção de micro-organismos produtores e o aprimoramento dos processos de purificação têm sido utilizados com essa finalidade [11].

Deste modo, foi realizado o Delineamento Composto Central Rotacional, (DCCR) utilizado como ferramenta estatística para realizar o processo de maximização da produção de biossurfactante por *Candida sphaerica*. O Delineamento Composto Central Rotacional permitiu estudar o comportamento das variáveis resposta Tensão superficial e Rendimento do líquido metabólico livre de células, de acordo com condições específicas, em função das variáveis independentes aeração, agitação e tempo de cultivo.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo maximizar a produção de um agente surfactante a partir de *C. sphaerica* utilizando resíduos industriais com substratos de baixo custo, investigar as propriedades do biossurfactante obtido, seu

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

isolamento, caracterização, formulação comercial, e sua aplicação na remoção de derivado de petróleo em ambientes terrestres e marinhos.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Todos os produtos químicos foram de grau reagente. Os meios de cultivo foram adquiridos da Difco Laboratories (USA). Dois resíduos industriais foram utilizados como substratos para a produção do biossurfactante. Resíduo da refinaria de óleo vegetal de soja, gentilmente cedido pela ASA LTDA, Recife-PE, foi utilizado como substrato insolúvel, enquanto a milhocina, resíduo da fabricação de produtos à base de milho, obtida pela Corn Products do Brasil, Cabo de Santo Agostinho-PE, foi utilizado como substrato solúvel. A água do mar foi coletada perto da termoeletrica TERMOPE, localizada no município de Ipojuca, em Pernambuco, Brasil. As amostras de água foram coletadas e armazenadas em garrafas plásticas de 10 L.

2.2 Micro-organismo

Uma cepa de *Candida sphaerica* UCP 0995 foi fornecida do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco. As culturas da cepa foram mantidas em tubos de ensaio inclinados contendo Yeast Mold Ágar (YMA) sob refrigeração a 5°C sendo repicadas a cada 30 dias.

2.3 Condição de cultivo

O inóculo da levedura foi preparado transferindo-se a cultura para um tubo contendo o meio YMA, a fim de se obter uma cultura jovem. Em seguida, a amostra foi transferida para frascos contendo 50 mL do meio YMB e incubados sob agitação de 150 rpm a 28°C durante 24 horas. Após este período, foram realizadas diluições até se obter a concentração final de células/mL. O meio de produção do biossurfactante de *C. sphaerica* estabelecido por Luna et al. [12] foi formulado em água destilada com 9% do resíduo de refinaria de óleo vegetal de soja, 9% de milhocina e esterilizado por autoclave a 121°C durante 20 min. As fermentações para produção do biossurfactante foram conduzidas em biorreator de 4.0 L (BIO-TEC – TECNAL, Brazil) obedecendo a um planejamento experimental (descrito mais adiante). Ao fim do cultivo, amostras foram centrifugadas e filtradas para determinação da tensão superficial e do rendimento em biossurfactante.

Para determinação da biomassa por peso seco, 10 mL das amostras foram centrifugados a 2000g durante 20 minutos, sendo a biomassa lavada com água destilada em tubo de centrífuga graduado. Após agitação e nova centrifugação, a fase superior foi descartada, e o “pellet” celular seco em estufa a 105°C por 24 horas e pesado [13].

2.4 Otimização da produção do biossurfactante utilizando DCCR

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizado para determinar os efeitos e interações de três fatores sobre a produção do biossurfactante. A velocidade de rotação, tempo de cultivo e aeração foram as variáveis independentes.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

A tensão superficial do meio de produção contendo o biossurfactante foi a variável de resposta e foi utilizada como critério de seleção da melhor condição de produção.

Neste planejamento, foram realizados 20 experimentos, com quatro repetições no ponto central. A análise estatística das quatro repetições dá uma indicação do erro experimental da técnica de produção. O intervalo e os níveis das variáveis independentes são apresentados na Tabela 1. Cada variável do planejamento foi estudada em cinco níveis (-1,68, -1,0, 0, +1 e +1,68), sendo o zero o valor codificado central. Esses níveis foram baseados nos resultados obtidos em experimentos preliminares.

Os valores ótimos do DCCR foram obtidos resolvendo a equação de regressão e analisando os gráficos de superfície de resposta. Análise de variância (ANOVA) com intervalos de confiança de 95% foi utilizada para determinar a significância dos efeitos. ANOVA, a determinação dos coeficientes de regressão e a construção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do programa Statistica®, versão 10.0.

Inserir Tabela 1

2.5 Determinação da tensão superficial

A tensão superficial de amostras dos líquidos metabólicos livre de células dos biossurfactantes formulados foram medidas em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY. A tensão superficial foi medida através da imersão do anel de platina no líquido metabólico e registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido [12].

2.6 Isolamento do biossurfactante

O líquido metabólico, após centrifugação a 4500 rpm por 20 minutos a 10°C para retirada das células, teve seu pH ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 M e precipitado com 1:2 volumes de metanol. Após 24 h a 4°C, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm por 20 minutos, lavadas duas vezes com metanol frio e seco a 37 °C por 24-48 h [12-13].

2.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

O extrato de biossurfactante recuperado do sobrenadante foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O espectro FTIR 400 Perkin Elmer, com uma resolução de 4 cm⁻¹, na região de 400 a 4000 números de onda (cm⁻¹).

2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O biossurfactante extraído foi redissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e os respectivos espectros de ¹H RMN foram registados em 25 °C utilizando um espectrômetro Agilent 300Mz que opera a 300,13 MHz. Deslocamentos químicos (δ) são dadas na escala de ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS).

2.9 Cromatografia gasosa (GC)

A amostra de ácidos graxos (fração hidrofóbica) do biossurfactante foi analisada no cromatógrafo a gás (Hewlett Packard modelo HP 5890 Série II) com a

temperatura do injetor a 220 °C. A separação cromatográfica foi efetuada com uma coluna DB-5 (30 m x 0,32mm x 0,5µm) detector de ionização de chama (FID) a 290 °C e nitrogênio como gás de arraste. A temperatura inicial foi programada em 60 °C com taxa de 7°C/min e temperatura final de 200 °C. Injetou-se 1µL da amostra usando-se hexano como solvente.

2.10 Formulação de biossurfactante

O líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante produzido foi conservado de acordo com os seguintes procedimentos: (1) ao líquido metabólico foi adicionado sorbato de potássio como conservante a 0,2%; (2) o líquido metabólico foi aquecido a 80°C (vapor fluente) durante 30 min e depois adicionado de sorbato de potássio a 0,2% e (3) o líquido metabólico foi esterilizado por tindalização fracionada (vapor fluente) durante 30 min por 3 dias consecutivos. Em seguida, o líquido metabólico tratado conforme os procedimentos descritos acima foram estocados à temperatura ambiente ao longo de 120 dias para observação da estabilidade. Testes foram realizados para determinação do tempo de estocagem (0, 15, 30, 45, 90 e 120 dias) à temperatura ambiente de 28°C, verificando-se a tensão superficial, capacidade de emulsificação e dispersão/ agregação de composto hidrofóbico em água do mar [14].

2.11 Determinação da tensão superficial

A determinação da tensão superficial do líquido metabólico livre de células do biossurfactante formulados foi medida em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY.

2.12 Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação das atividades de emulsificação, amostras do líquido metabólico livre de células do biossurfactante formulado foram analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg [15] em que 1,0 mL de óleo de motor obtido de um fabricante automotivo local na cidade de Recife, Brasil, foi adicionado a 1,0 mL do líquido metabólico em tubo graduado e a mistura agitada em vórtex por 2 minutos. Após 24 horas as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros, devido à altura do halo formado.

2.13 Teste de Deslocamento de Óleo (Teste de Dispersão)

A capacidade de dispersão de uma mancha de óleo foi simulada em laboratório, contaminando amostras de água com óleo de motor em uma placa de Petri. O biossurfactante formulado a uma concentração de 1,0% foi adicionado na proporção biossurfactante-óleo de 1:2 (v/v). O diâmetro médio das zonas claras de experimentos em triplicata foi medido e calculado como a taxa do diâmetro da placa de Petri [16].

2.14 Efeito dos fatores ambientais sobre atividade do biossurfactante formulado

Os efeitos de diferentes temperaturas (40°C – 50°C), diferentes concentrações de NaCl (1,0, 3,0 e 5,0%), e diferentes valores de pH (5,0, 7,0 e 9,0) nas atividades emulsificantes e tensoativas do biossurfactante formulado foram avaliados no líquido metabólico livre de células para determinação da tensão e da atividade de emulsificação sendo avaliados em 0, 15, 30, 45, 90 e 120 dias. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.15 Avaliação citotóxica do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio [17,18]. A linhagem celular L929 (fibroblasto de camundongos), foi mantida em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium). O meio foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células (2×10^5 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida 100 µL das soluções do biossurfactante foram adicionadas aos poços nas concentrações de 0,094 a 12 mg/mL. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a média da percentagem de viabilidade e desvio padrão foram calculados. A diferença entre os valores das médias da viabilidade celular foi avaliada pela ANOVA *one way* e pós teste Tukey ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism 7.0. demo.

2.16 Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio estático

Colunas de vidro (55 x 6 cm) foram inicialmente preenchidas com cerca de 200g da amostra da areia contaminada com 10% do contaminante hidrofóbico. Em seguida, a superfície foi inundada por 200 mL das soluções do biossurfactante. O

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

biossurfactante foram utilizados em concentrações correspondentes à metade da CMC (1/2CMC), à CMC e no dobro da CMC (2xCMC). O biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células) também foi testado na mesma quantidade (200 ml). Uma coluna contendo o solo e 200 mL de água, sem adição dos surfactantes, foi utilizada como controle. As percolações das soluções dos surfactantes foram monitoradas ao longo de 24 horas. As amostras foram retiradas para a estimativa de óleo de motor por análise gravimétrica. O óleo de motor residual foi extraído num Becker pré-pesado com hexano em um funil de decantação. A extração foi repetida duas vezes para assegurar uma recuperação completa do óleo. Após a extração, o hexano foi evaporado rotativo e óleo retirado da areia pesado [19].

