



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS
AMBIENTAIS

MARIA INEZ CAMPELLO BARATA

**PRODUÇÃO DE BIODERIVADO POR *Bacillus*
invictae UCP1617 PARA FORMULAÇÃO DE UM
DETERGENTE ECO-FRIENDLY COMO ADITIVO NA
REMEDIÇÃO DE PETRODERIVADOS**

Recife, 26 de fevereiro de 2024

B226p

Barata, Maria Inez Campello.

Produção de biossurfactante por *Bacillus invictae* UCP1617 para formulação de um detergente eco-friendly como aditivo na remediação de petroderivados / Maria Inez Campello Barata, 2024.

112 f. : il.

Orientadora: Leonie Asfora Sarubbo.

Coorientadora: Fabíola Carolina Gomes de Almeida.

Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2024.

1. Biotecnologia. 2. Petróleo - Derivados.
3. Biorremediação. 4. Biossurfactantes. I. Título.

CDU 574.6

Luciana Vidal - CRB4/1338

MARIA INEZ CAMPELLO BARATA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus
invictae* UCP1617 PARA FORMULAÇÃO DE UM
DETERGENTE *ECO-FRIENDLY* COMO ADITIVO NA
REMEDIAÇÃO DE PETRODERIVADOS**

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 em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

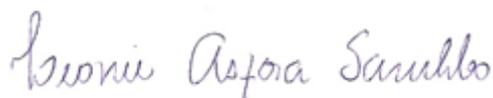
Coorientadora: Dra. Fabíola Carolina Gomes de Almeida

Recife, 26 de fevereiro de 2024

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Bacillus
invictae* UCP1617 PARA FORMULAÇÃO DE UM
DETERGENTE ECO-FRIENDLY COMO ADITIVO NA
REMEDIAÇÃO DE PETRODERIVADOS**

MARIA INEZ CAMPELLO BARATA

Examinadores:



Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP



Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino (Titular Interno)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP



Dra. Rita de Cássia Freire Soares da Silva (Titular Externo)
Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI)

Defendida em: 26/02/2024.

Coordenador: Prof. Dr. Sérgio Mendonça de Almeida

Dedico este trabalho de dissertação a todos os meus professores que ao longo de minha vida de estudante compartilharam comigo conhecimentos, moldando-me ao profissional que hoje me tornei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora do mestrado Prof^a Dra^a Leonie Asfora Sarubbo por ter tornado possível minha participação neste mestrado, abrindo um universo de possibilidades através de seu compartilhamento comigo de seus conhecimentos.

Agradeço à minha coorientadora Dra. Fabíola Carolina Gomes de Almeida pela paciência em me ensinar as técnicas que usei em meus experimentos no laboratório.

Ao Coordenador da Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, o Prof. Dr. Sérgio Mendonça de Almeida, pela condução do programa.

Ao técnico Lucas Ferreira da Costa, dos laboratórios da UNICAP, pela paciência e ajuda conferida ao longo do Mestrado.

À aluna de graduação e estagiária Cíntia Vitória Maria de Souza, pelo apoio nos experimentos realizados em laboratório.

À Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas da 17^a turma do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP e a todos do grupo de pesquisa da Prof^a Dra. Leonie Asfora Sarubbo, por compartilhar seus conhecimentos ao longo desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI) pelo suporte financeiro nos laboratórios da UNICAP.

SUMÁRIO

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1. Biossurfactantes	20
3.2. Classificação	22
3.2.1. Glicolípídeos	23
3.2.2. Lipopeptídeos e lipoproteínas.....	24
3.2.3. Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros	25
3.2.4. Biossurfactantes poliméricos	26
3.2.5. Biossurfactantes particulados.....	26
3.3. Propriedades	27
3.3.1. Atividade superficial e interfacial	27
3.3.2. Tolerância para temperatura, pH e força iônica.....	28
3.3.3. Biodegradabilidade	28
3.3.4. Toxicidade reduzida.....	28
3.3.5. Especificidade	28
3.3.6. Biocompatibilidade e digestibilidade.....	29
3.3.7. Formação de emulsão	29
3.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes.....	29
3.4.1. Fontes de carbono.....	29
3.4.2. Fontes de nitrogênio	30
3.4.3. Fontes de sais minerais.....	30
3.4.4. Condições de crescimento	31
3.5. Resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes.....	31
3.5.1. Milhocina	32
3.6. Aplicações ambientais dos biossurfactantes	33
3.6.1. Biorremediação	33
3.6.2. Recuperação avançada de petróleo.....	34
3.6.3. Remoção de petroderivados em ambiente marinho	36
3.6.4. Inibidores de corrosão metálica.....	36
3.6.5. Agentes desemulsificantes	37
3.6.6. Remoção de metais pesados	38
3.7. Perspectivas de utilização dos biossurfactantes no mercado.....	39

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
2.1. Materiais	6
2.2. Micro-organismo.....	6
2.3. Meio de crescimento do inóculo	6
2.4. Preparação do inóculo.....	6
2.5. Produção do biossurfactante	7
2.6. Maximização da produção do biossurfactante utilizando planejamento fatorial	8
2.7. <i>Scale up</i> de produção de produção do biossurfactante.....	9
2.8. Determinação da tensão superficial	9
2.9. Determinação da atividade de emulsificação	9
2.10. Avaliação da estabilidade do biossurfactante.....	10
2.11. Extração e caracterização química do biossurfactante	10
2.12. Caracterização estrutural do biossurfactante	10
2.13. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	11
2.14. Formulação do biossurfactante para obtenção de um detergente ecofriendly	11
2.15. Teste de toxicidade do biossurfactante com <i>Artemia salina</i>	11
2.16. Teste de fitotoxicidade do biossurfactante.....	12
2.17. Experimentos de dispersão de composto hidrofóbico em água do mar pelo biossurfactante ...	12
2.18. Teste de remoção de composto hidrofóbico em solo com o biossurfactante	13
2.19. Teste de lavagem de superfície de vidro oleosa contaminada com composto hidrofóbico com o biossurfactante	13
2.20. Teste de lavagem de composto hidrofóbico adsorvido à superfície porosa com o biossurfactante	14
2.21. Análises estatísticas dos dados obtidos	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1. Seleção do meio de produção do biossurfactante	14
3.2. Maximização da produção do biossurfactante.....	16
3.3. <i>Scale up</i> de produção de produção do biossurfactante.....	25
3.4. Determinação da atividade de emulsificação	27
3.5. Estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação.....	28
3.6. Caracterização do biossurfactante	31
3.7. Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante.....	33
3.8. Formulação do biossurfactante	34
3.9. Toxicidade do biossurfactante formulado	35
3.10. Dispersão de composto hidrofóbico em água do mar pelo biossurfactante formulado.....	36
3.11. Remoção de composto hidrofóbico em solo pelo biossurfactante formulado	37

3.12. Aplicação do biossurfactante formulado na remoção de poluente hidrofóbico em superfície de vidro	38
3.13. Teste de lavagem de composto hidrofóbico adsorvido à superfície porosa com o biossurfactante formulado	39
4. CONCLUSÕES	40
Agradecimentos	40
5. REFERÊNCIAS	41

CAPÍTULO III

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	4
2. ANEXO 1	5

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Molécula do surfactante com uma cauda apolar e cabeça polar.....	20
Figura 2 – Formação dos tipos de micela de acordo com o líquido	21
Figura 3 – Estruturas químicas de alguns biossurfactantes: (a) Raminolipídeo, (b) Soforolipídeo, (c) Lipideos Manosileritritol (MEL), (d) Trealose lipídeos, (e) Surfactina e (f) Emulsan.	27

CAPÍTULO II

Figura 4 - Gráfico de Médias Marginais.....	19
Figura 5 - Diagrama de Pareto	20
Figura 6 - Gráfico de Superfície de resposta, avaliando as relações entre os fatores: (1) Agitação (rpm) e (2) Temperatura de cultivo (°C), tendo como variável resposta a concentração de biossurfactante após 72 horas de cultivo de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.	21
Figura 7 - Gráfico de Superfície de resposta, avaliando as relações entre os fatores: (1) Agitação (rpm) e (3) Tamanho do inóculo (%), tendo como variável resposta a concentração de biossurfactante após 72 horas de cultivo de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.	22
Figura 8 - Gráfico de Superfície de resposta, avaliando as relações entre os fatores: (2) Temperatura de cultivo (°C) e (3) Tamanho do inóculo (%), tendo como variável resposta a concentração de biossurfactante após 72 horas de cultivo de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.	23
Figura 9 - Avaliação de Desejabilidade. As linhas verticais vermelhas indicam o valor do nível que os fatores devem assumir para maximizar simultaneamente a variável de resposta.....	24
Figura 10 - Crescimento celular, pH, tensão superficial e rendimento do biossurfactante de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral contendo 1,5% de milhocina em biorreator de 50 L durante 72 h a 175 rpm e 28 °C.	26
Figura 11 - Caracterização dos espectros FT-IR do biossurfactante extraído e purificado de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina.....	32
Figura 12 - Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina	34
Figura 13 - Ilustração da dispersão do óleo de motor pelo biossurfactante formulado de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 em água do mar.....	37
Figura 14 - Ilustração da remoção de óleo motor em superfície sólida pelo biossurfactante formulado obtido de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617. (A) Lâmina contaminada e solução de biossurfactante; (B) Processo de lavagem por imersão e (C) Lâmina lavada e solução de biossurfactante pós-lavagem.....	38
Figura 15 - Ilustração da remoção de óleo motor em rochas porosa pelo biossurfactante formulado obtido de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 na metade da CMC (A) e na CM (B).	39

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Composição química de milhocina.....	32
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 2 - Valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central.....	8
Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial	8
Tabela 4 - Tensão superficial dos biossurfactantes produzidos por <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em diferentes meios de cultivo formulados com resíduos industriais.....	15
Tabela 5 - Resultado do planejamento fatorial completo 2 ³ para rendimento do biossurfactante produzido por <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral contendo 1,5% de milhocina durante 72 horas	16
Tabela 6 - Análise de Variância para o rendimento em biossurfactante isolado (g/L) de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617. Os efeitos dos compostos foram estatisticamente significativos para p < 0,05.	18
Tabela 7 - Emulsificação de substratos hidrofóbicos pelo biossurfactante de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.....	27
Tabela 8 - Estabilidade do biossurfactante de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina avaliada em diferentes condições de pH, temperatura e sob adição de NaCl através da determinação da tensão superficial e da capacidade de emulsificação de óleo de motor	30
Tabela 9 - Influência do tempo na estabilidade do biossurfactante de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina sob diferentes temperaturas através da determinação da tensão superficial.....	31
Tabela 10 - Estabilidade do biossurfactante de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 formulado sob diferentes condições de pH, temperatura e adição de NaCl frente à tensão superficial após 90 dias de armazenamento à 28°C.....	35
Tabela 11 - Fitotoxicidade do biossurfactante de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 formulado em diferentes concentrações de biossurfactante determinadas a partir da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	36
Tabela 12 - Dispersão do óleo motor pelo biossurfactante formulado obtido de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 em diferentes proporções de biossurfactantes e óleo	37
Tabela 13 - Remoção do óleo de motor em solo argiloso pelo biossurfactante formulado de <i>Bacillus invictae</i> UCP1617 em diferentes concentrações determinadas a partir da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais classes de biossurfactantes produzidos por micro-organismos	23
Quadro 2 - Meios de cultura formulados com diferentes combinações de substratos alternativos para a produção de biossurfactante	7

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Índice de emulsificação	9
Equação 2 - G.R.S = Germinação relativa da semente.....	12
Equação 3 - C.R.R = <i>Crescimento relativo da raiz</i>	12
Equação 4 - IG = índice de germinação	12
Equação 5 – Índice de remoção.....	13

LISTA DE SIGLAS

CMC: Concentração Micelar Crítica

BRS: Bactérias Redutoras de Sulfato

CMI: Corrosão Microbiologicamente Influenciada

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

D.O.: Densidade Óptica

EOR: Enhanced Oil Recovery

EPS: Substâncias Poliméricas Extracelulares

FTIR: Fourier Transform Infrared

HEC: Hidroxietilcelulose

MEOR: Microbial Enhanced Oil Recovery

NPCIAMB: Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais

UCP: Universidade Católica de Pernambuco

RESUMO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial e interfacial entre fases fluidas, conferindo detergência, emulsificação e dispersão de fases. A maioria dos surfactantes em uso industrial é derivada do petróleo; entretanto, o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado devido à biodegradabilidade e toxicidade reduzida dessas biomoléculas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção e a formulação comercial de um novo biossurfactante pela bactéria *Bacillus invictae* UCP1617. Inicialmente, a produção do biossurfactante foi realizada utilizando diferentes combinações de substratos alternativos (melaço de cana-de-açúcar e milhocina). Em seguida, um planejamento fatorial completo foi utilizado como ferramenta para otimização das variáveis agitação, temperatura e tamanho do inóculo em meio mineral contendo 1,5% milhocina. A melhor condição do planejamento obtida (agitação de 175 rpm a 28°C e 4% de inóculo) foi utilizada para o *scale-up* de produção do biossurfactante em biorreator de 50 L. A produção do biossurfactante no biorreator alcançou uma produtividade correspondente a 16,70 mg/L/h. A tensão superficial do meio foi reduzida de 69,50 para 30,20 mN/m após 72 horas de fermentação. O biossurfactante foi isolado e caracterizado estruturalmente como um glicolípido e sua CMC foi determinada como 900 mg/L para uma tensão superficial de 29,10 mN/m. O biossurfactante foi submetido a avaliação da estabilidade em diferentes condições ambientais, sendo capaz de formar emulsões estáveis de maior eficiência com óleo de motor (90,80%) e petróleo (99,00%). A formulação do biossurfactante para obtenção de um detergente *eco-friendly* foi conduzida com a adição de 0,2% do estabilizante hidroxietilcelulose (HEC), 5% de ácido graxo e 0,2% de sorbato de potássio e o produto comercial foi armazenado à 28°C durante 90 dias. O biossurfactante formulado manteve a estabilidade de sua tensão superficial em vários pHs, temperaturas e concentrações de NaCl e apresentou ausência de toxicidade comprovada pelo crescimento das sementes dos vegetais repolho Coração-de-Boi (*Brassica oleracea*) e tomate cereja (*Solanum lycopersicum*), bem como pela sobrevivência do microcrustáceo *Artemia salina*. O biossurfactante formulado foi capaz de dispersar totalmente o óleo em água do mar. Ao ser colocado em solo argiloso contaminado com óleo de motor, o biossurfactante foi capaz de remover, em 24 horas, 99,21% do óleo contido no solo quando usado na sua CMC. O biossurfactante formulado removeu 98,42% do óleo aderido à superfície de vidro e foi capaz de remover 75,00% do composto hidrofóbico adsorvido à superfície porosa na sua CMC. Portanto, o biossurfactante comercial produzido por *Bacillus invictae* UCP1617 demonstra viabilidade de aplicação como aditivo biotecnológico *ecofriendly* para os processos de remediação que considerem a preservação e a redução dos impactos ambientais sobre os ecossistemas.

Palavras-chave: biossurfactantes; *Bacillus*; substratos alternativos; milhocina, biorremediação; remoção de poluentes.

ABSTRACT

Surfactants are amphipathic molecules that reduce surface and interfacial tension between fluid phases, providing detergency, emulsification and phase dispersion. Most surfactants in industrial use are derived from petroleum; however, interest in microbiological surfactants has increased due to the biodegradability and reduced toxicity of these biomolecules. Therefore, this work aimed to evaluate the production and commercial formulation of a new biosurfactant using the bacterium *Bacillus invictae* UCP1617. Initially, the production of the biosurfactant was carried out using different combinations of alternative substrates (sugar cane molasses and millet). Then, a complete factorial design was used as a tool to optimize the variables of agitation, temperature, and inoculum size in a mineral medium containing 1.5% corn steep liquor. The best planning condition obtained (agitation of 175 rpm at 28°C and 4% inoculum) was used to scale up biosurfactant production in a 50 L bioreactor. Biosurfactant production in the bioreactor reached a productivity corresponding to 16.70 mg/L/h. The surface tension of the medium was reduced from 69.50 to 30.20 mN/m after 72 hours of fermentation. The biosurfactant was isolated and structurally characterized as a glycolipid and its CMC was determined as 900 mg/L for a surface tension of 29.10 mN/m. The biosurfactant was subjected to stability evaluation under different environmental conditions, being able to form stable emulsions of greater efficiency with engine oil (90.80%) and petroleum (99.00%). The formulation of the biosurfactant to obtain an eco-friendly detergent was carried out with the addition of 0.2% of the stabilizer hydroxyethylcellulose (HEC), 5% fatty acid, and 0.2% potassium sorbate, and the commercial product was stored at 28°C for 90 days. The formulated biosurfactant maintained the stability of its surface tension at various pHs, temperatures, and NaCl concentrations and presented an absence of toxicity proven by the growth of the seeds of the vegetable cabbage *Coração-de-Boi* (*Brassica oleracea*) and cherry tomato (*Solanum lycopersicum*), as well as the survival of the microcrustacean *Artemia salina*. The formulated biosurfactant was able to fully disperse the oil in seawater. When placed in clayey soil contaminated with engine oil, the biosurfactant was able to remove, in 24 hours, 99.21% of the oil contained in the soil when used in its CMC. The formulated biosurfactant removed 98.42% of the oil adhered to the glass surface and removed 75.00% of the hydrophobic compound adsorbed to the porous surface in its CMC. Therefore, the commercial biosurfactant produced by *Bacillus invictae* UCP1617 demonstrates the feasibility of application as an eco-friendly biotechnological additive for remediation processes that consider the preservation and reduction of environmental impacts on ecosystems.

Keywords: biosurfactants; *Bacillus*; alternative substrates; corn steep liquor, bioremediation; pollutant removal.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Com o contínuo desenvolvimento da industrialização mundial, a demanda por petróleo como fonte de energia também está em constante aumento. No entanto, derramamentos de óleo devido à exploração e transporte acontecem com frequência em todo o mundo. Como consequência, grandes quantidades de óleo já foram lançadas em solo e ao mar em derrames de petróleo, deixando efeitos devastadores sobre o ambiente, os quais são ainda maiores em virtude do potencial tóxico dos dispersantes químicos comumente utilizados na remediação desses derramamentos (Geetha *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2022).

As plantas industriais movidas a óleo combustível, em especial, possuem problemas rotineiros de vazamentos acidentais, como também constituem fontes potenciais de poluição ambiental (Silva *et al.*, 2024). No caso da contaminação dos motores por óleo lubrificante, a remoção da graxa aderida torna-se um desafio específico e bem distinto da contaminação gerada pelas borras oleosas, uma vez que os processos de limpeza requerem a aplicação direta de algum agente tensoativo ou solvente, gerando, na maioria dos casos, outros problemas ambientais causados pela toxicidade e acúmulo dessas substâncias (Rocha e Silva *et al.*, 2019; Sarubbo *et al.*, 2022).

A tecnologia de tratamento biológico que utiliza microrganismos para degradação de poluentes hidrofóbicos, denominada biorremediação, apresenta a vantagens de ser uma tecnologia ambiental de baixo custo, podendo se tornar uma alternativa atrativa para solucionar os problemas relacionados à poluição por hidrocarbonetos (Almeida *et al.*, 2016; Sarubbo *et al.*, 2015). A biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo, entretanto, é limitada, uma vez eles são, na sua maioria, insolúveis em água. Alterações provocadas por agentes surfactantes, moléculas anfipáticas com capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial em fases fluidas, podem melhorar a mobilidade de óleo e, assim, aumentar a biodegradação de petróleo, acelerando o processo de remediação ambiental (Geetha *et al.*, 2018). Esses agentes tensoativos também são usados na solubilização de óleos e graxas em ambientes industriais (Sarubbo *et al.*, 2022).

Portanto, a importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado em aumentar a produção desses compostos em decorrência da diversidade de utilizações industriais. No mercado, há poucos

produtos capazes de remover com eficiência diversos tipos de petroderivados sem efeitos tóxicos secundários. Os dispersantes e detergentes que vêm sendo comumente utilizados pelas indústrias possuem alto grau de toxicidade, gerando resíduos nocivos ao meio ambiente (Farias *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022). Nesse sentido, a aplicação de agentes tensoativos naturais, como os surfactantes microbianos, surge como solução atrativa e eficiente nos processos de limpeza de petroderivados (Farias *et al.*, 2021). Os biossurfactantes são considerados ecológicos devido à alta biodegradabilidade e toxicidade reduzida. Apresentam, ainda, inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, como maior capacidade tensoativa, toxicidade reduzida, estabilidade frente a ampla faixa de pH e temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (Perfumo *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016).

