



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

BRUNA GABRYELLA ANDRADE DE LIMA SILVA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE ÓLEO E NA
ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Recife, 01 de Junho de 2023

BRUNA GABRYELLA ANDRADE DE LIMA SILVA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE ÓLEO E NA
ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

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

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Recife, 01 de Junho de 2023

S586p Silva, Bruna Gabryella Andrade de Lima
Produção, caracterização e aplicação de biossurfactante na remoção de óleo e na estabilização de nanopartículas de prata / Bruna Gabryella Andrade de Lima Silva, 2023.
118 f.: il.

Orientadora: Juliana Moura Luna
Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2023.

1. Biotecnologia. 2. Candida lipolytica.
3. Biossurfactantes. 4. Fermentação. 5. Nanopartículas.
6. Resíduos industriais. I. Título.

CDU 574.6
Luciana Vidal - CRB4/1338

Produção, caracterização e aplicação de biossurfactante na remoção de óleo e na estabilização de nanopartículas de prata. © 2023 by Bruna Gabryella Andrade de Lima Silva is licensed under CC BY-NC-ND 4.0

LIMA SILVA, A. G. B. **Produção, caracterização e aplicação de biossurfactante na remoção de óleo e na estabilização de nanopartículas de prata**, 2023. p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2023.

1. *Candida lipolytica*; 2. Biossurfactante; 3. Fermentação; 4. Efluente oleoso; 5. Nanopartículas; 6. Encapsulamento. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
BIOSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE ÓLEO E NA
ESTABILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

BRUNA GABRYELLA ANDRADE DE LIMA SILVA

Examinadores:

Juliana Moura de Luna

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

Raquel Diniz Rufino

Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino
Universidade Católica de Pernambuco –
UNICAP

Documento assinado digitalmente



ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO

Data: 19/09/2023 11:46:04-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

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

Defendida em __/__/__

Coordenador (a): Prof. Dr. Sérgio Mendonça de Almeida

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edijanete Angela e Isaque Pereira, pelo suporte ao longo desses dois anos, pela compreensão nos momentos difíceis e pela dedicação de parte de suas vidas para a minha formação.

Aos meus filhos amados, Rian Gabriel e Rodrigo Vega, à vocês, meu amor incondicional por toda minha vida!

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pelo infinito amor e piedade que permitiu concluir esta etapa dos estudos. Grande és tu, Senhor!

À Profa. Dra. Juliana Moura Luna, minha orientadora, pelo amor e carinho dedicado a pesquisa e a todos os seus alunos. Ju, você é sinônimo de inspiração! Muito obrigada pelo incentivo que proporcionou a realização deste trabalho. Obrigada por tudo, de verdade.

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

À UNICAP, pela oportunidade em desenvolver este trabalho nesta universidade.

À CAPES, pelo financiamento que permitiu a execução deste trabalho.

Ao coordenador do curso de Mestrado em desenvolvimento de Processos Ambientais – MDPA; Prof. Dr. Sergio Almeida pela dedicação a este renomado curso.

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

A família Julianáticos: Renata Silva (a doutora de milhões!), Júlio Vasconcelos, Hozana Souza, Maria Catarina, Yali Alves, Carlos Vinicius e Rayane Santos, que de maneira especial, me ajudaram no término desse trabalho. Amei conhecê-los! Muito obrigada pela dedicação e colaboração nos experimentos do laboratório. Estar com vocês, é sinônimo de trabalho duro, companheirismo e garantia de boas risadas!

À Hugo M. Meira e Ítalo B. Durval, pela troca de conhecimentos, dedicação e colaboração nos experimentos do laboratório.

À toda a minha turma de mestrado, em especial Marcelly e Gleice pelos intensos e calorosos momentos vividos no primeiro ano de disciplinas e depois também.

À minha família. Minha mãe por sempre lutar, acreditar e incentivar os meus sonhos. Meu pai, mesmo com seu jeitinho mais calado, sei que torce muito pelo meu sucesso. Aos meus irmãos, Julianne Andrade e Leonidas Neto, por serem meu porto seguro emocional, sou muito grata a Deus pela vida de vocês.

Ao meu esposo Renato Douglas pelo, companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis ao longo desses dois anos. Te amo.

Aos meus sogros José Ronaldo e Lúcia Bezerra por estarem presente nos bons e nos maus momentos de toda essa jornada. Meus cunhados Roney Arantes, Lílian Patrícia, Ruth Meirellis e meu sobrinho Robert Silva, pela torcida, orações e gargalhadas (de doer a barriga) principalmente nos nossos churrasquinhos. Amo vocês, “família badalada!”

Aos meus queridos amigos Werika Maria, Tadeu Leão, Rhubia Silva, Neto Bala, Tatiana Sandres e Rhafael Silva, por estarem presente nos tempos bons e nos ruins de toda essa jornada e compreenderem minha ausência em alguns momentos. Muito obrigada por sempre torcerem e orarem por mim. Amo vocês!

Aos meus queridos amigos Maria Carolina, Marcelo Arruda, Priscila Santos e Manoel Ribeiro, por me aguentarem todos os dias e por me darem força para continuar. Amo vocês.

A todos que não foram citados aqui, mas que me ajudaram, oraram/rezaram e torceram por mim, meus agradecimentos.

“Não te mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.”

Josué 1:9

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADRIOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.1.1 Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 Biossurfactantes.....	20
3.2 Classificação dos Biossurfactantes.....	22
3.3 Propriedades dos Biossurfactantes.....	23
3.4 Principais Características dos Biossurfactantes.....	25
3.5 Matérias-primas utilizadas para produção de Biossurfactantes.....	27
3.6 Aplicação dos Biossurfactantes na Área Ambiental.....	28
3.6.1 Contaminação por Petróleo e Derivados.....	28
3.6.2 Biorremediação.....	29
3.6.3 Remoção de Óleo do Solo.....	30
3.6.4 Biorremediação de Derramamento de Óleo.....	31
3.7 Aplicação do Biossurfactante em Dispersão de Óleo.....	31
3.8 Biorremediação de Metais Pesados.....	34
3.9 Patentes de Biossurfactantes Utilizadas em Remediação Ambiental.....	35
3.10 Utilização de Biossurfactante como Estabilizador de Nanopartículas.....	40
3.11 Nanopartículas de Prata como Agente Antimicrobiano.....	42

CAPÍTULO II

Resumo.....	52
1. Introdução.....	53
2. Material e Métodos.....	54
2.1 Microrganismo.....	54

2.2	Preparação do Inóculo.....	55
2.3	Produção do Biossurfactante.....	55
2.4	Determinação da atividade de emulsificação.....	55
2.5	Curva de Crescimento.....	55
2.6	Avaliação da estabilidade do biossurfactante.....	55
2.7	Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar.....	56
2.8	Isolamento do biossurfactante	56
2.9	Espectroscopia de FTIR.....	56
2.10	Espectroscopia de RMN.....	56
2.11	Toxicidade do biossurfactante frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	57
2.12	Teste de Fitotoxicidade.....	57
2.13	Teste de Germinação em Água do Mar.....	57
2.14	Experimento de Lavagem de Composto Hidrofóbico Adsorvido em Pedra.....	57
2.15	Aplicação de Tensoativo Químicos e Biossurfactante na Remoção de Óleo de Motor de Areia Por Meio de Ensaio Cinético.....	58
2.16	Remoção de Contaminante Hidrofóbico em Areia Pelos Surfactantes em Ensaio Estático.....	58
2.18	Análise dos Contaminantes na Areia.....	59
3.	Resultados e Discussão.....	59
3.1	Curva de Crescimento e Produção de Biossurfactante.....	59
3.2	Estabilidade do Biossurfactante (Emulsificação).....	61
3.3	Estabilidade do Biossurfactante (Tensão Superficial).....	62
3.4	Concentração Micelar Crítica.....	64
3.5	Carga Iônica do Biossurfactante.....	65
3.6	Caracterização Estrutural do Biossurfactante.....	65
3.7	Teste de Fitotoxicidade do Biossurfactante.....	67
3.8	Toxicidade do biossurfactante frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	68
3.9	Teste de Dispersão de Óleo de Motor em Água.....	68
3.10	Aplicação de Tensoativo Químicos e Biossurfactante na Remoção de Óleo de Motor de Areia Por Meio de Ensaio Cinético.....	68
3.11	Remoção do Contaminante Hidrofóbico em Areia Pelo Surfactante em Ensaio Cinético.....	69
3.12	Remoção do Contaminante Hidrofóbico em Areia Pelo Surfactante em Ensaio Estático.....	71
	Conclusão.....	72
	Agradecimentos.....	72
	Referências.....	73

CAPÍTULO III

Resumo.....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	82
Micro-organismo.....	82
Produção do Biossurfactante.....	83
Isolamento do Biossurfactante.....	83
Síntese de Nanopartículas de Prata.....	83
Caracterização das Nanopartículas de Prata.....	84
Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	84
Resultados e Discussão.....	85
Caracterização das Nanopartículas.....	85
Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	89
Conclusão.....	92
Agradecimentos.....	92
Referências.....	92

CAPÍTULO IV

Consiarações finais.....	97
Anexos.....	98

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Estruturas químicas de biossurfactantes.....22

Figura 2 - Estruturas moleculares propostas para diversos tipos de
formação de micelas.....24

Figura 3 - Ilustração das regiões em que ocorre a formação
de micelas (Concentração Micelar Crítica).....25

CAPITULO II

Figura 1 - Curva de crescimento, tensão superficial de pH e pro-dução de
biossurfactante de *C. lipolytica*.....61

Figura 2 - Estabilidade da tensão superficial do biossurfactante de *C. lipolytica*...64

Figura 3 - Espectro FT-IR do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.....66

Figura 4 - Espectro de RMN do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.....66

Figura 5 - Espectro de RMN do biossurfactante produzido por *C. lipolytica*.....67

CAPITULO III

Figura 1 – Espectro de UV-Visível das nanopartículas sintetizadas com
biossurfactante. (BS-AgNPs), com 0 e 120 dias de formadas.....86

Figura 2 – Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura
(MEV).....86

Figura 3 – Imagens de Espectroscopia por energia dispersiva (EDS), do biossur-
factante produzido por *C.*
lipolytica.....88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.....30

Tabela 2 - Diferentes substratos residuais de baixo custo explorados para
Produção de biossurfactante.....37

Tabela 3 - Patentes emitidas sobre a aplicação de biossurfactantes
relevantes para remediação ambiental.....

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Estabilidade da emulsificação do óleo de motor pelo
biossurfactante de *C. lipolytica*.....62

Tabela 2 – Percentual de remoção do contaminante hidrofóbico, pelo
biossurfactante de *C. lipolytica* em ensaio cinético.....70

Tabela 3 – Remoção do contaminante hidrofóbico adsorvido em areia,
através do ensaio estático com colunas de vidro.....71

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Análise por EDS da molécula de biossurfactante produzido por <i>C. lipolytica</i>	88
Tabela 2 – Análise por EDS das BS-AgNPs.....	88
Tabela 3 - Taxa de inibição (%) causada por nanopartículas de prata sintetizada com biossurfactante (BS-AgNPs) contra bactérias e fungos.....	90

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Grau Celsius
ppm	Parte por milhão
g	Gramma
mg/L	Miligramma por litro
mN/m	Mili Newton por metro
m ³ /dia	Metro cúbico por dia
µm	Micrometro
kgf/cm ²	Quilogramma-força por centímetro quadrado

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas com grande potencial de aplicação em vários setores industriais, pelas suas características bioquímicas e por serem compostos naturais com toxicidade reduzida, maior biodegradabilidade e estabilidade sob condições ambientais adversas, em comparação com os surfactantes químicos. Este trabalho, teve como objetivo a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 e aplicação na remoção de óleo e na estabilidade de nanopartículas de prata. O biossurfactante foi produzido em meio contendo 4,0% de melão, 2,5% de milhocina e 2,5% de óleo de soja residual, durante 144 horas a 200rpm, após essa etapa foi realizada a caracterização, avaliação da estabilidade, toxicidade e aplicação na remoção de óleo. Nos estudos de crescimento e de produção de biossurfactante, a tensão superficial do meio foi reduzida para 25 mN/m, Concentração Micelar Crítica (CMC) de 0,5% e um rendimento de 12 g/L. Testes em condições extremas de pH, temperatura e NaCl indicaram a estabilidade do biossurfactante. As estruturas químicas do biossurfactante foram identificadas por Espectroscopia de infravermelho e Ressonância magnética, onde revelou a natureza glicolipídica. O biossurfactante de natureza aniônico não foi tóxico para o microcrustáceo *Artemia salina* e nem para as sementes de hortaliças. O biossurfactante demonstrou eficiência na remoção do óleo em areia, tanto em ensaio estático, como ensaio cinético, nas concentrações de 1/2CMC, 1xCMC e 2xCMC apresentando remoção 70-96%. O biossurfactante também foi testado como estabilizante na síntese de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano. Nanopartículas de tamanho em torno de 20 nm foram obtidas. A presença do biossurfactante promoveu estabilidade, sendo observado um potencial zeta de - 60 mV. O potencial antimicrobiano das AgNPs foi avaliado, contra diferentes micro-organismos. Foram observadas inibição para *Staphylococcus aureus* (90%), *Echerichia coli* (95%), *Enterobacter* (75,48%) e 70,67% de inibição para e *Pseudomonas aeruginosa*, 90% para *Candida albicans* e 85% *Aspergillus niger* na concentração de AgNPs de 16,50 µg/mL. Os resultados obtidos demonstram que o biossurfactante de *Candida lipolytica* tem potencial de utilização em diversos setores econômicos, comprovando a versatilidade biotecnológica desta biomolécula e sua importância indústria.

Palavras-chave: Biodetergente, Tensão superficial, Recuperação ambiental, Nanopartícula.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules with great potential for application in various industrial sectors, due to their biochemical characteristics and because they are natural compounds with reduced toxicity, greater biodegradability and stability under adverse environmental conditions, compared to chemical surfactants. This work had as objective the production of biosurfactant by *Candida lipolytica* UCP 0988 and application in oil removal and stability of silver nanoparticles. The biosurfactant was produced in a medium containing 4.0% molasses, 2.5% cornstarch and 2.5% residual soybean oil, for 144 hours at 200rpm, after which the characterization, evaluation of stability, toxicity and application in oil removal. In the growth and biosurfactant production studies, the surface tension of the medium was reduced to 25 mN/m, Critical Micelle Concentration (CMC) of 0.5% and a yield of 12 g/L. Tests under extreme conditions of pH, temperature and NaCl indicated the stability of the biosurfactant. The chemical structures of the biosurfactant were identified by Infrared Spectroscopy and Magnetic Resonance, which revealed the glycolipidic nature. The anionic biosurfactant was not toxic to the microcrustacean *Artemia salina* or to vegetable seeds. The biosurfactant demonstrated efficiency in removing oil from sand, both in static and kinetic assays, at concentrations of 1/2CMC, 1xCMC and 2xCMC, showing 70-96% removal. The biosurfactant was also tested as a stabilizer in the synthesis of silver nanoparticles as an antimicrobial agent. Nanoparticles of size around 20 nm were obtained. The presence of the biosurfactant promoted stability, with a zeta potential of -60 mV being observed. The antimicrobial potential of AgNPs was evaluated against different microorganisms. Inhibition was observed for *Staphylococcus aureus* (90%), *Echerichia coli* (95%), *Enterobacter* (75.48%) and 70.67% inhibition for *Pseudomonas aeruginosa*, 90% for *Candida albicans* and 85% *Aspergillus ninger* at the concentration of 16.50 $\mu\text{g/mL}$ AgNPs. The obtained results demonstrate that the *Candida lipolytica* biosurfactant has the potential to be used in several economic sectors, proving the biotechnological versatility of this biomolecule and its industrial importance.

Keywords: Biosurfactant, Industrial waste, Nanoparticle, Oil removal

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos decorrentes das últimas décadas, mostram que uma das estratégias para a síntese ecologicamente correta e biocompatível é a utilização de resíduos como meio de produção para determinados processos. O biossurfactante, é a prova de que é possível uma produção sustentável de um biodetergente a base de resíduos industriais, na recuperação de acidentes ambientais com hidrocarbonetos e seus derivados (Johnson *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes, assim como os surfactantes sintéticos, são compostos anfipáticos com porções tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas que se particionam entre interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio. São capazes de aumentar a solubilidade de moléculas hidrofílicas, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais na interface óleo/água (Jahan *et al.*, 2020).

Atualmente, os surfactantes mais produzidos são quimicamente derivados do petróleo. Todavia, esses agentes tensoativos sintéticos são tóxicos e difíceis de decompor através da ação de micro-organismos. Em contrapartida, surfactantes naturais obtidos por via vegetal e microbiológica, são considerados uma alternativa verde em relação aos surfactantes químicos possuindo muitos atributos desejáveis, principalmente os surfactantes de origem microbiana, produzidos por bactérias e leveduras como: produção por micro-organismos de materiais renováveis; inúmeras variedades químicas, ampla gama de aplicações e compatibilidade com o lançamento no ambiente, como alternativa aos produtos existentes (Sarubbo *et al.*, 2022).

A produção de biossurfactantes pode apresentar diversas características que mostram seu excelente potencial para produção, tais como: atividade superficial e interfacial, tolerância à temperatura, pH e força iônica, biodegradabilidade, baixa toxicidade, disponibilidade, especificidade, emulsificação (López-Prieto *et al.*, 2021). Nesse contexto, o presente trabalho remete ao potencial da levedura *Candida lipolytica* como produtora de biossurfactante.

Outro estudo que tem despertado grande interesse científico é a nanotecnologia. Ela vem crescendo em virtude da grande quantidade de aplicações eficazes em diversos setores, que vão desde técnicas químicas tradicionais às tecnologias medicinais e ambientais (Taram *et al.*, 2021). Estipula-se que uma partícula é nano se o seu diâmetro for de 1 a 100 nanômetros (bilionésimo de metro), sendo inclusive nesta faixa encontradas as nanopartículas (NPs) consideradas mais práticas e eficazes, tradicionalmente sintetizadas por vias químicas (Javed *et al.*, 2020).

As nanopartículas de prata AgNPs têm sido usadas em uma ampla variedade de aplicações, por apresentarem propriedades não tóxicas, inorgânicas e antibacterianas (Eswari; Dhagat; Mishra, 2018). Além disso, as NPs exibem área superficial notavelmente alta, para relação de volume e reatividade intrínseca, propriedades físico-químicas novas e distintas dos materiais convencionais (Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020), podendo ser ajustadas de acordo com a aplicação desejada (Lee; Jun, 2019).

A produção de AgNPs é tradicionalmente feita através de métodos físicos e químicos; contudo, o interesse pelo uso de métodos de síntese verde está crescendo devido aos seus benefícios para eliminar ou minimizar os riscos e aumentar a biocompatibilidade em aplicações ambientais e biomédicas (Abdelghany *et al.*, 2018; Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020). A síntese verde oferece uma boa relação custo-benefício e é facilmente escalonada para síntese em larga escala, por não ser necessário o uso de alta temperatura, energia, pressão e produtos químicos perigosos (Rafique *et al.*, 2017).

Uma das estratégias recentes para a síntese sustentável, ecologicamente correta e biocompatível de nanopartículas metálicas biologicamente ativas é o uso de biossurfactantes como agentes de cobertura (Kumar *et al.*, 2021).

Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo a produção, caracterização do biossurfactante e aplicação desse bioproduto na remoção de óleo e na estabilização de nanopartículas de prata.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar um biossurfactante com potencial de aplicação na remoção de óleo e como estabilizante das nanopartículas de prata.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir o biossurfactante utilizando meio contendo resíduos industriais;
- Realizar a cinética de crescimento do micro-organismo e produção do biossurfactante;
- Determinar as propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante;
- Caracterizar estruturalmente o biossurfactante;
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante frente as condições específicas de pH, temperatura e salinidade;
- Avaliar o potencial de remoção do poluente hidrofóbico pelo biossurfactante em ensaios cinético e estático;
- Síntese de nanopartícula de prata.
- Caracterização das nano partícula de prata.
- Avaliar a aplicação do biossurfatante como estabilizante de nanopartículas de prata.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biossurfactantes

Biossurfactantes ou surfactantes microbianos são biomoléculas produzidas por uma grande variedade de micro-organismos, presentes na natureza. As moléculas de biossurfactante apresentam um caráter anfipático, pois possuem uma parte polar ou hidrofílica e apolar ou hidrofóbica (Banat *et al.*, 2021). São compostos tenso-ativos, assim como os surfactantes sintéticos, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial nas interfaces entre sólidos, líquidos e gases, permitindo-lhes assim, misturar ou dispersar prontamente como emulsões em água ou em outros líquidos. Os biossurfactantes ou tensoativos biológicos surgem como alternativa biotecnológica para competir com os surfactantes químicos e minimizar os efeitos no ambiente (Das *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020).

Vários seres vivos tem a capacidade de produzir biossurfactante, tais como as plantas, animais e microrganismos. A produção através dos microrganismos é mais vantajosa, devido ao curto tempo de produção, quando comparado ao crescimento de plantas e animais (Shi *et al.*, 2019). O quadro 1 mostra os tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos

Tabela 1. Tipos de biossurfactantes produzidos por micro-organismos

Classe	Subclasse	Micro-organismo
--------	-----------	-----------------

Glicolipídeos	Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas ssp.</i> <i>Lysinibacillus sphaericus</i> <i>Serratia rubidaea</i>
	Trealolipídeos	<i>Nocardia farcinica</i> <i>Rhodococcus sp.</i> <i>bombicola</i>
	Sorolipídeos	<i>Candida sphaerica</i> <i>Starmerella bombicola</i> <i>Cutaneotrichosporon</i>
	Mannosylerythritol	<i>Mucoides</i> <i>Pseudozyma aphidis</i>
	Não Informado	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida utilis</i>
Lipopeptídeos	Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus</i>
	Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus nealsonii</i>
	Não Informado	<i>Pseudomonas azotoformans</i> <i>Bacillus velezensis</i> <i>Bacillus pseudomycoides</i> <i>Virgibacillus salarius</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Halomonas sp.</i>
Fosforolipídeos		<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>K. pneumoniae</i>
Surfactantes Poliméricos	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	Emulsan	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>

Os tipos de tensoativos biológicos são compostos de superfície ativa sintetizados por microrganismos, sejam eles bactérias, fungos e leveduras, e classificados de acordo com sua natureza bioquímica que abrange diferentes estruturas, sendo elas lipopeptídeos, glicolipídeos, lipossacarídeos, fosfolipídeos além de ácidos graxos e lipídeos neutros (Sarubbo *et al.*, 2022). Nos últimos anos, os tensoativos biológicos têm despertado o interesse de pesquisadores quanto às propriedades e vantagens sobre os compostos químicos, e ganham atenção por causa de sua biodegradabilidade, biodisponibilidade, biocompatibilidade, alta

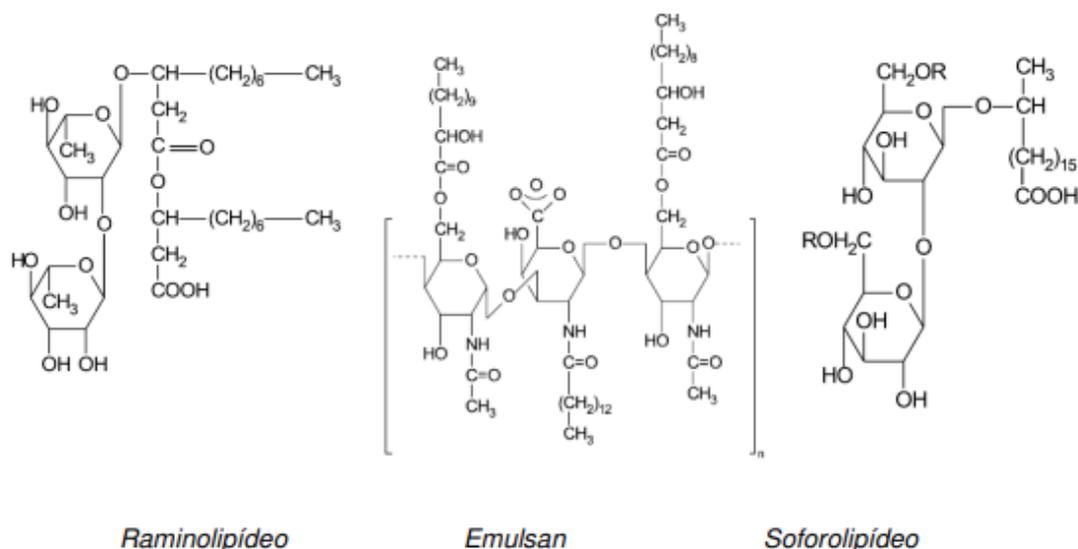
seletividade, eficácia em ambientes extremos e longo tempo de armazenamento (Jimoh; Lin, 2019; Singh; Patil; Rale, 2019) e acresce-se também a possibilidade de modificação de sua estrutura e de propriedades físico-químicas, através de técnicas de engenharia genética ou bioquímicas, o que permite obter produtos para usos específicos (Luna *et al.*, 2016).