O percentual de óleo removido será calculado usando a seguinte equação: óleo de motor removido (%) = $[(O \text{ inicial} - O \text{ remanescente}) / O \text{ inicial}] \times 100$, onde O inicial é o óleo na areia contaminada e O remanescente é o óleo de motor que permanece na areia (g) após a lavagem [20].

2.17 Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio cinético

Amostras de 10g de areia contaminada com óleo de motor foram adicionadas a 100 mL de água potável e a mistura foi enriquecida com 1 mL de melão de cana cedido de uma usina local. Essa mistura foi previamente esterilizada sob vapor fluente e constituída de uma condição controle. Em seguida, soluções do biossurfactante isolado na CMC e 2x CMC e 15% da sua espécie microbiana produtora (15% do inóculo contendo 10^8 células/mL da levedura) previamente cultivada em seu meio de

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

preparação do inóculo (YMB) foram adicionadas e as misturas incubadas a 28°C a 150 rpm durante 90 dias, de acordo com a Tabela 2.

A cada 15 dias de experimento 1% de melaço foi adicionado às misturas, totalizando quatro alimentações (após 15, 30, 45 e 60). Amostras de 5 mL foram retiradas a cada 15 dias (15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias) para análise do percentual de remoção do óleo, totalizando 06 amostragens. O percentual de remoção do óleo foi calculado como a concentração de óleo removida por gravimetria [21].

Inserir Tabela 2

2.18 Aplicação do biossurfactante na remediação do contaminante em água do mar

Os experimentos de remoção do óleo de motor foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de água do mar e 1% de óleo de motor. O meio foi esterilizado e em seguida inoculado com 5% de inóculo da levedura produtora do biossurfactante. Os experimentos foram conduzidos em três diferentes condições, uma das quais consistiu em água do mar + óleo de motor + *C. sphaerica* UCP 0995; o segundo foi composto por água do mar + óleo motor + *C. sphaerica* UCP 0995 + biossurfactante na CMC (0,2 g / L); e o terceiro consistia em água do mar + óleo de motor + *C. sphaerica* UCP 0995 + biossurfactante no dobro do CMC (0,4 g / L) conforme descrito na Tabela 3. Os frascos foram incubados em shaker rotativo a 150 rpm durante 30 dias, sendo amostras retiradas a cada 10 dias de experimento, totalizando 03 amostras.

Inserir Tabela 3

3. Resultados e discussão

3.1 Otimização da produção de biossurfactantes utilizando DCCR

A Tabela 4 apresenta a matriz de DCCR e os resultados correspondentes aos valores das tensões superficiais e rendimentos das diferentes condições utilizadas para a produção do biossurfactante por *C. sphaerica*. Análise de regressão múltipla aplicando metodologia de superfície de resposta (RSM) foi realizada para ajustar a função de resposta aos dados experimentais e investigar a influência simultânea das três variáveis selecionadas. A melhor condição para a produção de biossurfactante foi encontrada na Corrida 7, na qual o menor valor da variável resposta tensão superficial obtido coincidiu, também, com o maior rendimento em biossurfactante.

Inserir Tabela 4

Foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV%) de ambos grupos de dados apresentados na Tabela 4 (Tensão superficial e rendimento) com a finalidade de verificar o seu grau de dispersão. O CV% muito baixo encontrado para os dados de tensão superficial (9,10%) indicaram um alto grau de precisão e confiabilidade adequada dos valores experimentais para Y_1 . Já para o rendimento, o CV% foi de 34,53%, significando uma alta dispersão e maior heterogeneidade dos dados. Desde modo, os dados de tensão superficial obtidos se mostraram mais adequados para construção do modelo estatístico discutido mais adiante, objetivando melhor controle do processo fermentativo.

A aplicação do RSM para a estimativa dos parâmetros ótimos resultou em uma relação empírica entre a tensão superficial e as variáveis do processo. A seguinte equação polinomial quadrática se ajusta melhor aos dados:

$$Y_1 = 32,178883 - 0,8235X_1 + 0,1239X_2 + 0,2542X_3 - 0,9735X_1^2 - 2,1526X_2^2 - 1,9635X_3^2 - 0,1400X_1X_2 + 0,3375X_1X_3 + 0,3900X_2X_3 \quad (1)$$

Em que Y_1 é a tensão superficial (mNm^{-1}) e X_1 , X_2 e X_3 são valores codificados para a agitação, aeração e tempo de cultivo, respectivamente.

A ANOVA foi realizada para validar o modelo quadrático (Tabela 5). Como pode ser observado, os termos lineares e quadráticos, bem como suas interações, foram todos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) e o valor F (com intervalo de confiança de 95%) foi muito maior que 4 para cada variável e respectiva interação. O erro puro baixo (0,0579) indicou uma ótima reprodutibilidade dos dados experimentais. Além disso, o coeficiente de correlação ($R^2 = 0,99809$) indicou que menos de 1% da variação total não pôde ser explicada pelo modelo empírico.

Inserir Tabela 5

O gráfico de valor previsto versus valor real para a tensão superficial determinado pela equação do modelo demonstrou que os valores observados foram distribuídos perto da linha reta (Figura 1), o que indica que tais valores estão muito próximos dos valores previstos ($R^2 = 0,99809$). Assim, o modelo de regressão foi significativo e mostrou-se adequado para descrever a produção do biossurfactante sob as condições experimentais em estudo.

Inserir Figura 1

Pelo Diagrama de Pareto na (Figura 2), pôde-se observar que o termo quadrático da aeração foi o fator que apresentou maior significância estatística na redução da tensão superficial do líquido metabólico livre de células, seguido pelo termo quadrático da variável tempo. A variável agitação influenciou inversamente na redução da tensão superficial, enquanto que as variáveis tempo e aeração contribuíram diretamente para a redução da tensão superficial do meio de cultivo.

Inserir Figura 2

A Figura 3 mostra os gráficos de superfícies de resposta gerados de acordo com a Equação 1 para tensão superficial mínima (isto é, máxima produção de biossurfactante) para facilitar a visualização dos efeitos das variáveis independentes. A Fig. 3A indica que uma diminuição na agitação próxima ao nível mínimo contribui mais fortemente para uma diminuição da tensão superficial. Já na Fig. 3B verificou-se, através da análise, uma região de provável otimização de menor tensão superficial, localizada no nível mínimo da agitação (-1) e no nível médio do tempo (0). Por fim, a Fig. 3C demonstra um paralelismo considerável entre os aeração e tempo e, conseqüentemente, uma interação fraca, isto é, é possível prever a tensão superficial a partir de variações em apenas um dos fatores em cada gráfico de superfície de resposta, o que implica considerar que, sob condições de aeração e tempo, ambos no seu nível médio, consegue-se um bom resultado da tensão superficial.

Inserir Figura 3

Com base nos resultados do DCCR, a condição realizada com agitação de 175 rpm, aeração de 1,5 vvm e tempo de cultivo de 132 horas (experimento 7) foi selecionada para a produção de biossurfactante, alcançando uma redução da tensão superficial de 25,22 mN/m e com um rendimento em biossurfactante de 8,50 g/L. Os demais experimentos apresentaram resultados favoráveis em relação à tensão superficial e ao rendimento.

Comparando com os resultados observados por Almeida et al. [4], onde o biossurfactante produzido por *C. tropicallis* cultivada em meio contendo 2,5 % de melão, 2,5% de óleo de canola residual apresentou uma tensão superficial de 29,52 mN/m com um rendimento de 3,0g/L; e com os resultados obtidos por Luna et al. [12], onde o biossurfactante produzido por *C. sphaerica* em meio contendo resíduos industriais 9% de óleo vegetal de soja, 9% de milhocina apresentou uma tensão superficial de 25 mN/m com um rendimento de 8,5 g/L, os resultados obtidos neste presente trabalho mostraram-se excelentes.

3.2 Caracterização estrutural do biossurfactante

A Fig. 4 mostra os espectros de FT-IR obtidos para o biossurfactante isolado de *C. sphaerica*. O espectro do infravermelho evidenciou uma banda de absorbância entre as faixas 3000 a 3500 cm^{-1} , caracterizando a presença de grupos hidroxila. Um pico de absorbância foi constatado em 1710,96 cm^{-1} para o grupo funcional carbonila (C=O), e a presença de carbonos alifáticos foi verificada nas faixas 2924,41 e 2854,02 cm^{-1} , e na faixa 1464,69 cm^{-1} , os espectros evidenciaram ligações duplas, confirmando a presença de ligações duplas (C=C) na estrutura do biossurfactante.

Inserir Figura 4

O espectro de ^1H RMN (Figura 5) indicou a presença de hidrogênio ligado a grupos carboxílico na faixa dos sinais entre δ 10 e 11 ppm; e ligações duplas entre os sinais δ 5 a 6 ppm, além da presença de grupos alifáticos evidenciada na região compreendida entre δ 1 a 3 ppm.

Inserir Figura 5

Já o espectro de ^{13}C RMN (Figura 6) evidenciou três regiões bem definidas. O sinal em δ 180 ppm sugere carbono ligado a grupo carboxílico, e os sinais entre δ 120 e 140 ppm indicam a presença de ligações duplas. Já os sinais entre δ 10 e 40 ppm correspondem a carbonos alifáticos. E por fim, o pico em $\cong \delta$ 80 ppm foi atribuído ao sinal residual do solvente (CDCl_3).