O custo dos biossurfactantes microbianos variam de cerca de U.S. 10 \$/mg para a Sufactina pura (98% de pureza), um lipopeptídeo bacteriano utilizado em pesquisas médicas, a U.S. 24 \$/kg para fórmulas propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo (Singh *et al.*, 2018). Estimativas realizadas na década passada situaram os custos dos biossurfactantes em U.S. 3-20 \$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes sintéticos como etoxilatos e alquil-poliglicosídeos pelas indústrias químicas estão na faixa de U.S. 1-3 \$/kg (Geetha *et al.*, 2018; Karlapudi *et al.*, 2021). Os custos de produção dessas biomoléculas, embora ainda seja um gargalo tecnológico, têm sido reduzidos através do uso de substratos alternativos, de métodos de purificação mais eficientes, da seleção de cepas microbianas eficientes e do uso ferramentas estatísticas para aumentar os rendimentos.

O gênero *Bacillus*, em especial, tem sido investigado como produtor de biossurfactantes em diversos seguimentos industriais, destacando-se a indústria de petróleo. As espécies *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* produzem surfactantes de grande ação tensoativa (Rocha e Silva *et al.*, 2020). A eficiência de produção de biossurfactantes por essas bactérias pode ser intensificada a partir de alterações na fonte de nutrientes para os micro-organismos utilizando resíduos industriais, dentre outros parâmetros, o que colabora para uma economia verde (Silva *et al.*, 2022).

Portanto, o presente projeto teve como objetivo produzir um biossurfactante a partir de *Bacillus invicta* UCP1617 para aplicação na descontaminação de ambientes marinhos e terrestres contaminados por óleo. O biossurfactante foi

utilizado como componente da formulação de um detergente sustentável, atóxico e de baixo custo, capaz de remover petroderivados em diferentes superfícies comumente encontradas no ambiente industrial.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar o biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 para aplicação na formulação de um detergente sustentável, atóxico e de baixo custo capaz de remover petroderivados impregnados em solos, água e superfícies industriais.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a bactéria *Bacillus invictae* UCP1617 como produtora de biossurfactante.
- Avaliar diferentes meios de cultivo formulados com resíduos industriais para a produção de biossurfactante.
- Avaliar a influência das condições de cultivo na produção do biossurfactante utilizando um planejamento fatorial.
- Realizar o *scale-up* de produção do biossurfactante em biorreator piloto.
- Determinar as propriedades tensoativas e emulsificantes do biossurfactante selecionado.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante em diferentes condições ambientais.
- Caracterizar quimicamente e estruturalmente o biossurfactante.
- Determinar a toxicidade do biossurfactante.
- Formular o biossurfactante como aditivo de remediação.
- Avaliar a capacidade de dispersão de petroderivado em água do mar pelo biossurfactante.
- Simular experimentos de remediação de petroderivado pelo biossurfactante em solo contaminado.
- Simular experimentos de remoção de petroderivado pelo biossurfactante em superfície porosa.

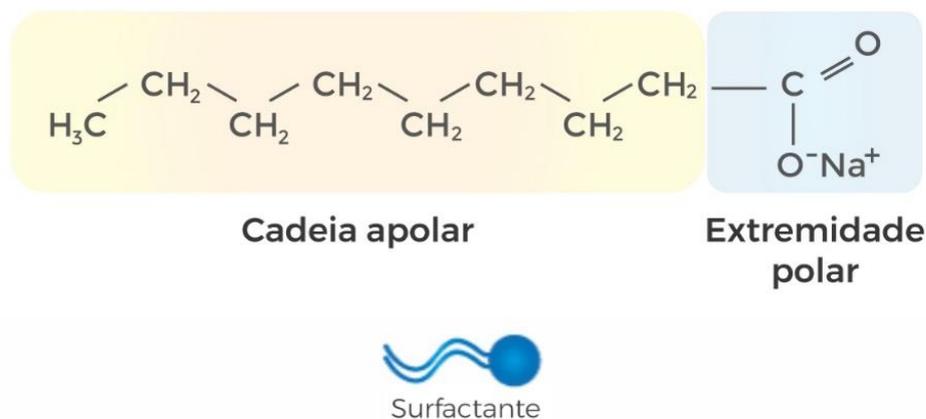
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biossurfactantes

Detergentes ou surfactantes são compostos constituídos de moléculas anfipáticas que possuem grandes grupos hidrocarbônicos, os hidrofóbicos, que não têm afinidade pela água e são apolares, e um ou mais grupos hidrofílicos, que têm afinidade pela água e são polares, e possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial. As partes não polares têm a capacidade de se dissolverem em gorduras e óleos e as partes polares se dissolvem em água. (Santos *et al.*, 2016; Selva Filho *et al.*, 2023).

A molécula do surfactante possui uma extremidade apolar constituída por uma longa cadeia carbônica linear e outra com extremidade polar podendo ser iônico (catiônico ou aniônico), não iônico ou anfotérico, conforme demonstrado na Figura 1 (Farias *et al.*, 2021).

Figura 1 – Molécula do surfactante com uma cauda apolar e cabeça polar

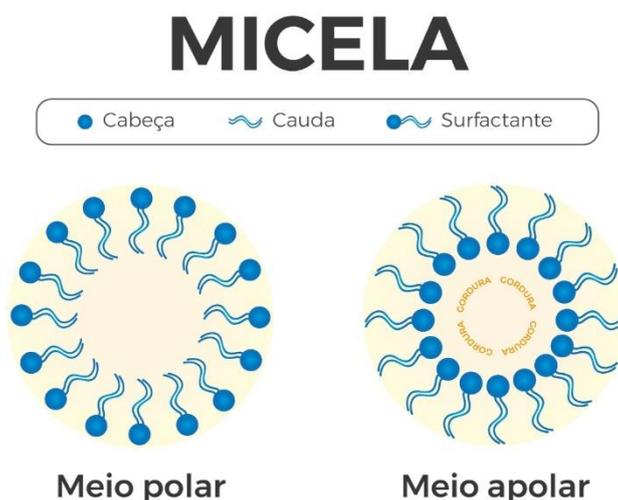


Fonte: O autor, 2023.

Os surfactantes, por serem substâncias que possuem moléculas anfifílicas, atuam na superfície dos líquidos reduzindo a sua tensão superficial, interferindo nas forças de coesão entre as moléculas da superfície deste líquido. À medida que o surfactante penetra e interage com o líquido, as forças de adesão entre as moléculas internas do líquido são alteradas, permitindo a formação de micelas (Silva *et al.*, 2024). A natureza do líquido determinará se estas micelas formadas estarão com as cadeias hidrofóbicas agrupadas voltadas para dentro e com a parte

hidrofílica das moléculas voltadas para fora (micela normal), ou o inverso, formando as micelas reversas (Figura 2).

Figura 2 – Formação dos tipos de micela de acordo com o líquido



Fonte: O autor, 2023.

A saturação ocorrerá com a adição progressiva do surfactante ao líquido, até que seja atingida a menor tensão superficial com a formação da Concentração Micelar Crítica (CMC), que poderá ser determinada através de mudanças bruscas no comportamento de algumas de suas propriedades físicas em solução, tais como, espalhamento de luz, viscosidade, condutividade elétrica, tensão superficial, pressão osmótica e capacidade de solubilização de solutos. (Silva; Araújo, 2019).

Os surfactantes podem ser de origem química, derivados do petróleo, e os de origem biológica, derivados da ação de micro-organismos e denominados de biossurfactantes. Os surfactantes químicos possuem uma grande variedade de aplicação em diferentes setores industriais, que por serem de origem química, apresentam características que os tornam nocivos ao meio ambiente, tais como baixa biodegradabilidade, alta toxicidade, bioacumulação e em corpos d'água podem provocar o fenômeno da eutrofização. Os surfactantes biológicos podem ter origem vegetal, extraídos de cascas, flores e frutos destes vegetais ou serem produzidos por micro-organismos. Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos, tais como bactérias, fungos e leveduras, utilizam como fonte de energia o carbono de constituintes de substratos diversos, gerando diferentes estruturas moleculares com diferentes propriedades emulsificantes (Farias et al., 2021).

Os biossurfactantes podem ser classificados em compostos de primeira e de segunda geração, onde os de primeira geração são os extraídos e purificados a partir de matérias-primas à base de plantas e animais e os de segunda geração são produzidos a partir de recursos renováveis através de síntese química e podem ser de baixo peso molecular ou de alto peso molecular (Farias *et al.*, 2021).

As vantagens dos biossurfactantes são de possuírem estabilidade em concentrações diversas de pH, temperatura e salinidade, baixa toxicidade, podem ser produzidos por uma grande diversidade de micro-organismos, serem biodegradáveis e permitirem a utilização de diferentes fontes de carbono como substrato (Sarubbo *et al.*, 2022).

3.2. Classificação

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua estrutura molecular como glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Sarubbo *et al.*, 2022).

Grande parte dos biossurfactantes possui uma parte lipofílica formada por uma cadeia de hidrocarbonetos e ácidos graxos e uma outra parte hidrofílica formada por um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato, aminoácido ou carboidrato, e classificados por sua composição química, massa molar, propriedades físico-químicas, modo de ação e origem microbiana (Freitas, 2021).

Os glicolipídeos, os lipopeptídeos e as lipoproteínas possuem baixa massa molar, enquanto os ácidos graxos e fosfolipídeos, os biossurfactantes poliméricos e os biossurfactantes particulados, são de alta massa molar (Fenibo *et al.*, 2019).

O Quadro 1 abaixo apresentam os tipos de biossurfactantes conforme sua classificação por estruturas moleculares os micro-organismos que lhes dão origem. (Fernandes, 2006).

Quadro 1 - Principais classes de biossurfactantes produzidos por micro-organismos

Tipo de biossurfactante	Micro-organismo
Glicolipídeos	
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sofrolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i>
Trealolipídeos	<i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos e fosfolipídios	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Surfactante particulados	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	<i>Cyanobacteria</i>
	<i>Pseudomonas marginalis</i>

Fonte: Fernandes (2006).

3.2.1. Glicolipídeos

Os glicolipídeos são compostos com uma ou mais unidades monossacarídicas, unidas através de ligações glicosídicas a uma molécula hidrofóbica. Dentre os glicolipídeos, os raminolipídios, sofrolipídeos e os o trehalolipídios, lipídios manosileritritol são os glicolipídios mais conhecidos (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2016).

Os raminolipídeos são moléculas anfifílicas compostas de uma parte hidrofóbica de ácidos graxos (ácido alifático hidroxilado ou não hidroxilado) e uma porção hidrofílica com uma ou duas raminoses e são produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* durante seu crescimento celular. Dentre os quatro tipos mais comuns produzidos por estes micro-organismos destacam-se os L-raminosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato e L-raminosil-L-raminosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Araújo *et al.*, 2016; Oliveira, 2018; Selva Filho *et al.*, 2023).

Os soforolipídeos são moléculas compostos por um dissacarídeo soforose (2'-O-β-Dglicopiranosil-1-β-D-glicopiranosose) e uma cauda apolar de ácido graxo de 16 ou 18 carbonos, unidos por uma ligação β-glicosídica. (Costa et al., 2021).

Os soforolipídios são metabólicos secundários produzidos pela levedura do gênero *Candida* não patogênica, tais como *Starmerella*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Cyberlindnera*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Wickerhamiella* (Afonso et al., 2020), a partir de açúcares e lipídeos, e secretados para o meio extracelular como uma mistura de compostos de estruturas químicas relacionadas (Santos et al., 2016). A parte polar é composta de soforose por lactonização ou acetilação e a parte apolar é uma cadeia de ácido graxo de comprimento variável (Selva Filho et al., 2023).

Os Trehalolipídeos são moléculas associados com diversas espécies dos gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* e *Gordonia* (Pele, 2017). Sua estrutura possui a trealose, que é formada por duas unidades de glicose, possuem baixa toxicidade e propriedades versáteis. (Sanches, 2016; Selva Filho et al., 2023).

3.2.2. Lipopeptídeos e lipoproteínas

Os lipopeptídeos constituem uma classe de biossurfactantes bastante variada, tanto por suas estruturas, quanto pelos micro-organismos produtores, onde o gênero *Bacillus* se destaca por ser o responsável pela produção de grande parte dos lipopeptídeos conhecidos atualmente (Lima, 2013). Os lipopeptídeos são formados por peptídeos hidrofílicos ligados a um ácido graxo hidrofóbico com diferentes comprimentos de cadeia. Entre os biossurfactantes produzidos, estão a surfactina, a iturina, a gramicidina e a polimixina. A surfactina e a iturina tipo A são ambas produzidas pelo *Bacillus subtilis* e a gramicidina e a polimixina são produzidas pelos *Bacillus brevis* e *Bacillus polymyxa*, respectivamente e por terem atividade antibacteriana são capazes de solubilizar enzimas de membrana (Eraz-Munõz et al., 2022; Larini et al., 2017).

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* e sua estrutura geral é formada por um aminoácido graxo ligado ao anel lactona (Ribeiro et al., 2020). A surfactina é um lipopeptídeo cíclico, constituído por sete aminoácidos cuja cauda hidrofóbica é formada por 13 a 15 carbonos de cadeia longa, havendo três tipos de surfactina conforme sequências destes aminoácidos (a

surfactina-A tem a L-leucina, a surfactina-B tem a L-valina e a surfactina-C tem a L-isoleucina) (Drakontis; Amin, 2020).

A itaurina é um heptapeptídeo ciclizado por ligação amida (Pathak, et al. 2014), formando um anel lactama ligados a uma cadeia de ácido graxo β -amino de 14 a 17 carbonos (Silva *et al.*, 2021) produzida por diversas linhagens de *Bacillus subtilis*, de baixa massa molar, contendo aminoácidos graxos, ligada por ponte amida a um resíduo de aminoácido no anel lactona (Fernandes, 2006). A itaurina apresenta uma sequência de aminoácidos ligados a um ácido graxo beta-aminado como componente lipofílico, com cadeias carbônicas que variam de 13 a 17 átomos de carbono (Bugay, 2009; Moro, 2018).

A gramicidina, produzida pelo *Bacillus brevis*, é um peptídeo hidrofóbico constituído de quinze aminoácidos intitulado de gramacidina D e um outro com dez chamado de gramicidina S, embora existam outros tipos com número de aminoácidos diferentes na cadeia (Solano, 2008).

A polimixina, produzida pelo *Bacillus polymyxa*, tem como estrutura básica um heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídeo acilada por um ácido graxo no terminal amino (Choi *et al.*, 2009). A polixina é formada por uma classe quimicamente multiforme com cinco porções químicas diferentes, intituladas de Polimixina A, B, C, D e E, com uma estrutura peptídica básica simples (Lahiry *et al.*, 2017).

3.2.3. Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros

Ácidos graxos e fosfolipídeos são produzidos por várias espécies de bactérias e leveduras utilizando n-alcenos como fonte de carbono (Maia Neto, 2021) e são constituídos de ácidos graxos, ou formados de uma parte lipídica ligadas a grupos fosfato (Da Silva Marinho *et al.*, 2022).

Diferentes bactérias e leveduras produzem grandes quantidades de surfactantes do tipo ácidos graxos e fosfolipídios durante o crescimento em n-alcenos (Santos *et al.*, 2016). Os ácidos graxos, fosfolipídios e lipídeos neutros pertencem a uma classe de baixa massa molar (Lima, 2017). Ácidos graxos podem ser produzidos a partir de bactérias do tipo *Candida* sp., *Corynebacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Acinetobacter* sp., e os fosfolipídios são derivados da *Thiobacillus thiooxidans* (Da Silva Marinho *et al.*, 2022).

3.2.4. Biossurfactantes poliméricos

Vários grupos químicos compõem os biossurfactantes poliméricos; dentre estes se destaca o emulsan, onde os ácidos graxos estão ligados a um heteropolissacarídeo (Woods Jr., 2004). Fazem parte deste grupo, além do emulsan, o biodispersan produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, e o liposan, obtido a partir da levedura *Candida lipolytica* (Silva; Nitschke, 2017).

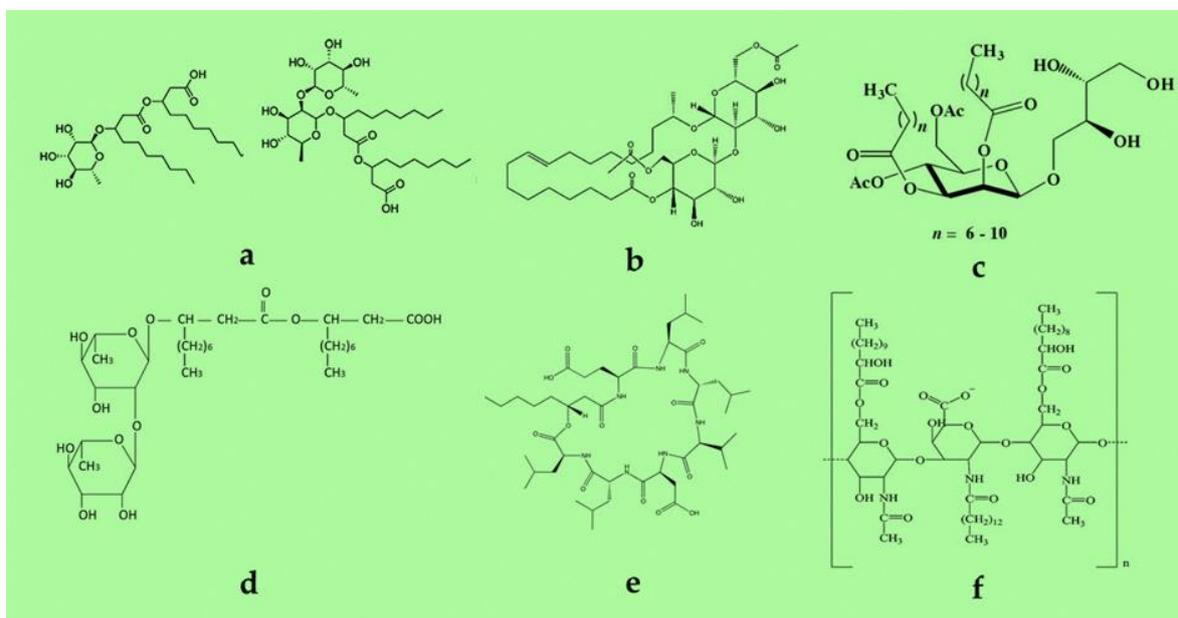
3.2.5. Biossurfactantes particulados

Os biossurfactante particulados são de alta massa molar e formam uma microemulsão que exerce uma influência na absorção de alcanos em células microbianas. São compostos essenciais para a absorção de alcanos pela célula microbiana, tendo como constituinte as vesículas e células microbianas como da membrana extracelular de *Acinetobacter* sp., que podem captar alcanos para a célula microbiana com elevada atividade surfactante (Lima, 2017).

Os biossurfactantes particulados apresentam elevada hidrofobicidade superficial e têm como exemplo bactérias degradadoras de hidrocarbonetos *Serratia* spp., *Cyanobacteria* spp. e *Staphylococcus aureus* (Moro, 2018).

A Figura 3 ilustra as estruturas de alguns dos biossurfactantes mais estudados.

Figura 3 – Estruturas químicas de alguns biossurfactantes: (a) Raminolipídeo, (b) Soforolipídeo, (c) Lipídeos Manosileritritol (MEL), (d) Trealose lipídeos, (e) Surfactina e (f) Emulsan.



3.3. Propriedades

Embora haja diferenças entre as biomoléculas surfactantes, elas geram biossurfactantes com características comuns relacionadas à estrutura química, metabolismo celular, substrato, pH e força iônica dentre outras. As propriedades que representam vantagens entre os biossurfactantes sobre os de origem convencional são as atividades superficial e interfacial, tolerância a temperatura, pH e força iônica, biodegradabilidade, baixa toxicidade, especificidade, biocompatibilidade e biodigestibilidade e formação de emulsão, como será discutido a seguir, tornando-os capazes de solubilizar substratos hidrofóbicos tais como hidrocarbonetos, lipídios, óleos e antibióticos (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Nitschke; Pastore, 2002).

3.3.1. Atividade superficial e interfacial

Os biossurfactantes produzem menor tensão superficial em menores concentrações. (Rocha, 2017). A CMC dos biossurfactantes, que é a medida de sua eficiência, varia entre 1 mg/L e 2000 mg/L, enquanto a tensão interfacial entre o óleo e a água varia entre 1 mN/m e 30 mN/m, respectivamente (Santos *et al.*, 2016).

3.3.2. Tolerância para temperatura, pH e força iônica

Os biossurfactantes apresentam propriedades emulsificantes e tensoativas estáveis e eficientes frente às variações de pH, temperatura e concentração salina; entretanto, sua eficiência é reduzida em valores de pH inferiores a 4 (Santos *et al.*, 2015). Embora os valores de pH do meio afetam fortemente a produção de muitos metabólitos secundários enzimáticos, os biossurfactantes mantêm sua habilidade de emulsificação tanto em pH ácidos como em básicos, pois em diferentes concentrações de NaCl se apresentaram estáveis em valores de pH entre 6 e 8, em concentrações de NaCl de até 10% (m/v) e em temperaturas de até 121°C (Banat *et al.*, 2021; Felix, 2012).