Além disso, os tensoativos biológicos são compostos que fazem parte da denominada “tecnologia verde”, a qual visa a proteção e conservação da natureza, e que vem ganhando destaque no setor industrial (Paraszkiewicz *et al.*, 2018).

3.2 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química, biológica ou microbiana. Onde a fração polar que os compõe, pode ser composta de açúcares (mono-, di ou polissacarídeos), peptídeos, ânions ou ácidos, enquanto a fração apolar é composta de hidrocarbonetos ou cadeias de ácidos graxos (Draconis *et al.*, 2020). Além disso, podem ser classificados também com base no seu peso molecular. Os biossurfactantes de baixo peso molecular são os glicolipídios, fosfolipídios e lipopeptídeos; enquanto, os de alto peso molecular são os chamados poliméricos e particulados (Beltran-Gracia *et al.*, 2017). A figura 1 mostra os principais tipos de biossurfactantes.

Figura 1 – estruturas químicas de biossurfactantes



Fonte: Nitschke e pastore (2002).

3.3 Propriedades dos biossurfactantes

As moléculas dos biossurfactantes apresentam a mesma estrutura anfipática dos surfactantes químicos (Figura 2), elas são capazes de se distribuir nas interfaces entre fases imiscíveis, o que confere maior afinidade óleo/água ou ar/água (Twigg *et al.*, 2021). Os biossurfactantes apresentam propriedades melhores do que seus equivalentes sintéticos. Algumas das propriedades importantes observadas na maioria dos biossurfactantes são descritas abaixo:

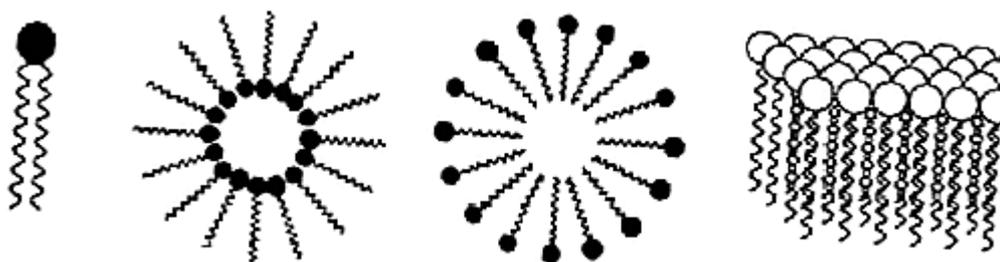
- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações. A CMC é utilizada para definir a eficiência dos surfactantes e é definida pela solubilidade de um surfactante em uma fase aquosa. Ela varia entre 1-2000 mg/L, quanto menor for a CMC, mais eficiente é o surfactante, pois será menor a quantidade necessária para diminuição da tensão superficial (Muhammad; Khan, 2018; Muntaha; Khan, 2015) enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente. Entretanto, é importante destacar que a CMC é um parâmetro característico de cada surfactante, apresentando

esquematisações gráficas diferentes para cada um na proporção que se aproximam ou se afastam do valor de CMC. Sendo assim, a CMC de cada surfactante determina as possíveis aplicações (industriais, em processos alimentares, sistema de administração de medicamentos, processos minerais e produção de novos surfactantes) do composto (Muhammad; Khan, 2018) (figura 3).

- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: a grande maioria dos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75 °C, por até 140 horas e variações de pH entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de sal, enquanto que 2 % de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais.
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros microrganismos na água e no solo, pois os mesmos o utilizam como fonte de energia, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos.
- Baixa toxicidade: os biossurfactantes têm se destacado por apresentar menores efeitos alérgicos que os produtos artificiais pela sua baixa toxicidade; permitindo seu uso em alimentos, em cosméticos e em produtos farmacêuticos (Ríos *et al.*, 2017).
- Disponibilidade: O grande diferencial dos biossurfactantes é que eles podem ser produzidos a partir de resíduos industriais, fato que garante larga disponibilidade e assegura seu baixo custo de produção (Rocha; SIVA *et al.*, 2019).
- Especificidade: biossurfactantes possuem moléculas específicas, o que facilita a sua produção para algum fim específico. Eles também são específicos em suas ações, essa propriedade pode ser de grande interesse da detoxificação de alguns poluentes ou em determinadas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética ou alimentícia.
- Emulsificação: outra propriedade importante dos biossurfactantes é a capacidade de emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos ou compostos

insolúveis em água, facilitando e mantendo a mistura de um líquido em outro (Liu *et al.*, 2019). A emulsificação garante que as moléculas hidrofóbicas se misturem em meio aquoso. Essa propriedade é fundamental para os processos de biorremediação, tornando possível o crescimento de microrganismos nestes meios contaminados com óleo (Khan *et al.*, 2017).

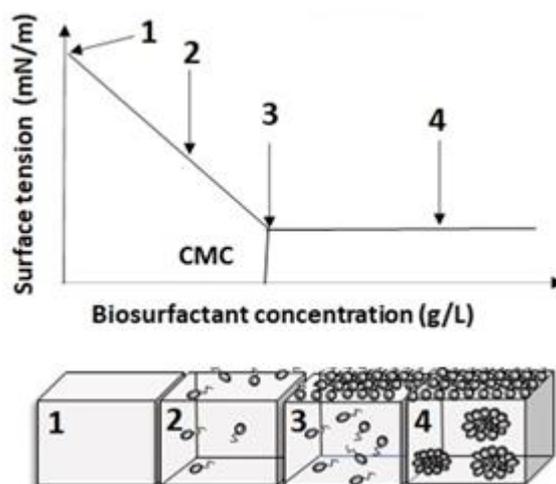
Figura 2 – Estruturas moleculares propostas para diversos tipos de formação de micelas



Fonte: Adaptado de <https://fr.questionofwill.com>

Figura 3 - Ilustração das regiões em que ocorre a formação de micelas (Concentração

Micelar Crítica)



Fonte: Adaptado de Sarubbo *et al.* (2022).

3.4 Principais características dos biossurfactantes

O que determina a capacidade de utilização dos biossurfactantes são suas propriedades químicas e físicas. Como a redução da tensão superficial, capacidade espumante, capacidade emulsificante e estabilizante, baixas concentrações micelares, solubilidade e poder detergente (Jahan *et al.*, 2020). Tais características apresentam vantagens no uso do biossurfactante.

- a) **Baixa toxicidade:** os biossurfactantes são compostos que possuem baixa toxicidade, atuando no desequilíbrio de duas fases químicas, ocasionando a formação de gotas e bolhas e imiscibilidade entre líquidos polares e apolares (Gajewski *et al.*, 2017) Na biorremediação, são aplicados em tratamentos residuais, pois são facilmente degradáveis na água e no solo, além de possuírem potencial aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos (Ricón-Fortan *et al.*, 2018).
- b) **Alta biodegradabilidade:** os biossurfactantes são degradáveis na água e no solo, o que permite que sejam usados no processo de biorremediação, para liberar contaminantes do solo, em formulações de pesticidas e no controle biológico (Rodriguez *et al.*, 2019).
- c) **Tolerância à variação de pH, salinidade e temperatura:** Os biossurfactantes têm ganhado maior atenção em pesquisas para sua aplicação comercial devido ao fato de

serem capazes de atuar com eficiência sob temperaturas extremas, pH e salinidade (Perfumo; Banat; Marchant, 2018)

- d) Uso de substratos renováveis: ainda tem muito a ser estudado, mas alguns experimentos mostram que o uso de substratos economicamente mais baratos torna o processo de produção de biossurfactante mais econômico nas indústrias (Santos *et al.*, 2016). O uso de resíduos de substrato renováveis para reduzir os custos iniciais de produção e o desenvolvimento de bioprocessos eficientes, incluindo a otimização das condições de cultura, melhoria dos processos a jusante e o uso de cepas melhoradas com modificações genéticas ou de potencial produtivo natural.
- e) Aplicações generalizadas: Vários tipos de biossurfactantes têm mostrado potencial para aplicação em diversas áreas, devido às suas atividades emulsificante, antimicrobiana, antitumoral, antiadesiva e anticorrosiva. Essas propriedades são de interesse das indústrias alimentícia, têxtil e biomédica. As propriedades de formação de espuma dos biossurfactantes em comparação com os surfactantes sintéticos tornam-os uma alternativa promissora para a produção comercial usando matérias-primas (Banat *et al.*, 2021).

3.5 Matérias primas utilizadas para produção de biossurfactantes

A geração de subprodutos industriais está crescendo rapidamente, juntamente com a necessidade de encontrar destino adequado para resíduos industriais, nocivos ou não, torna-se uma solução para a produção de biossurfactantes, uma vez que muitos destes podem ser usados como matérias-primas de baixo custo, superando os custos dispendiosos da produção (Sarubbo *et al.*, 2022).

Os subprodutos residuais selecionados devem possuir a quantidade de nutrientes adequado para permitir o crescimento microbiano e consequente produção de biossurfactante, destacando aqueles resíduos industriais com um elevado teor de hidrocarbonetos ou lipídeos, como os ideais para uso como substrato (Santos *et al.*, 2016). Indústria de alimentos, por exemplo, possui resíduos de produtos entre eles resíduos de amido, melaço, gordura animal e óleos que são ricos em compostos utilizados pelo metabolismo microbiano (Banat *et al.*, 2021; Jimoh; Lin, 2019; Sing; Patil; Rale 2019).

Vários estudos têm demonstrado que os biossurfactantes podem ser produzidos a partir de uma variedade de substratos, como misturas hidrofóbicas, solventes, hidrocarbonetos, óleos vegetais, produtos lácteos e cerveja. A literatura descreve uma série de produtos residuais empregados na produção de biossurfactantes, como óleos vegetais, efluentes oleosos, efluentes amiláceos, gordura animal, gordura vegetal, sabão, melão, resíduos da indústria de laticínios (soro), milhocina, efluentes de farinha de mandioca, resíduos de destilaria de óleo e glicerol, dentre esses resíduos destaca-se o óleo de fritura como grande fonte de carbono para a produção de biossurfactante, resíduo de fácil obtenção e baixo custo (Santos *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Diferentes substratos residuais de baixo custo explorados para produção de biossurfactante.

Resíduos	Referências
Óleos de palma, de soja, de côco, de algodão, de amendoim, azeite de oliva	Zambry <i>et al.</i> , 2021; Durval <i>et al.</i> , 2019; Suryawanshi <i>et al.</i> , 2021; Silva <i>et al.</i> 2021; Mendes da Silva Santos <i>et al.</i> 2021; Souza <i>et al.</i> , 2018
Resíduos de matadouro, processamento de peixes, gordura animal	Ramani <i>et al.</i> , 2012; Patil <i>et al.</i> , 2016; Sellami <i>et al.</i> , 2021
Gordura vegetal	De Gusmão <i>et al.</i> , 2010; De Almeida <i>et al.</i> , 2015
Soro de leite	Alkan <i>et al.</i> , 2019; Vera <i>et al.</i> , 2018
Borra	Santos <i>et al.</i> , 2013; 2014
Cascas de laranja, abacaxi, banana, cenoura, maçã, arroz, batata e bagaço de cana	Vieira <i>et al.</i> , 2021; Rajasimman <i>et al.</i> , 2021; Das; Kumar, 2019; Suryawanshi <i>et al.</i> , 2021; Mohanty <i>et al.</i> , 2021.
Melaço	Sarubbo <i>et al.</i> 2018; Lira <i>et al.</i> , 2020; Ostendorf <i>et al.</i> , 2019; Kanna, 2018; Almeida <i>et al.</i> , 2018
Milhocina	Sarubbo <i>et al.</i> , 2018; Lira <i>et al.</i> , 2020; Ostendorf <i>et al.</i> , 2019; kanna, 2018; almeida <i>et al.</i> , 2018
Farinha de mandioca	Rajasimman <i>et al.</i> , 2021
Resíduos de destilaria de petróleo	Luna <i>et al.</i> , 2011; 2013
Glicerol	Moshtagh; hawboldt e zhang, 2021

Fonte: Lira *et al.* (2022).

3.5 Aplicações de biossurfactantes na área ambiental

3.5.1 Contaminação por petróleo e derivados

Os acidentes ambientais envolvendo petróleo e derivados é uma das principais causas da poluição mundial, e trás grande preocupação, tanto em países considerados desenvolvidos como em desenvolvimento. Pois, uma vez que esses hidrocarbonetos e derivados estão presentes em diversos setores, a probabilidade de causarem danos em solos, águas e ar, também é muito maior (Sarubbo *et al.*, 2022).

Os acidentes durante o transporte de petroderivados geram uma gama de possibilidade de contaminação. Sejam por navios e caminhões; ou armazenamentos subterrâneos que ficam expostos à corrosão, bem como postos de gasolina, operações de extração de petróleo. As principais ocorrências de acidentes envolvendo contaminação de petróleo vem de operações de rotina como a lavagem do navio, lançamento inadequado de resíduos gerados pelas indústrias que utilizam derivados de petróleo na produção de plásticos, solventes, produtos farmacêuticos, cosméticos, vazamento de óleo natural no fundo do mar e os acidentes durante a exploração (Liu *et al.*, 2018).

Outro tipo de contaminação que preocupa a sociedade é por metais pesados. Pois, ela é resultante de diferentes atividades antrópicas, como a mineração, a fabricação de baterias veiculares, resíduos industriais e a dispersão de lavagem de processos de incineração (Zang *et al.*, 2021). Além de hidrocarbonetos petrolíferos e metais pesados, existe outra lista de poluentes que podem ser nocivos, causadores de danos irreversíveis à saúde, que são substâncias pesticidas, herbicidas, que possuem ação contaminante do ar como o monóxido de carbono, ozônio, chuva ácida e materiais particulados, causadores de danos extensos, como lesões corrosivas, toxicidade e doenças em geral (Hanfi *et al.*, 2020). O destino dos poluentes é geralmente o solo, lagos, rios e mar levando à bioacumulação ao longo do tempo, o que leva a graves efeitos à vida aquática e terrestre. Podendo afetar indiretamente o homem, através do consumo de vegetais, frutas, peixes e outros produtos alimentares (Jimoh; Lin, 2019).

Atualmente, existem algumas categorias principais de tecnologias de limpeza disponíveis para a remediação de derramamentos de petróleo em ambiente marinho: tratamento químico (dispersantes, disjuntores de emulsão); queima *in situ*; recuperação

mecânica (barreiras de contenção, escumadeiras, separadores de óleo e água, adsorventes; e biorremediação (Ivishina *et al.*, 2015). Entre estas categorias, a biorremediação se mostra como a melhor estratégia para o tratamento de tal contaminante, com destaque para os biossurfactantes, pois, esta melhora a dispersão dos contaminantes na fase aquosa e aumenta a biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para micro-organismos, com a remoção subsequente de tais poluentes por biodegradação, com a vantagem de ter baixa toxicidade e ser biocompatível.

3.5.2 Biorremediação

A biorremediação é a capacidade de degradação, natural ou através do metabolismo de plantas ou microrganismos, para a conversão total ou parcial de componentes tóxicos em menos agressivos ou conversão completa em dióxidos de carbono e água (Sales da Silva *et al.*, 2020). Portanto, a grande quantidade de população de micro-organismos leva a um processo mais rápido e mais eficiente de biorremediação. Esse processo é chamado de bioestimulação, pois consiste em estimular o crescimento de micro-organismos presentes no local contaminado. Outra forma é a realização através de bioaumentação, processo que consiste em adicionar os micro-organismos ao ambiente contaminado para acelerar e completar a degradação do poluente (Santos *et al.*, 2016).

A biodegradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo através dos biossurfactantes é dada através de dois mecanismos. O primeiro é através de um aumento na biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para micro-organismos, em consequência disso, ocorre a redução da tensão de superficial do meio em torno da bactéria bem como uma redução da tensão interfacial entre a parede da célula e moléculas de hidrocarbonetos. O outro mecanismo envolve a interação entre o biotensoativo e a superfície celular, conduzindo a alterações na membrana, o que facilita a adesão de hidrocarboneto (aumento na hidrofobicidade) e a redução do índice de lipopolissacarídeos da parede celular, sem danificar a membrana (Santos *et al.*, 2016).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos indica para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, a biorremediação. Pois, a via biológica é a mais estudada e indicada para auxiliar nesse processo de recuperação ambiental. Os biossurfactantes, mais uma vez, se mostram úteis por aumentarem a disponibilidade do

substrato hidrofóbico, sendo alternativa a processos químicos e mecânicos utilizados na recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos: incineração, dessorção térmica, a solidificação/estabilização e extração de vapores do solo (Ivshina *et al.*, 2015).

3.5.3 Remoção de óleo do solo

A biorremediação de contaminantes no solo é menos difundida do que em água, uma vez que a eficiência de remoção é impulsionada principalmente pelas propriedades físico-químicas do biossurfactante em vez de os efeitos sobre a atividade metabólica ou alterações nas propriedades de superfície da célula. Diferentes biossurfactantes já foram testados para a remoção dos produtos derivados do petróleo do solo e da água contaminada. Entre os diversos tensoativos utilizados em processos de descontaminação biotecnológicas está a surfactina, com remoções superiores a 85% com as biomoléculas produzidas por *Bacillus licheniformis* (Kavitha; Mandal; Gnanamani, 2014) e 88% por *Bacillus subtilis* (Fernandes *et al.*, 2016).

Pacwa-Płociniczak *et al.* (2011) diz que biossurfactantes promovem a remoção de hidrocarbonetos através da biodegradação, solubilização, mobilização ou emulsificação. Ocorre um aumento da capacidade de solubilização de hidrocarbonetos acima da CMC, devido à partição do hidrocarboneto na porção hidrofóbica das micelas, sendo necessárias muitas vezes maiores concentrações de biossurfactantes. Já a mobilização ocorre em concentrações baixas da CMC e é dividido em deslocação e dispersão, no entanto, os mecanismos que afetam a mobilização e a solubilização de hidrocarbonetos no solo são semelhantes aos envolvidos no aumento de biodisponibilidade para a biorremediação (Silva *et al.*, 2020).

A eficácia de um agente tensoativo na remoção de compostos hidrofóbicos também depende do pH e da força iônica da solução, o que pode alterar a disposição das micelas de agregados e de sorção do agente tensoativo para o solo, o que, por sua vez, limita o transporte de o hidrocarboneto pelo surfactante.

3.6 Biorremediação de derramamento de óleo

Derramamentos de óleo, independentemente de serem acidentais ou intencionais, geram grande impacto ao meio ambiente, principalmente quando ocorrem em ecossistema marinho. No geral, esses derramamentos ocorrem devido a condições meteorológicas (tempestades, furacões, maremotos), atos intencionais (guerras, vandalismo) e erro humano (Chen *et al.*, 2019). No longo prazo, o impacto desses desastres dependem mais da velocidade da limpeza/remediação do que do volume de óleo derramado (Pete *et al.*, 2021).

Embora cada técnica de limpeza/remediação tenha vantagens e desvantagens, a eficácia depende geralmente das características de cada cenário de derramamento, como a localização e condições climáticas, além da composição, viscosidade e volume do óleo, como também a velocidade de liberação dele (Da Silva *et al.*, 2022). As técnicas de resposta a esse tipo de desastre incluem métodos mecânicos (barreiras, skimmers e sorventes) que conseguem conter parcialmente a expansão do óleo, métodos térmicos (queima *in situ*), métodos químicos (dispersão) e métodos naturais (biorremediação) (Patel *et al.*, 2019).

A presença de grandes populações de micro-organismos leva a um processo de biorremediação mais rápido e mais eficiente. Portanto, esta técnica pode ser realizada através de bioestimulação, o qual consiste em estimular o crescimento de micro-organismos presentes no local contaminado (Santos *et al.*, 2016; Sayed *et al.*, 2021; Decesaro *et al.*, 2021). Outra forma é a realização através de bioaugmentação, no qual os micro-organismos são adicionados ao ambiente contaminado para acelerar e completar a degradação do poluente (Shi *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021).

A biodegradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo por biossurfactantes ocorre através de dois mecanismos. O primeiro envolve um aumento na biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para micro-organismos, com a consequente redução da tensão de superfície do meio em torno da bactéria bem como uma redução da tensão interfacial entre a parede da célula e moléculas de hidrocarbonetos. O outro mecanismo envolve a interação entre o biotensoativo e da superfície celular, conduzindo a alterações na membrana, o que facilita a adesão de hidrocarboneto (aumento na hidrofobicidade) e a redução do índice de lipopolissacarídeos da parede celular, sem danificar a membrana (Santos *et al.*, 2016).

Surfactantes podem auxiliar nos processos de biorremediação, uma vez que são capazes de aumentar a mobilidade dos hidrocarbonetos, bem como a biodisponibilidade. (Ławniczak *et al.*, 2020). Em 1989, o petroleiro Exxon Valdez derramou 41.000 mil litros de petróleo no Golfo do Alasca, e o uso de surfactantes químicos desempenhou um papel importante na limpeza, dando origem ao desenvolvimento desta tecnologia, dando razões para acreditar na eficácia da aplicação deste método de tratamento em derrames de petróleo futuras sob as circunstâncias adequadas (Morris; Loughlin 1994).

Com o passar dos anos, os estudos com surfactantes biológicos cresceram e estes tornaram-se alternativa aos químicos devido a sua diversidade de aplicações e às suas propriedades versáteis específicas, toxicidade diminuta e aceitabilidade biológica (Karlupudi *et al.*, 2018). As abordagens de biorremediação que utilizam biossurfactantes demonstram uma alta taxa de biodegradação do contaminante oleoso, sendo considerados tecnicamente eficientes, com possibilidade de serem liberados *in situ*, sem a necessidade de esforço no manuseio subsequente (Sarubbo *et al.*, 2022).

Durval *et al.* (2020) observou que a presença do biossurfactante de *Bacillus cereus* estimulava o crescimento dos micro-organismos autóctones de amostra de água de ambiente marinho contaminada com óleo de motor. Jadhav *et al.* (2013) observou que a adição de biossurfactante produzido por *Oceanobacillus* sp. ao meio rico em células bacterianas aumentou a biodegradação de óleo bruto para até 90%, enquanto o teste usando apenas células bacterianas como agentes de degradação obtiveram êxito de até 63% apenas. Mohanty *et al.* (2013) ressalta a importância da sinergia entre os (bio)surfactantes e consórcios de cultura microbiana para a máxima eficiência nos processos que promovam a biodegradabilidade de óleo.

Patowary *et al.* (2018) utilizando biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* para o aprimoramento da biorremediação de solo contaminado por óleo, observou a degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) de 86,1% e 80,5% em duas amostras de solo contendo 6800ppm e 8500ppm TPH, respectivamente. Eficiência superior a do surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS), também testado.

Além da biorremediação, os surfactantes (ou agentes umectantes) podem ajudar repelência à água do solo que é gerada pela matéria orgânica do solo. Ogunmokun *et al.* (2020) afirma que a repelência tem um efeito substancial na hidrologia da água no solo: dificulta a infiltração, levando ao escoamento superficial

melhorado e erosão do solo, e causa fluxo preferencial no perfil do solo além daquele da heterogeneidade natural do solo. Ao reduzir a tensão superficial do líquido em que são dissolvidos, eles reduzem simultaneamente a repelência à água no solo, aumentando a força motriz da absorção de água por superfícies hidrofóbicas. Os surfactantes tornam o solo molhável à medida que a cauda hidrofóbica do agente umectante se liga quimicamente ao revestimento hidrofóbico na partícula do solo, enquanto a cabeça hidrofílica atrai moléculas de água, permitindo que elas passem para o solo e aumentando a infiltração.

3.7 Aplicação de biossurfactante em dispersão de óleo

A aplicação de dispersantes em derramamentos de petroderivados é considerada uma importante opção de resposta que pode gerar benefícios ambientais em muitos casos; particularmente, para grandes desastres em plataformas petrolíferas ou resultantes de condições ambientais adversas (Cai *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes melhoram a dispersão de contaminantes na fase aquosa e aumentam a biodisponibilidade do substrato hidrofóbico aos microrganismos para posterior remoção desses poluentes por biodegradação, com as vantagens adicionais de baixa toxicidade e biocompatibilidade (Sarubbo *et al.*, 2022). Os produtos finais da ação dos biossurfactantes são substâncias ecologicamente corretas, como dióxido de carbono, ácidos graxos, água ou biomassa celular, ao contrário de similares químicos (Patel *et al.*, 2019).