Inserir a Figura 6

O biossurfactante produzido pelo micro-organismo *Candida sphaerica* também foi analisado por GC-MS e comparado com os dados da biblioteca (Figura 7). Os principais picos foram obtidos em tempos de retenção de 17.55, 20.82, 24.62, 25.03, 25.72, 26.78 minutos. De um modo geral, verificou-se que o biossurfactante é composto principalmente por ácidos graxos de cadeia longa. O pico mais predominante foi obtido aos 20.82 minutos correspondendo a 46,52% da substância de maior concentração (representando ácidos graxos C-18). A estrutura mais representativa apresentou massa molar entre 150 e 200 (m/z).

Com base nos resultados obtidos pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C , espectroscopia de FTIR e GC-MS, foi possível afirmar que o biossurfactante estudado apresenta uma natureza glicolipídica, devido, principalmente, grupos carboxílicos

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

encontrados, provavelmente relacionados à ácidos graxos metabolizados, provavelmente ligado a carboidratos, como descrito para outros biossurfactantes produzidos por leveduras, também de natureza glicolipídica. Todos estes resultados se mostraram similares a outros trabalhos relacionados com a caracterização de biossurfactantes produzidos por várias outras espécies de leveduras do gênero *Candida sp.*

Conforme descrito na literatura, Santos et al. [22], relataram resultados promissores para o cultivo da levedura *C. lipolytica* em meio contendo resíduo de gordura animal, no qual em sua caracterização sugeriu sua natureza glicolipídica.

Garg et al. [23] em seu estudo utilizando a *Candida parapsilosis*, confirmou a presença de grupos funcionais semelhantes aos biossurfactantes produzidos por *Candida albicans*, *C. lipolytica* e *Candida tropicalis* MTCC 230.

Contudo El-Sheshtawy et al. [24], utilizando um biossurfactante produzido por *Candida albicans* demonstrou detalhes estruturais como hidroxila, ácido carboxílico e carbonos alifáticos indicando que este composto é um soforolipídeos.

Inserir Figura 7

3.3 Estabilidade do biossurfactante formulado

A estabilidade a longo prazo é um dos requisitos para desenvolver um novo produto biotecnológico e colocá-lo no mercado. As propriedades de um produto comercial estável não devem mudar drasticamente com as flutuações de pH, temperatura e salinidade encontradas no ambiente industrial [25].

Para garantir um bioproduto comercial, o biossurfactante bruto produzido por *C. sphaerica* foi submetido ao método de conservação e suas propriedades tensoativas

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

foram analisadas por um período de 120 dias. O comportamento do biossurfactante após sua formulação foi avaliado sob condições ambientais específicas de pH, temperatura e presença de sal. As propriedades tensoativas (isto é, tensão superficial, atividade de emulsificação e capacidade de dispersão) foram avaliadas.

A Figura 8 mostra os resultados da tensão superficial do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* submetido aos processos de conservação com a adição de sorbato de potássio a 0,2%, vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada, após armazenamento por diferentes períodos de tempo, seguido de exposições as variações de pH (5,0, 7,0 e 9,0), temperaturas (40 e 50 °C) e concentrações de NaCl (1,0; 3,0 e 5,0%).

O biossurfactante demonstrou estabilidade na tensão superficial quando exposto aos diferentes valores de pH, temperaturas e concentrações dos valores de NaCl testados durante todo o tempo de armazenamento, quando comparado ao controle, mantendo a tensão superficial em torno de 27 mN / m quanto testado pelo processo de adição de 0,2% de sorbato de potássio.

Os resultados obtidos nos testes com vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada destacam o comportamento praticamente estável do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*, apresentando valores de tensão superficial em torno de 28,5 mN/m e 29,00 mN/m respectivamente, quando submetido à diferentes variações de pH, temperatura e NaCl.

Estudos realizados com biossurfactante produzido pela *C. bombicola* mostrou resultados semelhantes em relação à estabilidade, onde o biotensioactivo demonstrou pouca variação na tensão superficial, quando submetidos aos três métodos de conservação ao longo dos 120 dias de análise, especialmente na presença de sorbato

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

de potássio e sorbato de mais vapor de fluente [14]. Santos et al. [26], também demonstraram resultados satisfatórios referentes à formulação do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* exibindo pequenas variações ao longo dos 120 dias.

No entanto os resultados referentes à formulação do biossurfactante neste estudo, demonstraram que o sorbato de potássio, um conservante amplamente utilizado com aplicação na inibição do crescimento de micro-organismos, não causou alterações significativas na capacidade tensoativa da biomolécula, indicando a possibilidade de usar o biossurfactante sob condições ambientais específicas de pH, temperatura e salinidade apresentando-se economicamente viável ao processo de produção.

Inserir Figura 8

3.4 Atividade de emulsificação com óleo de motor

A Figura 9 mostra os resultados da atividade emulsificante do biossurfactante submetido aos processos de conservação adição de 0,2% de sorbato de potássio, vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada após armazenamento por diferentes períodos, seguido de exposição a variações de pH (5,0, 7,0 e 9,0), temperatura (40 e 50 ° C) e NaCl (1,0, 3,0 e 5,0%).

O biossurfactante atingiu aproximadamente 100% de emulsificação do óleo de motor com o método de formulação com 0,2% de sorbato de potássio e 90% os métodos de conservação vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada ao longo dos 120 dias de armazenamento.

O biossurfactante submetido ao método de conservação utilizando o sorbato de potássio foi observado que houve redução na atividade de emulsificação quando

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

submetido a concentração de 1% de NaCl durante os primeiros 15 dias. Com relação à variação do pH (7,0 e 9,0), no entanto, alcançou 100% de emulsificação durante 120 dias.

A atividade emulsificante do biossurfactante submetido aos processos de conservação por vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada demonstraram que o líquido metabólico contendo o biossurfactante para ambos os métodos apresentaram emulsificação em torno de 90% com o óleo de motor, quando submetidos a variações de pH, temperatura e NaCl.

Os biossurfactantes estão surgindo como uma alternativa promissora aos dispersantes químicos, acelerando a dispersão e degradação natural dos hidrocarbonetos liberados nos ambientes através da solubilização de compostos oleosos [14].

Inserir Figura 9

3.5 Aplicação de biossurfactante como dispersante

A Figura 10 apresenta a capacidade de dispersão do óleo de motor do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* submetido aos processos de conservação com a adição de sorbato de potássio a 0,2%, vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada, após armazenamento por diferentes períodos de tempo, seguido de exposição a variações de pH (5,0 7,0 e 9,0), temperatura (40 e 50 ° C) e concentrações de NaCl (1,0; 3,0 e 5,0%) na proporção biossurfactante-óleo de 1: 2.

O biossurfactante formulado demonstrou a melhor capacidade de dispersão aos 120 dias de armazenamento. O melhor desempenho foi obtido com o sorbato a 0,2%, chegando a 90% de dispersão. Contudo para os métodos de conservação com vapor

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

fluente adicionado 0,2% de sorbato e tindalização fracionada, foram observados que os resultados apresentaram dispersão em torno de 20% e 5% respectivamente de acordo com as devidas variações de pH, temperatura e concentrações de NaCl, na proporção biossurfactante-óleo de 1:2 (v/v).

Freitas et al. [14] submeteram um biossurfactante de *C. bombicola* a procedimentos de conservação e verificaram que a adição de sorbato de potássio e tratamento térmico foram os mais promissores. Soares da Silva et al. [25] estudaram um biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas cepacia* e descobriram que o agente biotensioativo era estável sob todas as condições investigadas, especialmente após ser submetido à tindalização fracionada e à adição de sorbato de potássio.

A capacidade de um biossurfactante para dispersar óleos é de extrema importância no tratamento de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, uma vez que essa propriedade acelera a mobilização do óleo pela quebra das gotículas e conseqüentemente aumenta a área de superfície do óleo em contato com o micro-organismo degradante.

Portanto a utilização de agentes biotensioativos com boa capacidade de lavagem e dispersão torna-se bastante atrativo quando um ecossistema é ameaçado por poluentes hidrofóbicos pois constituem uma vantagem econômica considerável, por não exigirem procedimentos dispendiosos de isolamento e purificação.

Inserir Figura 10

3.6 MTT test - Avaliação citotóxica do biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*

Os resultados obtidos usando o método colorimétrico do MTT, pode-se observar que o biossurfactante produzido por *C. sphaerica* apresentou percentuais de inibição em torno de 5%, não apresentando citotoxicidade para a linhagem celular avaliada, confirmando sua biocompatibilidade para diversos segmentos industriais (Tabela 6).

De acordo com Gomes Silva et al. [27], percentuais de inibição de 1 a 20 % são considerados sem atividade inibitória, sendo assim, os biossurfactantes não apresentam potencial citotóxico frente a linhagem celular L929. Estudos corroboram com os resultados encontrados. Testes realizados por Silva et al. [28], observaram que o biossurfactante produzido por *Aspergillus niger* não apresentou atividade citotóxica (inibição de crescimento de 18,75%) frente a linhagem celular de macrófagos. De acordo com os resultados obtidos por Ribeiro et al. [29], também observaram que as soluções dos biossurfactantes obtidos a partir de *S. cerevisiae* e *C. utilis* apresentaram percentuais de inibição inferiores a 20% frente as linhagens não cancerígenas de fibroblastos de camundongos (L929) e macrófagos de camundongos (RAW 264.7).

Resultados também foram encontrados por Marques et al. [30], os quais avaliaram a citotoxicidade utilizando-se este mesmo método frente a fibroblastos (3T3) de camundongos de um surfactante produzido por *Rhodococcus* sp. 51T7, observando-se menor citotoxicidade com relação aos surfactantes sintéticos.

Apenas Fernandes et al. [31], observaram que o raminolipideo produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, apresentou atividade citotóxica para as concentrações maiores ou igual 1g/L em ensaio com a linhagem celular HepG2 (células de hepatoma humano).