3.3.3. Biodegradabilidade

Os biossurfactantes são facilmente degradados na água e no solo nos processos de biorremediação, onde a degradação de hidrocarbonetos por micróbios presentes no ambiente contaminado é o principal método para remover poluentes de hidrocarbonetos do solo. Outra forma é adicionando ao solo micro-organismos produtores de surfactante (Banat *et al.*, 2000).

3.3.4. Toxicidade reduzida

Os biossurfactantes possuem baixa toxicidade, permitindo seu uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, pois são sintetizados a partir de substratos renováveis e apresentam grande variação química e características estruturais e propriedades físicas distintas e são altamente biodegradáveis (Araujo *et al.*, 2013; Felipe; Dias, 2017).

3.3.5. Especificidade

Os biossurfactantes podem ser utilizados em diversas aplicações, apresentando especificidade para cada situação, sendo assim usados como agente antifúngico, antiviral, biofungicida, além de serem usados em aplicações alimentares específicas, farmacêuticas e cosméticas, como mencionado anteriormente (Felipe; Dias, 2017; Nitschke; Pastor, 2002).

3.3.6. Biocompatibilidade e digestibilidade

Os biossurfactantes possuem características próprias, originando produtos de grande interesse tecnológico por sua elevada biodegradabilidade, biocompatibilidade e digestibilidade, permitindo seu emprego em diferentes indústrias, principalmente a alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (Alves *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016).

3.3.7. Formação de emulsão

A emulsão consiste em um sistema heterogêneo, contendo ao menos um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) em forma de pequenas gotas, com o diâmetro que, em geral, excede 0,1 µm. Os biossurfactantes podem atuar como emulsificantes ou desemulsificantes, estabilizando ou desestabilizando sistemas de emulsões (Santos *et al.*, 2016).

3.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactantes

Diversos fatores podem alterar a produção e o tipo dos biossurfactantes produzidos, pois o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos dependem de fatores físicos, químicos e nutricionais.

Os fatores ambientais que afetam a produção de biossurfactantes são pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia, a disponibilidade de receptores de elétrons e a presença de cometabólitos (Sarubbo *et al.*, 2022).

3.4.1. Fontes de carbono

Fontes de carbono diversas são empregadas na produção de biossurfactantes, tais como malte, melaço, gordura animal, óleos vegetais, óleos vegetais residuais (óleos pós fritura), derivados de petróleo, produtos derivados de laticínios, entre outras (Sarubbo *et al.*, 2022).

As fontes de carbono usadas na produção de biossurfactantes podem ser solúveis em água, como os açúcares, tendo seu efeito produtor de biossurfactantes potencializado com o acréscimo de substratos hidrofóbicos como elementos constituintes do meio de cultura, porque os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo para seu metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto os substratos hidrofóbicos

são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante (Fontes, 2008; Rocha e Silva *et al.*, 2017).

3.4.2. Fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio disponíveis no meio de cultura têm forte influência na quantidade e na qualidade dos biossurfactantes produzidos pelos micro-organismos, por se tratar de um elemento essencial para o crescimento celular e à produção de proteínas e enzimas (Santiago, 2019).

Nos processos fermentativos, a relação C/N afeta o acúmulo de metabólitos, onde concentrações reduzidas de nitrogênio limitam o crescimento de bactérias e direcionam o metabolismo celular para a produção de metabólitos, enquanto níveis elevados de nitrogênio direcionam o substrato à síntese de material celular, limitando relativamente o acúmulo de produtos (Santos *et al.*, 2016).

Existem fontes variadas de nitrogênio a serem empregadas. Extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de amônio, peptona, nitrato de sódio, extratos de malte e de carne têm sido utilizados para a produção de biossurfactantes (Santiago, 2019).

3.4.3. Fontes de sais minerais

Além das fontes nutricionais como carbono e nitrogênio, outros fatores podem afetar a produção dos biossurfactantes, tais como os sais minerais.

A composição de outros nutrientes ao meio de cultura, como fósforo, ferro, manganês e magnésio também contribuem para a síntese dos biossurfactantes. Dentre estes, destacam-se elementos como boro, cálcio, cobre, cobalto, ferro, manganês, molibdênio e zinco em suas formas catiônicas (K^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , B^{+3} , Mo^{+6}) (Fontes *et al.*, 2008).

O ferro atua na atividade de algumas enzimas e na respiração celular; o manganês atua como substituto do ferro na cadeia respiratória de alguns micro-organismos e como ativador enzimático; o cobalto participa da síntese das desoxirriboses, constituintes do DNA; o zinco é um metal traço associado à replicação do material genético; o cobre atua no crescimento e manutenção microbiana; o boro atua como indutor próprio na comunicação célula-célula em bactérias; o molibdênio atua como estabilizador dos ribossomos, membranas e ácidos nucleicos; o cálcio tem importância na integridade e estrutura das

membranas celulares; o potássio é necessário para a atividade de diversas enzimas (Santiago, 2019).

3.4.4. Condições de crescimento

Além das condições nutricionais, os fatores ambientais físicos afetam a produção e desenvolvimento de micro-organismos produtores de biossurfactantes (Sarubbo *et al.*, 2022).

A umidade é considerada o fator ambiental mais importante na produção dos micro-organismos, pois ocorre apenas mediante a disponibilidade adequada de água (Wetler-Tonini *et al.*, 2010).

A temperatura é um fator físico importante porque pequenas variações podem afetar o consumo de substrato pelo micro-organismo, sua atividade metabólica e a consequente produção dos biossurfactantes. Baixas temperaturas diminuem a fluidez do meio e aumentando sua viscosidade, afetando a permeabilidade da membrana celular e o metabolismo microbiano. Altas temperaturas estão associadas às atividades enzimáticas mais altas e taxas de biodegradação mais rápidas e podem provocar efeitos tóxicos dependendo do meio de cultura usado. A temperatura mais favorável para a produção dos biossurfactantes por diferentes fungos é de 30°C (Sarubbo *et al.*, 2022). Temperaturas altas podem desnaturar proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (Gonçalves, 2022).

O pH é um fator químico que tem relação direta com a solubilidade dos nutrientes e respectiva atividade microbiana. A permeabilidade celular é afetada diretamente pelo pH do meio porque este interage diretamente na atividade microbiana devido aos efeitos dos íons H⁺, como também na atividade enzimática, e, indiretamente, na disponibilidade de nutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos micro-organismos, afetando suas condições de crescimento (Wetler-Tonini *et al.*, 2010). Estudos demonstram que uma ótima faixa de pH para a geração de compostos biossurfactantes varia entre 5,7 e 7,8 (Sarubbo *et al.*, 2022).

3.5. Resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes

Os micro-organismos usam uma enorme gama de subprodutos como fonte de carbono e de energia para seu crescimento. As indústrias produzem diariamente subprodutos tais como derivados da indústria de petróleo, resíduos de amido,

resíduos de destilaria de óleos e produtos lácteos, melaço de cana, dentre outros, que podem ser usados como nutrientes para o desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos (Sarubbo *et al.*, 2022).

Dentre estes salientam-se os óleos vegetais, efluentes oleosos, efluentes amiláceos, gordura animal, gordura vegetais, resíduos de óleo de cozinha vegetal, sabão, melaço, resíduos laticínios (soro de leite), milhocina, água residual de farinha de mandioca e resíduos da destilaria de óleo e glicerol (Santos *et al.*, 2016). Dentre estes resíduos, a milhocina, subproduto da produção de beneficiamento do milho, se destaca.

3.5.1. Milhocina

A milhocina é um substrato de origem agroindustrial produzido a partir da umidificação da farinha de milho, cuja composição é de carboidratos e aminoácidos livres, proteínas, ácidos orgânicos, vitaminas, sais minerais (magnésio, fósforo, cálcio, potássio, cloreto, sódio, enxofre), fosfato de mio-inositol. (Freitas *et al.*, 2022; Pele, 2017).

A Tabela 1 mostra que a composição da milhocina varia de acordo com a sua origem, apresenta um alto valor proteico e é utilizada na composição de tônicos, em injeções endovenosas e enriquecimento com dextrose para transfusões (Lima *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Composição química de milhocina

Componentes	Concentração %
Milhocina em Base Seca	50,7
pH	3,9
Proteína	40,8 (Base Seca)
Ácido Láctico	16,0 (Base Seca)
Açúcares Redutores	12,8 (Base Seca)
Compostos Variados	30,4 (Base Seca)

Fonte: Lima *et al.*, (2011); Silva, (2019).

A milhocina é composta de 21% a 45% de proteínas, 20% a 26% de ácido láctico, 8% de cinzas (contendo Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, etc.), 3% de carboidratos e baixo teor de gordura (0,9% - 1,2%) (Santos *et al.*, 2016). É uma excelente fonte de

aminoácidos, vitaminas e minerais (cálcio, cobre, manganês, ferro, magnésio, potássio, sódio, fósforo, selênio, zinco e enxofre) para os micro-organismos. (Gomes, 2013).

3.6. Aplicações ambientais e industriais dos biossurfactantes

O uso de biossurfactantes está diretamente ligado às suas propriedades e natureza química. Uma vez que os surfactantes têm um caráter de fase versátil e possuem diversas estruturas coloidais, encontram aplicação em muitos processos industriais, especialmente onde é necessária a modificação da atividade da interface ou para a estabilidade dos sistemas coloidais (Ribeiro *et al.*, 2020).

Os biossurfactantes têm uma ampla gama de aplicações biotecnológicas em petróleo, alimentos, bebidas, cosméticos, detergentes, têxteis, tintas, mineração, celulose, indústrias farmacêuticas e em novas aplicações, como a nanotecnologia (Fenibo *et al.*, 2019). Sendo assim, o emprego dos biossurfactantes nos processos de limpeza e remoção de oleosidade têm melhor desempenho naqueles classificados como aniônicos e nos processos de emulsificação de produtos para a pele; os biossurfactantes não iônicos possuem melhor desempenho em detergentes de baixa temperatura, apresentando eficiências de degradação de petróleo bruto de 88%, 92% e 97% (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Selva Filho *et al.*, 2023).

Atualmente, o mercado principal para os biossurfactantes é a indústria do petróleo, onde esses compostos podem ser utilizados na limpeza de derramamento de óleos, na remoção de resíduos de óleo de armazenamento de tanques, na recuperação de petróleo e na biorremediação de solos e da água (Drakontis; Amin, 2020; Mohanty *et al.*, 2021; Sarubbo *et al.*, 2022).

3.6.1. Biorremediação

Define-se biorremediação como o emprego de processos biológicos para degradar, transformar e/ou remover contaminantes ambientais da água e do solo, através de processos usando-se micro-organismos tais como bactérias, leveduras e fungos que utilizam estes contaminantes como fontes de carbono e energia, sendo capazes de elaborar biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (Zahed *et al.*, 2022).

A biorremediação pode ser realizada através de dois processos, em que o micro-organismo degrada diretamente o contaminante através de seu metabolismo

no próprio local contaminado e indiretamente através da administração do biossurfactante modificando as propriedades físico-químicas e facilitar a recuperação do contaminante, que pode ser aplicado sozinho ou em combinação com outros compostos (Banat *et al.*, 2021; Eras-Muñoz *et al.*, 2022).

Uma vez que os micro-organismos podem produzir biossurfactantes a partir de diferentes substratos, a biorremediação pode ser usada em tratamentos de diferentes resíduos, que agem removendo o contaminante do meio através do processo de adsorção na sua superfície (Arruda, 2015).

Enquanto a biorremediação é um método eficaz e ambientalmente amigável, o tempo e os custos envolvidos tornam este processo inviável para o tratamento de grandes quantidades de resíduos (Carlos, 2019). Assim, a utilização de biossurfactantes, surge como uma alternativa segura para melhorar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos, permitindo a dessorção e solubilização de hidrocarbonetos e facilitando a assimilação destes compostos por células microbianas (Rocha e Silva *et al.*, 2019).

A biodegradação de hidrocarbonetos por biossurfactantes ocorre através de dois mecanismos. O primeiro ocorre através do aumento da disponibilidade dos substratos hidrofóbicos aos micro-organismos através da redução da tensão superficial do meio ao redor da bactéria e da redução da tensão interfacial entre a parede celular e as moléculas de hidrocarboneto. O outro mecanismo envolve a interação entre o biossurfactante e a superfície celular, promovendo modificações na membrana e facilitando a aderência do hidrocarboneto à membrana. Assim, os biossurfactantes impedem a formação de pontes de hidrogênio e permitem a ocorrência de interações hidrofílicas-hidrofóbicas, as quais provocam a reorganização das moléculas e reduzem a tensão superficial do líquido, aumentando a área superficial, promovendo a biodisponibilidade e a consequente biodegradabilidade (Sarubbo *et al.*, 2022). Em baixas concentrações iniciais de introdução do biossurfactante na água e no solo, ocorre uma melhor eficiência de biodegradação dos contaminantes derivados do petróleo (Selva Filho *et al.*, 2023).

3.6.2. Recuperação avançada de petróleo

A aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de óleo (EOR) se destaca, uma vez que essas biomoléculas atuam na emulsificação e desemulsificação de óleos pesados através da redução da tensão interfacial, da

umidificação de superfícies sólidas, da dissolução de óleos, espalhamento, formação de espumas e a inibição de corrosão de equipamentos (Eras-Muñoz *et al.*, 2022).

As estratégias adotadas nos métodos de recuperação de petróleo podem ser divididas em primária, secundária e terciária. A estratégia primária de recuperação de petróleo durante a extração do petróleo bruto pode ser realizada usando-se a própria pressão natural dos reservatórios para conduzir óleo e gás para poços de produção; entretanto, à medida que ocorre a redução desta pressão interna destes reservatórios se faz necessária a adoção de métodos que forneçam energia adicional para remover o óleo residual (Fenibo *et al.*, 2019).

A estratégia de recuperação secundária é usada quando a pressão do reservatório se torna insuficiente devido aos efeitos de descompressão dos fluidos no reservatório, das forças capilares, das forças gravitacionais e do aumento da viscosidade, sendo necessário o emprego de pressão induzida (Rocha e Silva *et al.*, 2019).

A recuperação de petróleo pelos métodos primário e secundário fica em torno de 40%, deixando 60% do óleo original retido no reservatório. A recuperação terciária ou avançada é empregada quando os métodos secundários não são mais suficientes para promover a recuperação do petróleo, embora a extração ainda seja rentável (Santiago, 2019). As técnicas avançadas de recuperação de petróleo podem aumentar o rendimento de recuperação de óleo através de métodos miscíveis, térmicos e químicos com a injeção de gases, polímeros sintéticos e surfactantes. A técnica não térmica usa métodos biológicos, sendo denominada de recuperação avançada de petróleo microbiana (MEOR) (Zahed *et al.*, 2022).

A MEOR é uma técnica de recuperação de óleo em que micro-organismos ou seus produtos metabólicos são usados para recuperar óleo residual e é empregada em duas abordagens diferentes: *ex situ* ou *in situ*. A técnica *in situ* consiste na injeção de micro-organismos produtores de surfactantes e nutrientes no reservatório e a técnica *ex situ* consiste na produção externa de biossurfactantes e posterior injeção no reservatório (Fenibo *et al.*, 2019).

Quanto maior a quantidade de micro-organismos produtores de biossurfactantes injetados no reservatório mais rápido e eficiente será o processo de biorremediação pois atuam reduzindo a pressão hidrostática, a viscosidade do óleo e a tensão nas interfaces óleo/rocha e óleo/água (Da Silva Marinho *et al.*, 2022; Santos, 2019).

3.6.3. Remoção de petroderivados em ambiente marinho

Os processos de extração em ambiente marinho do petróleo bruto e seu transporte através de navios petroleiros e dutos, podem envolver problemas graves de contaminação das águas oceânicas causando grandes impactos ambientais (Silva *et al.*, 2022).

As causas de derramamento de petróleo nos oceanos envolvem diversas fontes, que vão desde defeitos nos navios-petroleiros até naufrágios, vazamentos nas plataformas de petróleo e de poços, rompimentos de dutos submarinos causados por corrosões ou trincas, lançamento no mar de água utilizada para lavar reservatórios que contenham petróleo (Silva *et al.*, 2022).

Quando ocorre um derramamento de óleo no mar, podem ocorrer vários processos físico-químicos em função de fatores diversos, tais como, formação de um filme na superfície aquática que impede a oxigenação da água, causando a morte de espécies da fauna e flora marinhas; evaporação de parte do petróleo em função da temperatura, emulsificação do óleo com a água do mar, espalhamento, dissolução, dispersão, fotoxidação sedimentação e biodegradação (Arruda, 2015). Este óleo pode, através do movimento de marés e ação dos ventos, contaminar ecossistemas diversos.

A remoção destes poluentes xenobióticos envolve o uso de dispersantes e absorventes, contenção do óleo através de barreiras flutuantes, bombeamento a vácuo, jateamento com água a diferentes pressões até queima *in situ* deste material combustível sobrenadante (Zahed *et al.*, 2022).

Os biossurfactantes podem agir como dispersantes para a remoção de petroderivados do ambiente marinho, não poluindo o ambiente como os surfactantes sintéticos que constituem as fórmulas dos dispersantes (Eras-Muñoz *et al.*, 2022).

3.6.4. Inibidores de corrosão metálica

Os equipamentos usados na indústria do petróleo e gás, por serem confeccionados em aço-carbono e aços de baixa liga, são vulneráveis à corrosão devido às condições de elevadas temperaturas e pressões e aos gases corrosivos dissolvidos em meio salino (Ribeiro, 2020). A corrosão é um processo de deterioração de um material causado por ação química ou eletroquímica do meio, que começa com a adsorção de prótons em superfícies metálicas, seguida por um

choque eletroquímico irreversível. Em meio aquoso, os cátions metálicos podem se dissolver ou reagir com ânions como enxofre, expondo assim superfície mais metálica para ataques subsequentes (Da Silva, 2017; Kanicky *et al.*, 2001).

A corrosão destes materiais pode ser controlada com o uso de inibidores de corrosão, que são substâncias químicas que reduzem a taxa de corrosão do metal e podem ser produtos químicos inorgânicos, surfactantes ou inibidores de componentes mistos (Almeida *et al.*, 2016). Entretanto, o uso dessas substâncias pode causar riscos para a saúde humana e ambiental.

A biocorrosão microbiana em campos de petróleo em ambientes marinhos pode ser causada por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), que criam um biofilme constituído por várias células bacterianas, Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS) e produtos de corrosão (Faciolly *et al.*, 2022).

A acidificação e a Corrosão Microbiologicamente Influenciada (CMI) são os principais problemas associados às BRS dentro da indústria de petróleo pelo acúmulo de gás sulfídrico (Lima, 2017). Para o controle da CMI, vários métodos podem ser empregados, tais como limpeza mecânica, proteção catódica, biocidas e inibição microbiana da corrosão (Farias, 2016).

Uma alternativa aos tratamentos convencionais é o emprego de biossurfactantes para substituir os surfactantes sintéticos (Araújo *et al.*, 2016). Os surfactantes formam um filme na superfície do metal, onde o grupo hidrofílico destas moléculas interagem com a superfície metálica e outros íons O_2 e H^+ além da água, evitando a corrosão (Araújo *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2020).

3.6.5. Agentes desemulsificantes

Durante o processo de extração do petróleo, à medida que a pressão dos reservatórios diminui a água move-se para o interior destes, formando emulsões que podem ser muito estáveis devido à presença de compostos com características polares como asfaltenos e resinas, que atuam como emulsificantes naturais e formam filmes resistentes na interface petróleo/água (Rocha e Silva *et al.*, 2019). Para a quebra destas emulsões podem ser usados processos físicos, tais como separação térmica, mecânica, elétrica e química ou produtos químicos como desemulsificantes, que são compostos de um ou mais agentes tensoativos derivados de ácidos graxos, glicóis e alquilfenóis dispersos em um sistema de solvente (Junqueira *et al.*, 2018). Estes tensoativos químicos têm efeitos

contaminantes em organismos marinhos e não são biodegradáveis. Sendo assim, os biossurfactantes, por possuírem propriedades favoráveis tais como atividades superficial e interfacial, biodegradabilidade e baixa toxicidade, são mais favoráveis e eficientes neste tipo de aplicação (Rocha e Silva *et al.*, 2017).

3.6.6. Remoção de metais pesados

A contaminação do solo caracteriza-se pela presença de substâncias, micro-organismos ou organismos, que não fazem parte da sua composição geológica ou que se encontram presentes em menores concentrações ou quantidades no solo ou nos sedimentos. Embora haja a capacidade de autorecuperação do solo, quando a acumulação de contaminantes é excessiva, o dano pode ser irreversível, pois os metais não são biodegradáveis (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Sarubbo *et al.*, 2015).

Os integrantes do grupo de metais e metalóides contaminantes incluem os metais cobre, chumbo, cádmio, níquel, mercúrio, cromo, zinco, cobalto, selênio, molibdênio, urânio, tálio, vanádio, berílio, prata e os metalóides arsênio, antimônio e boro (Caralinda, 2022).