A capacidade de promover a dispersão está relacionada com a tensão interfacial e concentração de surfactante e difere da deslocação, que está relacionada apenas com a tensão interfacial entre as fases aquosa e hidrofóbica, sem formação de emulsão minúsculas (Bai; Brusseau; Miller, 1997). A redução da tensão interfacial óleo-água promove a desagregação de uma mancha de óleo em pequenas gotas, com auxílio de fatores que agitem aquele sistema, e assim promova a difusão na coluna de água, onde suas concentrações reduzem para abaixo dos limites de toxicidade (Cai *et al.*, 2021).

A eficácia dos dispersantes biológicos é observada em estudos como os de Jimoh e Lin (2020) que compararam o biossurfactante produzido por *Paenibacillus* sp. com os sintéticos dodecil sulfato de sódio (SDS) e o Triton X-100, e obtiveram uma

taxa de dispersão de 60% com o biológico, enquanto os químicos apenas 25 e 20%, respectivamente. Mistura de tensoativos também é uma alternativa promissora, como a proposta por Shah *et al.* (2019), um dispersante de óleo alternativo de baixa toxicidade, baseado em uma mistura binária de um surfactante líquido iônico, laurato de colina ([Cho][Lau]) e um biossurfactante, sofrorolípido lactônico (SL), produzido por *Starmerella bombicola*, a maior eficácia de dispersão, 83%, foi obtida para uma mistura de proporção 40:60 (p/p) de [Cho][Lau]: LS.

Na proposta de aumentar a funcionalidade de dispersantes, Shi *et al.* (2021) propuseram a modificação de nanopartículas de TiO₂ *in situ* por biossurfactante do tipo rhamnolípídios (Rha), desenvolvendo um dispersante de partículas altamente eficiente com atividade fotocatalítica. O Rha-TiO₂ mostrou excelência na dispersão de óleo diesel e óleo cru, e ainda facilitou a fotodegradação do óleo simultaneamente, em ambiente simulado com alta salinidade.

Pacwa-Płociniczak *et al.* (2011) afirma que para além da dispersão, os biossurfactantes promovem a remoção de hidrocarbonetos através da biodegradação, solubilização, mobilização ou emulsificação. Embora existam muitos biossurfactantes, cada um com uma variedade de aplicações potenciais, o que ainda restringe a sua ampla utilização é o custo de produção, que inviabiliza sua aplicação em operações de limpeza muito específicas (Jimoh; Lin 2019).

3.8 Biorremediação de metais pesados

Os metais pesados são um grupo de elementos metálicos de ocorrência natural, de alto peso molecular e densidade quando comparados com a água. Alguns metais pesados como Ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) em baixas concentrações são essenciais para a sobrevivência do ser humano, porém em concentrações mais altas podem se tornar agentes tóxicos. Outros metais pesados como arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), tálio (Tl) e mercúrio (Hg) não tem função biológica e se entrarem no corpo humano induzirão toxicidade quando forem atingidas determinadas concentrações (Fisher; Gupta, 2020).

O meio ambiente sofre uma crescente contaminação por metais pesados tóxicos e esses metais são uma grande ameaça devido a seus efeitos adversos e manifestações toxicológicas em todo o mundo. Os metais pesados representam uma das principais fontes de contaminação do meio ambiente e grande parte desses

metais é liberada através de atividades antropogênicas e industriais como a mineração, processamento de minério, curtimento de couro, queima de combustíveis fósseis, galvanoplastia e também através de vários produtos químicos como tintas, pigmentos, conservantes, fertilizantes e produtos químicos em geral (Mishra *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes são uma potencial solução para remediação de solos e sedimentos contaminados com metais pesados. Esses compostos anfipáticos são adicionados às soluções para facilitar a solubilização, dispersão e dessorção de contaminantes no solo (Da Rocha Junior *et al.*, 2019). Os biossurfactantes alcançados através da produção microbiana apresentam melhor desempenho e são considerados adequados na remoção de metais pesados do solo quando comparados com os surfactantes sintéticos (Tang *et al.*, 2017; Luna; Rufino; Sarubbo, 2016).

A remoção dos metais pesados do solo por lavagem utilizando uma solução de biossurfactante envolve três etapas principais. Os metais pesados adsorvidos na superfície das partículas do solo são separados pela sorção de moléculas de biossurfactante nas interfaces entre o solo úmido e o metal em solução aquosa. Em seguida o metal é adsorvido pelo biossurfactante e aprisionado dentro da micela por meio de interações eletrostáticas. Por fim, o biossurfactante pode ser recuperado através do processo de separação por membrana (Da Silva *et al.*, 2022).

3.9 Patentes de biossurfactantes utilizadas em remediação ambiental

Os biossurfactantes apresentam uma ampla gama de características, propriedades e diversidade estrutural, essas biomoléculas despertam um grande interesse científico. Atualmente as pesquisas sobre biossurfactantes são de grande relevância, levando em consideração este fator, as publicações científicas e patentes (Tabela 1) sobre esses tensoativos microbianos aumentaram significativamente em todo o mundo. Nos últimos anos ocorreu um aumento no mercado global de biossurfactantes, é estimado que no ano de 2013 o mercado global de biossurfactantes alcançou mais de 340 toneladas, de acordo com a Transparency Market Research (Brumano; Soler; Silva, 2016).

As aplicações patenteadas incluem o uso de biossurfactantes para recuperar petróleo bruto de reservatórios, uso como bioemulsificantes para estabilizar

hidrocarbonetos, limpeza de navios-tanque contaminados com óleo, recuperação de óleo de tanques de armazenamento de óleo e remediação de ambientes contaminados por metais pesados (De Almeida *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2014).

Tabela 3 - Patentes emitidas sobre a aplicação de biossurfactantes relevantes para remediação ambiental

Microrganismo/Biossurfactante	N° da patente	Data de publicação	Autores	Aplicações
Glicolipídios	CA1119794	16 de Março de 1982	Fritz Wagner, Peter Rapp, Hans Bock, Walter Lindorfer, Walther Schulz, Wilhelm Gebetsberger	Recuperação de óleo de um poço de petróleo ou areias betuminosas
Cepas bacterianas	2974914	04 de Agosto de 2016	Ane Kjolhamar, Anita Skarstad, Hans Kristian Kotlar	Recuperação Aprimorada de Petróleo (EOR) e remediação ambiental
Novas cepas de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos capazes de produzir biossurfactantes	PI 0519962-0 A2	28 de Junho de 2005	Robin L. Brigmon, Sandra Story, Denis Altman, Christopher J. Berry	Remediação de orgânicos recalcitrantes e metais pesados
Misturas de microrganismos produtores de biossurfactantes	US4450908	29 de Maio de 1984	Hitzman Donald O.	Recuperação Aprimorada de Petróleo (EOR)
Ramnolipídio	101948786	19 de Janeiro de 2011	Xia Wenjie, Dong Hanping, Yu Li, Huang Lixin, Cui Qingfeng	Tratamento de metais pesados em águas residuais, aplicação na degradação do petróleo bruto e aplicação na recuperação de combustível e extração de petróleo
Injeção de nutrientes microbianos para estimular a produção de biossurfactantes	US5083611	28 de Janeiro de 1992	Clark James B., Jenneman Gary E.	Recuperação Aprimorada de Petróleo (MEOR)

Biossurfactante catiônico	3318/DEL/2015	21 de Abril de 2017	Ganesan Sekaran, Paranji Saranya, Panchavarnam Bhavani, Somasundaram Swarnalatha and Asit Baran Mandal	Remediação <i>in situ</i> de locais contaminados por metais pesados
Lipopeptídeo	US4522261	11 de Junho de 1985	McInerney Michael J., Jenneman Gary E., Knapp Roy M., Menzie Donald E.	Recuperação de óleo
Ramnolípido	106077056	09 de Novembro de 2016	He Chuan	Método de remediação de solo poluído por metais pesados em áreas de mineração
Ramnolípido	107555571	09 de Janeiro de 2018	Xu Yunli	Processo de tratamento para águas residuais de metais pesados
Mistura de micróbios, enzimas, surfactantes e produtos químicos	US6033901	07 de Março de 2000	Powell John E	Remoção de borra de petróleo bruto do tanque de óleo
Fluido de tratamento contendo biossurfactante	US6069002	30 de Maio de 2000	Powell John E.	Recuperação de hidrocarboneto
Qualquer produtor de biossurfactante	CA2350907	25 de Maio de 2000	Willem P.C. Duyvesteyn, Julia R. Budden, Merijn A. Picavet	Extração e recuperação de betume
Agentes tensoativos por microorganismos exógenos	US7992639	26 de Fevereiro de 2009	Fallon Robert D	MEOR
Surfactantes viscoelásticos	US7052901	20 de Junho de 2002	Crews James B.	MEOR

Fonte: Adaptado de De Almeida *et al.* (2016).

3.10 Utilização do biossurfactante como estabilizador de nanopartículas de prata

A nanotecnologia é a parte da ciência que estuda o desenvolvimento, a caracterização e emprego de estruturas, de dispositivos e de sistemas que possuam suas dimensões na escala de 1 a 100 nm (Taram *et al.*, 2021). Vários são os materiais que constituem essa classe. Dentre eles, estão as nanopartículas, que de maneira especial, são formadas por metais nobres como ouro, prata e cobre, por serem componentes estáveis. A prata coloidal é de interesse particular devido às suas propriedades distintas como alta condutividade, sendo usadas na fabricação de elementos usados em eletrônicos impressos, estabilidade química, atividade antibacteriana, atividade catalítica e capacidade para construção de detectores extremamente sensíveis e seletivos em função da existência do *plasmon* superficial, substrato para espectroscopia *raman* de aumento de superfície devido a sua alta afinidade e adesão às membranas celulares de sistemas biológicos (Baghaienezhad; Boroghani; Anabestani, 2020; Javed *et al.*, 2020). Segundo Desireddy *et al.* (2013), as AgNPs têm um potencial pouco explorado em comparação com nanopartículas de ouro relativamente estáveis. Estudos mostraram que as propriedades físicas, ópticas e catalíticas das AgNPs são fortemente influenciadas por seu tamanho, distribuição, forma morfológica (haste, triângulo, redondo, octaédrico, poliédrico, etc.) e propriedades de superfície que podem ser modificadas por diversos métodos sintéticos, agentes redutores e estabilizadores (Lee; Jun, 2019).

As NPs são compostas por três camadas: (1) a camada superficial, que pode ser funcionalizada com uma variedade de pequenas moléculas, íons metálicos, surfactantes e polímeros; (2) a camada de casca, que é um material quimicamente diferente do núcleo em todos os aspectos; e o (3) o núcleo, que é essencialmente a parte central da NP e geralmente se refere a própria NP (Khan; Saeed; Khan, 2019).

Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para sintetizar nanopartículas, tais como redução química, técnicas eletroquímicas, redução fotoquímica, micelas reversas lamelares, técnicas com aerosol e a técnica por vaporização eletrostática. A redução química é o método mais largamente aplicado na preparação de nanopartículas de prata em dispersões coloidais em água ou solventes orgânicos estáveis (Kumar *et al.*,

2017; Meva *et al.*, 2019). Os redutores comumente utilizados são o borohidreto, o citrato, o ascorbato e o hidrogênio elementar. A redução de íons prata (Ag^+) em solução aquosa geralmente fornece prata coloidal com diâmetro de partícula de vários nanômetros. Essa redução da origem a vários complexos com íons Ag^+ e leva à formação de átomos de prata (Ag^0), a qual é seguida da aglomeração dentro de aglomerado. Esses indesejáveis aglomerados levam, então, à formação das partículas de prata coloidais. Portanto, a síntese de nanopartículas por redução química é sempre acompanhada da presença de estabilizadores que previnam a indesejável aglomeração dos coloides, como polímeros (goma arábica ou amido) e surfactantes.

Com o avanço da indústria, empresas tem despertado interesse por tecnologias “verde”, que tem o intuito de diminuir impactos causados por esse avanço (Durval *et al.*, 2021). Desta forma, para a síntese verde de nanopartículas de prata, tem-se o método de *Tollens*, onde os sacarídeos são usados para reduzirem os íons de prata na presença de amônia (Eswari; Dhagat; Mishra, 2018). Le *et al.* (2010) propôs associar a este método estabilizadores, entre eles surfactantes, para compor a camada superficial, núcleo externo, da NP. Como alternativa biológica e sustentável aos surfactantes químicos, pode-se utilizar os biossurfactantes, que além de estabilizadores, também podem atuar como um agente redutor (funcionalidade dupla) (Jimoh; Lin, 2019).

Biossurfactantes são compostos tensoativos com estruturas bioquímicas diversas produzidos por micro-organismos, podendo ser aplicados industrialmente em processos fermentativos, especialmente utilizando substratos imiscíveis em água como fontes nutricionais (Bezza; Tichapondwa; Chirwa, 2020). Eles apresentam vantagens sobre os similares químicos, como biocompatibilidade, baixa toxicidade, diversidade de aplicações e funcionalidade sob condições extremas (Liu *et al.*, 2020). Baseado nestes fatos, os biossurfactantes, como estabilizadores “verdes”, surgem como excelentes candidatos para a aplicação na síntese de nanopartículas.

3.11 Nanopartícula de prata como agentes antimicrobianos

O principal mecanismo de ação das AgNPs encontrado é devido a sua interação com a membrana celular e posterior penetração das mesmas no interior celular. Em seguida, as nanopartículas dificultam o processo de respiração celular,

impedindo a divisão da célula e levando a sua morte (Bocate *et al.*, 2019). Também devido ao pequeno tamanho das nanoestruturas, essas podem se ligar à superfície da célula sem danificar a parede celular, impedindo-a de continuar com seus processos metabólicos, causando em seguida a morte celular (Salas-Orozco *et al.*, 2019). Outros estudos relatam que as nanopartículas de prata inibem o crescimento dos fungos da mesma forma que nas bactérias, inibindo o crescimento através da deterioração da parede celular e penetração no interior da célula, prejudicando o funcionamento normal das organelas incluindo as mitocôndrias e ribossomos (Bocate *et al.*, 2019). Em um estudo com o fungo *Candida albicans* foi demonstrado a ruptura de sua membrana pelas AgNPs, causando um aumento da permeabilidade celular, levando ao transporte anormal através da membrana plasmática e conseqüentemente, à morte celular (Roblesmartínez *et al.*, 2020).

Nesse cenário, Akther e Hemalatha (2019), avaliaram o efeito biocida das nanopartículas de prata no controle *in vitro* contra a espécie *Raffaelea sp.*, onde foi observado que o crescimento do fungo foi significativamente inibido em função da aplicação das nanoestruturas de prata. Além da inibição, observou-se também efeitos prejudiciais com a germinação dos conídios. O estudo também mostrou o efeito das AgNPs contra outro fungo, a *Candida spp.*, obtendo resultados comparáveis ou até melhor que muitos fungicidas tradicionais, como a tericina B (concentração fungicida mínima (MFC) em torno de 1 mg L⁻¹), itraconazol e voriconazol (MFC em torno de 8 mg L⁻¹) ou caspofungina (MFC em torno de 1 mg L⁻¹).

REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, T. M. et al. Recent advances in green synthesis of silver nanoparticles and their applications: about future directions. A review. **BioNanoScience**, v. 8, p. 5-16, 2018.

ALKAN, Zerrin et al. Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 43, n. 5, p. 676-683, 2019.

AKTHER, Tahira; HEMALATHA, S. Mycosilver nanoparticles: Synthesis, characterization and its efficacy against plant pathogenic fungi. **BioNanoScience**, v. 9, n. 2, p. 296-301, 2019.

BAI, Guiyun; BRUSSEAU, Mark L.; MILLER, Raina M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 25, n. 1-2, p. 157-170, 1997.

BAGHAIENEZHAD, Mahnaz; BOROZHANI, Meshkat; ANABESTANI, Romina. Silver nanoparticles synthesis by coffee residues extract and their antibacterial activity. **Nanomedicine Research Journal**, v. 5, n. 1, p. 29-34, 2020.

BANAT, Ibrahim M. et al. Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. **Bioresource Technology**, v. 320, p. 124222, 2021.

BELTRAN-GRACIA, Esteban et al. Production of lipopeptides by fermentation processes: Endophytic bacteria, fermentation strategies and easy methods for bacterial selection. **Fermentation processes**, p. 199-222, 2017.

BEZZA, Fisseha A.; TICHAPONDWA, Shepherd M.; CHIRWA, Evans MN. Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. **Journal of hazardous materials**, v. 393, p. 122319, 2020.

BOCATE, Karla Paiva et al. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International journal of food microbiology**, v. 291, p. 79-86, 2019.

BRUMANO, Larissa Pereira; SOLER, Matheus Francisco; DA SILVA, Silvio Silvério. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.

CAI, Qinhong et al. A cross-comparison of biosurfactants as marine oil spill dispersants: Governing factors, synergetic effects and fates. **Journal of hazardous materials**, v. 416, p. 126122, 2021.

CHEN, Jihong et al. Oil spills from global tankers: Status review and future governance. **Journal of cleaner production**, v. 227, p. 20-32, 2019.

DA ROCHA JUNIOR, Rivaldo B. et al. Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. **Biodegradation**, v. 30, p. 215-233, 2019.

DA SILVA, Renata Raianny et al. Recent advances in environmental biotechnology: role of biosurfactants in remediation of heavy metals. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e4411527453-e4411527453, 2022.

DAS, A. J. et al. Bacterial biosurfactants can be an ecofriendly and advanced

technology for remediation of heavy metals and co-contaminated soil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 6, p. 1343-1354, 2017.

DRAKONTIS, Constantina Eleni; AMIN, Samiul. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77-90, 2020.

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

DE ALMEIDA, Fabiola Carolina Gomes 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.

DE GUSMAO, Carolina AB; RUFINO, Raquel D.; SARUBBO, Leonie 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, p. 1683-1692, 2010.

DECESARO, Andressa; THOMÉ, Antônio; COLLA, Luciane Maria. Biostimulation of the In Situ Production of Biosurfactants During the Bioremediation of Diesel Oil in Clayey Soil. **International Journal of Environmental Research**, v. 15, n. 6, p. 947-957, 2021.

DURVAL, Italo José B. et al. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, p. 111357, 2020.

DURVAL, Italo José Batista et al. Green synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 as stabilizing agent and its application as an antifungal agent. **Fermentation**, v. 7, n. 4, p. 233, 2021.

ESWARI, J. Satya; DHAGAT, Swasti; MISHRA, Preeti. Biosurfactant assisted silver nanoparticle synthesis: A critical analysis of its drug design aspects. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 4, p. 045007, 2018.

FERNANDES, P. L. et al. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 180, p. 551-557, 2016.

FISHER, Richard M.; GUPTA, Vikas. Heavy metals. In **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2020.

GAJEWSKI, Andrzej. A couple new ways of surface tension determination. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 115, p. 909-917, 2017.

HANFI, Mohamed Y.; MOSTAFA, Mostafa YA; ZHUKOVSKY, Michael V. Heavy metal contamination in urban surface sediments: sources, distribution, contamination control,

and remediation. **Environmental monitoring and assessment**, v. 192, p. 1-21, 2020.

IVSHINA, Irena B. et al. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 7, p. 1201-1219, 2015.

JAHAN, Ruksana et al. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 275, p. 102061, 2020.

JADHAV, Vipra Vijay et al. Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic sea water. **Desalination**, v. 318, p. 64-71, 2013.

JAVED, Rabia et al. Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, p. 1-15, 2020.

JIMOH, Abdullahi Adekilekun; LIN, Johnson. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 184, p. 109607, 2019.

JIMOH, Abdullahi Adekilekun; LIN, Johnson. Biotechnological applications of *Paenibacillus* sp. D9 lipopeptide biosurfactant produced in low-cost substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, p. 921-941, 2020.

JOHNSON, Phillip et al. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. **Advances in colloid and interface science**, v. 288, p. 102340, 2021.

KANNA, Rajesh. Enhanced and cost-effective biosurfactant production for marine remediation contaminated with oil spill. **International Journal of Civil Engineering and Technology**, v. 9, n. 7, p. 373-381, 2018.

KARLAPUDI, Abraham Peele et al. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. **Petroleum**, v. 4, n. 3, p. 241-249, 2018.

KAVITHA, Varadharajan; MANDAL, Asit Baran; GNANAMANI, Arumagam. Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase: an approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 24-30, 2014.

KHAN, Akhtar Ali. Distribution, relative abundance, species diversity and richness of syrphid flies in floricultural ecosystem of Kashmir, India. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 6, p. 1539-1552, 2017.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian journal of chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KUMAR, Brajesh et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract. **Saudi journal of biological sciences**, v. 24, n. 1, p. 45-50, 2017.

KUMAR, P. Senthil et al. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, p. 124827, 2021.

ŁAWNICZAK, Łukasz et al. Microbial degradation of hydrocarbons—basic principles for bioremediation: a review. **Molecules**, v. 25, n. 4, p. 856, 2020.

LEE, Sang Hun; JUN, Bong-Hyun. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, p. 865, 2019.

LI, Haoshuai et al. Solid inoculants as a practice for bioaugmentation to enhance bioremediation of hydrocarbon contaminated areas. **Chemosphere**, v. 263, p. 128175, 2021.

LIU, Guansheng et al. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. **Biotechnology and bioengineering**, v. 115, n. 4, p. 796-814, 2018.

LIU, Kang et al. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 45, p. 57-67, 2020.

LIU, Zhaopeng et al. Efficient sophorolipids production via a novel in situ separation technology by *Starmerella bombicola*. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 1-10, 2019.

LIRA, I. R. A. S. et al. Biosurfactant production from *Candida guilliermondii* and evaluation of its toxicity. **Chemical Engineering**, v. 79, 2020.

LUNA, Juliana M. et al. Production of biosurfactant from *Candida bombicola* URM 3718 for environmental applications. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 583-588, 2016.

LUNA, Juliana Moura; RUFINO, Raquel Diniz; SARUBBO, Leonie Asfora. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558-566, 2016.

MARKETS AND MARKETS. Biosurfactants market by type (glycolipids (sophorolipids, rhamnolipids), lipopeptides, phospholipids, polymeric biosurfactants), application

(detergents, personal care, agricultural chemicals, food processing), and region—Global forecast to 2022. 2017.

MENDES DA SILVA SANTOS, Emilia et al. Enhanced oil removal by a non-toxic biosurfactant formulation. **Energies**, v. 14, n. 2, p. 467, 2021.

MEVA, Francois Eya'ane et al. Stachytarpheta cayennensis aqueous extract, a new bioreactor towards silver nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 10, n. 02, p. 102, 2019.

MISHRA, Sandhya et al. Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 418, p. 126253, 2021.

MOHANTY, Sagarika et al. Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

MORRIS, Byron F.; LOUGHLIN, Thomas R. Overview of the Exxon Valdez oil spill. **Marine mammals and the Exxon Valdez**, p. 1, 2013.

MOSHTAGH, Bahareh; HAWBOLDT, Kelly; ZHANG, Baiyu. Biosurfactant production by native marine bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 11, p. 2386-2397, 2021.

MUHAMMAD, Maria Taj; KHAN, M. Nasiruddin. Eco-friendly, biodegradable natural surfactant (*Acacia Concinna*): An alternative to the synthetic surfactants. **Journal of Cleaner Production**, v. 188, p. 678-685, 2018.

MUNTAHA, Sidra-Tul; KHAN, M. Nasiruddin. Natural surfactant extracted from *Sapindus mukurossi* as an eco-friendly alternate to synthetic surfactant—a dye surfactant interaction study. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p. 145-150, 2015.

OGUNMOKUN, Felix A.; LIU, Zhipeng; WALLACH, Rony. The influence of surfactant-application method on the effectiveness of water-repellent soil remediation. **Geoderma**, v. 362, p. 114081, 2020.

OSTENDORF, Thaís A. et al. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **Journal of biotechnology**, v. 295, p. 71-79, 2019.

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

PATEL, Seema et al. Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 27-37, 2019.

PATOWARY, Rupshikha et al. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 129, p. 50-60, 2018.

PARASZKIEWICZ, Katarzyna et al. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal of environmental management**, v. 209, p. 65-70, 2018.

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

PETE, Amber J.; BHARTI, Bhuvnesh; BENTON, Michael G. Nano-enhanced bioremediation for oil spills: a review. **ACS ES&T Engineering**, v. 1, n. 6, p. 928-946, 2021.

RAMANI, K. et al. Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 254-263, 2012.

RAJASIMMAN, M. et al. Utilization of agroindustrial wastes with a high content of protein, carbohydrates, and fatty acid used for mass production of biosurfactant. In: **Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science**. Elsevier, 2021. p. 127-146.