Inserir Tabela 6

3.7 Remoção de óleo de motor de colunas empacotadas através de ensaio estático

Estudos em escalas laboratoriais utilizando colunas de solos são adequados para avaliar a recuperação microbiana de petróleo (MEOR) por diversas razões: é um modelo econômico; uma bateria de colunas pode ser configurada simultaneamente; e eles podem simular as operações de recuperação de petróleo comumente realizadas em reservatórios [32].

A Tabela 7 mostra os resultados dos experimentos de remoção do óleo motor adsorvido em areia contidos em colunas empacotadas.

Os percolantes utilizados apresentaram resultados satisfatórios na remoção do composto oleoso. A água foi utilizada como controle, visto que apresenta capacidade de atuar na remoção física de compostos oleosos.

O biossurfactante bruto e o isolado produzido pela *C. sphaerica* foram capazes de remover o óleo de motor adsorvido na areia no teste estático das colunas. A remoção do óleo pelo biossurfactante isolado variou dependendo da concentração empregada. Para a CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2x CMC, obtiveram 67,00%, 51,00%, 69,00% respectivamente.

O biossurfactante bruto (líquido metabólico livres de células) produzido a partir de *C. sphaerica* UCP 0995 também foi testado para avaliar a remoção do óleo, onde pode-se observar uma remoção de 70,00%. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência do biossurfactante bruto na remoção do óleo de motor, resultado importante considerando que os processos de purificação chegam a representar 60% do custo total do processo [33].

Estudos realizados por Urum et al. [34] demonstraram que a mobilização ou solubilização de compostos hidrofóbicos por surfactantes em colunas empacotadas com areia pode ou não variar dependendo da concentração empregada.

Estudos realizados por Rufino et al. [19] utilizando biossurfactante isolado de *C. lipolytica*, em colunas empacotadas, demonstraram a influência da concentração de biossurfactante, uma vez que as taxas de remoção dos líquidos percolados apresentaram-se em ordem crescente: água destilada (7%), Tween 80 (12%), líquido metabólico livre de células (26%), biossurfactante na CMC (33%) e biossurfactante em três vezes a CMC (37%) respectivamente.

Das et al. [35] utilizando um biossurfactante isolado de *C. tropicalis* foi capaz de recuperar 39,80%.

A literatura também descreve outros resultados de estudos envolvendo a aplicação de biossurfactantes para a remoção de hidrocarbonetos em colunas empacotadas. El-Sheshtawy et al. [24] investigou o potencial do biossurfactante isolado de *C. albicans* na recuperação de óleo, utilizando colunas de areia. A aplicação desse biossurfactantes para a remoção de hidrocarbonetos foi de (8,6%).

Muitos pesquisadores relataram recuperação de óleo aumentada de 20% a 60% a partir de diferentes espécies microbianas produtoras de biossurfactante, como *Bacillus firmus* BG4, *B. halodurans* BG5 [36], *Bacillus subtilis* [37], *P. Aeruginosa* [38].

Devido à sua natureza anfipática, o biossurfactante forma agregados micelares com o contaminante, promovendo uma maior remoção. Portanto este resultado indicou que o biossurfactante produzido a partir de *C. sphaerica* UCP0995 possui capacidade de reduzir a tensão interfacial do óleo facilitando sua mobilização, exibindo excelente capacidade de remoção.

Para aplicações ambientais, a utilização do biossurfactante na forma bruta é uma alternativa viável do ponto de vista econômico visto que são necessários grandes volumes para esta aplicação.

Batista et al. [39], verificou que o biossurfactante bruto produzido a partir da *Candida tropicalis* cultivado em óleo de fritura removeu aproximadamente 78 a 97% do petróleo e óleo de motor adsorvido em amostras de areia, enquanto que o biossurfactante bruto produzido a partir da *Candida guilliermondii* cultivada em resíduos industriais, removeu aproximadamente 90% do óleo de motor adsorvido em amostras de areia [40].

Inserir Tabela 7

3.8 Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio cinético

A Figura 11 apresenta o resultado da remoção de óleo de motor adsorvido em areia pelo biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* em ensaio cinético. Foi observado que a adição do biossurfactante aumentou o percentual de remoção do óleo motor, quando comparados com a condição sem adição de biossurfactante.

Os maiores percentuais de remoção (90%) foram obtidos para a condição contendo concentração de biossurfactante de 2XCMC no período de 90 dias. Pode-se observar que a concentração do biossurfactante isolado influenciou o percentual de remoção, demonstrando o aumento da capacidade de solubilização do óleo na fase aquosa pelo biossurfactante de *Candida sphaerica* acima da CMC.

Conforme Silva et al. [7], dois mecanismos estão associados à remoção de óleo no solo: mobilização e solubilização. A mobilização ocorre em concentrações abaixo da

CMC e os fenômenos associados a este mecanismo incluem a redução da tensão superficial e interfacial no qual os monômeros surfactantes aumentam o ângulo de interação entre o solo e o contaminante hidrofóbico, possibilitando a separação do contaminante das partículas do solo e consequente deslocamento do óleo. O segundo mecanismo é conhecido como solubilização e ocorre acima da CMC, na qual o contaminante é particionado no centro das micelas de surfactante [33].

A adição de biossurfactante na técnica de bioestimulação têm efeitos positivos em relação à dessorção de compostos orgânicos hidrofóbicos sorvidos no solo e ao aumento da solubilidade dos mesmos, principalmente, quando estes biossurfactantes são utilizados em concentrações acima da CMC [42].

Lai et al. [43], testaram a eficácia da remoção de alguns biossurfactantes bacterianos durante 7 dias, mostrando que um dia (24 horas) foi suficiente para a solubilização dos hidrocarbonetos. Os achados obtidos com um biossurfactante isolado de *Candida sphaerica* demonstraram que uma solução de 0,1% foi capaz de remover 65% do óleo de motor adsorvido ao solo. A solução de surfactante na CMC (0,08%) removeu 55% do óleo e a solução a 0,05% removeu aproximadamente 30% [13].

Estudos Realizados por Chaprão et al. [33], demonstraram que os biossurfactantes de *C. sphaerica* e *Bacillus sp.* foram capazes de remover 70-80% respectivamente de óleo do motor. Enquanto o biossurfactante isolado de *C. glabrata* removeu 84% do óleo de motor [44]. Santos et al. [22], demonstraram a considerável capacidade do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* na remoção de óleo de motor e petróleo adsorvidos à areia.

Soares da Silva et al. [45] utilizando um biossurfactante produzido por *P. cepacia* encontraram taxas de remoção superiores a 70%, com remoção máxima de 96% obtida

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

com o biossurfactante isolado a 2xCMC. Neste estudo, pode-se observar também que a concentração do biossurfactante isolado influenciou o percentual de remoção, demonstrando o aumento da capacidade de solubilização do óleo na fase aquosa pelo biossurfactante de *Candida sphaerica* acima da CMC.

Portanto a técnica de biorremediação em solos contaminados com hidrocarbonetos demonstra um papel positivo dos biossurfactantes na biodegradação de poluentes [41].

Inserir Figura 11

3.9 Aplicação do biossurfactante na remediação do contaminante em água do mar

A capacidade dispersante de um biossurfactante é de extrema importância quando se pretende utilizá-lo no tratamento de ambientes marinhos contaminados com hidrocarbonetos, pois esta característica será responsável pela facilitação de acesso dos micro-organismos autóctones ao poluente, proporcionando a ocorrência do processo de biorremediação [12].

A Figura 12 apresenta os resultados dos experimentos de biorremediação de óleo em água do mar no período de 30 dias. Foi possível observar que o tempo (dias) e o aumento da concentração do biossurfactante foram favoráveis para o aumento do percentual de remoção do óleo. O melhor resultado foi no período de 30 dias de experimento, obtendo 85% de remoção do óleo quando foi adicionado o biossurfactante em 2xCMC, porém pode-se observar que nas Condições 1 e 2 de menores concentrações de biossurfactante também obtiveram bons resultados, onde o percentual de remoção foi aumentando ao longo do tempo.

Santos et al. [22], relataram o efeito promissor do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* no crescimento de micro-organismos autóctones na água do mar e sua estimulação na remoção de óleo de motor nas concentrações de $\frac{1}{2}$ CMC, CMC e duas vezes a CMC durante 30 dias. Silva et al. [46], encontraram o mesmo efeito no crescimento de bactérias e fungos marinhos autóctones produzido pelo biossurfactante isolado de *Bacillus cereus* e *C. sphaerica*. Deste modo, o biossurfactante isolado de *C. sphaerica* promoveu o crescimento acelerado desses microrganismos ao longo dos 30 dias de cultivo e serviu como agente solubilizante do óleo do motor, facilitando sua remoção.

Inserir Figura 12

4. Conclusões

Este trabalho descreveu a produção de um biossurfactante e demonstrou a sua viabilidade de aplicação na descontaminação ambiental provocada por petróleo e derivados. A otimização das condições de cultivo de *C. sphaerica* em biorreator auxiliada por um planejamento estatístico experimental aumentou consideravelmente o rendimento do biossurfactante e foi efetiva para a formulação de um produto comercial eficiente, que poderá ser utilizado por indústrias de recuperação ambiental e por empresas de biorremediação. A caracterização estrutural do biossurfactante revelou sua natureza glicolipídica. Esta biomolécula também não apresentou um efeito citotóxico frente a linhagem celular L929, demonstrando ser ambientalmente inócua. Deste modo, o biossurfactante de *C. sphaerica* mostrou-se bastante eficaz na remoção de óleo adsorvido em diferentes matrizes, como solo e água do mar, apresentando potencial de aplicação na biorremediação e garantindo, de forma

expressiva, com uma máxima eficiência de recuperação do meio ambiente impactado por resíduos oleosos.