Entre as atividades antropogênicas que estão diretamente ligadas à contaminação por metais pesados, estão a mineração, fundição, indústrias eletrônicas, têxteis e petroquímicas, consumo de combustíveis fósseis e agricultura (Fernandes; Silva, 2021). Estes metais pesados podem ser dispersados por arraste de sedimentos, lixiviação em águas superficiais, infiltração em águas subterrâneas, dispersão por ventos, acumulando-se na cadeia alimentar, podendo ser removidos por processos diversos como encapsulamento, lavagem do solo, extração eletrocinética, estabilização, solidificação, vitrificação, fitorremediação e biorremediação (Fernandes; Silva, 2021).

Os metais pesados podem ser removidos do solo através de sua complexação associada a um tensoativo ou por troca iônica (Rocha Júnior *et al.*, 2019). Os mecanismos para a remoção de metais pesados por biossurfactantes são os de troca iônica, precipitação-dissolução e ligação contra-íon (Corrêa *et al.*, 2015). Os biossurfactantes aniônicos, por possuírem carga eletrônica negativa, se ligam ionicamente ao metal que possui carga positiva, enquanto os biossurfactantes catiônicos podem substituir íons metálicos de carga semelhante por meio de troca iônica, diminuindo a toxicidade de metais pesados e promovendo a atividade microbiana no solo, pois facilitaram a solubilização, dispersão e sorção de metais e

permitiram o reaproveitamento dos solos tratados (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2016).

Vários micro-organismos já foram usados para a produção de biossurfactantes para a remoção de metais pesados, devido às suas características intrínsecas tais como biodegradabilidade, baixa toxicidade e eficácia na remoção de metais pesados e compostos orgânicos hidrofóbicos do solo e da água, através dos micro-organismos *Candida bombicola*, *Candida sphaerica* como também *Bacillus* e *Pseudomonas*, que segundo têm a capacidade de absorver íons metálicos do solo (Rocha Júnior *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2022).

3.7. Perspectivas de utilização dos biossurfactantes no mercado

Nos processos biotecnológicos a economia é sempre um fator importante, especialmente nos casos de produção de biossurfactantes. Os biossurfactantes estão, cada vez mais ganhando o mercado, embora a produção industrial em larga escala ainda esteja comprometida em função do ponto de vista econômico (Zuffo; Aguilera, 2021).

O sucesso da produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos de baixo custo e da utilização de substratos mais baratos, que representam de 10 a 30% do custo total de produção. Os biossurfactantes têm que competir com os surfactantes petroquímicos considerando três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção junto à necessidade de aplicação pretendida (Farias *et al.*, 2021).

São sugeridos quatro fatores para a redução dos custos dos biossurfactantes: os micro-organismos (selecionados, adaptados ou criados para produção em larga escala), o processo (selecionado, adaptado ou criado para garantir baixo custo operacional), o meio de cultura (adaptado para baixo custo) e o processamento de produtos reciclados (Sarubbo *et al.*, 2022).

O custo de produção de biossurfactantes pode ser absorvido, caso estes sejam utilizados em baixa concentração, para a produção de cosméticos, de medicamentos e de alimentos. Para aplicações mais abrangentes, por outro lado, como a recuperação de óleos, a qual requer grandes volumes de surfactantes, o custo de produção pode dificultar a utilização destes biocompostos, o que pode ser superado através da utilização de biomoléculas brutas, que elimina os custos associados à purificação (Sarubbo *et al.*, 2022).

Embora o aperfeiçoamento das tecnologias de produção dos biossurfactantes já tenha possibilitado um aumento de 10-20 vezes da sua produtividade, é provável que novos e significativos progressos sejam necessários para tornar essa tecnologia comercialmente mais viável.

3.1. REFERÊNCIAS

AFONSO, L.; SILVEIRA, V.A.I.; Victória A.; CARETTA, T.O.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M.A.P.C. Application of agro-industrial by-products as nitrogen sources in the production of sophorolipids by *Starmerella bombicola*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 14875-14887. 2020.

ALMEIDA, D. G.; SOARES DA SILVA, R.D.C.F.; LUNA J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1718-1726, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>.

ALVES, E.P.; TAVARES, L.B.B.; GERN, R.M.; SILVA, D.A.K.; FURLAN, S.A.; WISBECK, E. Production and characterization of biosurfactants metabolized by *Pleurotus sajor-caju* from soybean oil. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, 2017. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620170003.0201>.

ARAUJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, p. 848-858, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019>.

ARAUJO, LV.; GUIMARÃES, C.R.; MARQUITA, R.L.S.; SANTIAGO, V.M.J.; SOUZA, M.P.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D.M.G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171-178, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.036>.

ARRUDA, F.V.F. **Biodiversidade de fungos filamentosos em água do mar e aplicação de consórcio na degradação de óleo diesel**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2015.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002530051648>.

BANAT, I.M., CARBOUÉ, Q., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., CÁZARES-MARINERO, J.D.J. Biosurfactants: The Green Generation of Specialty Chemicals and Potential Production Using Solid-State Fermentation (SSF) Technology. **Bioresource Technology**, v. 320, p. 124222, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124222>

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

CARALINDA, I.F.S. **Análise de Risco para a Saúde Humana devido à Contaminação de Solos com Metais Pesados - Caso de Estudo**. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa. Portugal. 2022.

CARLOS, A.C. **Prospecção de microrganismos e genes envolvidos na biodegradação de petróleo e derivados**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2019.

CHOI, S.K.; PARK, S.Y.; KIM, R.; KIM, S.B.; LEE, C.H.; KIM, J.F.; PARK, S.H. Identification of a Polymyxin Synthetase Gene Cluster of *Paenibacillus polymyxa* and Heterologous Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 10, pág. 3350-3358, 2009. <https://doi.org/10.1128/jb.01728-08>

CORRÊA, P.F.; DURVAL, I.J.B.; BRITO, J.G.M.; FERREIRA, I.N.S.; MERGULHÃO, T.G.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. **Remoção de metais pesados em efluente sintético pelo biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa***. Recife. 2015.

COSTA, N.J.A.; CARETTA, T.O.; BALDO, C.; CELLIGOI, M.A.P.; Application of sophorolipids produced by *Starmerella bombicola* in active films for strawberries coating. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 88834-88849, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-173>

DA SILVA, K.A. **Avaliação da trietilamina como inibidor de corrosão do aço API em meio ácido e marinho**. Rio de Janeiro. 2017.

DA SILVA MARINHO, P.S.; DA SILVA, R.R.; DE LUNA, J.M. Microbial biosurfactants and environmental applications: a narrative review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, 2022. <http://doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34123>

DRAKONTIS, C.E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 48, p. 77-90, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.01>

ERAS-MUÑOZ, E.; FARRÉ, A.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T. Microbial biosurfactants: A review of recent environmental applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 12365-12391, 2022. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>

FACCIOLI, Y.E.S. Aplicação do biossurfactante obtido por *Pseudomonas cepacia* CCT 6659 em processos de biorremediação e inibição de corrosão metálica. **Journal of Biotechnology**, v. 351, p. 109-121, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.04.009>

FARIAS, A.P.F. **Isolamento, seleção e identificação de bactérias produtoras de bioativos com potencial para aplicação na indústria do petróleo**. Salvador – BA. 2016.

FARIAS, C.B.B.; ALMEIDA, F.C.G.; SILVA, I.A.; SOUZA, T.C.; MEIRA, H.M.; SOARES DA SILVA, R.C.F.; SARUBBO, L.A. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28–39, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>

FELIX, A. K. **Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LAMI005 a partir de suco de caju**. Universidade Federal do Ceará (UFC). Fortaleza – Ceará, 2012.

FELIPE, L.O.; DIAS, S.C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Quím. nova esc.** – São Paulo-SP, BR. Vol. 39, N° 3, p. 228-236, 2017. <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160079>

FENIBO, E.O.; IJOMA, G.N.; SELVARAJAN, R.; CHIKERE, C.B. **Surfactantes Microbianos: a próxima geração multifuncional biomoléculas por formulários dentro da indústria do petróleo e suas associadas ambiental remediação.** Nigéria. 2019.

FERNANDES, J.A.F.; SILVA, L.N.A. Técnicas de biorremediação microbiana de solos contaminados com metais pesados. In: **XII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Salvador, BA.** 2021.

FERNANDES, P.A.V. **Produção, extração e caracterização de surfactante por *Bacillus subtilis* R14.** 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FONTES, G.C. **Produção de Biossurfactante por *Yarrowia lipolytica*.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. **Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos** – EQ, Rio de Janeiro. 2008.

FREITAS, E.L. **Biotransformação de resíduos agroindustriais por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1040) na síntese de biossurfactante aplicados na biodeterioração de petroderivados.** Paraíba. 2021.

FREITAS, E.L.; LIMA, S.O.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; ANDRADE, R.F.S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; ARAÚJO, H.W.C. Avaliação do fungo *Penicillium sclerotiorum* UCP 1040 na produção de biossurfactante utilizando óleo pós-fritura e milhocina. **Research, Society and Development.** 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.27502>

GEETHA, S.J., BANAT, I.M., JOSHI, S.J., 2018. Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,** v. 14, p. 23–32, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>

GONÇALVES, T.M. Ação da enzima quimosina no leite: propondo um experimento simples e de baixo custo para o ensino de bioquímica na disciplina de biologia. **Research, Society and Development,** v. 11, n. 11, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.32494>

GONÇALVES, T.M. Action of the chymosin enzyme in milk: proposing a simple and low-cost experiment for the teaching of Biochemistry in the Biology discipline. **Research, Society and Development,** v. 11, n. 11, p. e204111132494-e204111132494, 2022. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i11.32494>

JUNQUEIRA, B.P.; RAMOS, A.C.S.; LUCAS, E.F.; NUNES, R.C.P. **Avaliação de líquidos iônicos como estabilizantes/desestabilizantes de asfaltenos e como agente desemulsificante.** Pelotas, 2018.

KANICKY, J.R.; LOPEZ-MONTILLA, J.C.; PANDEY, S.; SHAH, D.O. **Química de superfícies na indústria do petróleo. Manual de superfície aplicada e química coloidal.** v. 1, p. 251-267. Florida, USA, 2001.

KARLAPUDI, A.P., VENKATESWARULU, T.C., TAMMINEEDI, J., KANUMURI, L., RAVURU, B.K., DIRISALA, V. RAMU, KODALI, V.P., 2021. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution—a review. **Petroleum**, 4, 241–249. [https://doi.org/10.1016/j. petlm.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007)

LAHIRY, S.; CHOUDHURY, S.; MUKHERJEE, A.; BHUNYA, P.K.; BALA, M. Polymyxin B-induced diffuse cutaneous hyperpigmentation. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 11, n. 2, p. FD01, 2017. DOI: 10.7860/JCDR/2017/24278.9213

LARINI, M.M.; REZENDE, M.I.; RIBEIRO, M.L.L.; MOREIRA-GASPARIN, F.G.M. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. Londrina, Paraná. **Evidência**, v. 17, n. 2, p. 105-118, 2017. <http://dx.doi.org/10.18593/eba.v17i2.15220>

LIMA, L.B. **Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará.** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

LIMA, J.M.N. **Potencial biotecnológico de amostras de *Rhizopus* na produção de lipídios e biossurfactante utilizando resíduos agroindustriais como substratos.** Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2017.

LIMA, D.F.; OLIVEIRA, O.M.C.; CRUZ, M.J.M. **Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte.** Cadernos de Geociências. Bahia. 2011.

MAIA NETO, A.M. **Resíduos agroindustriais aplicados à produção de biossurfactantes: uma revisão.** 2021. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

MORO, G.V. **Obtenção e caracterização de biossurfactantes produzidos por microrganismos isolados de ambientes contaminados com petróleo para usos biotecnológicos.** Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2018.

MOHANTY, S.S.; KOUL, Y.; VARJANI, S.; PANDEY, A.; NGO, HH.; CHANG, J.S.; WONG, J.W.C.; BUI, X.T. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>

NITSCHKE, M.; PASTOR, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, p. 772-776, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

OLIVEIRA, M.C.A. **Estudo da recuperação avançada de petróleo através da injeção do biossurfactante ramnolípido produzido a partir de *Pseudomonas aeruginosa***. Natal, Rio Grande do Norte. 2018.

PATHAK, K.V.; KEHARIA, H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. **3 Biotech**, v. 4, p. 283-295. 2014. DOI 10.1007/s13205-013-0151-3

PELE, M.A. **Seleção de amostras de *Rhizopus spp.* produtoras de biossurfactantes/bioemulsificantes e aplicação na remoção de poluentes hidrofóbicos**. Recife, Pernambuco. 2017.

PERFUMO, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R. Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 277-289, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.016>

RIBEIRO, B.G.; GUERRA, J.M.C.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. **Biotechnology Progress**, v. 36, n. 5, pág. e3030, 2020. <https://doi.org/10.1002/btpr.3030>

RIBEIRO, C.A.A. **Estudo do efeito de surfactantes catiônico e aniônico na corrosão do aço-carbono ABNT 1020 em meio de NaCl**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2020.

ROCHA, P.M. **Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Natal, 2017.

ROCHA E SILVA, F.C.P.; ROQUE, B.A.C.; ROCHA E SILVA, N.M.P.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M.; SARUBBO, L.A. Yeasts and bacterial biosurfactants as demulsifiers for petroleum derivative in seawater emulsions. **AMB Express**, v. 7, p. 1-13, 2017. DOI 10.1186/s13568-017-0499-6

ROCHA E SILVA, N.M.P.; MEIRA, H.M.; ALMEIDA, F.C.G.; SOARES DA SILVA, R.C.F.; ALMEIDA, D.G.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 48, p. 267–281, 2019. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1474477>

ROCHA E SILVA, N.M.P., ALMEIDA, F.C.G.; Rocha e Silva, F.C.P., LUNA, J.M., Sarubbo, L.A., 2020. Formulation of a biodegradable detergent for cleaning oily residues generated during industrial processes. **Journal of Surfactants Detergents**, 23, 1111–1123. <https://doi.org/10.1002/jsde.12440>.

ROCHA JUNIOR, R.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Application of a low-cost biosurfactant in heavy metal remediation processes. **Biodegradation**, v. 30, p. 215–233, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9833-1>

SANCHES, M.A. **Utilização de resíduos vegetais para a produção de biossurfactantes por fungos isolados de amostras de solo da região amazônica.** Manaus, Amazonas. 2016.

SANTIAGO, M.R.F. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria do petróleo.** Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 2019.

SANTOS, B. N.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, S.; PARENTE, A.; FRANÇA, Í. W. L. DE; MELO, V. M. M.; BATISTA, H.; GONÇALVES, L.R.B. Estabilidade de biossurfactante bacteriano do tipo lipopeptídeo frente às variações de temperatura, pH e concentrações salinas **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1559-1566, 2015.

SANTOS, D.K.F.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 401-430, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

SANTOS, I.B.A. **Panorama de aplicação de métodos microbiológicos como recuperação avançada de petróleo no brasil e no mundo.** Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2019.

SARUBBO, L.A.; ROCHA JÚNIOR.; R.B.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I.M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p. 707-723, 2015. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>

SARUBBO, L.A.; SILVA, M.G.C.; DURVAL, I.J.B.; BEZERRA, K.G.O.; RIBEIRO, B.G.; SILVA, I.A.; BANAT, I.M. Biosurfactants: production, properties, applications, trends, and perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181,108377, 2022. <https://doi.org/10.3390/en16031209>

SELVA FILHO, A.A.P.; CONVERTI, A.; SILVA, R.C.F.S.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants as Multifunctional Remediation Agents of Environmental Pollutants Generated by the Petroleum Industry. **Energies**, v. 16, n. 3, p. 1209, 2023. <https://doi.org/10.3390/en16031209>

SILVA, I.A.; ALMEIDA, F.C.G.; SOUZA, T.C.; BEZERRA, K.G.O.; DURVAL, I.J.B.; CONVERTI, A.; SARUBBO, L.A. Oil Spills: Impacts and perspectives of treatment technologies with focus on the use of green surfactants. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 194, 143, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100598>

SILVA, L.G.M.; ARAÚJO, A.A.L. **Influência de sais no ponto de névoa do tensoativo não iônico.** Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA Curso de Bacharelado e Ciência e Tecnologia. 2019.

SILVA, G.O. **Avaliação in vitro de biossurfactantes lipopeptídeos para o controle do crescimento e formação de biofilmes de *Malassezia furfur***. Universidade Federal do Ceará, 2021.

SILVA, M.G.C.; MEDEIROS, A.O.; CONVERTI, A.C.; ALMEIDA, F.C.G.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Promising Biomolecules for Agricultural Applications. **Sustainability**, v. 16, 449, 2024. <https://doi.org/10.3390/su16010449>

SILVA, S.; NITSCHKE, M. Potencial de uso de surfactina na dispersão de biofilme de *Staphylococcus aureus*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, 2017. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2017A115

SOLANO, A.G.R. **Desenvolvimento de método microbiológico analítico para determinação de gramicidina em matéria-prima**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2008.

WETLER-TONINI, R.M.C.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. RJ, Brasil, **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025-1035, 2010.

WOODS JR, C.E. **Exame dos efeitos da concentração de biossurfactante na formação de hidratos de gás natural em meios porosos do fundo do mar**. Universidade Estadual do Mississippi, 2004.

ZAHED, M.A.; MATINVAFA, M.A.; AZARI, A.; MOHAJERI, L. Biosurfactant, a green and effective solution for bioremediation of petroleum hydrocarbons in the aquatic environment. **Discover Water**, v. 2, n. 1, p. 5, 2022. <https://doi.org/10.1007/s43832-022-00013-x>

ZUFFO, A.M.; AGUILERA, J.G. Pesquisas agrárias e ambientais. Volume VI. **Mato Grosso: Pantanal Editora**, 2021.

CAPÍTULO II

ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO **Processes** -
Qualis A1

Produção de biossurfactante por *Bacillus invictae* para formulação de um detergente *eco-friendly* como aditivo na remediação de petroderivados

Maria Inez C. Barata¹, Maheus Henrique C. Cavalcanti², Raquel D. Rufino¹, Fabíola Carolina G. Almeida², Leonie A. Sarubbo^{1,2,*}

¹Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, Zip Code: 50050-900, Recife – Pernambuco, Brazil

² Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Potyra, n. 31, Prado, Zip Code: 50751-310, Recife – Pernambuco, Brazil

Corresponding author: leonie.sarubbo@unicap.br Tel.: +55 81 21194084.

Resumo

Os surfactantes são moléculas anfipáticas que reduzem a tensão superficial e interfacial entre fases fluidas, conferindo detergência, emulsificação e dispersão de fases. A maioria dos surfactantes em uso industrial é derivada do petróleo; entretanto, o interesse por surfactantes microbiológicos tem aumentado devido a sua biodegradabilidade e toxicidade reduzida. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção e a formulação comercial de um novo biossurfactante pela bactéria *Bacillus invictae* UCP1617. Inicialmente, a produção do biossurfactante foi realizada utilizando diferentes combinações de substratos alternativos (melaço de cana-de-açúcar e milhocina). Em seguida, um planejamento fatorial completo foi utilizado como ferramenta para otimização das variáveis agitação, temperatura e tamanho do inóculo em meio mineral contendo 1,5% milhocina. A melhor condição do planejamento obtida (agitação de 175 rpm a 28°C e 4% de inóculo) foi utilizada para o *scale-up* de produção do biossurfactante em biorreator de 50 L. A produção do biossurfactante no biorreator alcançou uma produtividade correspondente a 16,70 ± 0,2 mg/L/h. A tensão superficial do meio foi reduzida de 69,5 para 30,2 mN/m após 72 horas de fermentação. O biossurfactante foi isolado e caracterizado

estruturalmente como um glicolípido e sua CMC foi determinada como 900 mg/L para uma tensão superficial de $29,1 \pm 1,06$ mN/m. O biossurfactante também foi submetido a avaliação da estabilidade em diferentes condições ambientais, sendo capaz de formar emulsões estáveis de maior eficiência com óleo de motor (90,80%) e petróleo (99,00%). A formulação do biossurfactante para obtenção de um detergente *ecofriendly* foi conduzida com a adição de 0,2% do estabilizante hidroxietilcelulose (HEC), 5% de ácido graxo e 0,2% de sorbato de potássio e o produto comercial foi armazenado à 28°C durante 90 dias. O biossurfactante formulado manteve a estabilidade de sua tensão superficial em vários pHs, temperaturas e concentrações de NaCl e apresentou ausência de toxicidade comprovada pelo crescimento das sementes dos vegetais repolho Coração-de-Boi (*Brassica oleracea*) e tomate cereja (*Solanum lycopersicum*), bem como pela sobrevivência do microcrustáceo testado (*Artemia salina*). O biossurfactante formulado foi capaz de dispersar totalmente o óleo em água do mar. Ao ser colocado em solo argiloso contaminado com óleo de motor, o biossurfactante foi capaz de remover, em 24 horas, 99,21% do óleo contido no solo quando usado na sua CMC. O biossurfactante comercial removeu 98,42% do óleo aderido à superfície de vidro e foi capaz de remover 75,00% do composto hidrofóbico adsorvido à superfície porosa na sua CMC. Portanto, o biossurfactante comercial produzido pela bactéria *Bacillus invictae* UCP1617 demonstra claramente a viabilidade de aplicação como aditivo biotecnológico *ecofriendly* para os processos de remediação que considerem a preservação e a redução dos impactos ambientais sobre os ecossistemas.