RINCÓN-FONTÁN, Myriam et al. Design and characterization of greener sunscreen formulations based on mica powder and a biosurfactant extract. **Powder technology**, v. 327, p. 442-448, 2018.

RÍOS, Francisco et al. Ecotoxicological characterization of polyoxyethylene glycerol ester non-ionic surfactants and their mixtures with anionic and non-ionic surfactants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 10121-10130, 2017.

ROBLES-MARTÍNEZ, Marissa et al. *Mentha piperita* as a natural support for silver nanoparticles: A new *Anti-Candida albicans* treatment. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 35, p. 100253, 2020.

ROCHA E SILVA, Nathalia Maria P. et al. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 48, n. 4, p. 267-281, 2019.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, Lorena et al. Biodegradability study of the biosurfactant contained in a crude extract from corn steep water. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 23, n. 1, p. 79-90, 2020.

- SALAS-OROZCO, Marco et al. Mechanisms of resistance to silver nanoparticles in endodontic bacteria: a literature review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2019, 2019.
- SALES DA SILVA, Israel Gonçalves et al. Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. **Energies**, v. 13, n. 18, p. 4664, 2020.
- SANTOS, Danyelle Khadydja F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.
- SANTOS, Danyelle KF et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43-50, 2013.
- SANTOS, 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.
- SARUBBO, Leonie A. et al. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108377, 2022.
- SAYED, Khalid; BALOO, Lavania; SHARMA, Naresh Kumar. Bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) by bioaugmentation and biostimulation in water with floating oil spill containment booms as bioreactor basin. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 2226, 2021.
- SELLAMI, Mohamed et al. Agro-industrial waste based growth media optimization for biosurfactant production by *Aneurinibacillus migulanus*. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578, 2016.
- SHAH, Mansoor UI Hassan et al. A binary mixture of a biosurfactant and an ionic liquid surfactant as a green dispersant for oil spill remediation. **Journal of Molecular liquids**, v. 280, p. 111-119, 2019.
- SHI, Ke et al. Mechanism of degrading petroleum hydrocarbons by compound marine petroleum-degrading bacteria: surface adsorption, cell uptake, and biodegradation. **Energy & Fuels**, v. 33, n. 11, p. 11373-11379, 2019.
- SHI, Zhixin et al. Deep remediation of oil spill based on the dispersion and photocatalytic degradation of biosurfactant-modified TiO₂. **Chemosphere**, v. 281, p. 130744, 2021.
- SILVA, Rita De Cássia FS 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, 2014.
- SILVA, Iverson A. et al. Oil spills: impacts and perspectives of treatment technologies with focus on the use of green surfactants. **Environmental Monitoring and**

Assessment, v. 194, n. 3, p. 143, 2022.

SINGH, Pooja; PATIL, Yogesh; RALE, Vinaykumar. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 1, p. 2-13, 2019.

SOUZA, Karla S. Teixeira et al. Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. **Journal of hazardous materials**, v. 346, p. 152-158, 2018.

SURYAWANSHI, Tejas et al. Utilisation of oil-based waste for biosurfactant production. **International Journal of Environment and Sustainable Development**, v. 20, n. 1, p. 89-104, 2021.

TANG, Jian et al. Removal of heavy metals with sequential sludge washing techniques using saponin: optimization conditions, kinetics, removal effectiveness, binding intensity, mobility and mechanism. **RSC advances**, v. 7, n. 53, p. 33385-33401, 2017.

TARAN, Mojtaba et al. Benefits and application of nanotechnology in environmental science: an overview. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 7860-7870, 2021.

TWIGG, Matthew S. et al. Mono-Rhamnolipid Biosurfactants Synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* Detrimentially Affect Colorectal Cancer Cells. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2799, 2022.

VERA, Ellen Cristina Souza 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.

VIEIRA, Isabela Maria Monteiro et al. Potential of pineapple peel in the alternative composition of culture media for biosurfactant production. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 68957-68971, 2021.

ZANG, Tingting et al. Enhancement of PAHs biodegradation in biosurfactant/phenol system by increasing the bioavailability of PAHs. **Chemosphere**, v. 266, p. 128941, 2021.

ZAMBRY, Nor Syafirah et al. Production of lipopeptide biosurfactant in batch and fed-batch *Streptomyces* sp. PBD-410L cultures growing on palm oil. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 44, p. 1577-1592, 2021.

CAPÍTULO II

Artigo a ser submetido à Revista Processes – Fator de impacto: 3.352

Produção Sustentável de Biossurfactante usando Resíduos Industriais e Aplicação na Descontaminação de Poluentes de Petróleo

Bruna Gabryella Andrade de Lima^{1,3}, Júlio Cesar Vasconcelos dos Santos¹, Renata Raianny da Silva^{2,4}, Hugo Morais Meira^{3,4}, Leonie Asfora Sarubbo^{3,4}, Juliana Moura de Luna^{3,5*}

¹ Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil

² Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

³ Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Recife, Pernambuco, Brasil

⁴ Icam Tech School, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil

⁵ Escola de Saúde e Ciências da Vida, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil

*Corresponding author – juliana.luna@unicap.br

RESUMO

Este estudo investigou a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0988 cultivada em meio contendo 4,0% de melaço, 2,5% de milhocina e 2,5% de óleo de soja residual, durante 144 horas a 200rpm. A caracterização, avaliação da estabilidade, toxicidade e aplicação na remoção de óleo. Nos estudos de crescimento de *C. lipolytica* e de produção de biossurfactante, a tensão superficial do meio foi de 72 mN/m e reduzida para 25 mN/m, Concentração Micelar Crítica (CMC) de 0,5% e um rendimento de 12 g/L. Testes em condições extremas de pH, temperatura e NaCl indicaram a estabilidade do biossurfactante. As estruturas químicas do biossurfactante foram identificadas por Espectroscopia de infravermelho e Ressonância magnética, onde revelou a natureza da molécula. O biossurfactante de natureza aniônica não foi tóxico para o microcrustáceo *Artemia salina* e nem para as sementes de hortaliças testadas. O biossurfactante demonstrou eficiência na remoção do óleo em areia, tanto em ensaio estático, como ensaio cinético, nas concentrações de 1/2CMC, CMC e 2xCMC, apresentando remoção de 70-96%. Os resultados apresentados, indicam

que o biossurfactante tem um forte potencial para ser aplicado como agente de remediação para a limpeza de derramamentos de óleo no mar e na costa.

Palavras-chave: Biorremediação, Biossurfactante; *Candida lipolytica*; Tensão superficial

1. INTRODUÇÃO

Derramamentos de petróleo impactam negativamente ecossistemas. Sejam em ambientes aquáticos ou terrestres, alguns danos são irreparáveis à natureza e prejudica principalmente a população das áreas atingidas (Almeida *et al.*, 2021).

A biorremediação de solos e águas encontra obstáculos associados à biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo, uma vez que esses compostos hidrofóbicos se ligam às partículas do solo e apresentam pouca solubilidade em água, o que reduz biodisponibilidade para os micro-organismos e limita, conseqüentemente, a transferência de massa para a biodegradação (Gaur *et al.*, 2019).

A chave do processo para o aumento da biodisponibilidade dos óleos contaminantes é o transporte da carga poluente para a fase aquosa. Nesse contexto, a utilização de compostos surfactantes surge como alternativa para o aumento da solubilidade dos óleos, permitindo a desorção e conseqüente solubilização dos hidrocarbonetos, facilitando, assim, a assimilação desses compostos pelas células microbianas (Sarubbo *et al.*, 2022).

Estudos mostram que os surfactantes microbianos têm habilidade para solubilizar e mobilizar efetivamente compostos orgânicos adsorvidos no solo (Silva *et al.*, 2022). Alguns surfactantes sintéticos, como o Triton X – 100 e o Tween 80 também apresentam habilidade de aumentar a concentração dos compostos não polares na fase aquosa. Contudo, o uso de surfactantes sintéticos está associado a efeitos tóxicos e à resistência à biodegradação desses compostos (Jahan *et al.*, 2020).

Por outro lado, a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem motivado pesquisas para utilização de biossurfactantes. Embora os biossurfactantes sejam uma alternativa aos surfactantes químicos, seus altos custos do processo ainda dificultam sua produção em escala industrial (Silva *et al.*, 2022).

O desenvolvimento de um processo competitivo a termos de custo é de grande importância, levando em consideração que os custos de produção são significativamente maiores do que os surfactantes sintéticos. Novas abordagens precisam ser exploradas, como a utilização de fontes alternativas. A utilização dessas estratégias reduz de 10 a 80 % dos custos gerais de produção. O emprego de processos biotecnológicos na produção de biossurfactantes são mais rentáveis em longo prazo, visto que, implicam em menos desperdícios de material e energia (Moutinho *et al.*, 2021).

Vários resíduos renováveis e de baixo custo são empregados como substratos para a produção de biossurfactantes, estabelecendo uma estratégia eficaz de redução de custos associada ao gerenciamento de resíduos (Singh; Patil; Rale, 2019). Dessa forma, o potencial microbiano para a produção de biossurfactantes empregando substratos agroindustriais de baixo custo pode tornar o processo de produção global sustentável e econômico (Sodhi *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos) apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, tais como glicolipídios, lipopeptídeos, complexos proteínas - polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, apresentando diversas propriedades e funções fisiológicas entre as várias famílias destes biopolímeros (Marinho *et al.*, 2022).

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicações em vários processos industriais, além da possibilidade de novas aplicações

para estas biomoléculas. Os biossurfactantes são conhecidos como as “moléculas multifuncionais” do novo século (Liu *et al.*, 2020).

Portanto, esse trabalho teve como objetivo, a produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP0998 utilizando resíduos agroindustriais. Foram avaliados suas propriedades, isolamento, caracterização, toxicidade e aplicação na remoção de óleos e derivados de petróleo em ambientes terrestres e marinhos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo

Candida lipolytica UCP 0988 depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco foi testada como produtora do biossurfactante. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio inclinados contendo Yeast Mold Ágar (YMA) sob refrigeração a 5°C e repicadas a cada 30 dias.

2.2 Preparação do inóculo

O inóculo das leveduras foi padronizado, transferindo-se as culturas para um tubo contendo o meio YMA, obtendo -se 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 10^8 células/mL.

2.3 Produção do biossurfactante

A fermentação para a produção do biossurfactante foi realizada em meio contendo 4% de melaço, 2,5% de milhocina e 2,5% de óleo de soja residual e incubados com a suspensão celular de 10^8 células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm, durante 144 horas, pH 5,5.

2.4 Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, as amostras foram centrifugadas a 4500g durante 15 minutos e, em seguida, analisadas segundo a metodologia proposta por Cooper and Goldenberg (1987).

2.5 Curva de Crescimento

Alíquotas foram coletadas nos intervalos de 2, 4, 6, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 96, 120 e 144 horas ao longo da fermentação e submetidas à filtração, seguida por centrifugação (4500rpm e 9 ° C por 15 min), em seguida, líquidos metabólicos livres de células foram usados para a determinação da tensão superficial, pH e rendimento em biossurfactante. Para determinação da biomassa por peso seco, 50 mL da cultura foram inicialmente centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Após centrifugação, a biomassa foi secada em estufa a 105 °C por 24 horas e pesada (Lira *et al.*, 2022).

2.6 Avaliação da estabilidade do biossurfactante (efeitos do pH, da adição de NaCl, da temperatura)

Os efeitos de diferentes temperaturas (5°C, 70°C, 100°C e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 %), de diferentes pHs (2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,0), o biossurfactante foi avaliado para determinação da tensão superficial e da atividade de emulsificação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.7 Determinação da tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC)

A tensão superficial foi medida em tensiômetro KSV Sigma 700 (Finland) utilizando-se o anel de NUOY. A CMC do biossurfactante foi determinada automaticamente por medidas das tensões superficiais de uma amostra de água gradativamente adicionada do surfactante até se atingir um valor constante de tensão.

O valor da CMC foi determinado como g/L do biossurfactante extraído (Santos et al., 2021).

2.8 Isolamento do biossurfactante

O líquido metabólico foi extraído utilizando acetato de etila repetindo três vezes o processo. Em seguida o solvente foi transferido para um funil de separação, descartando a fase aquosa e a fase do solvente foi seco usando sulfato de sódio e em seguida filtrado e evaporado (Pinto *et al.*, 2022).

2.9 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}).

2.10 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

O biossurfactante extraído foi redissolvido em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os respectivos espectros de ^1H RMN foram registados em $25\text{ }^\circ\text{C}$ 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).

2.12 Toxicidade do biossurfactante frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Os testes de toxicidade para micro-crustáceos foram realizados com *Artemia salina* (larva de camarão), comumente usada como bioindicador marinho. Para o teste foi utilizado 1 litro de solução salina, composto por 33 gramas de sal marinho dissolvido. Após incubação dos micro-crustáceos, eles foram dispostos de 10 em 10 em soluções do biossurfactante com concentrações de 25%, 50% e 75% em água destilada (Silva *et al.*, 2010).

2.13 Teste de fitotoxicidade do biossurfactante

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*) (Tiquia *et al.*, 1996). Soluções teste dos biossurfactantes isolados foram preparados em água destilada em diferentes concentrações (1/2xCMC, 1xCMC e 2xCMC). Após, cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o crescimento da raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

Germinação relativa da semente (%) = $(n^{\circ}$ de sementes germinadas no extrato / n° de sementes germinadas no controle) x 100

Comprimento relativo da raiz (%) = $(\text{média do comprimento da raiz no extrato} / \text{média do comprimento da raiz no controle}) \times 100$

IG = $[(\% \text{ germinação da semente}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})] / 100\%$

2.14 Teste de dispersão de óleo em água do mar

Este ensaio foi realizado adicionando 40 mL de água a uma placa de Petri com diâmetro de 15 cm, o biossurfactante bruto e isolado nas concentrações (1/2 CMC (0,25%), CMC (0,5%) e 2XCMC (1,0%) foram testados. O poder de dispersão do biossurfactante foi avaliado. Os resultados dos experimentos em triplicata foram expressos como o diâmetro médio das zonas claras que apareceram nas placas de Petri, e o índice de dispersão foi definido como a porcentagem do diâmetro médio em relação ao diâmetro da placa (15 cm) (Santos *et al.*, 2021).

2.15 Experimentos de lavagem de composto hidrofóbico adsorvidos em pedra

A remoção de óleo foi realizada embebendo-se o material nos contaminantes até completa cobertura do mesmo, anotando-se o volume gasto. Em seguida, o material foi cuidadosamente colocado, com auxílio de uma pinça, em um becker de 100mL, o qual foi submetido aos seguintes tratamentos: adição do biossurfactante isolado na 1/2CMC (0,25%), CMC (0,5%), 2XCMC(1,0%) e no biossurfactante bruto. Os volumes gastos foram anotados e os percentuais obtidos na lavagem foram calculados. A

quantidade de óleo remanescente foi determinada no sólido lavado, por gravimetria, após extração com hexano, e expressa em percentual.

2.16 Aplicação de tensoativos químicos e biossurfactantes na remoção de óleo de motor de areia por meio de ensaio cinético.

Amostras de areia normal para ensaio de cimento NBR 7214 (ABNT, 1982), cuja matéria orgânica é expressa em termos de ácido tânico, num nível não superior a 100 partes por milhão, onde a mesma foi retida entre as peneiras de abertura nominal de 0,3 mm a 0,15 mm (denominação fina).

Amostras de 50 g de areia padrão foi contaminada com 10% de óleo de motor e transferidas para Erlenmeyers de 500 mL, submetidas a autoclavagem, e posteriormente, 100 mL de cada solução de surfactante adicionada ao frasco contendo o solo contaminado. O biossurfactante e os surfactantes sintéticos (Tween 20 e Tween 80) 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 (100 mL). Um frasco contendo a areia e 100 mL de água, sem adição dos surfactantes, foi utilizado como controle. Os frascos foram agitados a uma velocidade de agitação de 150 rpm durante por 24h a 28°C. Após o tratamento, a areia tratada e a solução de lavagem foram separadas para análise (Santos *et al.*, 2021).

2.17 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 e dos surfactantes sintéticos. O biossurfactante e os surfactantes sintéticos (Tween 20 e Tween 80) 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. A percolação das soluções dos surfactantes foi monitorada em intervalos de 5 minutos ao longo de 24 horas. Ao final de cada lavagem, o conteúdo do Erlenmeyer foi deixado em repouso por 5 min. Em seguida, a solução de lavagem foi separada com auxílio de uma pipeta e a areia remanescente no Erlenmeyer foi lavada com água destilada para remoção de restos de óleo das paredes do Erlenmeyer e de restos da solução de surfactante da areia (Santos *et al.*, 2021).

2.18 Análise dos contaminantes na areia

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de crescimento e produção de biosurfactante

Os biosurfactantes apresentam vantagens sobre os surfactantes químicos por serem biodegradáveis, apresentarem baixa toxicidade e por serem obtidos de fontes naturais. Todavia, os processos que envolvem a produção dos biosurfactantes ainda apresenta alto custo, causando uma desvantagem em comparação com a produção de surfactantes sintéticos (López-Prieto *et al.*, 2021). Com isso, é importante e necessário à busca por alternativas mais rentáveis para essa produção. Tendo isso em vista, algumas estratégias têm sido utilizadas para tornar sua produção mais econômica, como a utilização de substratos de baixo custo, resíduos industriais têm despertado grande interesse de pesquisadores como alternativa para o fornecimento

de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes (SARUBBO et al., 2022).

O crescimento e a produção de biossurfactante por *C. lipolytica* em meio contendo 4,0% de melaço, 2,5% de milhocina e 2,5% de óleo de fritura residual, foi avaliado durante 6 dias.

A curva de crescimento (Figura 1) demonstrou uma fase exponencial em um período de 5 h–12 h de cultivo. A produção máxima de biomassa foi de 9,0 g/L após 120 h de cultivo. A produção máxima de biossurfactante foi de 12g/L e ocorreu na fase estacionária de crescimento. A tensão superficial do meio foi reduzida de 55 mN/m para 28 mN/m após 144 horas e o pH houve um aumento a partir de 24 horas.

De acordo com a literatura, a maioria das espécies de *Candida* tem demonstrado capacidade de produzir biossurfactantes eficientes. Rufino *et al.* (2014) avaliaram o crescimento de *C. lipolytica* UCP 0988 em meio mineral suplementado com 6 % de resíduo de refinaria de óleo de soja e 1 % de ácido glutâmico para produção de biossurfactante. Após 72 h de cultivo, a tensão superficial do caldo livre de células foi reduzida de 55 para 25 mN/m e o rendimento de biossurfactante foi de 8,0 g/L.

Em outro trabalho, Luna *et al.* (2013) estudaram um biossurfactante produzido com *C. sphaerica* usando um meio contendo 9% de resíduo de refinaria de óleo de amendoim e 9% de milhocina. Eles obtiveram um rendimento de biossurfactante de 9 g/L e uma tensão superficial de 25 mN/m após 144h.

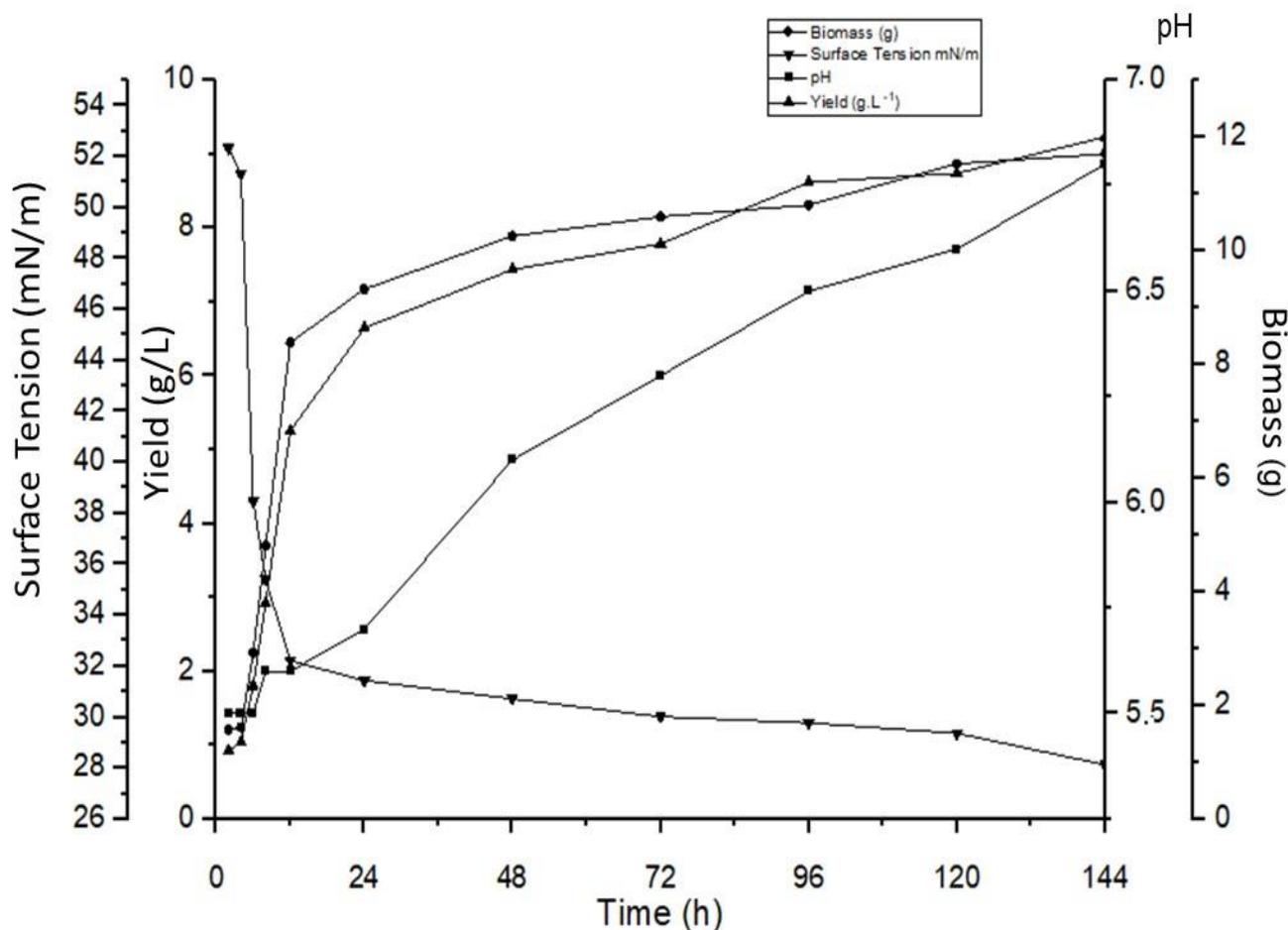
De acordo com Akbari *et al.* (2018), um biossurfactante eficaz é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m.

De acordo com Asgher *et al.* (2020), a chave para a produção de biossurfactante é a otimização do bioprocessamento que consequentemente influencia no rendimento total da produção. Existe uma variedade de fatores que influenciam na produção do biossurfactante, a acessibilidade a fontes de carbono e nitrogênio colaboram fortemente na produção.

Silva *et al.* (2021) observaram que após a produção de um biossurfactante comercial utilizando a levedura *Starmerella bombicola* em meio contendo 50 g/L de óleo de algodão, 25 g/L de glicose, 1 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O e 0,3 g/L de NaNO₃ a tensão superficial foi reduzida para 32 mN/m, e o biossurfactante isolado utilizando acetato de etila como solvente de extração apresentou rendimento de 32,5 g/L.

Silva *et al.* (2022), produziu meio contendo água destilada suplementada com 5,0 % de melação, 3,0 % de milhocina e 2,5 % de óleo de fritura residual.

Figura 1 - Curva de crescimento, tensão superficial de pH e produção de biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em água destilada suplementada com 5,0% de gordura animal e 2,5% milhocina durante 144 h a 200 rpm e 28°C



3.2 Estabilidade do biossurfactante relacionada ao índice de emulsificação

Uma das características mais importantes dos surfactantes microbiológicos, que o tornam uma excelente alternativa aos surfactantes sintéticos, é a sua alta tolerância a condições ambientais extremas. Assim, estudar a estabilidade do biossurfactante é fundamental, visto a influência que fatores como pH, temperatura e

salinidade exercem sobre os biotensoativo, uma vez que a estabilidade é um parâmetro para considerar a aplicação dessas moléculas em diversas áreas, sobretudo, a ambiental, onde os fatores do ambiente estão constantemente em mudança (Somoza-Coutiño *et al.*, 2020; Saubbo *et al.*, 2022).

Os resultados da atividade de emulsificação demonstraram uma elevada afinidade do biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células) com o óleo de motor, o qual, independentemente das condições ambientais testadas, ou seja, variações de temperatura, pH e adição de NaCl foi bem emulsificado (Tabela 1).