5. Referências

- [1] A.P. Karlapudi, T.C. Venkateswarulu, J. Tammineedi, L. Kanumuri, B.K. Ravuru, V. ramu Dirisala, V.P. Kodali, Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review, *Petroleum*. 4 (2018) 241–249. doi:10.1016/j.petlm.2018.03.007.
- [2] T.A. Ostendorf, I.A. Silva, A. Converti, L.A. Sarubbo, Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater, *J. Biotechnol.* 295 (2019) 71–79. doi:10.1016/j.jbiotec.2019.01.025.
- [3] D.S. Cardona, K.B. Debs, S.G. Lemos, G. Vitale, N.N. Nassar, E.N.V.M. Carrilho, D. Semensatto, G. Labuto, A comparison study of cleanup techniques for oil spill treatment using magnetic nanomaterials, *J. Environ. Manage.* 242 (2019) 362–371. doi:10.1016/j.jenvman.2019.04.106.
- [4] D.G. Almeida, R. de C.F.S. da Silva, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–13. doi:10.3389/fmicb.2017.00157.
- [5] O.B. Ojuederie, O.O. Babalola, Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14 (2017). doi:10.3390/ijerph14121504.
- [6] F. Dell’Anno, C. Sansone, A. Ianora, A. Dell’Anno, Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives, *Mar. Environ. Res.* 137 (2018) 196–205. doi:10.1016/j.marenvres.2018.03.010.
- [7] E.J. Silva, P.F. Correa, D.G. Almeida, J.M. Luna, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 172 (2018) 127–135. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.08.034.
- [8] A.K. Nogueira Felix, J.J.L. Martins, J.G. Lima Almeida, M.E.A. Giro, K.F. Cavalcante, V.M. Maciel Melo, O.D. Loiola Pessoa, M.V. Ponte Rocha, L. Rocha Barros Gonçalves, R. Saraiva de Santiago Aguiar, Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 175 (2019) 256–263.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

doi:10.1016/j.colsurfb.2018.11.062.

- [9] J.M. Campos, T.L. Montenegro Stamford, L.A. Sarubbo, J.M. de Luna, R.D. Rufino, I.M. Banat, Microbial biosurfactants as additives for food industries, *Biotechnol. Prog.* 29 (2013) 1097–1108. doi:10.1002/btpr.1796.
- [10] D.K.F. Santos, Y.B. Brandão, R.D. Rufino, J.M. Luna, A.A. Salgueiro, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3 (2014) 48–57. doi:10.1016/j.bcab.2014.02.004.
- [11] R. Marchant, I.M. Banat, Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 558–565. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.003.
- [12] J.M. Luna, R.D. Rufino, L.A. Sarubbo, G.M. Campos-Takaki, Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 102 (2013) 202–209. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.008.
- [13] H.B.S. Sobrinho, R.D. Rufino, J.M. Luna, A.A. Salgueiro, G.M. Campos-Takaki, L.F.C. Leite, L.A. Sarubbo, Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995, *Process Biochem.* 43 (2008) 912–917. doi:10.1016/j.procbio.2008.04.013.
- [14] B.G. Freitas, J.G.M. Brito, P.P.F. Brasileiro, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–9. doi:10.3389/fmicb.2016.01646.
- [15] D.G. Cooper, B.G. Goldenberg, Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 224 LP – 229. <http://aem.asm.org/content/53/2/224.abstract>.
- [16] N.M.P. Rocha e Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3 (2014) 132–139. doi:10.1016/j.bcab.2013.09.005.
- [17] C. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, P.A., Hursey, M.L., R.H. & B. M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, M.R., M.C. Alley, D.A. Scudiere, A. Monks, M.L. Hursey, M.J. Czerwinski, D.L. Fine, B.J. Abbott, J.G. Mayo, R.H. Shoemaker, M.R. Boyd, Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay, *Cancer Res.* 48 (1988) 589–601.
- [18] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

- [19] R.D. Rufino, J.M. Luna, P.H.C. Marinho, C.B.B. Farias, S.R.M. Ferreira, L.A. Sarubbo, Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*, J. Pet. Sci. Eng. 109 (2013) 117–122.
- [20] B. Dahrazma, C.N. Mulligan, Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration, Chemosphere. 69 (2007) 705–711. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.05.037.
- [21] S. Joshi, S. Yadav, A.J. Desai, Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2, Biochem. Eng. J. 41 (2008) 122–127. doi:10.1016/j.bej.2008.04.005.
- [22] D.K.F. Santos, H.M. Meira, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent, Process Biochem. 54 (2017) 20–27. doi:10.1016/j.procbio.2016.12.020.
- [23] M. Garg, Priyanka, M. Chatterjee, Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*, Biotechnol. Reports. 18 (2018) e00251. doi:10.1016/j.btre.2018.e00251.
- [24] H.S. El-Sheshtawy, I. Aiad, M.E. Osman, A.A. Abo-ELnasr, A.S. Kobisy, Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery, Egypt. J. Pet. 25 (2016) 293–298. doi:10.1016/j.ejpe.2015.07.018.
- [25] R.D.C.F. Soares da Silva, D.G. de Almeida, P.P.F. Brasileiro, R.D. Rufino, J.M. de Luna, L.A. Sarubbo, Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant, Biodegradation. (2018) 1–11. doi:10.1007/s10532-018-9830-4.
- [26] D.K.F. Santos, A.H.M. Resende, D.G. de Almeida, R. de C.F.S. da Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, I.M. Banat, L.A. Sarubbo, *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: Potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product, Front. Microbiol. 8 (2017) 1–11. doi:10.3389/fmicb.2017.00767.
- [27] de A.G.S. Jéssica, C. da S. Gibbely, G. de F.S. Marília, F. da S. Vanessa, dos S.A. Jaciana, G. da S. Teresinha, P.L. Sônia, Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae), African J. Pharm. Pharmacol. 11 (2017) 321–326. doi:10.5897/ajpp2017.4798.
- [28] G.K.B. da Silva, Isolamento, identificação, caracterização e potencial biotecnológico na produção de biossurfactante por *Aspergillus Niger* UCP/WFCC 1355 isolado de solo da caatinga-PE, Brasil, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- [29] B.G. Ribeiro, Biossurfactante produzido por leveduras para aplicação na formulação de biscoito tipo cookie, Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

- [30] A.M. Marqués, A. Pinazo, M. Farfan, F.J. Aranda, J.A. Teruel, A. Ortiz, A. Manresa, M.J. Espuny, The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7, *Chem. Phys. Lipids.* 158 (2009) 110–117. doi:10.1016/j.chemphyslip.2009.01.001.
- [31] T.C.C. Fernandes, Investigação dos efeitos tóxicos do biossurfactante ramnolip dio e suas implicações quando usado na biorremediação de águas contaminadas por petróleo, Universidade Estadual Paulista, 2011.
- [32] L.A. Sarubbo, R.B. Rocha, J.M. Luna, R.D. Rufino, V.A. Santos, I.M. Banat, Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants, *Chem. Ecol.* 31 (2015) 707–723. doi:10.1080/02757540.2015.1095293.
- [33] M.J. Chaprão, I.N.S. Ferreira, P.F. Correa, R.D. Rufino, J.M. Luna, E.J. Silva, L.A. Sarubbo, Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand, *Electron. J. Biotechnol.* 18 (2015) 471–479. doi:10.1016/j.ejbt.2015.09.005.
- [34] K. Urum, T. Pekdemir, M. Gopur, Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions, *Process Saf. Environ. Prot. Trans. Inst. Chem. Eng. Part B.* 81 (2003) 203–209. doi:10.1205/095758203765639906.
- [35] Ashish, M. Debnath (Das), Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water, *J. Pet. Sci. Eng.* 170 (2018) 40–48. doi:10.1016/j.petrol.2018.06.034.
- [36] B. Shibulal, S. Al-Bahry, Y. Al-Wahaibi, A. Elshafie, A. Al-Bemani, S. Joshi, Microbial-Enhanced Heavy Oil Recovery under Laboratory Conditions by *Bacillus firmus* BG4 and *Bacillus halodurans* BG5 Isolated from Heavy Oil Fields, *Colloids and Interfaces.* 2 (2018) 1. doi:10.3390/colloids2010001.
- [37] E.J. Gudi a, J.F.B. Pereira, R. Costa, J.A.P. Coutinho, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns, *J. Hazard. Mater.* 261 (2013) 106–113. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.06.071.
- [38] S. S Cameotra, R. S Makkar, Synthesis of biosurfactants in extreme conditions., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 (1998) 520–529. <http://www.mendeley.com/research/synthesis-biosurfactants-extreme-conditions/>.
- [39] R.M. Batista, R.D. Rufino, J.M. Luna, J.E.G. de Souza, L.A. Sarubbo, Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

- Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil , Water Environ. Res. 82 (2010) 418–425. doi:10.2175/106143009x12487095237279.
- [40] C.D. Coimbra, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Studies of the cell surface properties of *candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications, Curr. Microbiol. 58 (2009) 245–251. doi:10.1007/s00284-008-9315-5.
- [41] X. Mao, R. Jiang, W. Xiao, J. Yu, Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review, J. Hazard. Mater. 285 (2015) 419–435. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.12.009.
- [42] M. Nitschke, G.M. Pastore, Biossurfactantes: Propriedades e aplicações, Quim. Nova. 25 (2002) 772–776. doi:10.1590/S0100-40422002000500013.
- [43] C.C. Lai, Y.C. Huang, Y.H. Wei, J.S. Chang, Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil, J. Hazard. Mater. 167 (2009) 609–614. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.017.
- [44] J.M. de Luna, L. Sarubbo, G.M. de Campos-Takaki, A new Biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in Oil Recovery, Brazilian Arch. Biol. Technol. 52 (2009) 785–793. doi:10.1590/S1516-89132009000400001.
- [45] R. de C.F. Soares da Silva, D.G. Almeida, H.M. Meira, E.J. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry, Biocatal. Agric. Biotechnol. 12 (2017) 206–215.
- [46] SILVA, I. Application of Biosurfactants Produced by *Bacillus cereus* and *Candida sphaerica* in the Bioremediation of Petroleum Derivative in Soil and Water, Chemical Engineering Transactions, 64 (2018) 553-558. doi: 10.3303/CET1864093.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 1: Intervalos experimentais e níveis de variáveis independentes para o delineamento composto central rotacional usado na otimização da produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* (UCP 0995)

Nível	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Tempo de cultivo (horas)
-1,68	150	0	96
-1	175	0,5	108
0	200	1,0	120
+1	250	1,5	132
+1,68	275	2,0	144

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 2: Misturas formuladas para os experimentos de remoção de óleo de motor em areia.