Palavras-chave: biossurfactantes; *Bacillus*; substratos alternativos; milhocina, biorremediação; remoção de poluentes.

1. INTRODUÇÃO

Com o contínuo desenvolvimento da industrialização mundial, a demanda por petróleo como fonte de energia também está em constante aumento. No entanto, derramamentos de óleo devido à exploração e transporte acontecem com frequência em todo o mundo. Como consequência, grandes quantidades de óleo já foram lançadas em solo e ao mar em derrames de petróleo, deixando efeitos devastadores sobre o ambiente, os quais são ainda maiores em virtude do potencial tóxico dos dispersantes químicos comumente utilizados na remediação desses derramamentos (Eras-Muñoz *et al.*, 2022; Geetha *et al.*, 2018).

As plantas industriais movidas a óleo combustível, em especial, possuem problemas rotineiros de vazamentos acidentais, como também constituem fontes potenciais de poluição ambiental. No caso da contaminação dos motores por óleo lubrificante, a remoção da graxa aderida torna-se um desafio específico e bem distinto da contaminação gerada pelas borras oleosas, uma vez que os processos de limpeza requerem a aplicação direta de algum agente tensoativo ou solvente, gerando, na maioria dos casos, outros problemas ambientais causados pela toxicidade e acúmulo dessas substâncias (Rocha e Silva *et al.*, 2019).

A tecnologia de tratamento biológico que utiliza microrganismos para degradação de poluentes hidrofóbicos, denominada biorremediação, apresenta a vantagens de ser uma tecnologia ambiental de baixo custo, podendo se tornar uma alternativa atrativa para solucionar os problemas relacionados à poluição por hidrocarbonetos (Almeida *et al.*, 2016; Sarubbo *et al.*, 2022). A biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo, entretanto, é limitada, uma vez eles são, na sua maioria, insolúveis em água. Alterações provocadas por agentes surfactantes, moléculas anfipáticas com capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial em fases fluidas, podem melhorar a mobilidade de óleo e, assim, aumentar a biodegradação de petróleo, acelerando o processo de remediação ambiental (Zahed *et al.*, 2022). Esses agentes tensoativos também são usados na solubilização de óleos e graxas em ambientes industriais (Sarubbo *et al.*, 2022).

Portanto, a importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado em aumentar a produção desses compostos em decorrência da diversidade de utilizações industriais. No mercado, há poucos produtos capazes de remover com eficiência diversos tipos de petroderivados sem

efeitos tóxicos secundários. Os dispersantes e detergentes que vêm sendo comumente utilizados pelas indústrias possuem alto grau de toxicidade, gerando resíduos nocivos ao meio ambiente (Farias *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2024). Nesse sentido, a aplicação de agentes tensoativos naturais, como os surfactantes microbianos, surge como solução atrativa e eficiente nos processos de limpeza de petroderivados (Farias *et al.*, 2021). Os biossurfactantes são considerados ecológicos devido à alta biodegradabilidade e toxicidade reduzida. Apresentam, ainda, inúmeras vantagens sobre os surfactantes de origem química, tais como, maior capacidade tensoativa, toxicidade reduzida, estabilidade frente a ampla faixa de pH e temperaturas elevadas, bem como resistência a elevadas concentrações salinas (Perfumo *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2024).

O custo dos biossurfactantes microbianos variam de cerca de U.S. 10 \$/mg para a Surfactina pura (98% de pureza), um lipopeptídeo bacteriano utilizado em pesquisas médicas, a U.S. 24 \$/kg para fórmulas propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo (Singh *et al.*, 2018). Estimativas realizadas na década passada situaram os custos dos biossurfactantes em U.S. 3-20 \$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes sintéticos como etoxilatos e alquil-poliglicosídeos pelas indústrias químicas estão na faixa de U.S. \$ 1-3/kg (Geetha *et al.*, 2018; Karlapudi *et al.*, 2021). Os custos de produção dessas biomoléculas, embora ainda seja um gargalo tecnológico, têm sido reduzidos através do uso de substratos alternativos, de métodos de purificação mais eficientes, da seleção de cepas microbianas eficientes e do uso ferramentas estatísticas para aumentar os rendimentos (Mohanty *et al.*, 2021).

O gênero *Bacillus*, em especial, tem sido investigado como produtor de biossurfactantes em diversos seguimentos industriais, destacando-se a indústria de petróleo (Chaprão *et al.*, 2018). As espécies *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis* produzem surfactantes de grande ação tensoativa (Rocha e Silva *et al.*, 2020). A eficiência da produção de biossurfactantes por essas bactérias pode ser intensificada a partir de alterações na fonte de nutrientes para os micro-organismos utilizando resíduos industriais, dentre outros parâmetros, o que colabora para uma economia verde (Silva *et al.*, 2022).

Portanto, este trabalho teve como objetivo produzir um biossurfactante a partir de *Bacillus invictae* UCP1617 para aplicação na descontaminação de ambientes marinhos e terrestres contaminados por óleo. O biossurfactante foi utilizado como

componente da formulação de um detergente sustentável, atóxico e de baixo custo, capaz de remover petroderivados que contaminam o meio ambiente e as indústrias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico. A milhocina foi obtida da “Corn Products do Brasil” no município de Cabo de Santo Agostinho, estado de Pernambuco, Brasil. O melaço de cana-de-açúcar foi obtido da Usina de Açúcar São José, no município de Igarassu, estado de Pernambuco, Brasil.

2.2. Micro-organismo

A bactéria *Bacillus invictae* UCP1617 isolada de resíduo do chorume do aterro sanitário de Muribeca, Jaboatão dos Guararapes/PE e depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais (NPCIAMB) da Universidade Católica de Pernambuco foi testada como produtora do biossurfactante.

2.3. Meio de crescimento do inóculo

O *Bacillus invictae* UCP1617 foi mantido em Ágar Nutriente (AN), composto por 5,0 g de extrato de carne; 10,0 g Peptona; 5,0g de NaCl; 15,0 g de Ágar e 1000 mL água destilada, pH 7,0. Para o crescimento do inóculo foi utilizado o meio líquido Caldo Nutritivo (CN), composto por 5,0g de extrato de carne, 15,0 g peptona, 5,0 g de NaCl, 5,0 g de K₂HPO₄ e 1000 mL de água destilada, pH 7,0.

2.4. Preparação do inóculo

Culturas jovens da bactéria obtidas após 24 horas de cultivo em meio AN foram transferidas para Erlenmeyer contendo 50 mL de Caldo Nutritivo (CN), o qual foi mantido sob agitação orbital de 150 rpm durante um período de 10-14 horas a 28°C para obtenção de uma D.O. (Densidade Óptica) de 0,7 (correspondente a um inóculo de 107 U.F.C./mL) a 600 nm. Esta leitura foi utilizada como inóculo na concentração de 2% (v/v).

2.5. Produção do biossurfactante

A produção do biossurfactante por *Bacillus invictae* UCP1617 foi realizada utilizando o meio mineral descrito por Dubey e Juwarkar (2001), com composição de 2,0 g de NaNO₃; 0,5 g de KH₂PO₄, 1,0 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de KCl e 0,01 g de FeSO₄.7H₂O e 1000 mL de água destilada. Este meio foi suplementado com diferentes fontes orgânicas em combinações distintas, conforme mostrado no Quadro 2. Além do meio mineral, água destilada também foi usada como meio basal em algumas combinações. Em todos os meios, os componentes foram solubilizados e esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Quadro 2 - Meios de cultura formulados com diferentes combinações de substratos alternativos para a produção de biossurfactante

Meios	Composição dos meios
1	Meio mineral + 1,5% de melaço de cana-de-açúcar
2	Meio mineral + 2,0% de melaço de cana-de-açúcar
3	Meio mineral + 1,5% de milhocina
4	Meio mineral + 1,5% de melaço de cana-de-açúcar +2,0% de milhocina
5	Meio mineral + 2,0% de milhocina
6	Água destilada + 2,0% de milhocina
7	Água destilada + 2,0% de milhocina +1,5% de melaço de cana-de-açúcar

Fonte: O autor, 2023.

A produção do biossurfactante foi conduzida em frascos Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 mL do meio mineral ou água destilada adicionado de diferentes substratos, conforme o Quadro 2 e inoculados com 2,0% do pré-inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 250 rpm durante 72 horas, à temperatura de 28°C. Após o período de fermentação, as amostras foram retiradas e centrifugadas a 5,000 x g, à temperatura de 5°C, durante 30 minutos e o líquido metabólico livre de células (biossurfactante bruto) foi utilizado para determinação da tensão superficial.

2.6. Maximização da produção do biossurfactante utilizando planejamento fatorial

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas no meio de produção selecionado, submetido à variação das condições de cultivo (velocidade de rotação, temperatura de cultivo e tamanho do inóculo) de acordo com um Planejamento Fatorial completo 2^3 apresentado nas Tabelas 2 e 3. Ao fim do cultivo, que teve duração de 72 horas, amostras foram centrifugadas e filtradas para determinação do rendimento em biossurfactante isolado como parâmetro utilizado para o critério de seleção da melhor condição de produção.

Tabela 2 - Valores das variáveis independentes nos níveis -1 e +1 e no ponto central

Nível	Agitação (rpm)	Temperatura de cultivo (°C)	Tamanho do inóculo (%)
-1	175	28	2
0	200	33	3
+1	225	38	4

Tabela 3 - Matriz do planejamento fatorial

Experimentos	Níveis		
	Agitação (rpm)	Temperatura do cultivo (°C)	Tamanho do inóculo (%)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

2.7. Scale up de produção de produção do biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada em biorreator de 50 L (MA502, MARCONI, Piracicaba, São Paulo, Brasil) contendo 20 L do meio de produção nas condições selecionadas a partir do planejamento fatorial, com aeração de 0,5 vvm, durante 96 horas. Amostras foram retiradas para determinação da tensão superficial e do crescimento do *Bacillus invictae* UCP1617.

Durante a fermentação, amostras foram retiradas a cada 4 e 12 horas e centrifugadas a 5,000 x g, à temperatura de 5°C, durante 30 minutos, sendo o líquido metabólico livre de células (biossurfactante bruto) utilizado para determinação da tensão superficial.

2.8. Determinação da tensão superficial

A tensão superficial do biossurfactante foi medida em tensiômetro automático (KSV Sigma 700, Finland) através do método do anel de Du Noüy. A grandeza foi medida através da imersão do anel de platina no líquido metabólico, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido.

2.9. Determinação da atividade de emulsificação

Para a determinação da atividade de emulsificação, amostras do líquido metabólico livre de células foram analisadas segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987), onde 2,0mL de um substrato oleoso (óleo de girassol, óleo de milho, óleo de oliva, óleo de amendoim, querosene, n-hexadecano, óleo de motor e petróleo) foram adicionados a 2,0mL do líquido metabólico livre de células (biossurfactante bruto) em tubo graduado e a mistura agitada em vórtex por 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado dividindo-se a altura da emulsão pela altura total da mistura e multiplicando-se por 100 para fornecer o percentual da emulsão formada no tubo. A taxa de emulsificação é calculada pela Equação 1:

Equação 1 – Índice de emulsificação

$$\text{Índice de Emulsificação (\%)} = \frac{\text{Altura da emulsão}}{\text{Altura total do tubo}} \times 100$$

2.10. Avaliação da estabilidade do biossurfactante

Os efeitos diferentes de temperaturas (5, 70, 100 e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0%) e de diferentes concentrações de pHs (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0, 12,0 e 14,0) na atividade do biossurfactantes foram avaliados no líquido metabólico livre de células para determinação da tensão superficial e do índice de emulsificação utilizando óleo de motor como substrato hidrofóbico (Cooper e Goldenberg, 1987).

A influência do tempo na estabilidade do biossurfactante mantido a 5, 70, 100 e 120°C durante 30, 60, 120 e 180 minutos também foi avaliada.

2.11. Extração e caracterização química do biossurfactante

O líquido metabólico livre de células teve o pH reduzido para 2 utilizando ácido clorídrico, sendo mantido durante *overnight* a 5°C, de acordo com a metodologia descrita por Nitschke e Pastore (2002). Após o *overnight*, foi submetido a um balão volumétrico e embebedado com clorofórmio e metanol em diferentes proporções. O biossurfactante extraído foi caracterizado quanto ao total de proteínas (Bradford, 1976), carboidratos (Dubois et al., 1956) e lipídios (Manocha, 1980).

2.12. Caracterização estrutural do biossurfactante

O biossurfactante isolado foi analisado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por análise em espectrômetro (BRUKER IFS66) com brometo de potássio (10 mg de amostra e 90 mg de brometo de potássio) na região espectral de 4.000 a 400 cm⁻¹. A precisão foi mantida na faixa de número de onda de -0,1 a +0,1 cm⁻¹ (Varjani; Upasani, 2016).

A caracterização também foi realizada por determinação da carga iônica), analisada pelo potencial zeta utilizando um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Kassel, Germany). Três medidas de cada suspensão foram realizadas a partir de alíquotas das suspensões aquosas do biossurfactante cujas concentrações foram equalizadas a 0,005% (m/v).

A análise elementar quantitativa do biossurfactante foi realizada com o objetivo de verificar a presença dos elementos carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio no biossurfactante após extração e purificação. As medições foram realizadas em um analisador elementar EA1110-CHNS-O CE Instruments EA 1110.

2.13. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante foi medida automaticamente em tensiômetro automático (KSV Sigma 700, Finland) através do método do anel de Du Noüy. A grandeza foi medida através da imersão do anel de platina em diferentes amostras de água ultrapura às quais o surfactante isolado foi gradativamente adicionado até o aparelho atingir uma tensão superficial constante.

2.14. Formulação do biossurfactante para obtenção de um detergente *eco-friendly*

O biossurfactante isolado foi adicionado de 0,2% de hidroxietilcelulose (HEC) como estabilizante (p/p), 5% de ácido graxo (p/p) e 0,2% de sorbato de potássio (p/p) como conservante e armazenado em condições estéreis em frascos hermeticamente fechados à temperatura ambiente (28°C) durante 90 dias para determinação da tensão superficial. Os efeitos diferentes de temperaturas (5, 70, 100 e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0%) e de valores de pH (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 e 12,0) na tensão superficial do biossurfactante formulado também foram avaliados após 90 dias de armazenamento.

2.15. Teste de toxicidade do biossurfactante com *Artemia salina*

A Toxicidade do biossurfactante formulado foi avaliada utilizando-se larvas de camarão (microcrustáceo *Artemia salina*) como indicador. As larvas foram usadas após 24 horas de incubação. Soluções do biossurfactante em sal marinho sintético (33 mg/L) nas concentrações de 450 mg/L (1/2 CMC), 900 mg/L (CMC) e 1800 mg/L (2xCMC) foram usadas. As análises foram conduzidas em frascos de penicilina de 10 mL de capacidade contendo 10 larvas em 5 mL de sal marinho sintético por frasco. As larvas contidas em cada frasco foram expostas a 5 mL das soluções do biossurfactantes nas concentrações testadas durante 24 h e depois observadas quanto à mortalidade. O sal marinho sintético foi utilizado como controle. A concentração tóxica limite foi definida como a menor concentração capaz de provocar a morte do crustáceo em 24 horas (Silva *et al.*, 2010)

2.16. Teste de fitotoxicidade do biossurfactante

A fitotoxicidade do biossurfactante formulado foi avaliada em ensaio estático através da germinação das sementes e do crescimento das raízes de repolho (*Brassica oleracea*) e tomate cereja (*Solanum lycopersicum*), de acordo com Tiquia *et al.* (1996). Soluções teste do biossurfactante formulado foram preparadas em água destilada na metade da CMC, na CMC e no dobro da CMC. A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman Nº1. As sementes foram previamente tratadas com NaClO, sendo 10 sementes simetricamente adicionadas por placa, que foram inoculadas com 5 ml da solução teste a 28°C. Água destilada foi utilizada como controle. 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 equações abaixo:

Equação 2 - G.R.S = Germinação relativa da semente

$$G.R.S (\%) = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas no extrato}}{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \right) \times 100$$

Equação 3 - C.R.R = Crescimento relativo da raiz

$$C.R.R (\%) = \left(\frac{\text{média do comprimento da raiz no extrato}}{\text{média do comprimento da raiz no controle}} \right) \times 100$$

Equação 4 - IG = índice de germinação

$$IG (\%) = \frac{G.R.S \times C.R.R}{100}$$

2.17. Experimentos de dispersão de composto hidrofóbico em água do mar pelo biossurfactante

A capacidade de dispersão de manchas de derivado de petróleo foi simulada em laboratório contaminando-se amostras de água do mar contidas em placas de Petri com 5% de óleo de motor. Testes foram conduzidos pela adição do biossurfactante formulado na CMC, numa proporção biossurfactante/óleo de motor de 1:1, 1:2 e 1:8 (v/v). Os valores médios dos diâmetros das zonas claras

formadas foram medidos com auxílio de uma régua e calculados como percentagem da placa de Petri (Saeki *et al.*, 2008).

2.18. Teste de remoção de composto hidrofóbico em solo com o biossurfactante

O teste de remoção do óleo de motor em solo foi realizado através da saturação de 60 g de solo argiloso (Local de coleta: mangue localizado nas margens do rio Capibaribe, Recife- PE) com 10 mL do respectivo óleo de motor. O teste foi conduzido utilizando Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 20 g de solo. Em seguida, nos frascos foram adicionados 20 mL de uma solução aquosa do biossurfactante formulado na metade da CMC e na CMC. O controle foi realizado utilizando 20 mL de água destilada. Todos os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm a 28°C. Amostras foram retiradas nos intervalos de 0,5, 1,0, 2,0 e 24 horas para análise. As quantidades iniciais e finais do contaminante hidrofóbico foram determinadas no solo tratado. Dessa forma, 100 mL de n-hexano foram adicionados ao solo e colocados em *shaker* a 200 rpm por duas horas a 28°C. O extrato final de hexano e óleo obtido foi colocado em estufa a 68-70°C. A eficiência de remoção foi avaliada por análise gravimétrica após a lavagem do solo contendo o contaminante residual com hexano.

2.19. Teste de lavagem de superfície de vidro oleosa contaminada com composto hidrofóbico com o biossurfactante

Uma lâmina de vidro de massa conhecida teve parte da sua superfície contaminada uniformemente com 100 µL de óleo de motor. A seção contaminada da lâmina foi submersa na solução do biossurfactante formulado na CMC durante 10 minutos. A lâmina foi mergulhada em água destilada para a remoção de qualquer excesso do biossurfactante. Em seguida, a lâmina foi seca em estufa a 40°C por 30 minutos e seu peso anotado. O índice de remoção foi calculado pela Equação 5:

Equação 5 – Índice de remoção

$$I = 100x \frac{(M_C - M_L)}{(M_C - M_i)}$$

Onde M_c representa o peso da lâmina contaminada, M_L o peso da lâmina pós-lavagem e M_i o peso inicial da lâmina.

2.20. Teste de lavagem de composto hidrofóbico adsorvido à superfície porosa com o biossurfactante

A capacidade do biossurfactante formulado na remoção de petroderivado adsorvido às rochas foi realizada embebendo as amostras de rochas no óleo até a cobertura completa e registrando o volume de óleo gasto. O material foi cuidadosamente colocado em um béquer de 100 mL com o auxílio de pinças e submetido à lavagem com soluções do biossurfactante formulado na sua CMC e na metade da CMC. Após o processo, a remoção do óleo foi calculada por gravimetria a partir da quantidade de óleo remanescente na rocha lavada.

2.21. Análises estatísticas dos dados obtidos

Os dados colhidos foram expressos como a média \pm desvio padrão dos testes realizados em triplicata. A análise estatística de variância de ANOVA foi aplicada para determinar a significância, onde valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção do meio de produção do biossurfactante

Neste estudo, diferentes meios de produção de baixo custo foram inicialmente avaliados para a produção do biossurfactante. Os substratos orgânicos milhocina e melaço de cana, obtidos de indústrias locais como resíduos da produção de produtos de milho e açúcar, respectivamente, foram utilizados como fonte de carbono e nitrogênio para avaliar o desempenho da bactéria *Bacillus invictae* UCP1617 na produção da biomolécula.