Tabela 1 - Estabilidade da emulsificação do óleo de motor pelo biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em água destilada suplementada com 4,0% de melaço, 2,5% óleo de fritura e 2,5% de milhocina como substratos frente a variações de temperatura, de pH e na presença de NaCl

NaCl (%)	Emulsificação do óleo de motor (%)	Temperatura (°C)	Emulsificação do óleo de motor (%)	pH	Emulsificação do óleo de motor (%)
0	92±1,4	0	88±1,5	2	90±1,1
2	92±1,3	5	88±1,1	4	91±1,1
4	90±1,8	28	90±1,8	6	90±1,7
6	90±1,2	70	90±2,0	8	90±1,2
8	90±1,4	100	90±1,2	10	90±1,5
10	90±1,1	120	90±1,3	12	90±1,2

Da Rocha Junior *et al.* (2019) utilizaram *C. tropicalis* na produção de um biossurfactante em meio de crescimento contendo 4,0 % de milhocina, 2,5 % de melaço e 2,5 % de óleo de canola e obtiveram resultados semelhantes em relação a estabilidade de emulsificação, os testes de emulsificação demonstraram afinidade entre o líquido metabólico e o óleo de motor, e a estabilidade constante da emulsificação ficou em torno de 92 % nas faixas de temperatura e pH testados.

3.3 Estabilidade do biossurfactante relacionada à tensão superficial

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 144 horas de cultivo quanto a diferentes valores de pH, temperatura e na presença de NaCl em função da tensão superficial da biomolécula (Figura 2).

Os testes realizados com o líquido metabólico livres de células, não apresentou variações quanto as mudanças de pH, demonstrando que o biossurfactante obtido não apresentou mudanças significativas na tensão superficial (Figura 2A).

O biossurfactante se mostrou estável nas temperaturas testadas, como pode ser observado (Figura 2B).

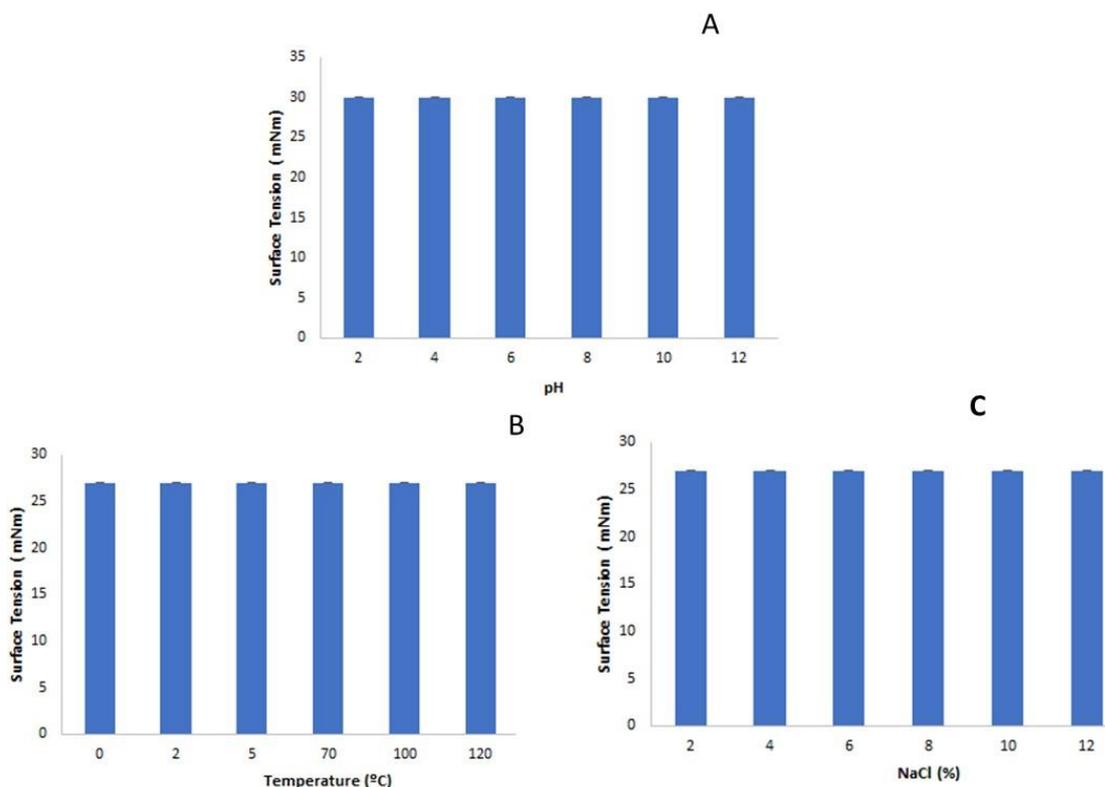
Com relação a variação de temperatura do biossurfactante à adição de NaCl (Figura 2C). A tensão superficial no líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante foi estável, independentemente da concentração de sal adicionado.

Comparando os resultados com a literatura, a influência da salinidade foi avaliada em função da possibilidade de uso do biossurfactante produzido em ambientes marinhos. Considerando que a maior salinidade encontrada no mundo é de 3% (Millero *et al.*, 2008).

O biossurfactante de *C. lipolytica* foi capaz de manter a capacidade de reduzir a tensão superficial na presença de até 12% de sal.

O biossurfactante obteve resultados semelhantes aos de Santos *et al.* (2021), com estabilidade na tensão superficial quando exposto a diferentes valores de pH, temperaturas e concentrações de valores de NaCl testados durante todo o tempo de armazenamento, quando comparado ao controle.

Figura 2 - Estabilidade da tensão superficial do biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em água destilada suplementada com em 4,0% de melaço, 2,5% óleo de fritura e 2,5% de milhocina como substratos frente a variações de na presença pH (A), temperatura (B) e adição de NaCl (C)



3.4 Concentração Micelar Crítica

O biossurfactante produzido por *C. lipolytica* apresentou excelente capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão da água foi reduzida de 72 mN/m para 28 mN/m com o aumento da concentração do biossurfactante para 0,5 %, ou seja, indicando que a CMC foi atingida.

O biossurfactante de *C. lipolytica* demonstrou uma CMC menor em comparação com outros biossurfactantes produzidos, por exemplo *Candida utilis* (0,6 %) (RIBEIRO et al., 2019), *Saccharomyces cerevisiae* (0,8 %) (RIBEIRO et al., 2020) e *Yarrowia lipolytica* (1,2 %) (Radha et al., 2020). De acordo com Kumar et al. (2021) os biossurfactantes tem sido aplicado na redução da tensão superficial e/ou interfacial entre a solução e a superfície, nas interfaces ar/água ou óleo/água. A adição de um surfactante em um sistema ar/água ou óleo/água ocasiona uma redução na tensão superficial até um ponto em que eles formam estruturas micelares, vesículas e bicamadas. Este ponto crítico é conhecido como concentração micelar crítica (CMC).

O baixo peso molecular de surfactantes produzidos e sintetizados por

microrganismos apresentam uma grande capacidade na redução da tensão superficial, por outro lado, o alto peso molecular está relacionado à capacidade de formar uma emulsão estável. Segundo Twigg et al. (2020), a CMC é a concentração de um composto tensoativo em solução no momento que acontece a formação de micelas.

Rocha Junior et al. (2019) utilizaram *C. tropicalis* na produção de um biossurfactante em meio de crescimento contendo 4,0 % de milhocina, 2,5 % de melaço e 2,5 % de óleo de canola e obtiveram um CMC 0,5%.

3.5 Carga Iônica do biossurfactante

O biossurfactante produzido por *C. lipolytica* mostrou carga negativa na região hidrofílica após a análise em zeta potenciômetro, com -97.9 ZPmV, 282.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à 22.4 °C, indicando que é um surfactante aniônico. Comparando com a literatura, outros biossurfactantes produzidos por espécies de *Candida* também apresentaram caráter aniônico quando submetidos ao mesmo teste (Sobrinho et al., 2008; Luna et al., 2014; Rocha Júnior et al., 2019; Pinto et al., 2022).

3.6 Caracterização estrutural do biossurfactante

O biossurfactante isolado de *C. lipolytica* foi caracterizado por FT-IR e análises de RMN. O espectro IR (Figura 3) mostrou uma região de estiramento entre as faixas de 3000-3500 cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxila em um ácido carboxílico juntos. O grupo carbonila (C=O) foi detectado em 1562 cm^{-1} e o carbono alifático (C-O) ligações em 2851-2922 cm^{-1} regiões. O RMN (Figura 4) sugeriu a presença de hidrogênio próximo ao grupo de ácido carboxílico em 10-12 ppm, perto de ligações duplas em 5-6 ppm. O RMN (Figura 5) confirma os resultados anteriores mostrando um pico característico de ácido carboxílico em 180 ppm, picos de ligações duplas entre 120-140 ppm e carbonos alifáticos na região de 10-40 ppm. Este resultado sugere que a biomolécula do surfactante é um tipo de ácido carboxílico metabolizado provavelmente ligado a carboidratos, como descrito para outros biossurfactantes produzidos por leveduras, que são glicolipídios.

Figura 3 - Espectro FT-IR do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* UCP0988 cultivada em meio contendo 4% de melaço, 2,5% de milhocina, enriquecida de 2,5% de óleo de soja residual.

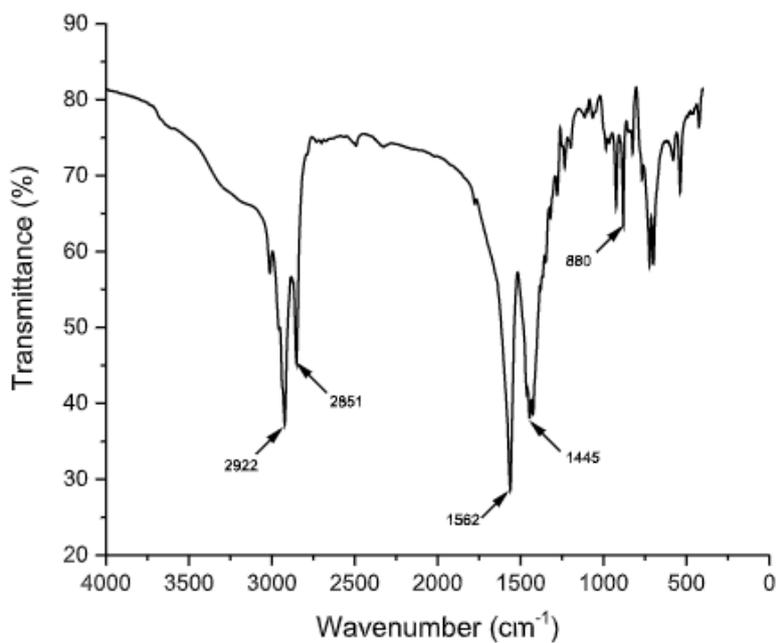


Figura 4 - Espectro de RMN do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* UCP0988 cultivada em meio contendo 4% de melaço, 2,5% de milhocina, enriquecida de 2,5% de óleo de soja residual.

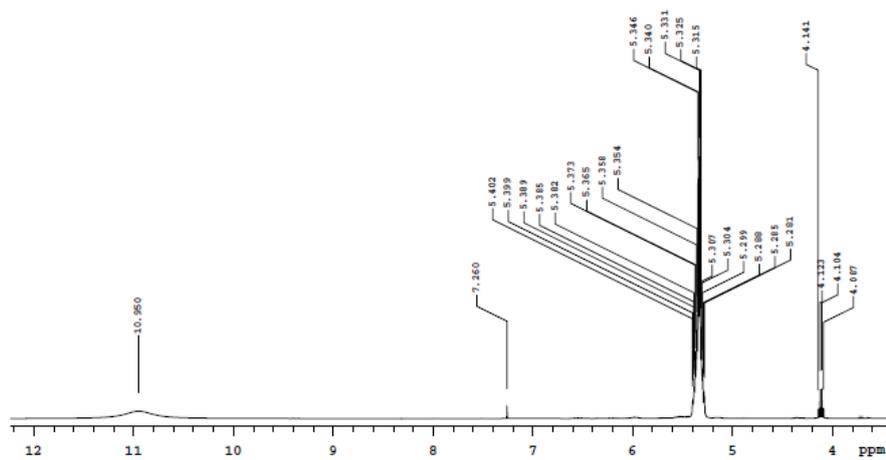
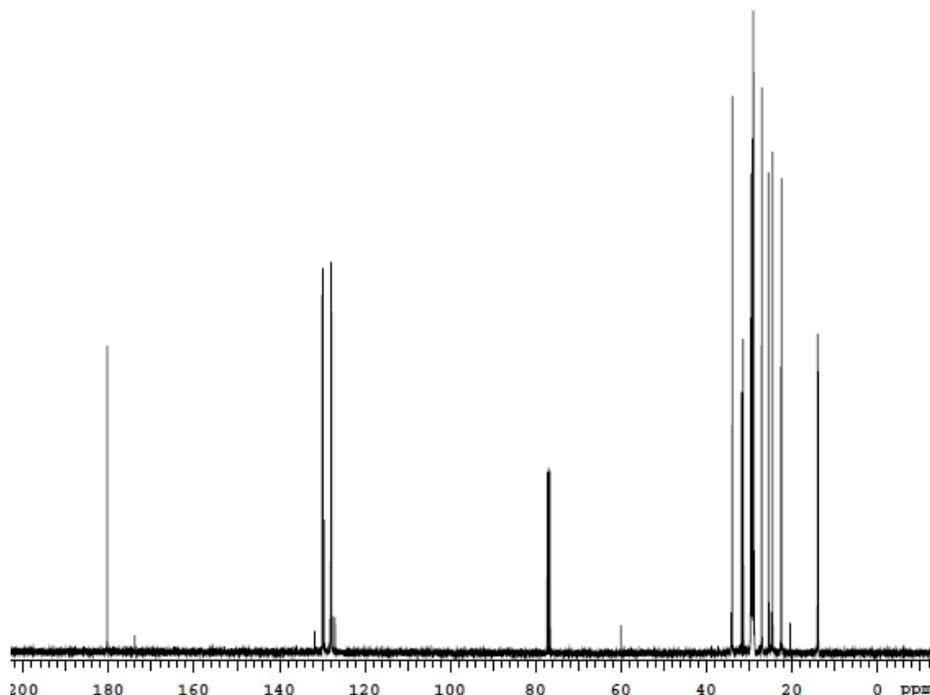


Figura 5 - Espectro de RMN do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* UCP0988 cultivada em meio contendo 4% de melaço, 2,5% de milhocina, enriquecida de 2,5% de óleo de soja residual



3.7 Teste de Fitotoxicidade do Biossurfactante

Toxicidade pode ser definida como a capacidade de uma substância causar um efeito prejudicial em um organismo vivo, que depende na concentração e propriedades do produto químico ao qual o organismo está exposto e o tempo de exposição (Werrie *et al.*, 2020). A toxicidade do biossurfactante foi testada nas sementes do repolho (*Brassica oleracea*). Os resultados demonstram que os diferentes tratamentos de solução do biossurfactante não causaram efeito inibitório na germinação das sementes e no crescimento das raízes. Os índices de germinação variaram em 99%, 98% e 95% para as soluções de $\frac{1}{2}$ CMC, 1 CMC e 2 XCMC, respectivamente.

A literatura considera um Índice de Germinação (IG) mínimo de 80% para indicar ausência de fitotoxicidade. O resultados obtidos neste trabalho, mostraram que o biossurfactante de origem microbiológica, nas diluições testadas (CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2x CMC) não apresentou efeito inibitório na germinação.

Santos *et al.* (2021), também estudaram a toxicidade do biossurfactante de *C. lipolytica* e os resultados demonstraram que os diferentes tratamentos de solução do biossurfactante não causaram efeito inibitório na germinação das sementes e no

crescimento das raízes. Os índices de germinação variaram em 100, 90, 98 e 95% para as soluções de líquido metabólico, ½ CMC, CMC e 2XCMC, respectivamente.

3.8 Teste de Toxicidade do Biossurfactante frente ao Microcrustáceo *Artemia Salina*

A toxicidade contra organismos aquáticos pode causar irreparáveis danos aos seres vivos do local. *Artemia salina* é um ser vivo marinho, utilizado como padrão em estudos sobre ecotoxicologia, isso é devido à viabilidade de manutenção em escala de laboratório, condições de crescimento simples e um ciclo de vida curto (PINTO *et al.*, 2022). Após exposição ao biossurfactante (½ CMC, CMC e 2x CMC) por 24h, larvas de *Artemia salina*, apresentaram taxa de sobrevivência de 100%. Esses resultados, que indicam que não apresentou toxicidade nas condições testadas. Resultados encontrados por Luna *et al.* (2013) e Rufino *et al.* (2014), que indicaram baixa toxicidade.

Pinto *et al.* (2022) utilizou o biossurfactante produzido a partir da *C. bombicola*, amostras em 0,5% e 1%, a taxa de letalidade foi 50 e 100% respectivamente. Enquanto o biossurfactante isolado não exibiu taxas letais significativas.

3.9 Teste de dispersão de óleo motor em água

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 (Silva *et al.*, 2022).

Os melhores resultados de dispersão foram obtidos para o biossurfactante bruto que apresentou capacidade de dispersão de 100% do óleo, seguindo do biossurfactante isolado na concentração 2x CMC dispersou 95% o óleo, indicando alta atividade de superfície. Os resultados na concentração da CMC e ½ CMC foram, respectivamente, 68,23 e 32,09 %.

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.

3.10 Experimentos de lavagem de composto hidrofóbico adsorvidos em pedra

Poucos são os métodos adequados para a realização de uma limpeza efetiva de recifes de corais contaminados, tendo em vista que estes são ecossistemas extremamente delicados e de difícil acesso. O uso de dispersantes pode ser um método atrativo quando algum outro ecossistema sensível próximo está sendo ameaçado por poluentes hidrofóbicos, como por exemplo, o manguezal (Almeida *et al.* 2021).

Os testes foram realizados com o biossurfactante bruto, bem como o biossurfactante isolados. Os resultados obtidos para a remoção de óleo apresentaram valores de 100% de remoção para o líquido metabólico, 34% para o biossurfactante na 1/2CMC, 67% na concentração CMC e 96% de remoção para o biossurfactante em 2XCMC, mostrando a viabilidade de sua aplicação como dispersante biológico para remover poluentes hidrofóbicos em ecossistemas sensíveis como recifes de coral.

De acordo com a literatura Luna *et al.* (2016) avaliaram a capacidade de remoção do biossurfactante de *C. sphaerica* mostrando uma remoção de 70% do óleo de motor adsorvido em uma superfície porosa. Em outro estudo, foi relatada a taxa de remoção de 60% de óleo de motor em superfícies porosas com biossurfactante bruto, demonstrando o potencial do biossurfactante de *C. sphaerica* como dispersante (Sobrinho *et al.*, 2013).

3.11 Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio cinético.

A Tabela 2 apresenta os resultados da remoção de óleo de motor adsorvido

em areia pelo biossurfactante produzido por *C. lipolytica* em ensaio cinético. Pode-se observar que a maior concentração do biossurfactante isolado, influenciou o percentual de remoção, demonstrando o aumento da capacidade de solubilização do óleo presente na areia, pelo biossurfactante de *C. lipolytica*. Os maiores percentuais de remoção 70% e 61% foram obtidos para a condição contendo a concentração de 2X CMC e CMC.

Tabela 2 - Percentual de remoção do contaminante hidrofóbico, pelo biossurfactante de *C. lipolytica* em ensaio cinético

Agente de Remoção	Remoção de óleo (%)
Controle (água destilada)	10%
Tween 20	8%
Tween 80	14%
Biossurfactante bruto	50%
Solução isolada de biossurfactante a ½ CMC	50%
Solução isolada de biossurfactante a CMC	61%
Solução isolada de biossurfactante a 2X CMC	70%

Os estudos realizados por Durval (2021), utilizando um biossurfactante produzido por *B. cereus*, encontraram taxas de remoção superiores a 80%, com remoção máxima de 84% obtida com o biossurfactante isolado a 2xCMC.

Santos *et al.* (2021), demonstrou que o biossurfactante produzido por *C. sphaerica* obteve os maiores percentuais de remoção (90%) quando submetidos a concentração de biossurfactante de 2XCMC no período de 90 dias. A agitação aplicada ao processo de remoção promoveu aumento nas taxas de remoção, demonstrando como a ação mecânica pode auxiliar na descontaminação.

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

3.12 Remoção do contaminante hidrofóbico em areia pelos surfactantes em ensaio estático.

Nesse trabalho, uma coluna de vidro foi preenchida com areia e usada para estudar o efeito dos surfactantes sintéticos Tween 20 e Tween 80 e do biossurfactante produzido pela *C. lipolytica* na solubilização do óleo.

O biossurfactante bruto e o isolado 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, ½ CMC e 2x CMC, obtiveram remoção de 38%, 20%, 85% respectivamente (Tabela 3).

O biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células) produzido a partir de *C. lipolytica* também foi testado para avaliar a remoção do óleo, onde pode-se observar uma remoção de 50%. 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.

Os resultados obtidos para os surfactantes químicos Tween 20 e Tween 80 apresentaram remoção do óleo motor, de 10 e 18% respectivamente, quando comparados com o biossurfactante produzido pela *C. lipolytica*.

Tabela 3 - 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%± 0,3
Tween 20	10%± 0,4
Tween 80	18%± 0,5
Biossurfactante bruto	17%± 0,2
Solução isolada de biossurfactante a 1/2CMC.	20,0± 0,2
Solução isolada de biossurfactante a CMC.	38%± 0,4
Solução isolada de biossurfactante a 2X CMC	85%± 0,4

De acordo com Santos *et al.* (2019), o biossurfactante produzido pela *C. sphaerica* também foi capaz de remover o óleo de motor adsorvido na areia no teste estático das colunas, para a $\frac{1}{2}$ CMC, CMC e 2x CMC, obtiveram aproximadamente, 30%, 48%, 70% respectivamente.

Estudos realizados por Rufino *et al.* (2013), 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: Tween 80 (12%), líquido metabólico livre de células (26%), biossurfactante na CMC (33%) e biossurfactante em três vezes a CMC (37%) respectivamente.

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.

CONCLUSÃO

O biossurfactante produzido por *C. lipolytica* cultivado em meio de baixo custo não apresentou toxicidade e apresentou não apenas boa redução da tensão superficial e rendimento do biossurfactante, mas também uma excelente estabilidade sob condições extremas, 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.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brasil.

REFERÊNCIAS

AKBARI, S. *et al.* Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 2, n. 1, p. 81-90, 2018.

ALMEIDA, D.G. *et al.* Production, Characterization and Commercial Formulation of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP0996 and Its Application in Decontamination of Petroleum Pollutants. *Processes*, v. 9, n. 5, p. 885, 2021.

ASGHER, M. *et al.* Optimization of biosurfactant production from chemically mutated strain of *Bacillus subtilis* using waste automobile oil as low-cost substrate. *Environmental Sustainability*, v. 3, n. 4, p. 405-413, 2020.

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.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 224-229, 1987.

DURVAL, I. J.B. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 as stabilizing agent and its application as an antifungal agent. *Fermentation*, v. 7, n. 4, p. 233, 2021.

FERREIRA, I.N.S. *et al.* Biosurfactant and bioemulsifier as promising molecules produced by *Mucor hiemalis* isolated from Caatinga soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 47, p. 51-58, 2020.

Fiskesjo, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 1985, 12, 99–112.

FRAGA, J.L. *et al.* Valorization of urban waste oil by microbial conversions. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, v. 4, p. 100145, 2021.

GAUR, V.K. et al. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresource technology*, v. 285, p. 121314, 2019.

Gudiña, E.J, 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.

JAHAN, R. *et al.* Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 275, 2020.

JAMIR, L. *et al.* Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. *Environmental Technology Reviews*, v. 10, n. 1, p. 131-142, 2021.

LIU, K. *et al.* Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 45, p. 57–67, 2020.

LIRA, I.R.A.S. *et al.* Biosurfactant Production from *Candida Guilliermondii* and Evaluation of Its Toxicity. *CHEMICAL ENGINEERING*, v. 79, 2020

LÓPEZ-PRIETO, A. *et al.* Characterization of extracellular and cell bound biosurfactants produced by *Aneurinibacillus aneurinilyticus* isolated from commercial corn steep liquor. *Microbiological Research*, v. 242, p. 126614, 2021.

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.

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.

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.

MARINHO, P.S.S.; SILVA, R.R.; LUNA, J.M. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 12, e103111234123, 2022.