Misturas	Composição
Controle	Areia contaminada + melação de cana
Condição 1	Areia contaminada + melação de cana + <i>C. sphaerica</i>
Condição 2	Areia contaminada + melação de cana + biossurfactante (CMC) de <i>C. sphaerica</i> + <i>C. sphaerica</i>
Condição 3	Areia contaminada + melação de cana + biossurfactante (2XCMC) de <i>C. sphaerica</i> + <i>C. sphaerica</i>

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 3: Misturas formuladas para os experimentos de biodegradação de óleo de motor em água do mar

Misturas	Composição
Controle	Água do mar + óleo de motor
Condição 1	Água do mar + óleo de motor + <i>C. sphaerica</i>
Condição 2	Água do mar + óleo de motor + <i>C. sphaerica</i> + biossurfactante na (CMC)
Condição 3	Água do mar + óleo de motor + <i>C. sphaerica</i> + biossurfactante (2xCMC)

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 4: Matriz de projeto experimental para otimização de biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* (UCP 0995) de acordo com o DCCR

Níveis	Agitação (rpm), X_1	Aeração (vvm), X_2	Tempo (horas), X_3	Tensão superficial (mNm^{-1}), Y_1	Produção Biossurfactante (gL^{-1})
1	-1,0	-1,0	-1,0	28,21	4,5
2	+1,0	-1,0	-1,0	27,21	5,0
3	-1,0	+1,0	-1,0	27,80	2,0
4	+1,0	+1,0	-1,0	28,32	3,2
5	-1,0	-1,0	+1,0	26,23	4,0
6	+1,0	-1,0	+1,0	26,54	3,27
7	-1,0	+1,0	+1,0	25,22	8,5
8	+1,0	+1,0	+1,0	27,13	5,03
9	-1,68	0,0	0,0	30,87	2,2
10	+1,68	0,0	0,0	28,00	3,3
11	0,0	-1,68	0,0	25,68	6,87
12	0,0	+1,68	0,0	26,52	3,15
13	0,0	0,0	-1,68	26,12	3,12
14	0,0	0,0	+1,68	27,15	4,6
15	0,0	0,0	0,0	32,18	5,2
16	0,0	0,0	0,0	32,15	5,5
17	0,0	0,0	0,0	32,17	5,3
18	0,0	0,0	0,0	32,00	5,33
19	0,0	0,0	0,0	32,32	5,34
20	0,0	0,0	0,0	32,25	5,5

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 5: Análise de variância do modelo quadrático em relação à tensão superficial obtida com o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* (UCP 0995) ^a

Fator	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	Valor-F	Valor- <i>p</i> ^b
X_1 (L) ^c	9,2620	1	9,26196	800,054	0,000001
X_1 (Q) ^d	13,6579	1	13,65790	1179,779	0,000000
X_2 (L)	0,2098	1	0,20980	18,1229	0,008037
X_2 (Q)	66,7781	1	66,77808	5768,33	0,000000
X_3 (L)	0,8828	1	0,88281	76,2582	0,000326
X_3 (Q)	55,5580	1	55,55804	4799,14	0,000000
X_1 (L) x X_2 (L)	0,1568	1	0,15680	13,5445	0,014289
X_1 (L) x X_3 (L)	0,9112	1	0,91125	78,7143	0,000303
X_2 (L) x X_3 (L)	1,2168	1	1,21680	105,107	0,000152
Falta de ajuste	0,1891	5	0,03783	3,26767	0,109844
Erro puro	0,0579	5	0,01158	–	–
Soma dos quadrados total	129,5375	19	–	–	–

^a $R^2 = 0,99809$; ajustado $R^2 = 0,99638$.

^b $p \leq 0,05$ – Significância ao nível de 5%.

^c (L) = Efeito linear.

^d (Q) = Efeito quadrático.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 6: Percentual de viabilidade celular de fibroblastos de camundongos (L929).

Concentração do biossurfactante (mg/mL)	Porcentagem de viabilidade celular
Controle	99,99 ± 1,21
0,094	97,71 ± 2,90
0,18	95,16 ± 4,84
0,37	96,75 ± 3,25
0,75	97,55 ± 2,45
1,5	97,75 ± 2,50
3,0	94,8 ± 5,20
6,0	96,78± 3,22
12,0	97,01±2.25

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

Tabela 7: Remoção do contaminante hidrofóbico adsorvido em areia, através do ensaio estático com colunas de vidro.

Agente de Remoção	Remoção de óleo (%)
Controle (água destilada)	10,00 %
Biossurfactante bruto	70,00%
Solução isolada de biossurfactante a 0,1%	51,00%
Solução isolada de biossurfactante a 0,2%	67,00%
Solução isolada de biossurfactante a 0,4%	69,00%

Legenda das Figuras

Figura 1. Valores previstos versus valores observados para o modelo da tensão superficial de resposta.

Figura 2. Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para (1) agitação, (2) aeração e (3) tempo, utilizando tensão superficial como variável resposta.

Figura 3. Superfície de resposta da tensão superficial mostrando a interação entre a aeração e a agitação (A), tempo e agitação (B), tempo e aeração (C).

Figura 4. Espectro FT-IR da transmissão do biossurfactante *C. sphaerica* obtido após purificação.

Figura 5. Espectro de ^1H RMN do biossurfactante *C. sphaerica*.

Figura 6. Espectro de ^{13}C RMN para o biossurfactante gravado em CDCl_3 .

Figura 7. Cromatografia Gasosa.

Figura 8. Tensão superficial do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* durante 120 dias de armazenamento submetido aos métodos de conservação (A) sorbato de potássio a 0,2%, (B) vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e (C) tindalização fracionada.

Figura 9. Capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido por *C. sphaerica* durante 120 dias de armazenamento submetido aos métodos de conservação (A)

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

sorbato de potássio a 0,2%, (B) vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e (C) tindalização fracionada.

Figura 10. Capacidade de dispersão do óleo motor por biossurfactante durante 120 dias de armazenamento, submetido ao método de conservação (a) sorbato de potássio a 0,2%, (b) vapor fluente adicionado 0,2% de sorbato e (c) tindalização fracionada na proporção biossurfactante-óleo de 1: 2(v/v).

Figura 11. Remoção de óleo adsorvido em areia pelo processo de biorremediação utilizando o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*.

Figura 12. Remoção de óleo contaminante em água do mar pelo processo de biorremediação utilizando o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica*.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

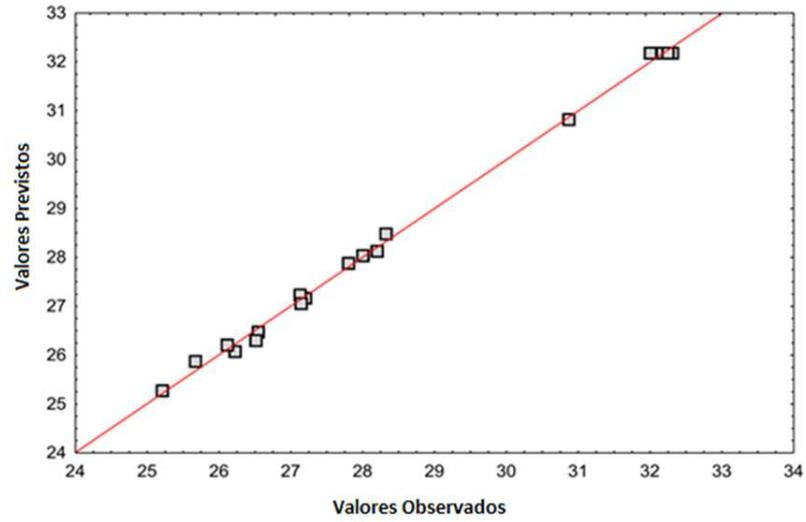


Fig 1

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

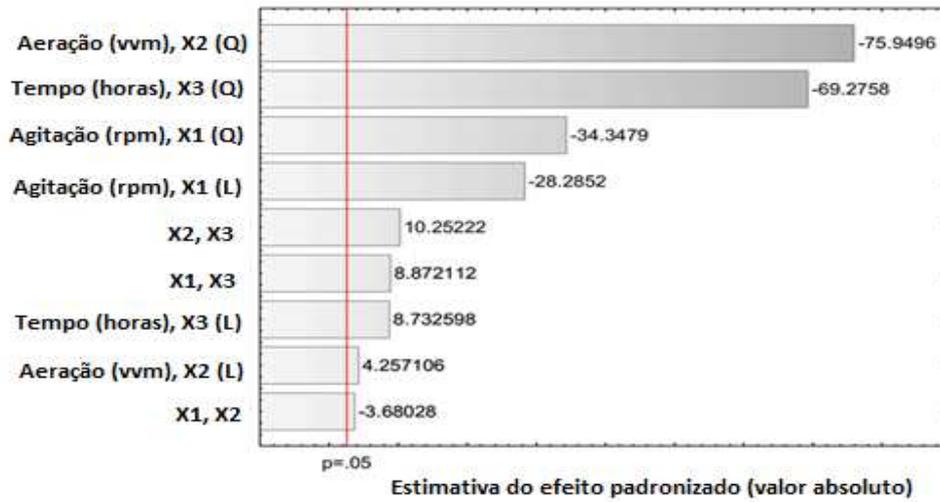


Fig 2

Santos, E. M. S. Produção de biosurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