A presença de compostos tensoativos nos meios de produção após o cultivo do microrganismo foi indicada pela capacidade de redução da tensão superficial (Santos *et al.*, 2016; Sarubbo *et al.*, 2022), considerando que a tensão superficial/interfacial é considerada como principal parâmetro para detecção de um composto surfactante (Rocha e Silva *et al.*, 2019). A tensão superficial é a medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma

molécula do interior do líquido para a superfície. Devido à presença de surfactantes, menor energia é requerida para trazer uma molécula até a superfície, reduzindo, assim, a tensão superficial do meio (Perfumo *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante produzido no meio mineral contendo 1,5% de milhocina apresentou a maior capacidade redução da tensão superficial quando comparado aos surfactantes produzidos nos demais meios formulados com os resíduos industriais (Tabela 4). O tensoativo produzido nesse meio foi capaz de reduzir a tensão superficial para $29,73 \pm 0,80$ mN/m. A redução da tensão superficial indica que o *Bacillus invictae* UCP1617 conseguiu metabolizar os substratos presentes no meio alternativo, garantindo seu crescimento e a conseqüente produção do biossurfactante.

Tabela 4 - Tensão superficial dos biossurfactantes produzidos por *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em diferentes meios de cultivo formulados com resíduos industriais

Biossurfactantes produzidos nos meios de cultivo alternativos	Tensão superficial (mN/m)
Meio 1: Meio mineral + 1,5% de melaço de cana-de-açúcar	$40,56 \pm 0,20$
Meio 2: Meio mineral + 2,0% de melaço de cana-de-açúcar	$37,71 \pm 0,30$
Meio 3: Meio mineral + 1,5% de milhocina	$29,73 \pm 0,80$
Meio 4: Meio mineral + 1,5% de melaço de cana-de-açúcar + 2,0% de milhocina	$36,29 \pm 0,32$
Meio 5: Meio mineral + 2,0% de milhocina	$30,67 \pm 0,44$
Meio 6: Água destilada + 2,0% de milhocina	$30,26 \pm 0,07$
Meio 7: Água destilada + 2,0% de milhocina + 1,5% de melaço de cana-de-açúcar	$30,03 \pm 0,10$

Em alguns estudos realizados com diferentes microrganismos do gênero *Bacillus* já descritos na literatura, pode-se avaliar as tensões obtidas em meios alternativos. Felix *et al.* (2019) obtiveram tensões em torno de 31,8 mN/m para várias cepas de *Bacillus* cultivadas em suco de caju. Verma *et al.*, (2022), para o cultivo de *Bacillus subtilis* RSL-2, utilizaram apenas melaço de cana como única fonte de nutrientes, obtiveram uma tensão superficial de 24 mN/m.

A literatura descreve que os micro-organismos considerados bons produtores de biossurfactante devem ser capazes de reduzir a tensão superficial do meio em relação a da água para valores em torno de 35 mN/m (Sarubbo *et al.*, 2022; Silva *et*

al., 2024). Portanto, o *Bacillus invictae* UCP1617 pode ser considerado promissor como microrganismo produtor de biossurfactante.

3.2. Maximização da produção do biossurfactante

A maximização da produção de metabólitos de interesse industrial a partir de processos fermentativos, como os biossurfactantes, requer a padronização do meio e das condições de cultivo (Abbot *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2020).

Neste trabalho, a maximização da produção do biossurfactante foi conduzida no meio previamente selecionado e submetido à variação das condições de cultivo. Nesta etapa, utilizou-se um Planejamento Fatorial completo 2^3 com 4 repetições no Ponto Central. As variáveis independentes analisadas foram Agitação (rpm), Temperatura de cultivo ($^{\circ}\text{C}$) e Tamanho do inóculo (%); já a variável resposta foi o Rendimento em biossurfactante isolado (g/L).

A Tabela 5 apresenta as variáveis independentes (fatores) decodificadas com os níveis estudados e os valores da variável de resposta (rendimento do biossurfactante) obtidos após o experimento fatorial.

Tabela 5 - Resultado do planejamento fatorial completo 2^3 para rendimento do biossurfactante produzido por *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral contendo 1,5% de milhocina durante 72 horas

Experimentos	Níveis			Resultados
	Agitação (rpm)	Temperatura de cultivo ($^{\circ}\text{C}$)	Tamanho do inóculo (%)	Biossurfactante (g/L)
1	175	28	2	0,03
2	225	28	2	0,05
3	175	38	2	0,11
4	225	38	2	0,10
5	175	28	4	1,00
6	225	28	4	0,04
7	175	38	4	0,10
8	225	38	4	0,18
9	200	33	3	0,06
10	200	33	3	0,07
11	200	33	3	0,06
12	200	33	3	0,07

Conforme pode ser observado na Tabela 6, a Análise de Variância (ANOVA) para um nível de confiança de 95%, apresenta que todas as variáveis independentes e interações demonstraram significância estatística para o Rendimento em biossurfactante isolado (g/L), valores $p < 0,05$ e valores de F elevados; ou seja, todos os fatores contribuem de maneira significativa para o aumento ou redução da variável dependente estudada. É importante destacar que o efeito da Curvatura, observado pela aplicação das repetições no Ponto Central, também foi muito significativo ($p = 0,000038$), uma possível indicação da possibilidade futura da aplicação de modelos de DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) para modelagem através de Planejamentos de Superfície de Resposta e possível Otimização.

A Variância explicada ($R^2 = 0,99987$) indica a capacidade que o modelo matemático gerado tem de explicar a variação na variável de resposta causada pelos fatores e níveis escolhidos. Nesse sentido, o coeficiente de determinação foi de 99,98% da variação do Rendimento em biossurfactante isolado (g/L), pode ser explicado pela variação nos níveis dos fatores: Agitação (rpm), Temperatura de cultivo ($^{\circ}\text{C}$) e Tamanho do inóculo (%). O Coeficiente de Correlação (Ajuste) também apresentou valores muito satisfatórios ($R = 0,99$) indicando a confiabilidade do modelo matemático abaixo.

$$Z = -18,18 + 0,08*(1) + 0,49*(2) + 8,81*(3) - 0,002*(1)*(2) - 0,039*(1)*(3) - 0,236*(2)*(3) + 0,001(1)*(2)*(3)$$

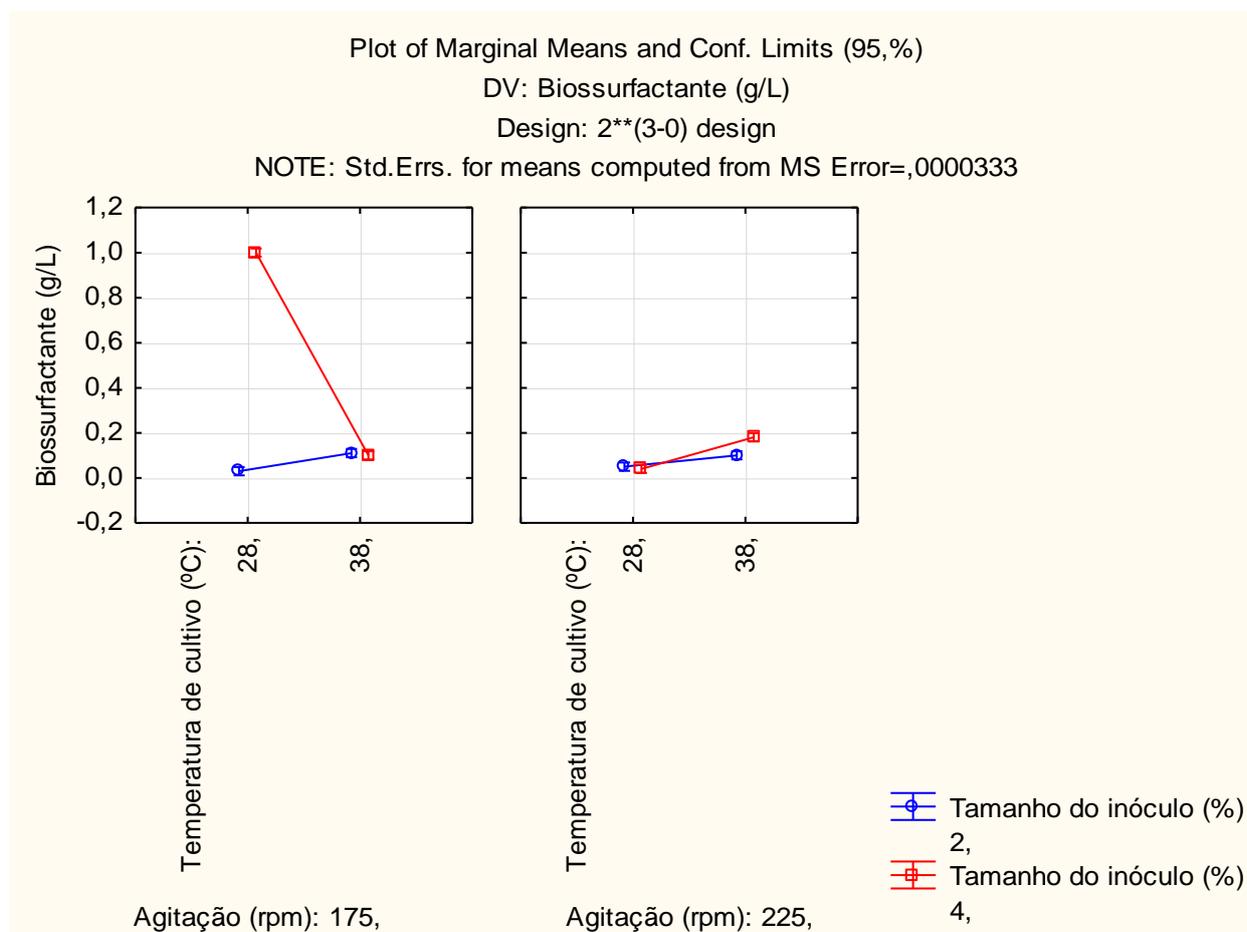
Tabela 6 - Análise de Variância para o rendimento em biossurfactante isolado (g/L) de *Bacillus invictae* UCP1617. Os efeitos dos compostos foram estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F	Valor de p^b
Curvatura	0,049504	1	0,049504	1485,125	0,000038
Agitação (1)	0,094612	1	0,094612	2838,375	0.000015
Temperatura (2)	0,049613	1	0,049613	1488,375	0.000038
Tamanho inóculo (3)	0,132612	1	0,132612	3978,375	0.000009
1 x 2	0,127512	1	0,127512	3825,375	0.000009
1 x 3	0,0990012	1	0,0990012	2970,375	0.000014
2 x 3	0,0990013	1	0,0990013	2970,375	0.000014
1 x 2 x 3	0,143113	1	0,143113	4293,375	0.000008
Erro puro	0,000100	3	0,000033		
SS total	0.795092	11	0.01103		

Para avaliação visual facilitada das relações entre as variáveis preditoras e a variável dependente, foi gerado o gráfico de médias marginais (Figura 4) para nível de confiança de 95% ($p=0,05$). Está confirmado visualmente que, nas condições estudadas, os maiores valores para a variável resposta Rendimento em biossurfactante isolado (g/L) se dá apenas na condição de Agitação = 175 rpm, Temperatura de Cultivo = 28°C e Tamanho do inóculo = 4%, conforme já visto na Tabela 5, experimento 5.

O aumento da temperatura de cultivo gerou uma queda drástica no valor da variável de resposta. Nenhuma outra influência individual dos fatores é tão forte quanto a da temperatura de cultivo. Conforme apresentado abaixo, o aumento dos níveis dos demais fatores, não gera grandes inclinações da reta.

Figura 4 - Gráfico de Médias Marginais.

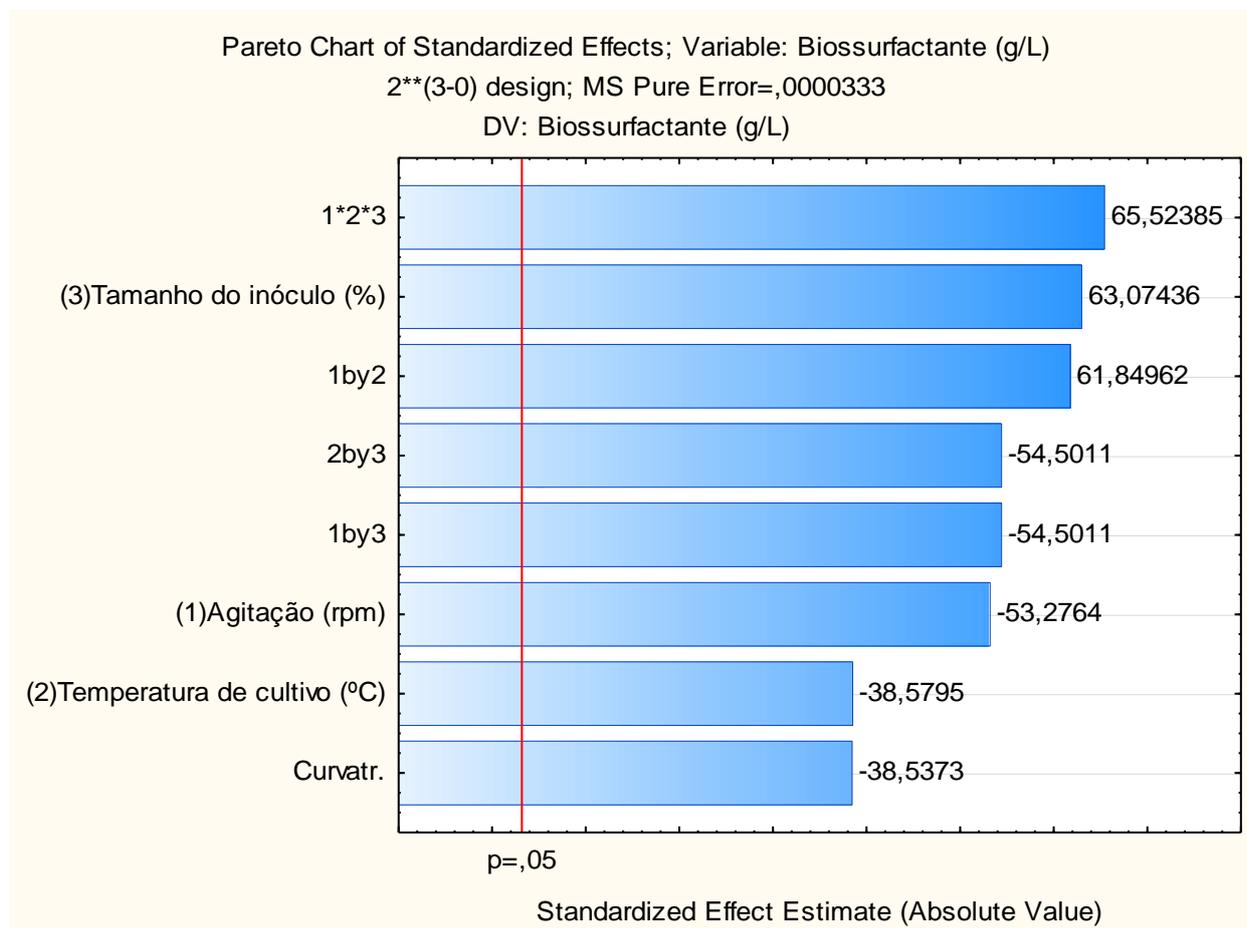


Ambas as imagens acima mostram o Rendimento em biossurfactante isolado (g/L) no eixo das ordenadas (eixo y). A imagem da esquerda leva em consideração a Agitação de 175 rpm. Já a da direita, 225 rpm. Em cada uma das imagens no eixo da Abscissa (eixo x) está, da esquerda para a direita, a variação da temperatura de cultivo (de 28°C para 38°C). Os tamanhos dos inóculos são diferenciados pelas cores (azul: 2% e vermelha: 4%).

O Diagrama de Pareto abaixo (Figura 5) revela, por ordem decrescente de significância estatística, os efeitos gerados pelos 3 fatores estudados na variável de resposta. A interação trifatorial é a responsável pelo maior efeito aparente no aumento do Rendimento em biossurfactante isolado (g/L). Dentre os efeitos principais, o aumento no nível do (3) Tamanho do inóculo, de 2% para 4%, é o que gera uma alteração positiva (crescimento) mais alta no valor da variável resposta, seguido da interação entre (1) Agitação (rpm) e (2) Temperatura de Cultivo (°C). Todas as demais interações bifatoriais e efeitos individuais são significativos para redução no valor da variável de resposta (o que pode ser facilmente observado pelo

sinal negativo (-) antes dos valores do efeito). Ou seja, para as interações entre (2) e (3), (1) e (3) e os efeitos individuais de (1) e (2), o aumento no nível dos fatores gera um efeito para redução no Rendimento em biossurfactante isolado (g/L).

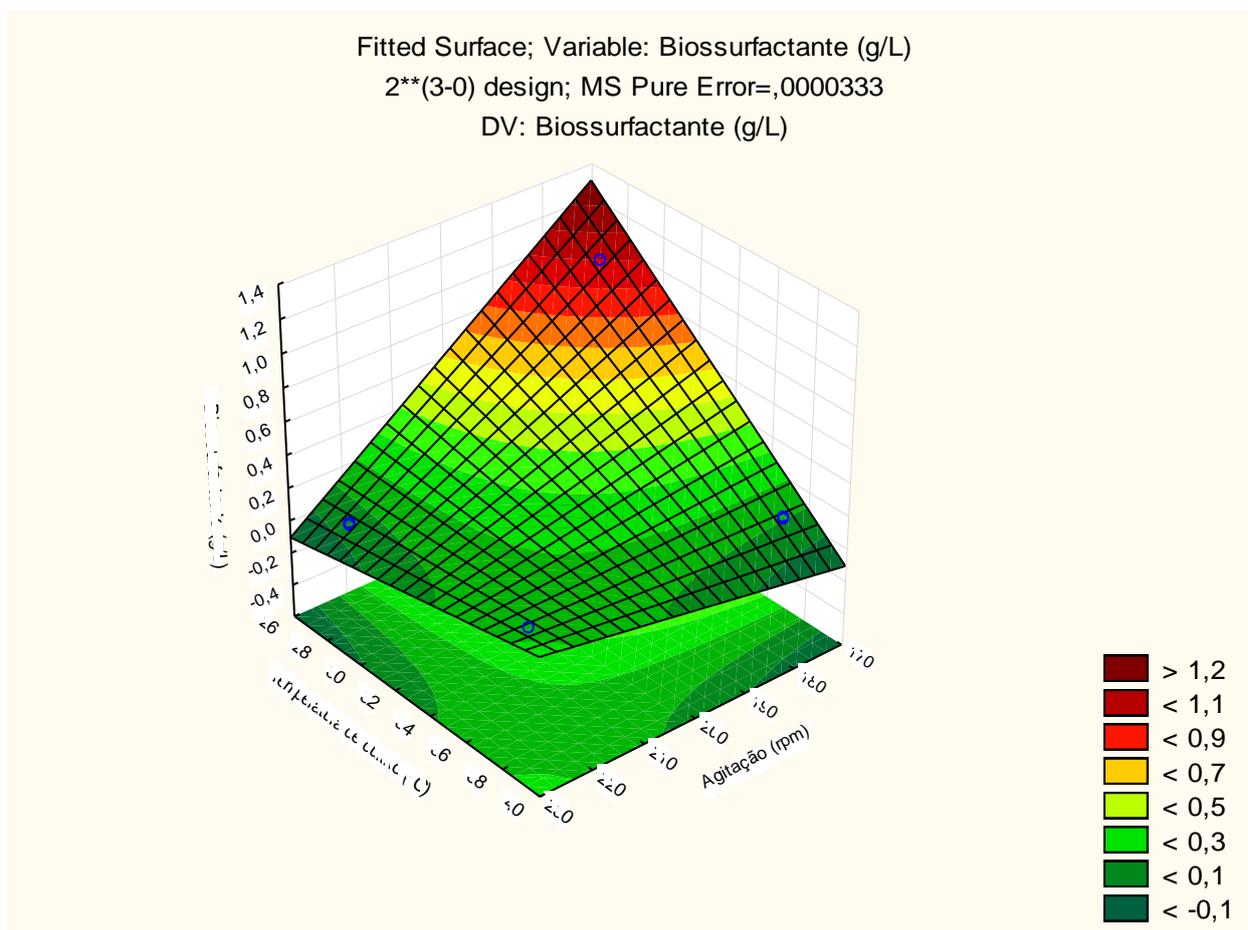
Figura 5 - Diagrama de Pareto



A Figura 5 mostra o Diagrama de Pareto para estimativa dos efeitos padronizados das variáveis testadas sobre a produção do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral contendo 1,5% de milhocina após 72 horas de cultivo. Variáveis testadas: (1) agitação, (2) temperatura e (3) tamanho do inóculo. Todos os efeitos que ultrapassam no gráfico a linha vertical vermelha demonstram significância estatística para a variável de resposta.