MILLERO, FRANK J.; FEISTEL, RAINER; WRIGHT, DANIEL G.; MCDUGALL, TREVOR J. (janeiro de 2008). "A composição da água do mar padrão e a definição da escala de salinidade de composição de referência". *Deep Sea*

Research Parte I: Documentos de Pesquisa Oceanográfica . **55** (1): 50–72. Código Bib: 2008DSRI...55...50M . doi : 10.1016/j.dsr.2007.10.001

MOUTINHO, L. F. *et al.* Microbial biosurfactants: a broad analysis of properties, applications, biosynthesis, and techno-economical assessment of rhamnolipid production. *Biotechnology Progress*, v. 37, n. 2, p. e3093, 2021.

NEHAL, N.; SINGH, P. Role of nanotechnology for improving properties of biosurfactant from newly isolated bacterial strains from Rajasthan. *Materials Today: Proceedings*, n. xxxx, 2021.

RADHA, P. *et al.* Chicken tallow, a renewable source for the production of biosurfactant by *Yarrowia lipolytica* MTCC9520, and its application in silver nanoparticle synthesis. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 23, n. 1, p. 119-135, 2020.

RIBEIRO, B. G. *et al.* Production and optimization of the extraction conditions of a biosurfactant of *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential of application in the food industry. *Chemical Engineering Transactions*, v. 74, p. 1477-1482, 2019.

RIBEIRO, B.G.; GUERRA, J.M.C.; SARUBBO, L.A. Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 434, 2020.

ROCHA JUNIOR, R.B. *et al.* Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. *Biodegradation*, v. 30, n. 4, p. 215-233, 2019.

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

SANTOS, E. F. *et al.* Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces* sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 17, p. 142-150, 2019.

SANTOS, J.C.V. *et al.* Application of *Candida lipolytica* Biosurfactant for Bioremediation of Motor Oil from Contaminated Environment. *Chemical Engineering Transactions*, v. 86, p. 649-654, 2021.

SANTOS J.C.V., da S. Santos E.M., da Silva Y.A., Lira I.R.A.D.S., Raianny Silva R., Durval I.J.B., Sarubbo L.A., Luna J.M., 2021, Application of *Candida Lipolytica*. Biosurfactant for Bioremediation of Motor Oil from Contaminated Environment, *Chemical Engineering Transactions*, 86, 649-654

SANTOS, E.M.S. *et al.* Enhanced Oil Removal by a Non-Toxic Biosurfactant Formulation. *Energies*, v. 14, n. 2, p. 467, 2021.

SARUBBO L.A *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochem Eng J*, v.18, 2022.

SILVA, S. N. R. L. *et al.* Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, n. 1, p. 174-183, 2010.

SILVA, André Felipe *et al.* Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, n. 10, p. 2003-2034, 2021.

SILVA, R.R. *et al.* Recent advances in environmental biotechnology: role of biosurfactants in remediation of heavy metals. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 5, e4411527453, 2022.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of applied microbiology*, v. 126, n. 1, p. 2-13, 2019.

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.

SOBRINHO, H.B.S. *et al.* Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 16, n. 4, p. 4-4, 2013.

SODHI, Abhinashi Singh *et al.* Insights on sustainable approaches for production and applications of value added products. *Chemosphere*, v. 286, p. 131623, 2022.

SOMOZA-COUTIÑO, G. *et al.* A bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* B0406 pathogen opportunistic, produce a biosurfactant with tolerance to changes of pH, salinity and temperature. *Microbial Pathogenesis*, v. 139, p. 103869, 2020.

Tiquia, S.M.; Tama, N.F.Y.; Hodgkis, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent ping-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* 1996, 93, 249–256.

TWIGG, M.S. *et al.* Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology*, v. 14, n. 1, p. 147-170, 2020.

WERRIE, P.-Y. *et al.* Phytotoxicity of essential oils: opportunities and constraints for the development of biopesticides. A Review. *Foods*, v. 9, n. 9, p. 1291, 2020.

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido à Revista Processes – Fator de impacto: 3.352

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Prata Estabilizadas com Biossurfactante e Aplicação como Agente Antimicrobiano

Bruna Gabryella Andrade de Lima¹, Renata Raianny da Silva², Hugo Morais Meira^{3,4}, Italo José Batista Durval^{3,4}; Alessandro Alberto Casazza⁵, Attilio Converti⁵, Leonie A. Sarubbo^{3,4}, Juliana M. Luna^{4,5*}

¹Master's Degree in Environmental Process Development, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, Pernambuco, Brazil; e-mail: brunagabryella57@gmail.com (B.G.A.L)

²Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil; renatabiology2015@gmail.com (R.R.S)

³Icam Tech School, Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, Pernambuco, Brazil; hugo_morais15@hotmail.com (H.M.M.); italo.durval@gmail.com (I.J.B.D.); leonie.sarubbo@unicap.br (L.A.S.)

⁴Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Rua Potira de Brito, 216, 50070-280, Boa vista, Recife, Pernambuco, Brazil; hugo.meira@iati.org.br (H.M.M.); italo.durval@gmail.com (I.J.B.D.); leonie.sarubbo@iati.org.br (L.A.S.); juliana.luna@unicap.br (J.M.L.)

⁵School of Health and Life Sciences, Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, Pernambuco, Brazil; juliana.luna@unicap.br (J.M.L.);

⁶Univeristà Università degli Studi di Genova (UNIGE), Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale, Via Opera Pia, n. 15, 1-16145, Genova, Italia; alessandro.casazza@unige.it (A.A.C.); converti@unige.it (A.C.)

* Correspondence: juliana.luna@unicap.br

RESUMO

Os tensoativos são utilizados como agentes estabilizadores de nanopartículas, porém, os tensoativos sintéticos não são ambientalmente e economicamente viáveis. Portanto, os biossurfactantes surgem como uma alternativa verde para a síntese e estabilização de nanopartículas. O objetivo deste estudo foi sintetizar de forma

simples e verde, nanopartículas de prata (AgNPs), utilizando como estabilizador o biossurfactante por *Candida lipolytica* UCP 0899. As nanopartículas obtidas foram identificadas e caracterizadas morfológicamente usando as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Visível), microscopia eletrônica de varredura (MEV), potencial zeta e a espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS). As nanopartículas estabilizadas foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana frente aos isolados bacterianos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus*, e aos fungos *Candida albicans* e *Aspergillus Niger*. A máxima absorção de UV-visível observada foi de 400 nm para nanopartículas de prata. A micrografia MEV confirmou a formação de nanopartículas, com estruturas predominantemente esféricas. O tamanho médio das nanopartículas formadas foi estimado em 20 nm. A presença do biossurfactante promoveu estabilidade, sendo observado um potencial zeta de - 60 mV. O potencial antimicrobiano das AgNPs foi avaliado, contra diferentes micro-organismos. Foram observadas inibição para *Staphylococcus aureus* (90%), *Echerichia coli* (95%), *Enterobacter* (75,48%) e 70,67% de inibição para e *Pseudomonas aeruginosa*, 90% para *Candida albicans* e 85% *Aspergillus niger* na concentração de AgNPs de 16,50 µg/mL. Desta forma, observa-se o potencial de utilização do biossurfactante como estabilizador de nanopartículas de prata e sua aplicação como agente antimicrobiano.

Palavras-chaves: Nanopartículas de prata, Síntese verde, Multirresistência, Atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia envolve a manipulação e criação de novos materiais com dimensões abaixo de 100 nm. Nanomateriais (NMs) têm propriedades biológicas, físicas e químicas distintas de materiais de tamanho convencional, despertando o interesse de diversos setores, como a indústria farmacêutica, eletrônica, têxtil, alimentícia e de cosméticos (Laux et al., 2018). Pesquisas apontam que o mercado global da nanotecnologia poderá lucrar aproximadamente 125 bilhões de dólares até 2024 (Research and Markets, 2018). Dos nanomateriais estudados, as nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam papel de destaque, em virtude de suas propriedades biológicas, como atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antiviral (Zhao et al., 2017).

Diversos métodos de síntese desses NMs são empregados, contudo, a síntese por via biológica ou biossíntese tem despertado interesse por ser um método barato, eficiente e limpo, utilizando biocatalisadores, oriundos de bactérias, algas, fungos filamentosos e plantas, como intermediadores da síntese de nanopartículas de prata (Abdelghany et al., 2018).

A síntese mediada por surfactantes de nanopartículas é emergindo como um método potencial para a estabilização de nanopartículas. Embora os processos químicos e físicos sejam potencialmente útil na síntese de nanopartículas, a síntese de tamanho controlado ainda permanece como um desafio na ciência dos materiais (Sousa et al., 2018).

O tamanho e a forma são fatores críticos que decidem a atividade biológica e especificidade. Nesse contexto, os tensoativos estão surgindo como potenciais agentes estabilizadores, porém, a tensoativos sintéticos não são economicamente viáveis, bem como não são ecologicamente corretos. Portanto, os biossurfactantes estão emergindo como uma alternativa verde para a síntese e estabilização de nanopartículas (Sarubbo *et al.*, 2022; Durval *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos) apresentam uma grande variedade de estruturas químicas, tais como glicolipídios, lipopeptídeos, complexos proteínas - polissacarídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros, apresentando diversas propriedades e funções fisiológicas entre as várias famílias destes biopolímeros (Marinho *et al.*, 2022)

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicações em vários processos industriais, além da possibilidade de novas aplicações para estas biomoléculas (Liu *et al.*, 2020). Podem ser usados para alto desempenho na produção de nanomateriais, uma vez que formam facilmente uma variedade de cristais líquidos em soluções aquosas (SINGH *et al.*, 2020; DURVAL *et al.*, 2022).

Reddy *et al.* (2009) mostrou que a síntese de nanopartículas de prata pode ser estabilizada por surfactina. O biossurfactante ramnolipídio foi avaliado quanto ao seu efeito na síntese/estabilização de partículas de nano zirconia (Biswas e Raichur, 2008). Durval *et al.* (2022) comprovou que a síntese de nanopartículas de prata pode ser estabilizada por lipopeptídeo com propriedades fungicidas.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo sintetizar de forma simples e verde, nanopartículas de prata, utilizando como estabilizador o biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0899, utilizando meio alternativo a partir de resíduos industriais. As nanopartículas obtidas foram identificadas e caracterizadas morfológicamente usando as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Visível), microscopia eletrônica de varredura (MEV), potencial zeta e a espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS). As nanopartículas estabilizadas com o biossurfactante foram avaliadas quanto ao seu potencial de ação antimicrobiana e antifúngico frente a isolados de origem clínica.

Material e Métodos

Micro-organismo

Candida lipolytica UCP 0988 depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco foi utilizada como micro-organismo produtor de biossurfactante.

Produção do biossurfactante

A fermentação para a produção do biossurfactante foi realizada em meio contendo 4% de melaço, 2,5% de milhocina e 2,5% de óleo de soja residual e incubados com a suspensão celular de 108 células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação de 200 rpm, durante 144 horas, pH 5,5.

Isolamento do biossurfactante

O biossurfactante foi extraído e isolado do líquido metabólico utilizando acetato de etila, repetindo três vezes o processo. Em seguida o solvente foi transferido para um funil de separação, descartando a fase aquosa e a fase do solvente foi seco usando sulfato de sódio e em seguida filtrado e evaporado (Pinto *et al.*, 2022).

Síntese de nanopartículas de prata

Todos os reagentes apresentaram grau analítico e foram usados sem purificação adicional. A técnica utilizada foi adaptada de Le *et al.* (2010). Primeiramente, 1,7 g ($1,0 \times 10^{-2}$ mol) de nitrato de prata (AgNO_3) foi dissolvido em 100 mL de água deionizada. A solução de AgNO_3 foi então precipitada com 0,62 g ($1,55 \times 10^{-2}$ mol) de hidróxido de sódio. O precipitado obtido, composto de Ag_2O , foi filtrado e dissolvido em 100 mL de 132 amônia aquosa (NH_3) (0,4% p/p, $2,3 \times 10^{-2}$ mol) até uma solução transparente de complexo de prata-amônio, $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ (aquoso), ser formada. Em seguida, 2,5 g ($8,9 \times 10^{-3}$ mol) do biossurfactante isolado (BS) foram adicionados gota a gota ao complexo e a solução resultante foi agitada suavemente por 2 h em temperatura ambiente até a obtenção de uma mistura homogênea. Finalmente, 2 g ($1,11 \times 10^{-2}$ mol) de glicose foram adicionados à mistura em temperatura ambiente com agitação suave.

O processo de redução da solução do complexo de prata (em vidro de quartzo) foi iniciado com irradiação de luz ultravioleta (UV). O tratamento por UV foi realizado durante 8 h sob agitação vigorosa sem aquecimento. Uma lâmpada UV ($\lambda = 365$ nm, 35 W) foi usada como fonte de luz para estimular o processo de redução. Após 8 h de irradiação, foi obtida uma dispersão transparente de AgNPs estabilizados com biossurfactante. A síntese das NPs de prata foi conduzida com sucesso com uma concentração final de prata em torno de 1%. A solução obtida contendo nanopartículas de prata complexadas com biossurfactante (BS-AgNP) foi armazenada a 4° C para outros experimentos.

Caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas (AgNPs)

A propriedade absorptiva da suspensão de BS-AgNP foi analisada usando espectroscopia UV-visível. As amostras foram observadas na faixa de comprimento de onda entre 320 e 450 nm. Enquanto o potencial zeta, e consequentemente a estabilidade das nanopartículas em suspensão, foi determinado utilizando o equipamento Zeta-Meter 4.0+ ZM3-DG Direct Imaging (Zeta Meter, Inc., EUA).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para avaliar a morfologia das nanopartículas e a espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDS) permite uma avaliação semiquantitativa dos elementos químicos existentes na superfície da amostra.

As análises de MEV foram realizadas utilizando o microscópio do modelo Tescan Mira 3, utilizando uma tensão de aceleração de 30KV. Para a realização da análise EDS utilizou-se o MEV acoplado ao detector de EDS da Oxford Instruments modelo 40 Ultim Max. As nanopartículas foram depositadas na superfície de uma fita de carbono na concentração de 0,01 mg/mL (diluídas em água ultrapura), sendo posteriormente cobertas com uma placa de Petri e secas em temperatura ambiente e

posteriormente uma fina camada de revestimento de ouro foi feita para tornar as amostras condutoras.

Determinação da atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata estabilizada com biossurfactante (BS-AgNP).

Foram testados os micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Echerichia Coli*, *Aspergillus Niger* e *Candida albicans*, cepas de isolados clínicos de um hospital estadual de referência.

O efeito antibacteriano de nanopartículas de prata foi avaliado usando o disco de Kirby-Bauer método de difusão (Habiba et al., 2015). Uma suspensão bacteriana (100 µL de 5×10^6 UFC/mL) foi espalhada uniformemente na superfície de uma placa de ágar nutriente. Em seguida, discos de papel de filtro (cerca de 6 mm de diâmetro), impregnados com AgNPs estabilizados por biossurfactante (16,50 µg/disco) foram colocados na superfície do ágar. As placas de ágar foram então invertidas e incubadas a 37 °C por 24 horas, após esse período, foi medido com uma régua, o diâmetro da zona de inibição ao redor do disco.

Para atividade antifúngica foi realizado com meio de crescimento fúngico BDA (Agar Dextrose Batata) com soluções de nanopartículas de prata sintetizadas adicionadas. Foram adicionados 200 µL da solução das nanopartículas de prata com objetivo de obter as concentrações finais de nanopartículas de prata de cerca de 16,50 µg/L por placa de Petri. Após o preparo das placas foi inoculado o fungo, e as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h, e o tamanho dos halos de inibição foram registrados (Durval et al., 2022).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas

O pico máximo de absorção da NP recém produzida, em 400 nm, observado na Figura 1, obtido por espectrofotometria de luz UV-visível, indica a produção da nanopartícula. Essa característica é típica de nanopartículas de prata, e corresponde à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) (TYAGI et al., 2020). Este resultado evidenciou que a prata em nanoescala pode ser sintetizada em micelas reversas usando como estabilizador. Um pico de absorção plasmônico semelhante, próximo aos 400 nm, é observado por Elakkiya et al. (2020) na NP recém sintetizada, BS-AgNP, descrita ainda como tendo formato esférico com diâmetro em torno de 20nm.

A Figura 2 mostra as micrografias do Biossurfactante, nanopartículas de prata estabilizadas com o biossurfactante produzido pela *C. lipolytica* e nanopartículas de prata. As nanopartículas de prata sintetizadas no presente estudo foram estáveis e uniformes. O biossurfactante agiu como agente de estabilização e preveniu a formação de agregados e favoreceu a produção e estabilidade das nanopartículas.

A síntese de nanopartículas de prata foi realizada segundo Tyagi et al. (2020) e percebida através da mudança de cor da solução após o processo de redução da solução do complexo de prata, mostrando a formação das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNPs).

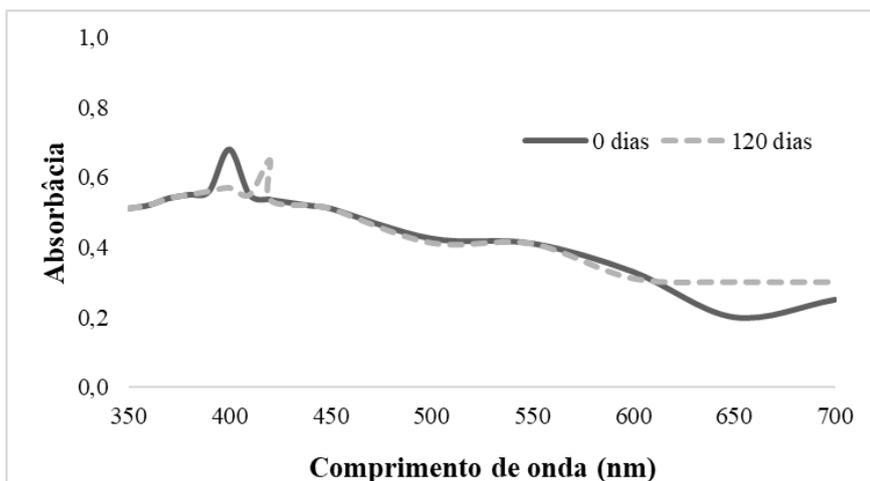


Figura 1 - Espectro de UV-visível das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNPs), com 0 e 120 dias de formadas

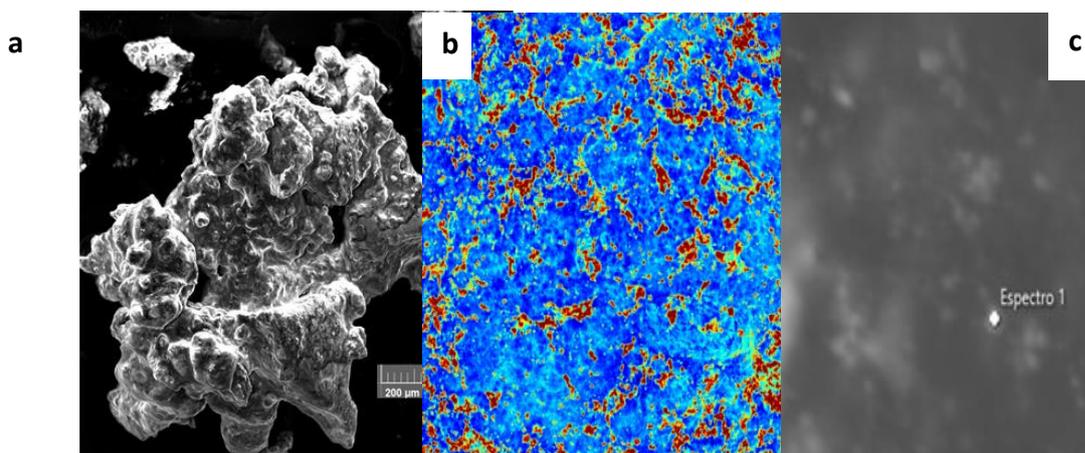


Figura 2 - Imagens da Microscopia eletrônica de Varredura (MEV): a) Biossurfactante, b) Biossurfactante estabilizando as nanopartículas de prata; e c) Nanopartículas de prata

De acordo com os resultados obtidos foi observado que as nanopartículas sintetizadas e estabilizadas com biossurfactante retrataram alta densidade de estruturas com faixa de diâmetro de aproximadamente 100 nm. Comparando os resultados com a literatura, Durval *et al.* (2021) utilizando nanopartículas de prata sintetizada com biossurfactante retratou alta densidade de estruturas com faixa de

diâmetro de aproximadamente 160 nm, além de também observar uma distribuição aleatória de partículas de prata nas amostras.

Xie *et al.* (2006), que encontraram tamanhos na faixa de 2-8 nm para a prata nanopartículas estabilizadas pelo biosurfactante ramnolipídico adquirido de Jeneil Biosurfactant Co., LLC (EUA) em heptano. Pesquisa envolvendo surfactantes sintéticos demonstraram a síntese de nanopartículas de prata na ordem de 59-70, 43-53 e 57-76 nm com o catiônico cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), o dodecil de sódio aniônico sulfato (SDS) e o não iônico Tween 80, respectivamente, de acordo com a variação de concentração de soluções desses surfactantes [28].

Kiran *et al.* (2010) usaram um biosurfactante glicolipídico produzido a partir de *Brevibacterium casei* MSA19 marinho associado a esponja usando os resíduos agroindustriais e industriais como substrato para sintetizar prata nanopartículas. As nanopartículas de prata sintetizadas neste estudo foram descritas como uniformes e apresentaram-se estáveis por 2 meses. A após 120 dias de armazenamento, as BS-AgNP sintetizada no presente estudo, foi novamente analisada no espectrofotômetro de luz UV-visível, e observou-se o pico de absorção plasmônico em 420 nm, o que indica um aumento do diâmetro das NP, mas ainda estabilizadas pelo biosurfactante.

Através do EDS (Espectroscopia por energia dispersiva), técnica analítica que permite uma análise elementar de materiais, foi possível conhecer os elementos, e quantificar, da molécula do biosurfactante e das nanopartículas de prata (AgNP). Os resultados da análise do biosurfactante e da BS-AgNP estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os dados obtidos são mais um indício da formação de AgNP, uma vez que o elemento prata aparece nas amostras de BS-AgNP, como resultado da interação com o biosurfactante.

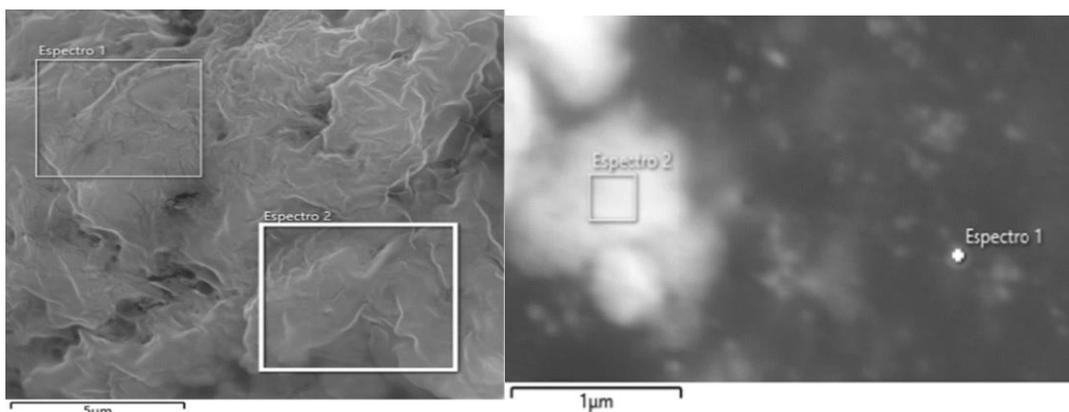


Figura 3 - Imagens de Espectroscopia por energia dispersiva (EDS), do biossurfactante produzido por *C. lipolytica* UCP 0899 (A) e do BS-AgNP (B).

Tabela 1 - Análise por EDS da molécula de biossurfactante produzido por *C. lipolytica* UCP 0899. Dados expressos com média e desvio padrão de três análises independentes.

Elementos	% Peso	% Atômico
Carbono	51 ± 0,8	30± 1,9
Oxigênio	12 ± 0,3	36± 1,8

Tabela 2 - Análise por EDS das BS-AgNPs. Dados expressos com média e desvio padrão de três análises independentes

Elementos	% Peso	% Atômico
Carbono	43 ± 0,8	30± 0,8
Oxigênio	10 ± 0,3	36± 0,8
Prata	46,2± 0,9	36± 0,8

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese (Schaffazick *et al.*, 2003). Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como ele reflete a carga efetiva das partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão.

A estabilidade coloidal foi observada através do potencial Zeta das nanopartículas de prata, determinado em $-60,6 \text{ mV} \pm 1,2$, apresenta uma boa estabilidade. Este valor de potencial zeta é distante de zero; sendo assim, apresenta uma maior repulsão eletrostática entre as partículas, resultando em menos chances de ocorrer agregação ou precipitação.