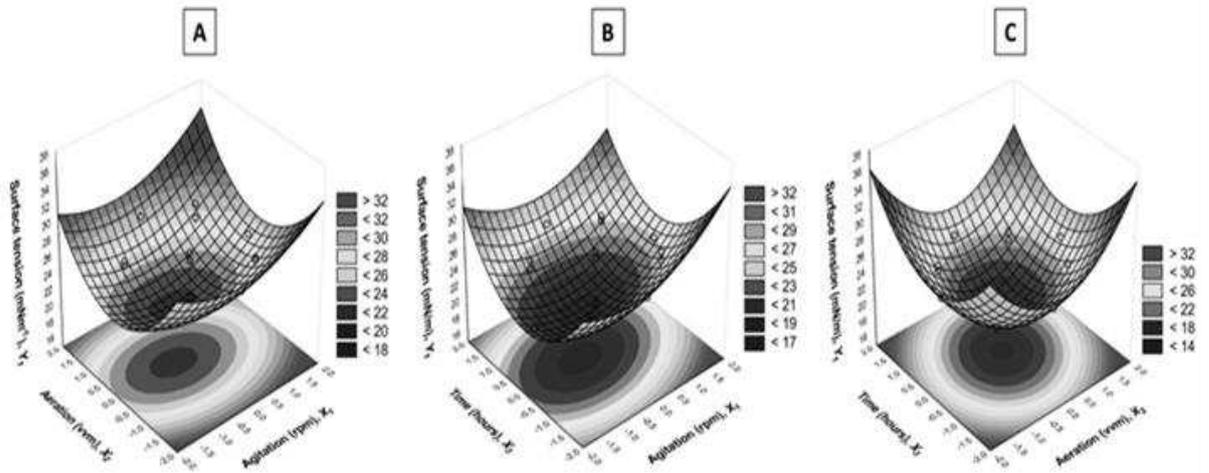


Fig 3

Santos, E. M. S. Produção de biosurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

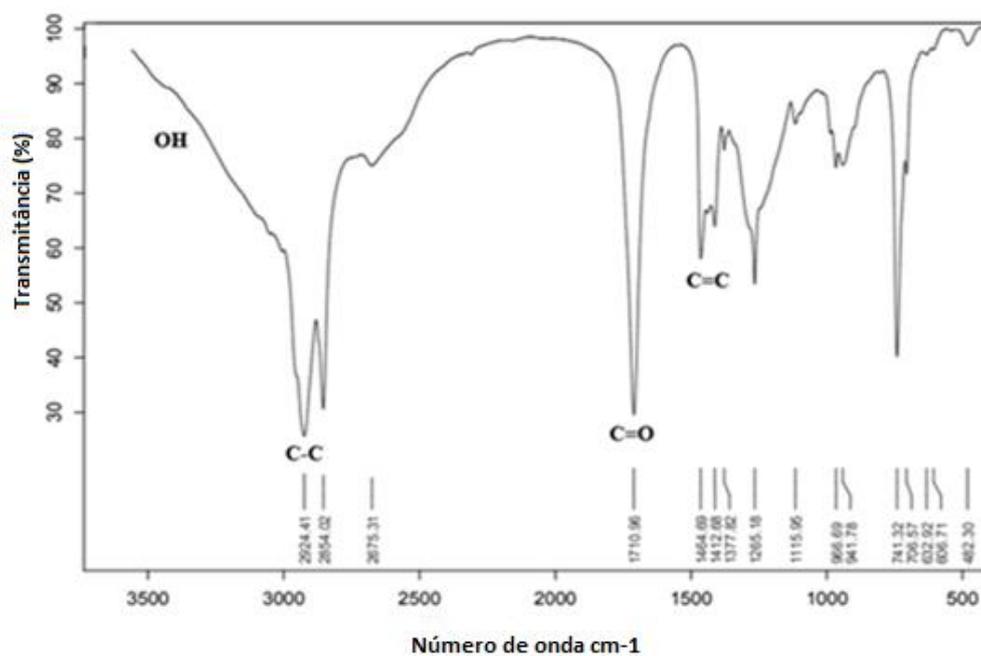


Fig. 4

Santos, E. M. S. Produção de biosurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

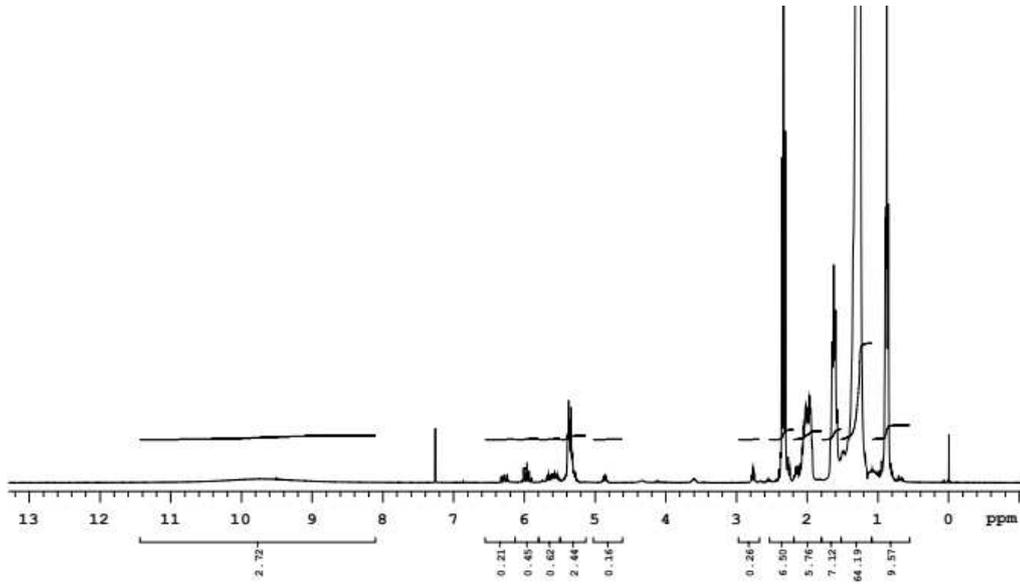


Fig.5

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

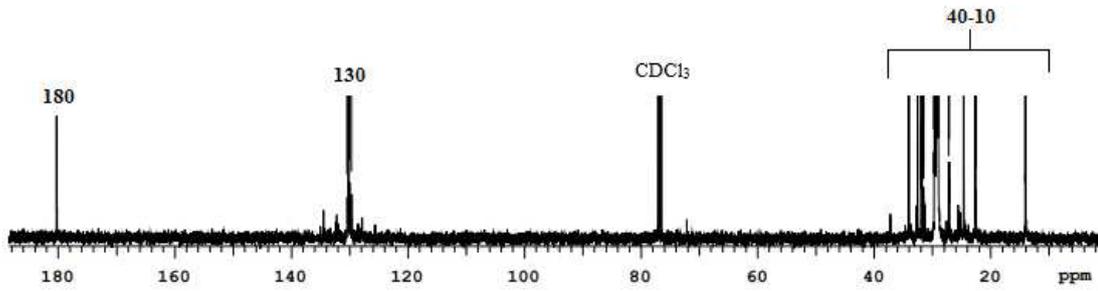


Fig.6

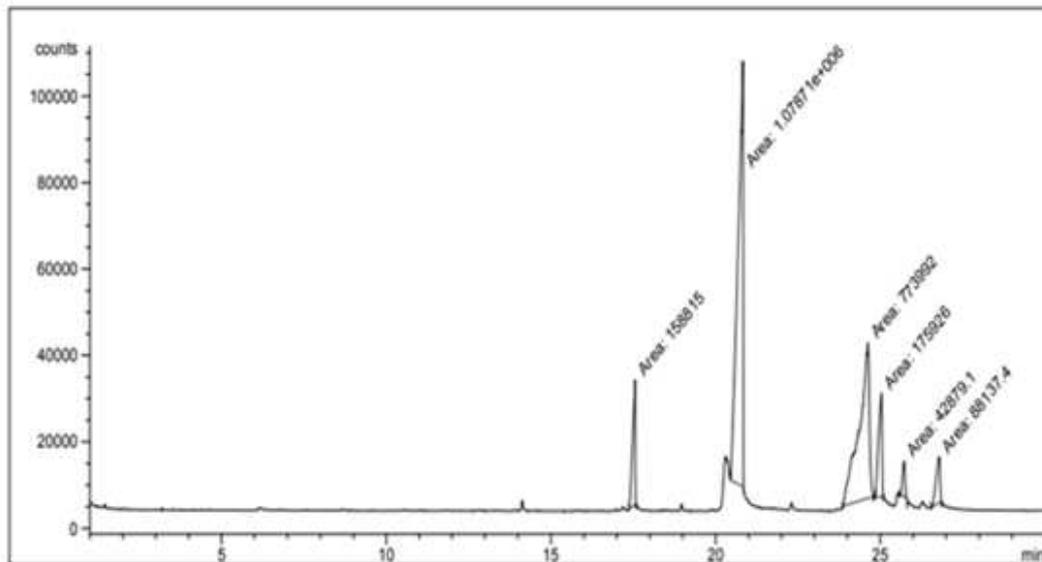


Fig.7

Santos, E. M. S. Produção de biosurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