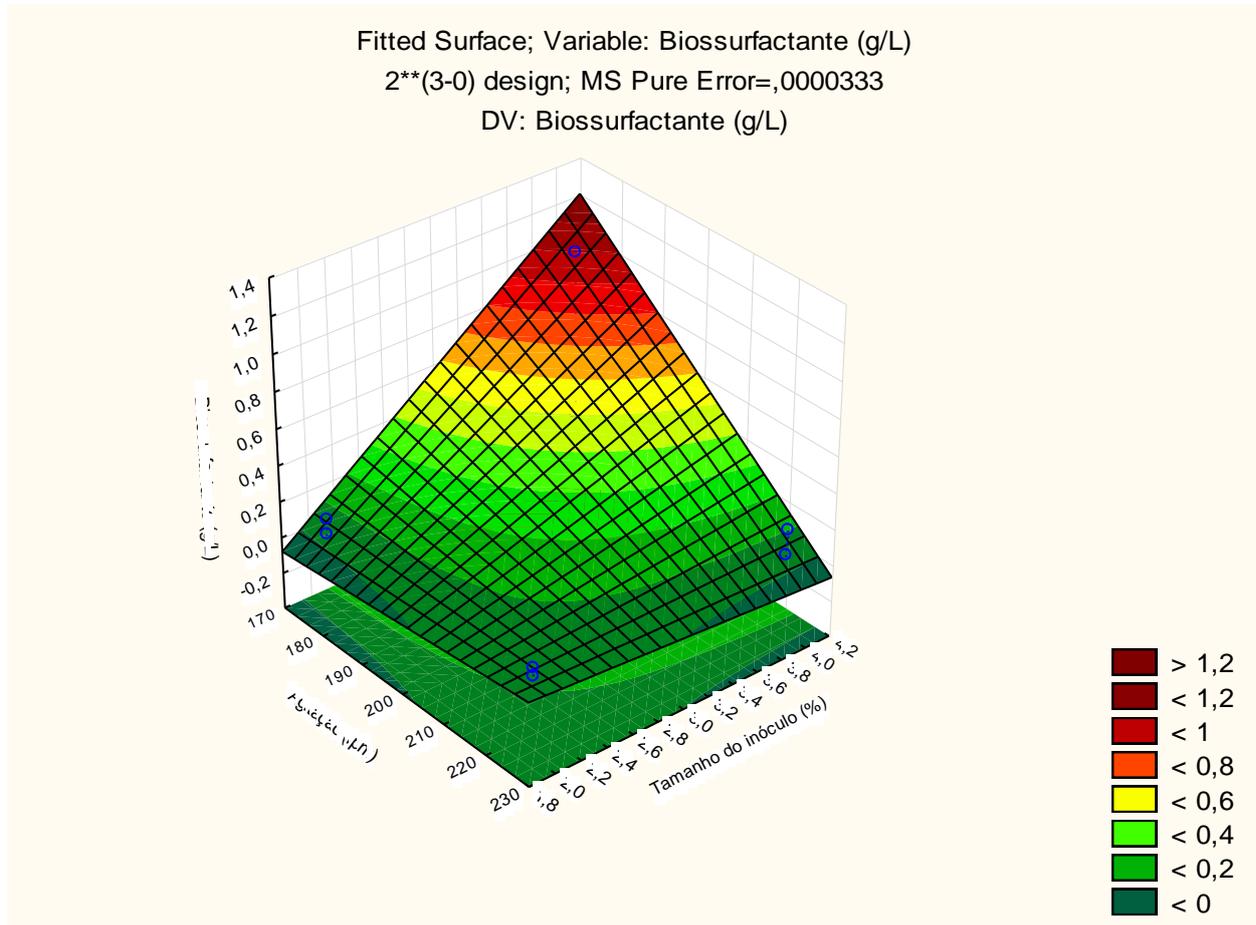
Após obtenção do diagrama de Pareto, gráficos de superfície de resposta para as interações apresentadas foram criados (Figuras 6, 7 e 8) a fim de observar as tendências que os efeitos dos fatores têm no aumento/redução da variável resposta.

Figura 6 - Gráfico de Superfície de resposta, avaliando as relações entre os fatores: (1) Agitação (rpm) e (2) Temperatura de cultivo (°C), tendo como variável resposta a concentração de biossurfactante após 72 horas de cultivo de *Bacillus invictae* UCP1617 em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.



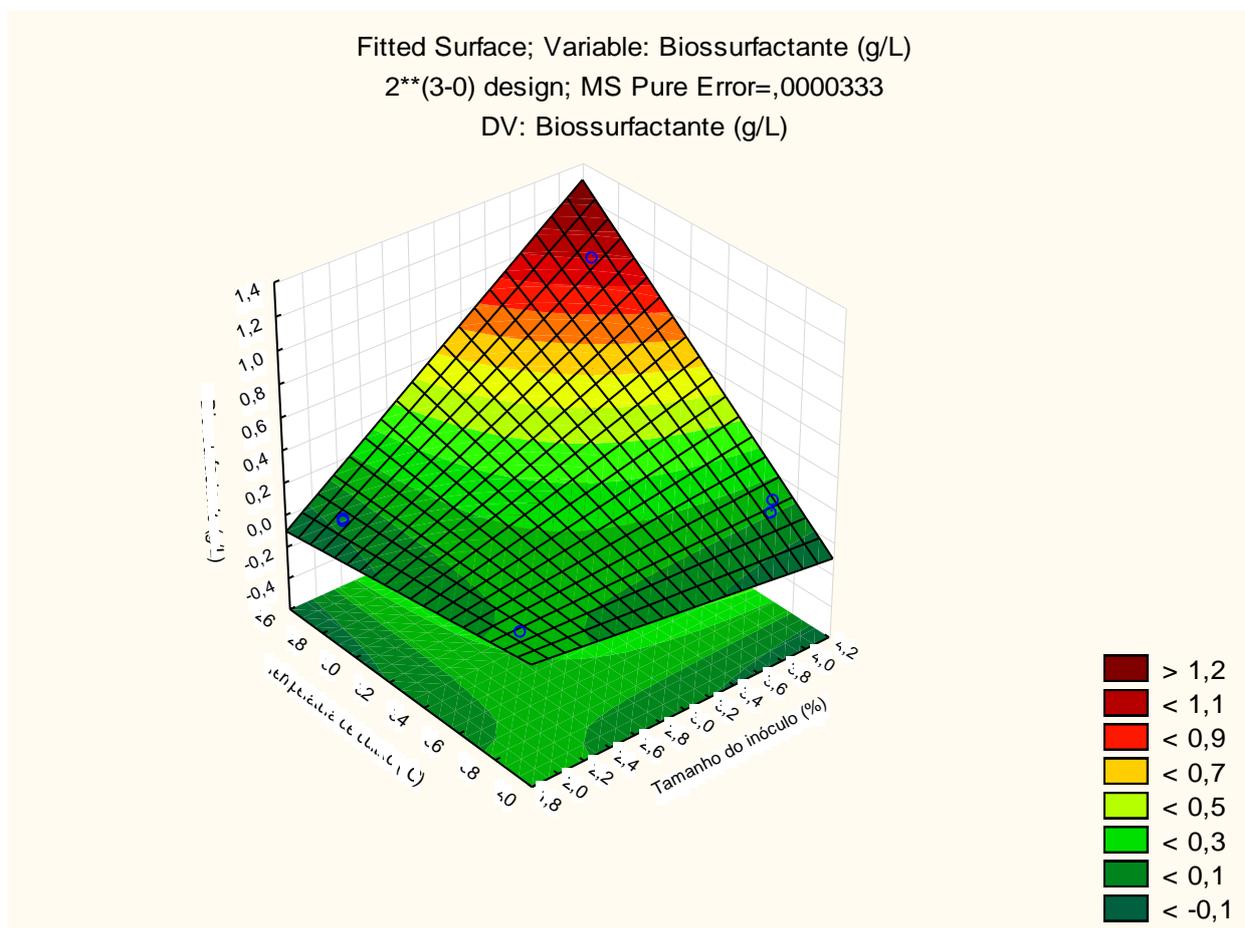
Através da análise do gráfico de Superfície de Resposta acima é possível observar que quanto menor for o valor do nível da Temperatura de cultivo (°C) e menor também o valor do nível de Agitação (rpm), maior a probabilidade de encontrar valores mais elevados para o Rendimento em biossurfactante isolado (g/L). A Região Vermelha no gráfico mostra valores da variável resposta próximos a 1,2 g/L.

Figura 7 - Gráfico de Superfície de resposta, avaliando as relações entre os fatores: (1) Agitação (rpm) e (3) Tamanho do inóculo (%), tendo como variável resposta a concentração de biossurfactante após 72 horas de cultivo de *Bacillus invictae* UCP1617 em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.



Através da análise do gráfico de Superfície de Resposta acima é possível observar que quanto menor for o valor do nível de Agitação (rpm), e maior o valor do nível do Tamanho do inóculo (%), maior a probabilidade de encontrar valores mais elevados para o Rendimento em biossurfactante isolado (g/L). A Região Vermelha no gráfico mostra valores da variável resposta próximos a 1,2 g/L.

Figura 8 - Gráfico de Superfície de resposta, avaliando as relações entre os fatores: (2) Temperatura de cultivo (°C) e (3) Tamanho do inóculo (%), tendo como variável resposta a concentração de biossurfactante após 72 horas de cultivo de *Bacillus invictae* UCP1617 em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.

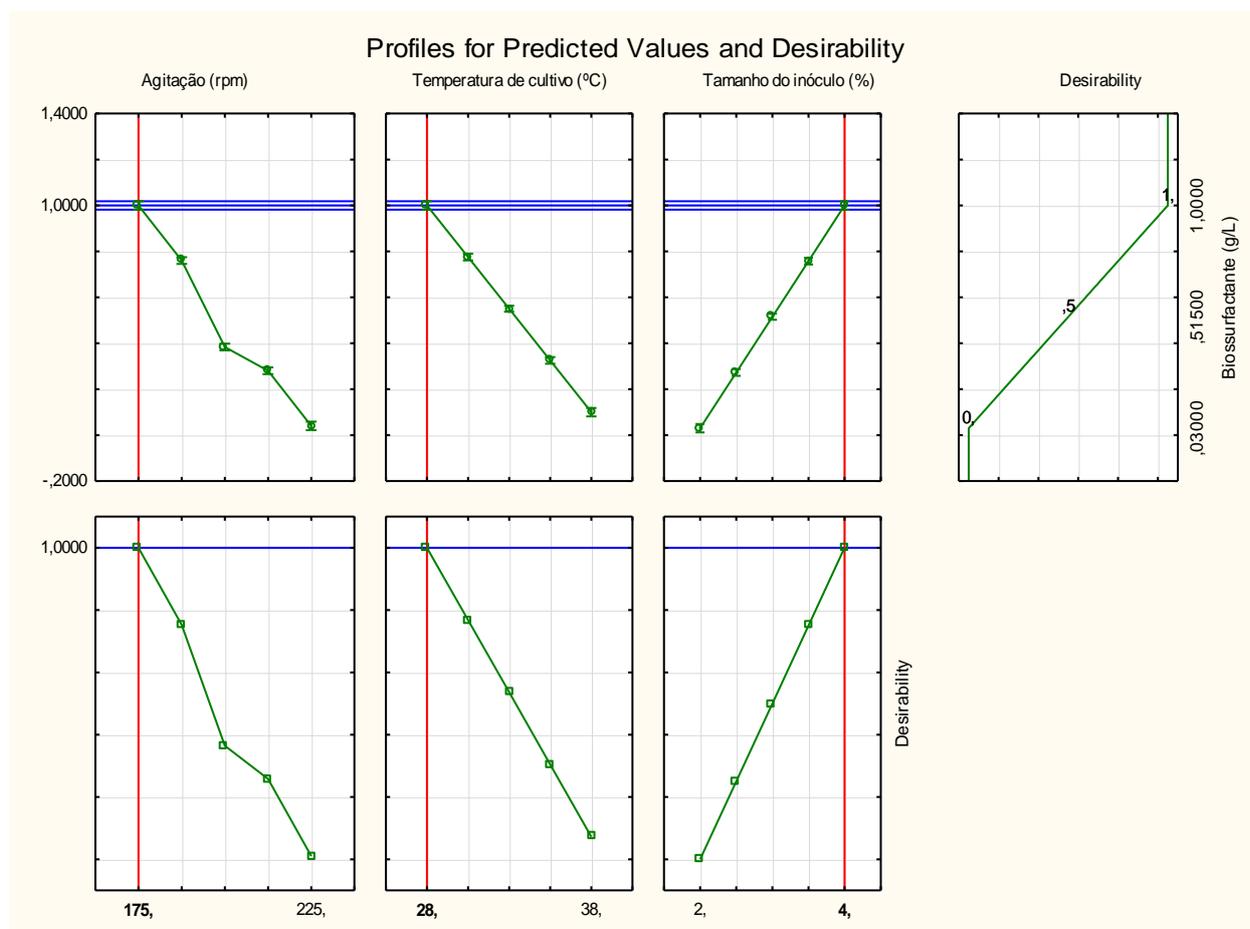


Através da análise do gráfico de Superfície de Resposta acima é possível observar que quanto menor for o valor do nível Temperatura de cultivo (°C) e maior o valor do nível do Tamanho do inóculo (%), maior a probabilidade de encontrar valores mais elevados para o Rendimento em biossurfactante isolado (g/L). Região Vermelha no gráfico mostra valores da variável resposta próximos a 1,2 g/L.

Após a aplicação de uma análise de desejabilidade (Figura 9), é possível selecionar a condição do ensaio 5 (Agitação de 175 rpm, Temperatura de 28°C e Inóculo de 4%), como a condição que maximiza o valor da variável resposta, definindo assim os valores para o *scale-up* de produção do biossurfactante em biorreator, considerando o melhor valor de rendimento em 72 horas de cultivo. Pendyala e Kulkarni (2022) também descreveram a otimização da produção de

biossurfactante por *Bacillus vallismortis* RMS25 utilizando resíduo de penas de frango como substrato. Um rendimento de 1,12 g/L foi validado nas condições otimizadas (4% do resíduo, 4% de glicose, 2% de inóculo e 48 horas de fermentação).

Figura 9 - Avaliação de Desejabilidade. As linhas verticais vermelhas indicam o valor do nível que os fatores devem assumir para maximizar simultaneamente a variável de resposta.



Os resultados obtidos permitem observar que a modelagem estatística é uma importante ferramenta que pode ser usada para explicar não só a influência mais relevante, como também, a interação entre as influências dos parâmetros fermentativos envolvidos no desempenho de um determinado processo.

Através da modelagem estatística, foi possível gerar informação a partir de poucos ensaios experimentais, reduzindo, conseqüentemente, os custos e o tempo necessários para o desenvolvimento do processo experimental (Huiqing e Qingxin, 2017). Estudos realizados também utilizando a modelagem estatística observaram

que a partir de poucos ensaios experimentais pode-se reduzir os custos e o tempo necessário...

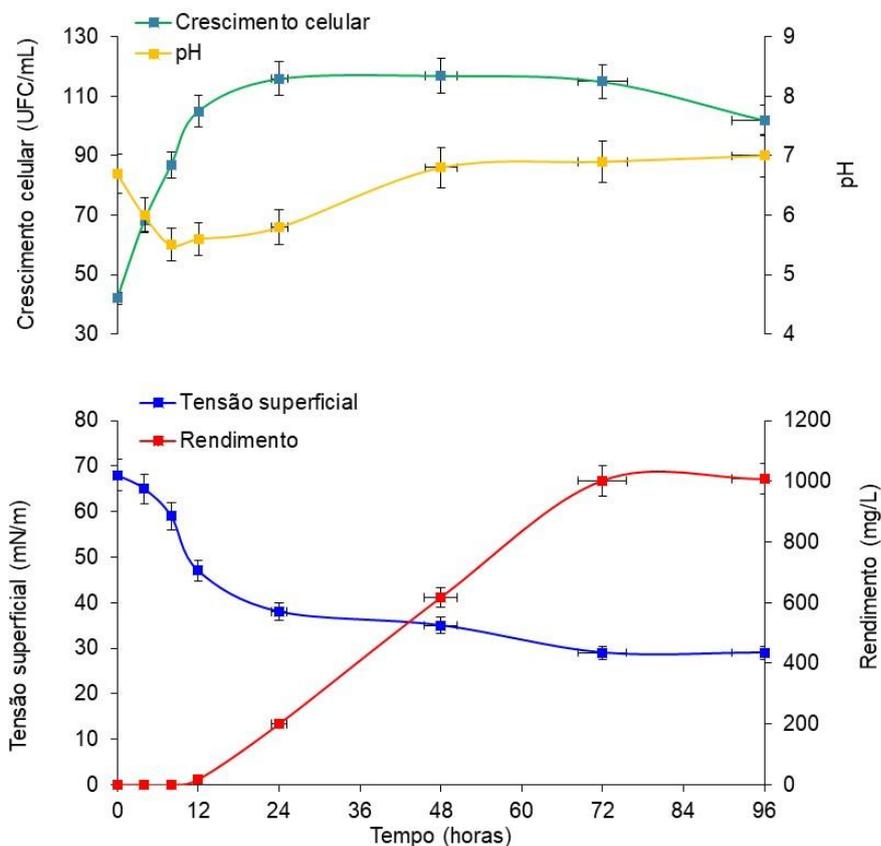
3.3. *Scale up* de produção de produção do biossurfactante

A Produção do biossurfactante em biorreator de 50 L foi realizada a partir das condições do ensaio 5 (agitação de 175 rpm, temperatura de 28°C e inóculo de 4%) do planejamento fatorial para avaliar o desempenho do *Bacillus invictae* UCP1617 em uma escala de produção semi-industrial.

O crescimento do *Bacillus invictae* UCP1617 foi analisado nas amostras de meio de cultura coletadas durante um período de 96 horas (Figura 10). O crescimento microbiano foi caracterizado por uma fase de crescimento linear nas primeiras 12 horas, acompanhada da redução do pH, de 6,7 para 5,7, seguida por uma fase estacionária de crescimento, quando o pH voltou a aumentar, atingindo o valor 7,0 ao final da fermentação. A taxa de crescimento nas 12 horas iniciais foi de 0,254/h.

A produtividade do surfactante, correspondente ao rendimento máximo obtido, foi de $16,70 \pm 0,2$ mg/L/h e teve início no final da fase de crescimento, indicando que o biossurfactante foi produzido como um metabólito secundário. A tensão superficial do meio de cultura no início da fermentação foi de $69,5 \pm 1,21$ mN/m, e após 72 h, a tensão caiu para $30,20 \pm 0,70$ mN/m, com rendimento de produção de 1.002,56 mg/L.

Figura 10 - Crescimento celular, pH, tensão superficial e rendimento do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral contendo de milhocina em biorreator de 50 L durante 96 h a 175 rpm e 28°C.



Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Gomes *et al.* (2018), que observaram a redução da tensão superficial do líquido metabólico de

aproximadamente 60 mN/m para $35,2 \pm 2,1$ mN/m. Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos obtidos para o biossurfactante de *Bacillus cereus* em óleo de fritura utilizando um biorreator de 50 L, o qual apresentou tensão superficial de 32 mN/m e um rendimento de 4,7 g/L (Durval *et al.*, 2020).

Por outro lado, o biossurfactante produzido em um biorreator de 1L por *Bacillus amyloliquefaciens* cultivado em óleo de oliva reduziu a tensão superficial para 46 mN/m (Diez *et al.*, 2022), enquanto outro biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* B30 cultivado em glicose ou melaço foi capaz de reduzir a tensão superficial para $26,63 \pm 0,45$ mN/m, sendo produzido numa concentração de 0,3-0,5 g/L (Al-Wahaibi *et al.*, 2014). Verma *et al.* (2022) realizaram um estudo em biorreator em modo batch, seguido pela operação semicontínua para a produção de um biossurfactante por *Bacillus subtilis* RSL2 em meio de melaço. Uma melhor transferência de massa foi alcançada no biorreator em comparação com o estudo em frascos, com a produção de 13,7 g /L de biossurfactante.

3.4. Determinação da atividade de emulsificação

Em adição à tensão superficial e/ou interfacial, a estabilidade de emulsões óleo/água também é muito utilizada como um indicador de atividade tensoativa, embora a habilidade de uma molécula formar uma emulsão estável não esteja sempre associada à redução da tensão superficial (McClements e Jafari, 2018; Santos *et al.*, 2016)

Os resultados da atividade de emulsificação demonstraram uma elevada afinidade do biossurfactante aos substratos hidrofóbicos utilizados no teste. O biossurfactante produzido por *Bacillus invictae* UCP1617 foi capaz de formar emulsões estáveis de maior eficiência sobre o óleo de motor e o petróleo, seguido do querosene, demonstrando potencial para ser aplicado em processos de remediação onde estes tipos de óleo sejam os contaminantes (Tabela 7).

O biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, por outro lado, for capaz de emulsificar 58,4% do óleo de girassol e 46,6% do óleo de oliva (Diez *et al.*, 2022).

Tabela 7 - Emulsificação de substratos hidrofóbicos pelo biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral contendo 1,5% de milhocina.