No estudo publicado por Durval *et al.* (2022), utilizando uma nanopartícula de prata, estabilizada com biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615, a estabilidade coloidal foi observada através do potencial Zeta das NPs, determinado em $-23,4 \text{ mV} \pm 1,4$. Nehal e Singh (2020), utilizaram um extrato livre de células, rico

em lipopeptídeos, obtido pela fermentação de *Bacillus paramycoides* em meio suplementado com óleo de oliva, e adicionaram à solução de AgNO₃ e boro-hidreto de sódio (NaBH₄). No final do processo químico gerou-se nanossuspensões estáveis de potencial zeta em -38,7 mV. Outro trabalho, utilizando metodologia similar só que com rhamnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* obteve valor de -31,6 mV (Elakkiya *et al.*, 2020).

Já em um estudo, também com rhamnolipídeo de *P. aeruginosa*, mas que formou a AgNP através da reação dele com AgNO₄ com solução em pH 12, demonstrou-se o aumento da estabilidade com o potencial, passando de -23,8 mV para - 56,3 mV quando utilizado o biossurfactante (KHALID *et al.*, 2019).

Em estudos realizados por Xie *et. al* (2006), o biossurfactante ramnolipídeo foi usado como agente estabilizador de prata nanopartículas. No presente estudo, demonstramos que a síntese mediada por glicolipídeos de nanopartículas de prata seria eficaz e vantajoso em relação aos surfactantes químicos.

Determinação da atividade antimicrobiana

A resistência bacteriana, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma das principais ameaças de saúde pública do mundo no século 21, devido à maior dificuldade no tratamento eficaz de patologias causadas por bactérias e fungos de origem clínica, levando, por consequência, a um aumento nos gastos com saúde pública pelo prolongamento dose tratamentos e das internações.

Por esses motivos, o presente trabalho avaliou o potencial bactericida e fungicida de BS-AgNP para a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Aspergillus ninger*, *Staplylococcus aureus* e a *Candida albicans*. A Tabela 3 mostra os resultados da atividade antimicrobiana, onde pode-se observar que o BS-AgNP possui ótimo potencial de inibição para os micro-organismos em estudo.

Tabela 3 - Taxa de inibição (%) causada por nanopartículas de prata sintetizada com biossurfactante (BS-AgNPs) contra bactérias e fungos. Dados expressos como média

Micro-organismos	Taxa de inibição (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71%± 0,3
<i>Enterobacter</i>	75%± 0,4
<i>Aspergillus niger</i>	85%± 0,3
<i>Escherichia coli</i>	95%± 0,5
<i>Staplylococcus aureus</i>	90%± 0,2
<i>Candida albicans</i>	85%± 0,1

Foi observado que nas concentrações de 16,50 µg/mL de nanopartículas de prata (BS-AgNPs) foram capazes de inibir cepas de *S. aureus* (90%) e *Escherichia coli* (95%), sugerindo que concentrações maiores apresentam efeito inibidor maior, principalmente em bactérias Gram positivas. Os níveis mais baixos de inibição, entre 75% e 71%, foram observados para bactérias Gram negativas *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizando com 16,50 µg/L de BS-AgN.

De acordo com Durán *et al.* (2010) as bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas, devido à complexidade da membrana celular das primeiras, que acaba dificultando

Com relação aos fungos, foi observado que as nanopartículas de prata (BS-AgNPs) foram capazes de inibir 90% para *Candida albicans* e 85% *Aspergillus niger*.

a entrada e conseqüentemente a difusão das NPs Ag para o interior desses micro-organismos.

De acordo com Durval *et al.* (2022) a nanopartícula de prata estabilizada com biossurfactante obtido a partir do *Bacillus cereus*, apresentou inibição de 85,78% foi observado para *A. niger*, na maior concentração do BS-AgNP, e de 74,20% na menor concentração.

De acordo com a literatura, Brito e Ferraz (2019) observaram que concentrações de 1,50 µg/mL de nanopartículas de prata foram capazes de inibir cepas de *S. aureus* e *Escherichia coli*. No entanto, as cepas de *S. aureus*, apresentaram diferença significativa com concentração de 7,50 µg/mL.

Estudo realizado por Freire *et al.* (2018) boa atividade in vitro das AgNPs contra bactérias Gram negativas com múltiplos mecanismos de resistência, dentre eles *Enterobacteria*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As nanopartículas de prata obtidas por intermédio de *Aspergillus flavo-furcatis* apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar por poço contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com halos de inibição variando de 12,0 a 19,8 mm.

No estudo de Hassan *et al.* (2015) foi demonstrado que as AgNPs sintetizadas por *Aspergillus flavus* inibiram o crescimento de *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. Além disso, a investigação de Rani *et al.* (2017) também evidenciou que as AgNPs de *Aspergillus terreus* Thom 1918 inibiram *E. coli* e *S. aureus*.

Dados da literatura têm revelado a forte atividade de AgNPs contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Além disso, também são consideradas como potenciais agentes antifúngicos biocompatíveis e econômicos. O efeito antimicrobiano de AgNPs e seus nanomateriais está em evidência, essencialmente devido à crescente resistência microbiana aos antibióticos, além da eficácia na profilaxia da colonização bacteriana de próteses e cateteres (Panáček *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva-Vinhote *et al.*, 2017)

Os resultados descritos na literatura corroboram com os dados obtidos neste trabalho, indicando assim o potencial das nanopartículas como agentes antimicrobianos, com o benefício de terem sido obtidas por um método verde que também utilizou um agente estabilizador biocompatível, o biossurfactante.

CONCLUSÃO

O biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* UCP 0899, em meio de baixo custo suplementado com resíduos industriais, mostrou-se eficiente como agente estabilizador em processo de síntese verde de nanopartículas de prata (BS-AgNPs). As BS-AgNPs obtidas mostraram-se estáveis, mesmo sofrendo um aumento em seu diâmetro ao longo do tempo. Por serem pequenas, esféricas e uniformes, as AgNPs são compatíveis com diversas aplicações biotecnológicas. As nanopartículas

exibiram atividade antimicrobiana contra patógenos que prejudicam a saúde humana. Portanto, pode-se concluir que os biossurfactantes têm potencial para uso como estabilizadores ecológicamente corretos de nanopartículas, em produção feita por síntese verde.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brasil.

REFERÊNCIAS

Abdelghany, T.M.; Al-Rajhi, A.M.H.; Al Abboud, M.A.; Alawlaqi, M.M.; Magdah, A.G.; Helmy, E.A.M.; Mabrouk, A.S. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. *BioNanoSci.* **2018**, *8*, 5–16.

Ahmad, S.; Munir, S.; Zeb, N.; Ullah, A.; Khan, B.; Ali, J.; Bilal, M.; Omer, M.; Alamzeb, M.; Salman, S.M.; Ali, S. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine.* **2019**, *14*, 5087–5107.

Bezza, F.A.; Tichapondwa, S.M.; Chirwa, E.M.N. Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *393*, 122319.

Biswas, M.; Raichur, A.M. Electrokinetic and rheological properties of nano zirconia in the presence of rhamnolipid biosurfactant. *J. Am. Ceram.* **2008**, *91*, 3197-3201.

Marinho, P.S.daS.; Silva, R.R.da.; Luna, J.M.de. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. *Res., Soc. Dev.* **2022**, *11*, e103111234123.

Brito, A.S.; Ferraz, R.R.N. Importância dos probióticos no equilíbrio da microbiota intestinal de recém-nascidos: síntese de evidências. *Saúde Foco* **2019**, *9*, 773-781.

Sousa, A.; Viana, D.D.S.F.; Figueirêdo, G.S.; Viana, V.G.F. Géis, extratos naturais e nanopartículas de Ag para ação bactericida Gels, natural extracts and Ag nanoparticles for bactericidal action. *Braz. J. Dev.* **2022**, *8*, 7989-8001.

Durán, A.B.; Nelson, R.; Wallace, R.; Durán, M.; Fávaro, W.J.; Seabra, A.B. Nanotoxicologia De Nanopartículas De Prata: Toxicidade Em Animais E Humanos. *Quim. Nova* **2019**, *42*, 206–213.

Durval, I.J.B.; Meira, H.M.; Veras, B.O.; Rufino, R.D.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando um biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP 1615 como agente estabilizador e sua aplicação como agente antifúngico. *Fermentation* **2021**, *7*, 233.

Durval, I.J.B.; Mendonça, A.H.R.; Rocha, I.V.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *157*, 111357.

Elakkiya, V.T.; Kumar, P.S.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Govindarajan, M. Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 1892–1899.

Freire, N.B.; Pires, L.C.S.R.; Oliveira, H.P.; Costa, M.M. Atividade antimicrobiana e antibiofilme de nanopartículas de prata sobre isolados de *Aeromonas* spp. Obtidos de organismos aquáticos. *Pesqui. Vet. Bras.* **2018**, *38*, 244–249.

Hassan, M.U.; Chattha, M.U.; Khan, I.; Chattha, M.B.; Aamer, M.; Nawaz, M.; Ali, A.; Khan, M.A.U.; Khan, T.A. Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities - a review. *Environ Sci Pollut Res* **2019**, *26*, 12673–12688.

Kasture, M.B; Patel, P.; Prabhune, A.A.; Ramana, C. V.; Kulkarni, A.A.; Prasad, B.L.V. Synthesis of silver nanoparticles by sophorolipids: Effect of temperature and sophorolipid structure on the size of particles. *J Chem Sci* **2008**, *120*, 515–520.

KHALID, H. F.; Tehseen, B.; Sarwar, Y.; Hussain, S.Z.; Khan, W.S.; Raza, Z.A.; Bajwa, S.Z.; Kanaras, A.G.; Hussain, I.; Rehman, A. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *364*, 441–448.

Kiran, G.S.; Sabarathnam, B.; Selvin, J. Potencial de ruptura de biofilme de um biosurfactante glicolípido de *Brevibacterium casei* marinho. *FEMS Microbiol. Immunol.* **2010**, *59*, 432-438.

Maússe, B. J. Caracterização química e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das polpas e derivados dos frutos de massala (*Strychnos spinosa*) e mapfilwa (*Vangueria infausta*). Doctoral dissertation, Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Moçambique, 1-Nov-2015.

Nehal, N.; Singh, P. Role of nanotechnology for improving properties of biosurfactant from newly isolated bacterial strains from Rajasthan. *Mater Today* **2022**, *50*, 2555-2561.

Palanisamy, P.; Raichur, A.M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfact: emulsion technique, *Mater. Sei. Eng C.* **2009**, *20*, 199-204.

Panáček, A.; Kolár, M.; Vecerová, R.; Pucek, R.; Soukupová, J.; Krystof, V.; Hamal, P.; Zboril, R.; Kvítek, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6333-6340.

Pinto, M.I.S.; Campos Guerra, J.M.; Meira, H.M.; Sarubbo, L.A.; Luna, J.M. A Biosurfactant from *Candida bombicola*: Its Synthesis, Characterization, and its Application as a Food Emulsions. *Foods* **2022**, *11*, 561.

Pryshchepa, O.; Pomastowski, P.; Buszewski, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *284*, 87–100.

Rani, R.; Sharma, D.; Chaturvedi, M.; Yadav, J.P. Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles of endophytic fungi *Aspergillus terreus*. *J Nanomed Nanotechnol* **2017**, *8*, 457.

Reddy, A.S.; Chen, C.Y.; Chen, C.C.; Jean, J.S.; Fan, C.W.; Chen, H.R.; Chen, J.W.; Nimje, V.R. Synthesis of gold nanoparticles via an environmentally benign route using a biosurfactant. *J Nanosci Nanotechnol.* **2009**, *9*, 6693-6699.

Roy, S.; Mukherjee T.; Chakraborty, S.; Das, T.K. Biosynthesis, characterisation and antifungal activity of silver nanoparticles synthesized by the fungus *Aspergillus foetidus* MTCC8876. *Digest J. Nanomat. Biostruct.* **2013**, *8*, 197–205.

Roy, A.; Bulut, O.; Some, S.; Mandal, A.K.; Yilmaz, M.D. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC advances* **2019**, *9*, 2673-2702.

Sarubbo, L.A.; Silva, M.da.C.S.; Durval, I.J.B.; Bezerra, K.G.O.; Ribeiro, B.G.; Silva, I.A.; Banat, I.M. (2022). Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochem. Eng. J.* **2022**, *181*, 108377.

Schaffazick, S.R.; Guterres, S.S.; Freitas, L.D.L.; Pohlmann, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím nova* **2003**, *26*, 726-737.

Silva, T.A.; Andrade, P.I.F.; Segala, K.; Silva, L.S.C.; Silva, L.P.; Nista, S.V.G.; Mei, L.H.I.; Duran, N.; Teixeira, M.F.S. Silver nanoparticles biosynthesis and impregnation in cellulose acetate membrane for anti-yeast therapy. *Afr. J. Biotechnol.* **2017**, *16*, 1490-1500.

Silveira, G.D.P. Estudo da capacidade catalítica de nanopartículas de prata, estabilizadas por ramnolipídeos, na redução do corante azul de metileno. Bachelors degrees, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil, 2019.

Soukupová J, Kvítek L, Panáček A, Nevečná T, Zboril R. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. *Mater Chem Phys* 2008;111:7–81

Tyagi, P.K.; Mishra, R.; Khan, F.; Gupta, D.; Gola, D. Antifungal effects of silver nanoparticles against various plant pathogenic fungi and its safety evaluation on *Drosophila melanogaster*. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2020**, *10*, 6587–6596.

Xie, Y., Ye, R., Liu, H. 2006. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, n. 1-3, p. 175-178, 2006.

Zhao, C.B.; Liu, S.; Piao, X.; Wang, D.B.; Lobell, Y.; Huang, M.; Huang, Y.; Yao, S.; Bassu, P.; Ciais, J.-L. Durand, J.; Elliott, F.; Ewert, I.A.; Janssens, T.; Li E.; Lin, Q.; Liu, P.; Martre, C.; Müller, S.; Peng, J.; Peñuelas, A.C.; Ruane, D.; Wallach, T.; Wang, D.; Wu, Z.; Liu, Y.; Zhu, Z.; Asseng., S. Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, 114, 9326-9331.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica*, são compatíveis com outras descritas na literatura para biossurfactantes eficientes;
- O biossurfactante de *C. lipolytica*, mostrou-se bastante eficaz na remoção de óleo de motor adsorvido em solo nos ensaios cinético e estático;
- O biossurfactante apresenta capacidade de solubilização e dispersão de contaminantes hidrofóbicos em ambientes marinhos;
- O biossurfactante tem potencial para síntese de nanopartículas de prata;
- O biossurfactante apresentou estabilidade e redução às nanopartículas de prata;
- A nanopartícula de prata produzida com biossurfactante tem potencial antimicrobiano;
- O biossurfactante se apresenta como um insumo biotecnológico de alto valor agregado para diferentes setores industriais.

ANEXOS

Capítulo de livro aceito para publicação na Springer Nature

7

Microbial biosurfactants: An eco-friendly perspective environmental remediation

Bruna Gabryella Andrade de Lima^{a,b}, Renata Raianny da Silva^{a,b}, Italo José Batista Durval^b, Leonie Asfora Sarubbo^{b,c} and Juliana Moura de Luna^{c,d*}

^a Masters degree in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil

^b Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Recife, Pernambuco, Brazil

^c Icam Tech School, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil

^d School of Health and Life Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil

*Corresponding author– juliana.luna@unicap.br

Contents

- 7.1. Introduction
- 7.2. Environmental contaminants
- 7.3. Biosurfactants
- 7.4. Applications of biosurfactants in the environmental area
 - 7.4.1. Oil bioremediation in marine and soil environment
 - 7.4.2. Biosurfactant application in oil dispersion
 - 7.4.3. Bioremediation of heavy metals
- 7.5. Conclusion and future perspectives
- References

Abstract:

The biggest present challenge, when it comes to environmental needs, are the industrial waste, especially petrochemicals. They are responsible for most of the hydrocarbon contamination in soil and water. The environmental pollution caused by petroleum/derivatives and heavy metals causes serious damage, which has attracted great attention for the development and application of innovative technologies for the removal of these contaminants. Compared to chemical surfactants, biological surfactants have shown advantages, from their production to their use, because the biomolecules have better surfactant properties over to their synthetic counterparts, better functionality under extreme conditions, are less toxic and have good biodegradability. These conditions are essential for the remediation of soil and seawater. In addition, biosurfactants can be obtained using industrial waste as a substrate, which helps to reduce overall production costs. This chapter reports patent disclosures related to the production of biosurfactants by microorganisms, as well the possible applications of biosurfactants in the remediation of polluted environments affected by oil and heavy metal spills.

Keywords: Biosurfactants, Bioremediation, Sustainable technology, Industrial waste

7.1. Introduction

Due to technological advances, people all over the world make utilization of different natural resources caused by exploration and intervention activities. Crude oil related products such as gasoline, kerosene, fuel excavation, diesel and crude oil exploration; many products from chemical, agricultural and pharmaceutical origin exercise a successive role in world economy currently. However some activities result in harmful problems to environment due to the reckless use of chemical products, solvents, and heavy metals. Furthermore, these substances and contaminants generate may impact terrestrial and aquatic environments (Durval *et al.* 2018). Given this reality, there is a high probability of environmental contamination, with a

priority need to develop new technologies that can control and eliminate probable contaminations (Li *et al.* 2020). Contamination by petroleum and derivatives, including heavy metals, is normally treated through physical, chemical or biological methodologies. However, new waters and soils recovery guidelines have restricted the use of chemical products (Silva *et al.* 2022). In this context, the use of biosurfactant compounds appears as an ecological alternative in relation to chemical surfactants and have many desirable attributes such as production by microorganisms through renewable materials; numerous chemical varieties, wide range of applications, biodegradability, low toxicity and environmental compatibility (Farias *et al.* 2021). Biosurfactants are amphiphilic compounds that have the capacity to reduce the tensions of surface and interfacial and as well dispersate oil particles in little droplets, fragmenting them in compounds with no toxicity (Sarubbo *et al.* 2022). Among the diverse types of natural surfactants, the surfactin, rhamnolipids, and sophorolipids have been greatly used in EOR, bioremediation of contaminated soils and water, storage tanks of waste oil removal and oil spill clean up (Silva *et al.* 2014). This chapter provides further knowledgment about the use of biosurfactants as safe measure compared to chemical nature products from the oil industry in the bioremediation of oil in soils and aquatic environments, as dispersing agents and in the removal of heavy metals.

7.2. Environmental contaminants

Environmental accidents involving oil and derivatives are one of the main causes of world pollution, bringing great concern both in countries considered developed and in development. Because once these hydrocarbons and derivatives are present in several sectors, the probability of causing damage to soil, water and air is also much greater (Sarubbo *et al.* 2022). Accidents during the transport of petro derivatives generate a range possibility of contaminations.

Different ways of transport which use fossil fuels, or underground storage that stay exposed to corrosion, as well as gas stations and oil extraction operations. The main occurrences of accidents involving petroleum contamination come from routine operations such as washing ships, inconvenient releases of waste generated by industries that use petroleum derivatives on solvents, plastics, cosmetics and pharmaceuticals production; leakage of natural oil into the seabed and accidents during exploration (Liu *et al.* 2018). Another type of contamination that concerns society is by heavy metals, can be the result of different anthropic activities, such as mining, the manufacture of vehicle batteries, industrial waste and the dispersion of washing from incineration processes (Zang *et al.* 2021; Hanfi *et al.* 2020). The destination of pollutants is usually natural environments, affecting fauna and flora, leading to bioaccumulation over time, which leads to serious damage on aquatic and terrestrial life (Jimoh and Lin 2019; Ivishina *et al.* 2015).

7.3. Biosurfactants

Biosurfactants or microbial surfactants are biomolecules produced by a wide variety of microorganisms present in nature. These synthesized surface-active compounds are classified according to their biochemical nature, which encompasses different structures, which are lipopeptides, glycolipids, liposaccharides, phospholipids, in addition to fatty acids and neutral lipids (Sarubbo *et al.* 2022). Microbial surfactants produced primarily by microorganisms using low-cost substrates are a good option of use in comparison to synthetic surfactants due to their less or none toxicity, biodegradability and high capacity to foaming. In addition, they are part of the called “green technology”, which aims to protect and conserve nature, and which has been gaining prominence in the industrial sector (Akbari *et al.* 2018). The wide and multiple

structural diversity that characterizes natural surfactants and the wide range of properties of this group of molecules has increasingly encourage the scientific interest of researchers and companies, which has led to an increasing number of patent applications (Silva et al. 2014). Most of the patents related to biosurfactants and biodetergents concern processes of obtaining them from microorganisms, including mainly the genera *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.* and *Candida sp.*, covering a infinity of industrial applications (Almeida et al. 2016). Second estimatives, the world market for biosurfactants in 2017 had the book value around \$4.2 bi dollars and it expects to increase around \$5.52 bi in year of 2022 with a annual growth rate of 5.6% (Ambaye et al. 2021). Table 1 lists important patents of biosurfactants produced by microorganisms with possible applications in the recovery of crude oil in reservoirs, use as bioemulsifiers to stabilize hydrocarbons and remediation of environments contaminated by heavy metals (Almeida et al. 2016; Silva et al. 2014).

Table 7.1: Patents produced by microorganisms and applications in environmental remediation

Microrganism/Biosurfactant	Patent n°	Publication date	Authors	Applications
Glycolipids	CA1119794	16 March, 1982	Fritz Wagner, Peter Rapp, Hans Bock, Walter Lindorfer, Walther Schulz, Wilhelm Gebetsberger	Recovery of oil from an oil well or oil sands
Bacterial strains	2974914	04 August, 2016	Ane Kjolhamar, Anita Skarstad, Hans Kristian Kotlar	Enhanced Oil Recovery (EOR) and environmental remediation
New strains of hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing biosurfactants	PI 0519962-0 A2	28 June, 2005	Robin L. Brigmon, Sandra Story, Denis Altman, Christopher J. Berry	Remediation of recalcitrant organics and heavy metals
Biosurfactant-producing microorganisms mixtures	US4450908	29 May, 1984	Hitzman Donald O.	Enhanced Oil Recovery (EOR)
Rhamnolipid	101948786	January 19, 2011	Xia Wenjie, Dong Hanping, Yu Li, Huang Lixin, Cui Qingfeng	Treatment heavy metals in wastewater, application to degrading the crude oil and application to fuel scavenge and oil extraction
Injecting microbial nutrients to stimulate biosurfactant production	US5083611	January 28, 1992	Clark James B., Jenneman Gary E.	Enhanced Oil Recovery (MEOR)
Cationic Biosurfactant	3318/DEL/2015	April 21, 2017	Ganesan Sekaran, Paranji Saranya, Panchavarnam Bhavani, Somasundaram Swarnalatha and Asit Baran Mandal	<i>In situ</i> remediation of heavy metal contaminated sites

Lipopeptide	US4522261	June 11, 1985	McInerney Michael J., Jenneman Gary E., Knapp Roy M., Menzie Donald E.	Oil Recovery
Rhamnolipid	106077056	November 09, 2016	He Chuan	Remediation method for heavy metal polluted soil in mining areas.
Rhamnolipid	107555571	January 09, 2018	Xu Yunli	Treatment process for heavy metal wastewater
Mixture of microbes, enzymes, surfactants and chemicals	US6033901	March 07, 2000	Powell John E	Removing of crude oil sludge from oil tank
Treatment fluid containing Biosurfactant	US6069002	May 30, 2000	Powell John E.	Recover of hydrocarbon
Any biosurfactant producer	CA2350907	May 25, 2000	Willem P.C. Duyvesteyn, Julia R. Budden, Merijn A. Picavet	Extraction and recovery of bitumen
Surface-active agents by exogenous microorganisms	US7992639	February 26, 2009	Fallon Robert D	MEOR
Viscoelastic surfactants	US7052901	June 20, 2002	Crews James B.	MEOR

Source: Adapted from Almeida et al. (2016).