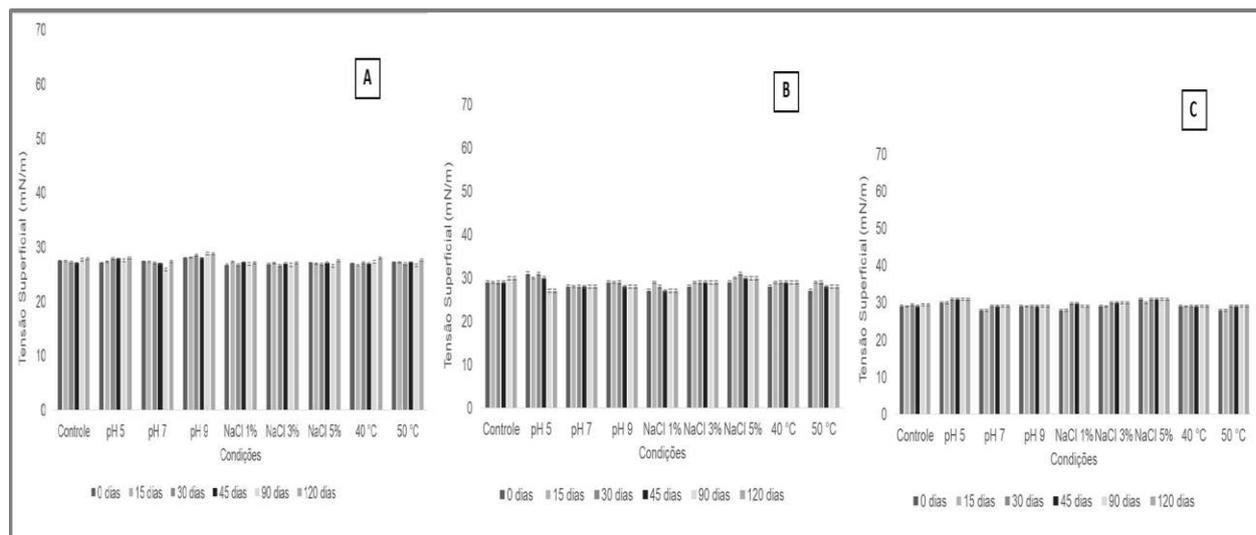


Fig.8

Santos, E. M. S. Produção de biosurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

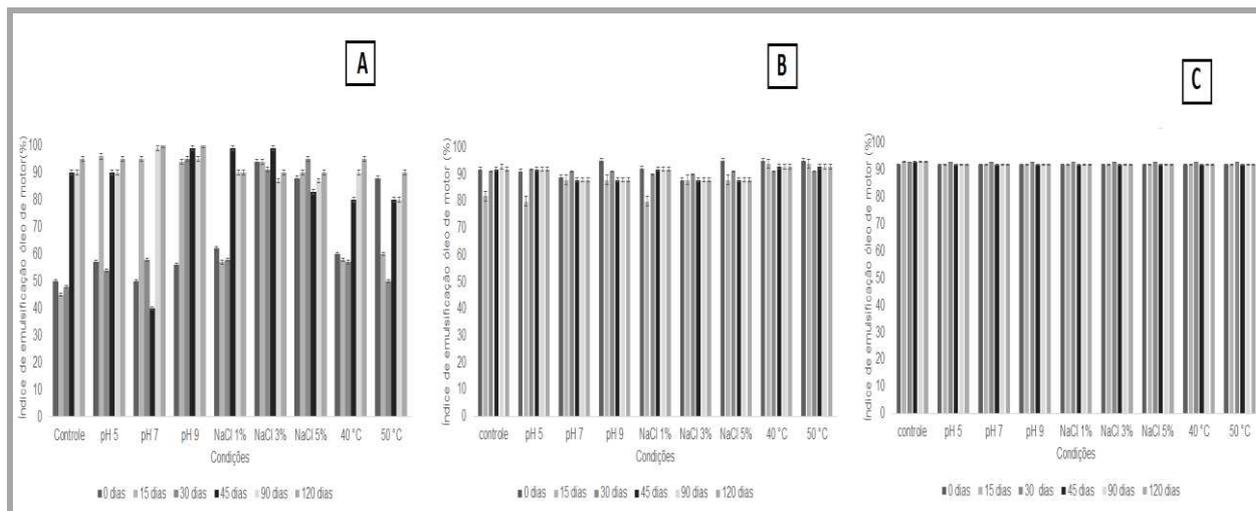


Fig.9

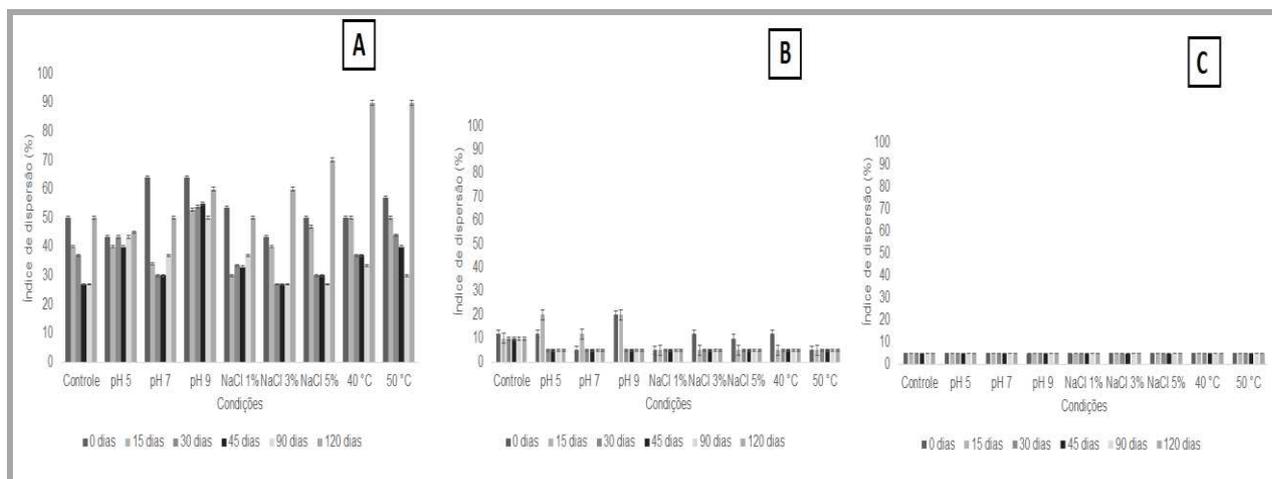


Fig. 10

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

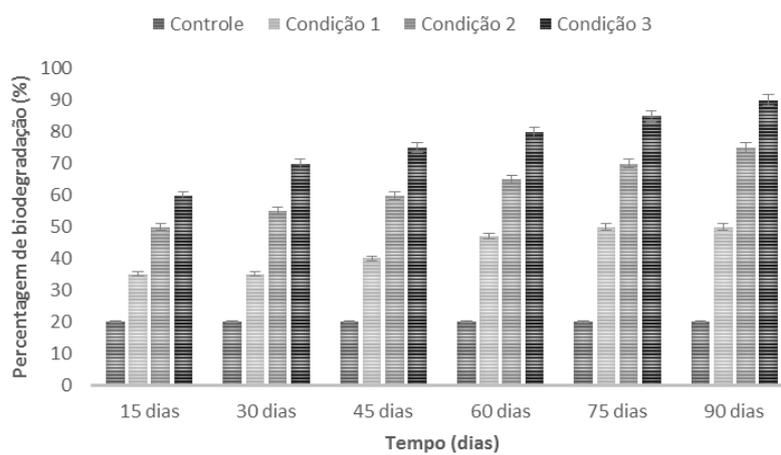


Fig. 11

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

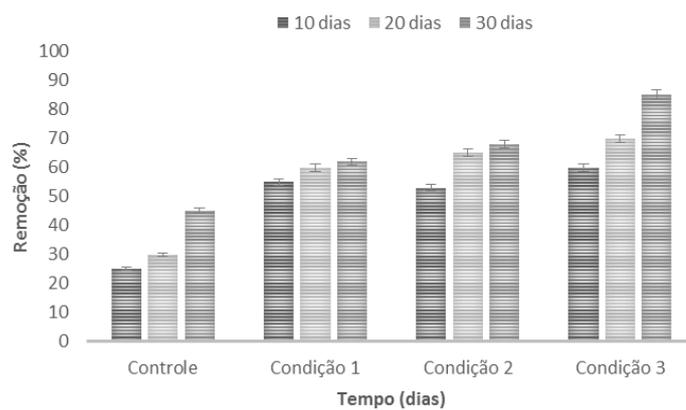


Fig. 12

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A maximização da produção do biossurfactante de *C. sphaerica* em biorreator foi efetiva com a utilização do planejamento fatorial, possibilitando a aplicação industrial do tensoativo na redução da contaminação ambiental provocada por petróleo e derivados.
- A caracterização estrutural do biossurfactante sugere sua natureza glicolípídica.
- O biossurfactante não apresentou citotoxicidade frente a linhagem L929.
- A formulação aumentou a vida de prateleira do biossurfactante com manutenção de suas propriedades tensoativas e emulsificantes produto.
- O biossurfactante formulado mantém suas propriedades tensoativas e emulsificantes sob diferentes condições ambientais de pH, temperatura e presença de sal.
- O biossurfactante de *C. sphaerica*, mostrou-se bastante eficaz na remoção de óleo de motor adsorvido em solo nos ensaios cinético e estático.
- É possível afirmar que o biossurfactante de *C. sphaerica* possui grande potencial para ser utilizado na remediação de solos, podendo contribuir de forma expressiva com a remoção de óleos e com a recuperação de petroderivados, garantindo máxima eficiência e respeito ao meio ambiente.
- A possibilidade de comercialização de um agente estável a longo prazo foi demonstrada, tornando o processo de produção e aplicação dos biossurfactantes mais viável frente ao mercado dos surfactantes químicos derivados de petróleo.

Santos, E. M. S. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo

ANEXO- Submissão do trabalho para a Revista Process Biochemistry

Ref: PRBI_2019_1203

Title: Enhanced oil removal by a non-toxic biosurfactant formulation

Journal: Process Biochemistry

Dear Dr. Luna,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Process Biochemistry. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRN_L_ACR=PRBI and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Process Biochemistry

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.