7.4. Applications of biosurfactants in the environmental area

7.4.1. Oil bioremediation in marine and soil environment

Oil spills, regardless of be accidental or intentional, have a great impact on the environment, especially when they occur in a marine ecosystem (Chen *et al.* 2019). In the long term, the impact of these disasters depends more on the speed of clean up/remediation than on the volume of oil spilled (Pete *et al.* 2021; Decesaro *et al.* 2021). Although each clean-up/remediation technique has advantages and disadvantages, effectiveness generally depends on the characteristics of each spill scenario, such as location and weather conditions, as well the composition, viscosity and volume of the oil, and the velocity of it is released (Silva *et al.* 2022; Silva *et al.* 2020). Response techniques to this type of disaster include mechanical methods that can partially contain the expansion of the oil, thermal methods, chemical methods and natural methods (Patel *et al.* 2019). In 1989, the oil tanker Exxon Valdez spilled 41,000 liters of oil in the Gulf of Alaska, and the use of chemical surfactants played an important role in cleaning, because surfactants can assist in bioremediation processes, as they are able to increase hydrocarbon mobility as well the bioavailability (Lawniczak *et al.* 2020). Over the years, studies with biological surfactants (biosurfactants) have grown and these have become an alternative to chemical ones due to their diversity of applications and their specific versatile properties, low toxicity and biological acceptability (Karlapudi *et al.* 2018). The bioremediation approaches that use biosurfactants show a high rate of biodegradation of the oily contaminant, being considered technically efficient, with the possibility of being released *in situ*, without the need of effort in subsequent handling (Sarubbo *et al.* 2022). Bioremediation of contaminants in soil is less widespread than in water, once that the elimination capacity is mainly driven by the physicochemical characteristics of the biosurfactant rather than the effects on metabolic activity or changes in cell surface properties. Thus, the use of biosurfactants appears as an alternative to increase the solubility of hydrophobic

compounds, allowing the desorption and solubilization of hydrocarbons and facilitating the assimilation of these compounds by microbial cells (Santos *et al.* 2016). The removal of hydrophobic pollutants with microbial surfactants occurs by two mechanisms using the soil washing technique: the first method occurs below the critical micelle concentration of the biosurfactant and the biomolecules of surfactant accumulate at the soil-pollutant or water-soil interface and make the alteration of the system affinity for water, the second is called solubilization and occurs in high levels of concentration (Sarubbo *et al.* 2022). In addition, in the second, the incorporation of contaminants in micelles favors their partition in the aqueous phase. Contaminants decomposed in micelles may be recovered, demulsified, destroyed through electrochemical or even adsorbed into activated carbon. The washing solution with biosurfactant may be recycled minimizing costs of the bioremediation (Silva *et al.* 2020; Sayed *et al.* 2021). Pacwa-Płociniczak *et al.* (2011) says that biosurfactants promote the removal of hydrocarbons through biodegradation, solubilization, mobilization or emulsification. Surfactin is between the many tensioactives applied in biorecovery processes, with removal rates greater than 85% and 88% using biomolecules produced by *B. licheniformis* and *B. Subtilis*, respectively (Khademolhosseini *et al.* 2019; Alvarez *et al.* 2015). Other biosurfactants produced by *Bacillus* (Chaprão *et al.* 2018; Gudiña *et al.* 2018) and *Candida* species (Chaprão *et al.* 2015; Minucelli *et al.* 2017; Sobrinho *et al.* 2013a) are also used for remediation of soils contaminated by oils. Table 2 shows the biosurfactants that are effective in the remediation of oil pollutants in soil and in marine spills.

Table 7.2: Microbial biosurfactants with potential application in the bioremediation of pretroderivatives

Microorganism	Biosurfactant Type	Environment of contamination	Oil type	Removal/rem ediation index (%)	References
<i>Bacillus cereus</i>	Lipopeptide	Sand	Motor oil	84.0	Durval et al. 2021
<i>Bacillus cereus</i>	Lipopeptide	Seawater	Motor oil	90.0	Durval et al. 2018
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipopeptide	Sand	Diesel	81.8	Felix et al. 2019
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin	Sand	Heavy oil	77.8	Felix et al. 2019
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptide	Soil	Crude oil	92.0	Prakash et al. 2021
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptide	Sand	Motor oil	79.0	Ali et al. 2019
<i>Candida sphaerica</i>	Glycolipidic	Sand	Motor oil	95.0	Santos et al. 2021
<i>Candida tropicalis</i>	Glycolipidic	Seawater	Motor oil	70.0	Almeida et al. 2021
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Uninformed	Soil	Motor oil	76.5	Silva et al. 2021
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Uninformed	Seawater	Motor oil	70.0	Silva et al. 2021
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Uninformed	Soil	Motor oil	90.0	Silva et al. 2018
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Uninformed	Seawater	Motor oil	90.0	Silva et al. 2018
<i>Serratia marcescens</i>	Polymeric	Sand	Motor oil	94.0	Araújo et al. 2019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Uninformed	Soil	Crude oil	86.1	Patowary et al. 2018
<i>Oceanobacillus</i> sp	Uninformed	Sand	Crude oil	90.0	Jadhav et al. 2013

7.4.2. Biosurfactant application in oil dispersion

The application of dispersants in petro derivatives spills are considered an important answer option that can generate environmental benefits in many cases for major disasters on petroleum platforms or resulting from adverse environmental conditions (Cai *et al.* 2021). Biosurfactants act by facilitating the dissolution of contaminants in the aqueous phase, increasing the bioavailability of the hydrophobic substrate to microorganisms for later elimination of these pollutants by biodegradation, with the additional advantages of low toxicity and biocompatibility (Sarubbo *et al.* 2022; Li *et al.* 2021). The end products of the action of biosurfactants are eco-friendly substances such as carbon dioxide, fatty acids, water or cell biomass, as opposed to similar chemicals (Patel *et al.* 2019).

The reduction of the oil-water interfacial tension promotes the disaggregation of an oil slick into small drops, with the aid of factors that agitate that system, and thus promotes the diffusion in the water column, where its concentrations reduce to below the limits of toxicity (Cai *et al.* 2021). The effectiveness of biological dispersants is observed in studies such as those by Jimoh and Lin (2020) who compared the biosurfactant produced by *Paenibacillus* sp. with the synthetic sodium dodecyl sulfate (SDS) and Triton X-100, and obtained a dispersion rate of 60% with the biological one, while the chemical one only 25 and 20%, respectively. A mixture of surfactants is also a promising alternative, as proposed by Shah *et al.* (2019), a low toxicity alternative oil dispersant, based on a binary mixture of an ionic liquid surfactant, choline laurate ([Cho][Lau]) and a biosurfactant, lactonic sophorolipid (SL), produced by *Starmerella bombicola*, the highest efficiency of dispersion, 83%, was obtained for a 40:60 (w/w) ratio mixture of [Cho][Lau]: LS. In the proposal to increase the functionality of dispersants, Shi et al. (2021) proposed the modification of TiO₂ nanoparticles *in situ* by rhamnolipids (Rha) type biosurfactant, developing a highly efficient particle dispersant with photocatalytic activity. Rha-TiO₂ showed excellence in the dispersion of diesel and crude oil, and also facilitated the photodegradation of the oil simultaneously, in a simulated environment with high salinity. Pacwa-

Płociniczak *et al.* (2011) says that in addition to dispersion, biosurfactants act by consuming and eliminating hydrocarbons through biodegradation, solubilization, mobilization or emulsification. Although there are many biosurfactants, each one with a variety of potential applications, what still restricts their wide use is the cost of production, which makes their application in very specific cleaning operations unfeasible (Jimoh and Lin 2019).

7.4.3. Bioremediation of heavy metals

The environment suffers an increasingly contamination by toxic heavy metals and these metals are a major threat due to their adverse effects and toxicological manifestations worldwide. Heavy metals also play a large role in the contamination of the environment and most of these metals are released through anthropogenic and industrial activities such as mining, ore processing, leather tanning, burning fossil fuels, electroplating and also through various chemicals products such as paints, pigments, fertilizers and chemicals in general (Mishra *et al.* 2021). Some heavy metals such as zinc (Zn), iron (Fe), manganese (Mn) and copper (Cu) at higher concentrations they become highly toxic. Other heavy metals such as cadmium (Cd), arsenic (As), lead (Pb), mercury (Hg) and thallium (Tl) have no biological function and when exposed to the human body in certain concentrations, cause toxicity (Fisher and Gupta 2021). Biosurfactants are a potential solution for the remediation of soils and sediments contaminated with heavy metals (Table 3). These amphipathic compounds are added to solutions to facilitate solubilization, dispersion and desorption of contaminants in the soil (Rocha Junior *et al.* 2019). Biosurfactants achieved through microbial production have better performance and are considered suitable for removing heavy metals from soil when compared to synthetic surfactants (Tang *et al.* 2017; Luna *et al.* 2016). According to Silva *et al.* (2022) the removal of heavy metals from soil by washing using a biosurfactant solution involves three main steps:

1. Heavy metals that are impregnated on the surface of soil particles are separated by the contact of biosurfactant molecules at the interfaces between the wet soil and the metal in aqueous solution;
2. Then the metal is adsorbed by the biosurfactant and trapped inside the micelle through electrostatic interactions;
3. Finally, the biosurfactant can be recovered through the membrane separation process.

Table 7.3: Applications of biosurfactants in the removal of heavy metals

Biosurfactantgroup	Microrganism	Applications	References
Rhamnolipids	Indigenous soil microflora	Degrading petroleum hydrocarbon	Benincasa 2007
Fatty Acid Glycoside	<i>Candida tropicalis</i>	Heavy metal remediation	Rocha Júnior et al. 2019
Glycolipid	<i>Nocardiopsis sp.</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>R. wratislaviensis</i> BN38	Enhancement of the biodegradation of hydrocarbons in soil and marine environment	Pacwa-Plociniczak et al. 2011; Franzetti et al. 2010
Glycolipid	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	Heavy metals remediation	Luna et al. 2016
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>N. alba</i> strain MSA10	Enhancement of oil recovery; removal of heavy metals from contaminated soil, sediment, and water	Chen et al. 2009; Bennur et al. 2015; Jenneman et al. 1983
Surfactin	Indigenous soil microflora	Degrading diesel oil	Whang et al. 2008
Polymeric biosurfactants	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida lipolytica</i>	Stabilization of hydrocarbons in water emulsions	Cirigliano and Carman 1985; Cameron et al. 1988
Sophorolipid	Indigenous soil microflora	Degradation of crude oil, naphthalene, hexadecane, pristane	Kang et al. 2010
Fatty acids	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Increasing the tolerance of bacteria to heavy metals	Appanna et al. 1995

Source: Adapted from Rizvi, Verma and Ashish (2021).

7.5. Conclusion and future perspectives

With the advancement of industries, environmental deterioration due to urbanization and increasing population influence became evident, causing a great concern throughout the world. Crude oil and its derivatives are among the main sources of oil contamination both in aquatic and soil environments. Microbial surfactants present amphiphilic nature with less toxicity, biodegradability, high surface activity and eco-friendly nature, making them promising candidates for application as agents in the bioremediation of environments contaminated by oil and heavy metals. Currently, natural surfactants are mainly produced by microbial fermentation on a laboratory scale and therefore it is necessary to increase the production to industrial scale up levels to maximize the yields for future applications at field levels. Despite that, the costs of yield production and purification of the biosurfactant in commercial-scale are the main problems that cause limitation on their applicability. Then, more potent products and new microbial strains capable to produce surfactants biomolecules should be studied, as well culture conditions need to be optimized to increase biosurfactant yield for an environment sustainable and free of pollutants.

References

- Akbari S, Abdurahman NH, Yunus RM, Fayaz F, Alara OR (2018) Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnol. Res. Innov.*2(1), 81-90. doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001
- Ali N, Wang F, Xu B, Safdar B, Ullah A, Naveed M, Wang C, Rashid MT (2019) Production and Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* Ali5 in Enhanced Oil Recovery

- and Motor Oil Removal from Contaminated Sand. *Molecules*. 24, 4448. doi.org/10.3390/molecules24244448
- Almeida DG, Soares da Silva R de CF, Meira HM, Brasileiro PPF, Silva EJ, Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA (2021) Production, Characterization and Commercial Formulation of a Biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP0996 and Its Application in Decontamination of Petroleum Pollutants. *Process*. 9,885. doi.org/10.3390/pr9050885
- Almeida DG, Soares Da Silva RDCF, Luna JM, Rufino RD, Santos VA, Banat IM, Sarubbo LA (2016) Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front. Microbiol.* 7, 1718. doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718
- Alvarez VM, Jurelevicius D, Marques JM, de Souza PM, de Araújo LV, Barros TG, & Seldin L (2015) *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 136, 14-21. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.046
- Ambaye TG, Vaccari M, Prasad S, Rtimi S (2021) Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. *Environ. Technol. Innov.* 24, 102090. doi.org/10.1016/j.eti.2021.102090
- Appanna VD, Finn H, Pierre MS (1995) Exocellular phosphatidylethanolamine production and multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131(1), 53-56. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07753.x
- Araújo HWC, Andrade RFS, Montero-Rodríguez D, Rubio-Ribeaux D, Alves da Silva CA, Campos-Takaki GM (2019) Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microb. Cell Fact.* 18,2. doi.org/10.1186/s12934-018-1046-0
- Benincasa M (2007) Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. *Curr. Microbiol.* 54(6), 445-449. doi.org/10.1007/s00284-006-0610-8

- Bennur T, Kumar AR, Zinjarde S, Javdekar V (2015) Nocardiosis species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiol. Res.* 174, 33-47. doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.010
- Cai Q, Zhu Z, Chen B, Lee K, Nedwed TJ, Greer C, Zhang B (2021) A cross-comparison of biosurfactants as marine oil spill dispersants: Governing factors, synergetic effects and fates. *J. Hazard. Mater.* 416, 126122. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126122
- Cameron DR, Cooper DG, Neufeld RJ (1988) The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(6), 1420-1425. doi.org/10.1128/aem.54.6.1420-1425.1988
- Chaprão MJ, Ferreira IN, Correa PF, Rufino RD, Luna JM, Silva EJ, Sarubbo LA (2015) Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electron. J. Biotechnol.* 18(6), 471-479. doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.09.005
- Chaprão MJ, da Silva RDCFS, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2018) Production of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* UCP1616 for use in the bioremediation of oil-contaminated environments. *Ecotoxicology.* 27(10), 1310-1322. doi.org/10.1007/s10646-018-1982-9
- Chen YG, Wang YX, Zhang YQ, Tang SK, Liu ZX, Xiao HD, Li WJ (2009) *Nocardiosis litoralis* sp. nov. a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int. J. Syst. and Evol.* 59(11), 2708-2713. doi.org/10.1099/ijs.0.009704-0
- Chen J, Zhang W, Wan Z, Li S, Huang T, Fei Y (2019) Oil spills from global tankers: Status review and future governance. *J. Clean. Prod.* 227, 20–32. doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.020
- Cirigliano MC, Carman GM (1985) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4), 846-850. doi.org/10.1128/aem.50.4.846-850.1985
- Decesaro A, Thomé A, Colla LM (2021) Biostimulation of the In Situ Production of Biosurfactants During the Bioremediation of Diesel Oil in Clayey Soil. *Int. J. Environ. Res.* 15, 947–957. doi.org/10.1007/s41742-021-00364-8

- Durval I, Rufino R, Sarubbo L (2021) Biosurfactant as an Environmental Remediation Agent: Toxicity, Formulation, and Application in the Removal of Petroderivate in Sand and Rock Walls. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 12, 34–48. doi.org/10.33263/BRIAC121.034048
- Durval IJB, Resende AHM, Figueiredo MA, Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA (2018) Studies on Biosurfactants Produced using *Bacillus cereus* Isolated from Seawater with Biotechnological Potential for Marine Oil-Spill Bioremediation. *J. Surfactants Deterg.* 22, 349–363. doi.org/10.1002/jsde.12218
- Farias CBB, Almeida FC, Silva IA, Souza TC, Meira HM, Rita de Cássia F, Sarubbo LA (2021) Production of green surfactants: Market prospects. *Electron. J. Biotechnol.* 51, 28-39. doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002
- Felix AKN, Martins JLL, Almeida JGL, Giro MEA, Cavalcante KF, Melo VMM, Pessoa ODL, Rocha MVP, Gonçalves LRB, Aguiar RS de S (2019) 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 Surf. B. Biointerfaces.* 175, 256–263. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062
- Fisher RM, Gupta V (2021) Heavy metals. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Smyth TJ, Banat IM (2010) Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112(6), 617-627. doi.org/10.1002/ejlt.200900162
- Gudina EJ, Pereira JF, Costa R, Coutinho JA, Teixeira JA, Rodrigues LR (2013) Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. *J. Hazard. Mater.* 261, 106-113. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.071
- Hanfi MY, Mostafa MY, Zhukovsky MV (2020) Heavy metal contamination in urban surface sediments: sources, distribution, contamination control, and remediation. *Environ. Monit. Assess.* 192(1), 1-21. doi.org/10.1007/s10661-019-7947-5
- Ivshina IB, Kuyukina MS, Krivoruchko AV, Elkin AA, Makarov SO, Cunningham CJ, Philp JC (2015) Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. *Environ. Sci. Process. Impacts.* 17(7), 1201-1219. doi.org/10.1039/C5EM00070J

- Jadhav VV, Yadav A, Shouche YS, Aphale S, Moghe A, Pillai S, ... & Bhadekar RK (2013) Studies on biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 isolated from Antarctic Sea water. *Desalination*. 318, 64-71. doi.org/10.1016/j.desal.2013.03.017
- Jenneman GE, McInerney MJ, Knapp RM, Clark JB, Feero JM, Revus DE, Menzie DE (1983) Halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. *Dev. Ind. Microbiol.*(United States). 24(CONF-8208164-).
- Jimoh AA, Lin J (2020) Biotechnological Applications of *Paenibacillus* sp. D9 Lipopeptide Biosurfactant Produced in Low-cost Substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 191, 921–941. doi.org/10.1007/s12010-020-03246-5
- Jimoh AA, Lin J (2019) Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 184, 109607. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607
- Karlapudi AP, Venkateswarulu TC, Tammineedi J, Kanumuri L, Ravuru BK, Dirisala V ramu, Kodali VP (2018) Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*. 4, 241–249. doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007
- Kang SW, Kim YB, Shin JD, Kim EK (2010) Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(3), 780-790. doi.org/10.1007/s12010-009-8580-5
- Khademolhosseini R, Jafari A, Mousavi SM, Hajfarajollah H, Noghabi KA, Manteghian M (2019) Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. *RSC Adv* 9, 7932–7947. doi.org/10.1039/C8RA10087J
- Ławniczak Ł, Woźniak-Karczewska M, Loibner AP, Heipieper HJ, Chrzanowski Ł (2020) Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*. 25, 856. doi.org/10.3390/molecules25040856
- Li Y, Chen Y, Tia, X, Chu J (2020) Advances in sophorolipid-producing strain performance improvement and fermentation optimization technology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104(24), 10325-10337. doi.org/10.1007/s00253-020-10964-7

- Li H, Li Y, Bao M, Li S (2021) Solid inoculants as a practice for bioaugmentation to enhance bioremediation of hydrocarbon contaminated areas. *Chemosphere*. 263, 128175. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128175
- Liu G, Zhong H, Yang X, Liu Y, Shao B, Liu Z (2018) Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: a review. *Biotechnol. Bioeng.* 115(4), 796-814. doi.org/10.1002/bit.26517
- Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA (2016) Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Saf. Environ. Prot.* 102, 558-566. doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.010
- Minucelli T, Ribeiro-Viana RM, Borsato D, Andrade G, Cely MVT, de Oliveira MR, Celligoi MAPC (2017) Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in soil bioremediation. *Waste and Biomass Valorization*. 8(3), 743-753. doi.org/10.1007/s12649-016-9592-3
- Mishra S, Lin Z, Pang S, Zhang Y, Bhatt P, Chen S (2021) Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 418, 126253. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126253
- Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–654. doi.org/10.3390/ijms12010633
- Patowary R, Patowary K, Kalita MC, & Deka S (2018) Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 129, 50-60. doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.01.004
- Patel S, Homaei A, Patil S, Daverey A (2019) Microbial biosurfactants for oil spill remediation: pitfalls and potentials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 27–37. doi.org/10.1007/s00253-018-9434-2
- Pete AJ, Bharti B, Benton MG (2021) Nano-enhanced Bioremediation for Oil Spills: A Review. *ACS ES&T Eng.* 1, 928–946. doi.org/10.1021/acsestengg.0c00217

- Prakash AA, Prabhu NS, Rajasekar A, Parthipan P, AlSalhi MS, Devanesan S, Govarathanan M (2021) Bio-electrokinetic remediation of crude oil contaminated soil enhanced by bacterial biosurfactant. *J. Hazard. Mater.* 405, 124061. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124061
- Rabodonirina S, Rasolomampianina R, Krier F, Drider D, Merhaby D, Net S, Ouddane B (2019) Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *J. Environ. Manage.* 232, 1-7. doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.005
- Ramadass K, Megharaj M, Venkateswarlu K, Naidu R (2018) Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Sci. Total Environ.* 636, 968-974. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.379
- Rizvi H, Verma JS (2021) Biosurfactants for oil pollution remediation. In *Microbial Biosurfactants*. 197-212. doi.org/10.1007/978-981-15-6607-3_9
- Rocha Junior RB, Meira HM, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2019) Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. *Biodegradation.* 30(4), 215-233. doi.org/10.1007/s10532-018-9833-1
- Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2016) Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–31. doi.org/10.3390/ijms17030401
- Santos EM da S, Lira IRA da S, Meira HM, Aguiar J dos S, Rufino RD, Almeida DG de, Casazza AA, Converti A, Sarubbo LA, Luna JM de (2021) Enhanced Oil Removal by a Non-Toxic Biosurfactant Formulation. *Energies.* 14, 467. doi.org/10.3390/en14020467
- Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2016) Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1–31. doi.org/10.3390/ijms17030401
- Sarubbo LA, Silva M da GC, Durval IJB, Bezerra KGO, Ribeiro BG, Silva IA, Twigg MS, Banat IM (2022) Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochem. Eng. J.* 181. doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377

- Sayed K, Baloo L, Sharma NK (2021) Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 18, 2226. doi.org/10.3390/ijerph18052226
- Shah MUH, Moniruzzaman M, Sivapragasam M, Talukder MMR, Yusup SB, Goto M (2019) A binary mixture of a biosurfactant and an ionic liquid surfactant as a green dispersant for oil spill remediation. *J. Mol. Liq.* 280, 111–119. doi.org/10.1016/j.molliq.2019.02.049
- Shi K, Zhang Q, Xue J, Chen X, Chen Y, Qiao Y, Yang Y, Sun J (2020) Study on the degradation performance and bacterial community of bioaugmentation in petroleum-pollution seawater. *J. Environ. Chem. Eng.* 8, 103900. doi.org/10.1016/j.jece.2020.103900
- Shi Z, Li Y, Dong L, Guan Y, Bao M (2021) Deep remediation of oil spill based on the dispersion and photocatalytic degradation of biosurfactant-modified TiO₂. *Chemosphere*. 281, 130744. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130744
- Silva RR da, da Silva YA, e Silva TADL, Sarubbo LA, de Luna JM (2022) Recent advances in environmental biotechnology: role of biosurfactants in remediation of heavy metals. *Res., Soc. Dev.* 11(5), e4411527453-e4411527453. doi.org/10.33448/rsd-v11i5.27453
- Silva R de CFS da, Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA (2021) Ecotoxicity of the formulated biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* CCT 6659 and application in the bioremediation of terrestrial and aquatic environments impacted by oil spills. *Process Saf. Environ. Prot.* 154, 338–347. doi.org/10.1016/j.psep.2021.08.038
- Silva RDCF, Almeida DG, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2014) Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Int. J. Mol. Sci.* 15(7), 12523-12542. doi.org/10.3390/ijms150712523
- Silva EJ, Correa PF, Almeida DG, Luna JM, Rufino RD, Sarubbo LA (2018) Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 172, 127–135. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.034

- Silva IA, Almeida FCG, Souza TC, Bezerra KGO, Durval IJB, Converti A, Sarubbo LA (2022) Oil spills: impacts and perspectives of treatment technologies with focus on the use of green surfactants. *Environ. Monit. Assess.* 194. doi.org/10.1007/s10661-022-09813-z
- Silva IGS da, de Almeida FCG, da Rocha e Silva NMP, Casazza AA, Converti A, Sarubbo LA (2020) Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. *Energies.* 13. doi.org/10.3390/en13184664
- Sobrinho HBSS, de Luna JM, Rufino RD, Figueiredo Porto AL, Sarubbo LA (2013) Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electron. J. Biotechnol.* 16(4), 4-4. doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-4
- Tang J, He J, Liu T, Xin X (2017) Removal of heavy metals with sequential sludge washing techniques using saponin: optimization conditions, kinetics, removal effectiveness, binding intensity, mobility and mechanism. *RSC Adv.* 7(53), 33385-33401. doi.org/10.1039/C7RA04284A
- Whang LM, Liu PWG, Ma CC, Cheng SS (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 151(1), 155-163. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063
- Zhang W, Pang S, Lin Z, Mishra S, Bhatt P, Chen S (2021) Biotransformation of perfluoroalkyl acid precursors from various environmental systems: advances and perspectives. *Environ. Pollut.* 272, 115908. doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115908