Substrato	Índice de emulsificação (%)
Óleo de girassol	41,42 ± 2,12
Óleo de milho	41,67 ± 3,51
Hexadecano	50,32 ± 3,21
Óleo de amendoim	50,54 ± 1,69
Querosene	52,20 ± 2,52
Óleo de oliva	80,21 ± 3,00
Óleo de motor	90,80 ± 2,21
Petróleo	99,01 ± 0,80

A formação de uma emulsão ocorre a partir da dispersão de uma fase líquida como gotas microscópicas em outra fase líquida contínua. As pequenas gotas formadas promovem uma grande quantidade de área interfacial e superficial. Na presença de surfactantes, as emulsões formadas podem permanecer estáveis através da redução da tensão interfacial e da redução do grau de coalescência (Ribeiro *et al.*, 2020). A estabilidade de uma emulsão está relacionada, assim, ao equilíbrio da fase óleo/água/surfactante formada com a adição do tensoativo. Desta forma, as diferenças entre as capacidades de emulsificação observadas entre os diversos substratos podem ser explicadas pela compatibilidade conformacional entre a biomolécula surfactante e o substrato oleoso, que pode ou não favorecer a formação de uma emulsão estável.

As emulsões do tipo água em óleo formadas com óleo de motor e petróleo apresentaram-se compactas e permaneceram estáveis por mais de seis meses à temperatura ambiente, sugerindo o uso do biossurfactante em derramamento de óleos ou em ambientes industriais que fazem uso de óleos pesados. Por outro lado, a capacidade de emulsificar óleos vegetais sugere um potencial de aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

3.5. Estabilidade do biossurfactante relacionada à manutenção da tensão superficial e à capacidade de emulsificação

A aplicação dos biossurfactantes no meio ambiente e no setor industrial requerer produtos estáveis a condições operacionais e/ou ambientais extremas. No

caso da indústria petroquímica, especificamente, o uso de biossurfactantes como coadjuvantes nos processos de recuperação avançada de petróleo (*Microbial Enhanced Oil Recovery*), tem sido bastante promissor, embora as condições encontradas nos reservatórios de óleo, ou seja, alta temperatura, pressão e salinidade exijam a utilização de agentes eficientes e estáveis (Sarubbo *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022).

A etapa de purificação de biossurfactantes representa cerca de 60% dos custos totais de produção (Almeida *et al.*, 2016). Considerando a indústria do petróleo e, mais especificamente, a remoção de óleos poluentes, a aplicação da maioria dos surfactantes microbiológicos exigiria a utilização do líquido metabólico obtido ao fim do cultivo ou do extrato bruto contendo o biossurfactante. Nesse sentido, a aplicação do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 contido no líquido metabólico livre de células foi testada em condições ambientais específicas de pH, temperatura e concentrações salinas (Tabela 8).

Inicialmente, a estabilidade do biossurfactante à adição de NaCl foi investigada em função da possibilidade de uso do biossurfactante produzido em ambientes marinhos. O biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 manteve a capacidade de redução da tensão superficial principalmente até a presença de 6,0-7,0% de sal, apresentando uma tendência discreta de aumento da tensão proporcional ao aumento da concentração do sal. A capacidade de emulsificação também sofreu redução com o aumento da concentração salina. Uma vez que a maior salinidade marinha encontrada no mundo está em torno de 3%, o biossurfactante é adequado para uso na remediação de ambientes marinhos impactados por derramamento de óleos.

O líquido metabólico livre de células (biossurfactante bruto) em diferentes pHs, demonstrou a estabilidade da capacidade de reduzir a tensão superficial na faixa de pH compreendida entre 4 e 12, enquanto para os pH extremos de 2 e 14 observou-se um aumento da tensão superficial. Sugere-se que o comportamento observado tenha ocorrido em virtude da alteração de algum componente estrutural do biossurfactante. A capacidade de emulsificação do óleo de motor, por outro lado, manteve-se estável em pH mais ácido.

A estabilidade do biossurfactante também foi testada para diferentes temperaturas. O biossurfactante demonstrou pequenas variações nos valores de tensão superficial e na capacidade de emulsificação durante a faixa de temperatura

estudada, entre 5°C e 120°C, indicando a possibilidade de uso em indústrias onde temperaturas elevadas sejam utilizadas ou alcançadas durante os processos industriais.

Tabela 8 - Estabilidade do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina avaliada em diferentes condições de pH, temperatura e sob adição de NaCl através da determinação da tensão superficial e da capacidade de emulsificação de óleo de motor

NaCl (%)	Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação (%)
2,0	30,07 ± 0,30	90,11± 2,26
4,0	30,24 ± 0,26	89,21±1,30
6,0	30,50 ± 0,02	85,32± 0,95
8,0	31,14 ± 0,70	79,41± 3,20
10,0	32,17 ± 0,40	55,19± 2,26
pH	Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação (%)
2,0	34,45 ± 0,40	90,30± 2,06
4,0	30,74 ± 0,20	89,66± 1,50
6,0	30,17 ± 0,41	94,21± 2,36
8,0	29,80 ± 0,60	65,15± 3,01
10	32,45 ± 0,43	55,23± 3,16
12	32,77 ± 0,52	53,33± 2,44
14	34,50 ± 0,22	51,41± 1,31
Temperatura (°C)	Tensão superficial (mN/m)	Índice de emulsificação (%)
5	30,05 ± 0,93	68,61± 2,36
70	31,18 ± 0,62	80,56± 3,05
100	31,85 ± 0,41	90,37± 3,01

120	30,40 ± 0,27	90,42 ± 2,78
-----	--------------	--------------

Considerando a importância da manutenção das propriedades surfactantes do longo do tempo nos diferentes processos industriais de remoção de óleos, independentemente da temperatura do ambiente de aplicação da biomolécula, o mesmo foi submetido a diferentes intervalos de tempo, conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Influência do tempo na estabilidade do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina sob diferentes temperaturas através da determinação da tensão superficial

Tempo (minutos)	Tensão superficial (mN/m)			
	5°C	70°C	100°C	120°C
0	30,05 ± 0,93	31,18 ± 0,62	31,85 ± 0,41	30,40 ± 0,27
30	29,60 ± 0,31	29,60 ± 0,71	29,18 ± 0,31	30,16 ± 0,31
60	29,41 ± 0,42	30,23 ± 0,21	29,50 ± 0,21	35,70 ± 0,12
120	29,22 ± 0,73	29,21 ± 0,22	31,11 ± 0,28	33,15 ± 0,22
180	29,11 ± 0,69	30,10 ± 0,30	31,13 ± 0,11	31,12 ± 0,12

Os resultados demonstraram que o biossurfactante bruto de *Bacillus invictae* UCP1617 demonstrou estabilidade frente às condições testadas, indicando sua versatilidade de uso sob condições prolongadas de aplicação.

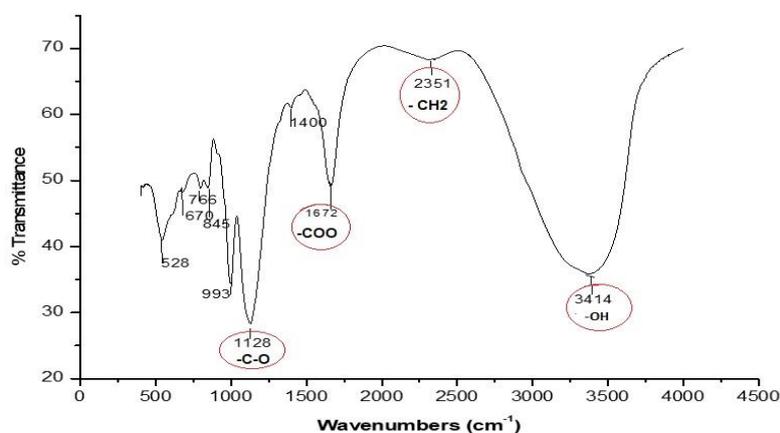
3.6. Caracterização do biossurfactante

Os biossurfactantes são moléculas complexas, não sendo fácil determinar a sua estrutura química, especialmente quando estes compostos são produzidos a partir de resíduos industriais. A análise da composição química do biossurfactante produzido por *Bacillus invictae* UCP1617 indicou a presença de 65% de lipídios e 32% de carboidratos, sugerindo possivelmente a natureza glicolipídica do composto.

Por outro lado, o biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* cultivado em óleo de oliva foi caracterizado como um lipopeptídeo (Diez *et al.*, 2022).

O biossurfactante isolado foi analisado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), caráter iônico e análise elementar. O espectro FT-IR mostrou um pico amplo e intenso em torno de 3414 cm^{-1} característico de grupos hidroxilas (Figura 11). Uma vibração de alongamento CH assimétrica do grupo CH_2 alifático atribuída foi visualizada em torno de 2351 cm^{-1} . O pico em torno de 1672 cm^{-1} e os picos próximos a 1128 cm^{-1} sugeriram a presença do grupo COO^- e C-O presente no carboxilato, respectivamente. Um pico esticado simétrico próximo a 1400 cm^{-1} indicou a presença de grupos carboxila (Haque *et al.*, 2020; *et al.*, 2022).

Figura 11 - Caracterização dos espectros FT-IR do biossurfactante extraído e purificado de *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina



As propriedades de carga das micelas do biossurfactante foram caracterizadas medindo-se seus potenciais zeta. O potencial zeta descreve o potencial eletrostático da superfície das partículas e pode indicar a carga total da biomolécula. A solução do biossurfactante apresentou um potencial zeta de 28,6 mV, sugerindo características aniônicas. Valores em torno de 29,9 mV foram observados por Barbosa *et al.* (2022) para o bioemulsificante produzido pela levedura *Scheffersomyces shehatae* 16-BR6- 2A em um meio contendo hidrolisado de bagaço de cana hemicelulósico e óleo de soja. Resultados semelhantes foram

observados para o biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP1615 submetido ao mesmo teste (Durval *et al.*, 2020).

A determinação do potencial zeta também fornece informações sobre o grau de repulsão eletrostática entre partículas em uma solução, ajudando a compreender as razões dos fenômenos de coalescência, agregação ou floculação em uma emulsão, o que pode ser aplicado para obter formulações de dispersões coloidais estáveis (Kourmentza *et al.*, 2019).

A análise elementar da composição do biossurfactante evidenciou a presença de carbono (70,05%), hidrogênio (9,74%), oxigênio (15,01%), sugerindo, mais uma vez, a natureza glicolípídica do biossurfactante.

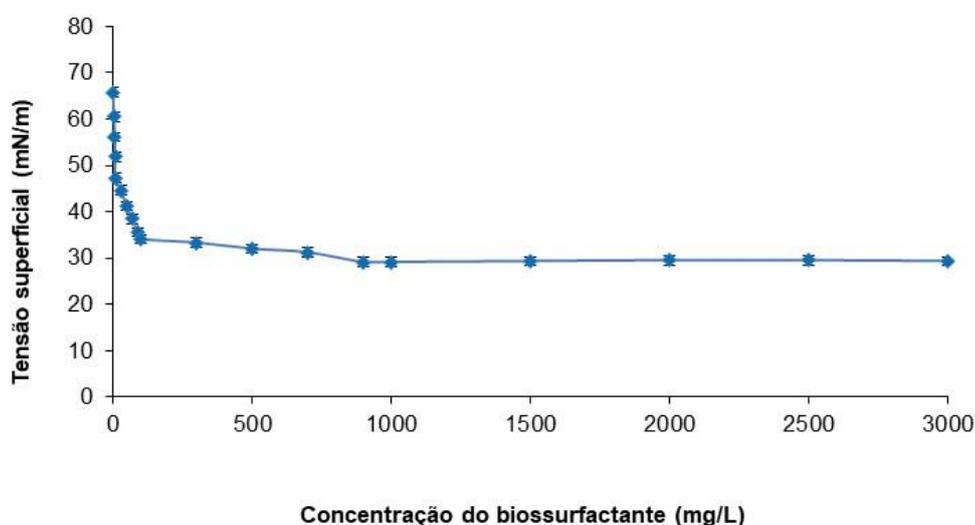
3.7. Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante

As propriedades tensoativas de um surfactante dependem principalmente de sua habilidade em reduzir as tensões superficial e interfacial, dos seus valores de CMC e da formação de emulsões compactas e estáveis.

A capacidade de reduzir a tensão superficial depende da concentração do composto tensoativo, isto é, da CMC, que é definida como a concentração mínima do surfactante requerida para reduzir ao máximo a tensão superficial da água, dando início à formação de micelas. Surfactantes eficientes possuem valores de CMC muito reduzidos, o que significa que pouco surfactante é requerido para reduzir a tensão superficial (Sarubbo *et al.*, 2022). O biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de $71,01 \pm 1,21$ mN/m para $29,1 \pm 1,06$ mN/m para uma concentração de 900 mg/L de biossurfactante isolado (Figura 12). Já o biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* cultivado em óleo de fritura apresentou uma CMC de 500 mg/L (Durval *et al.*, 2019), enquanto outras espécies de *Bacillus* foram capazes de produzir biossurfactantes com CMCs inferiores comparadas às obtidas neste trabalho (Mendoza *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2022). O lipopeptídeo produzido por *Geobacillus thermodenitrificans* ME63, por sua vez, apresentou uma CMC de 55 mg/L, embora sua tensão superficial tenha sido de 39,5 mN/m (Li *et al.*, 2023). A surfactina produzida por uma nova cepa de *Bacillus subtilis* (sp.) 50499 isolada de solo contaminado por óleo bruto, por sua vez, reduziu

a tensão superficial da água para 28,6 mN/m para uma CMC de 20 mg/L (Du *et al.*, 2023). As diferenças encontradas se devem não só às diferenças entre os microrganismos testados e as condições de cultivo, mas também às impurezas remanescentes após o isolamento do biossurfactante.

Figura 12 - Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *Bacillus invictae* UCP1617 cultivado em meio mineral suplementado com 1,5% de milhocina



3.8. Formulação do biossurfactante

O biossurfactante isolado foi adicionado de estabilizante (HEC), ácido graxo e sorbato de potássio ($C_6H_7KO_2$) como preservativo para compor a fórmula comercial de um detergente *eco-friendly*.

A formulação do biossurfactante não provocou alterações consideráveis na sua tensão superficial, uma vez que a mesma foi registrada como 31 mN/m após 90 dias em repouso. O formulado produzido também demonstrou ser um produto

promissor para ser aplicado em diferentes processos de limpeza por apresentar estabilidade nos vários valores de pH, de temperaturas e de concentrações de NaCl, uma vez que sua tensão superficial sofreu poucas alterações (Tabela 10).

Tabela 10 - Estabilidade do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 formulado sob diferentes condições de pH, temperatura e adição de NaCl frente à tensão superficial após 90 dias de armazenamento à 28°C

pH	Tensão superficial (mN/m)	Concentração de NaCl (%)	Tensão superficial (mN/m)	Temperatura (°C)	Tensão superficial (mN/m)
2	30,45 ± 0,45	2	30,07 ± 0,31	5	30,05 ± 0,92
4	30,04 ± 0,22	4	31,74 ± 0,26	70	30,18 ± 0,63
6	30,07 ± 0,41	6	32,61 ± 0,22	100	30,25 ± 0,42
8	30,80 ± 0,60	8	32,14 ± 0,71	120	30,40 ± 0,22
10	31,05 ± 0,43	10	31,17 ± 0,40	-	-
12	31,77 ± 0,52	-	-	-	-

Fonte: O autor

3.9. Toxicidade do biossurfactante formulado

Testes de fitotoxicidade e toxicidade em organismos aquáticos têm sido usados como critérios importantes na seleção de tensoativos a serem empregados em detergentes domésticos e industriais (Santos *et al.*, 2016).

Após a exposição das larvas do microcrustáceo *Artemia salina* ao biossurfactante formulado diferentes concentrações testadas (1/2 CMC-450, CMC - 900 e 2xCMC- 1800 mg/L), as mesmas apresentaram sobrevivência de 100%, não

havendo taxa de mortalidade. Silva *et al.* (2023) também obtiveram os mesmos resultados com um biossurfactante produzido por *Candida bombicola*.

Considerando que um IG de 80% tem sido utilizado como indicador de ausência de toxicidade (Tiquia *et al.*, 1996), os resultados obtidos indicaram que as soluções de biossurfactante testadas na $\frac{1}{2}$ CMC (450 mg/L) e na CMC (900 mg/L) não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação das sementes e sobre o alongamento das raízes dos vegetais testados, uma vez que houve índice de germinação entre 80 e 90% nessas concentrações (Tabela 11).

Tabela 11 - Fitotoxicidade do biossurfactante de *Bacillus invictae* UCP1617 formulado em diferentes concentrações de biossurfactante determinadas a partir da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Sementes de vegetais	Índice de Germinação (%)			
	Concentração do biossurfactante			
	$\frac{1}{2}$ CMC	CMC	2xCMC	Água
Tomate cereja (<i>Solanum lycopersicum</i> var. cerasiforme)	90,00± 3,33	80,00± 1,22	50,00± 2,76	100,00± 0,43
Repolho Coração-de-Boi (<i>Brassica oleracea</i>)	87,35± 2,97	70,60± 2,13	42,86± 3,09	100,00± 0,21

3.10. Dispersão de composto hidrofóbico em água do mar pelo biossurfactante formulado

Outro parâmetro bastante utilizado para determinação da qualidade de um biossurfactante é a avaliação de sua capacidade dispersante. O biossurfactante formulado na CMC foi capaz de dispersar totalmente o óleo, considerando o diâmetro inicial de óleo, nas proporções 1:1 e 1:2 (v/v). Mesmo o óleo estando em

uma proporção oito vezes maior que o biossurfactante, a biomolécula não perdeu sua eficiência, indicando que o biossurfactante é um excelente dispersante de hidrocarbonetos, podendo ser utilizado, também, como agente remediador em ambientes marinhos (Tabela 12). A Figura 13 ilustra o experimento de dispersão do óleo pelo biossurfactante.

Tabela 12 - Dispersão do óleo motor pelo biossurfactante formulado obtido de *Bacillus invictae* UCP1617 em diferentes proporções de biossurfactantes e óleo

Proporção biossurfactante/óleo de motor (v/v)	Capacidade de dispersão (%)
1:1	100,00 ± 0,03
1:2	100,00 ± 0,02
1:8	80,00 ± 0,51

Figura 13 - Ilustração da dispersão do óleo de motor pelo biossurfactante formulado de *Bacillus invictae* UCP1617 em água do mar.



Fonte: O autor, 2023.

3.11. Remoção de composto hidrofóbico em solo pelo biossurfactante formulado

A eficiência do biossurfactante formulado foi observada no teste de remoção do óleo de motor. Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante foi capaz de remover, após 24 horas, 90,06±0,14 e 99,21±0,12% do óleo de motor contido no solo quando usado na metade da CMC e na CMC, respectivamente (Tabela 13). Estudos realizados por Sharma *et al.* (2018) avaliaram o efeito do biossurfactante produzido *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 e *Bacillus subtilis* BR-15, na remoção de óleo do motor em solo, mostrando que os biossurfactantes (lipopeptídeos) foram capazes de remover entre 56,91±1,52 e 66,31±2,32% do óleo

no solo. Portanto, o biossurfactante produzido por *Bacillus invictae* UCP1617 apresenta capacidade satisfatória de atuar na remediação de solos contaminados.

Tabela 13 - Remoção do óleo de motor em solo argiloso pelo biossurfactante formulado de *Bacillus invictae* UCP1617 em diferentes concentrações determinadas a partir da Concentração Micelar Crítica (CMC)

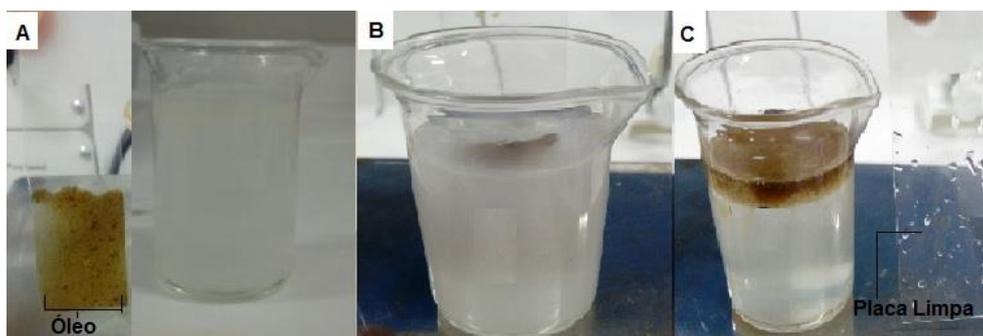
Concentração do biossurfactante	Tempo de contato (h)	Índice de remoção (%)
½ CMC	0,5	64,62 ± 0,21
	1,0	75,94 ± 0,16
	2,0	82,12 ± 0,11
	24,0	90,06 ± 0,14
CMC	0,5	89,62 ± 0,16
	1,0	90,56 ± 0,18
	2,0	92,45 ± 0,23
	24,0	99,21 ± 0,12

3.12. Aplicação do biossurfactante formulado na remoção de poluente hidrofóbico em superfície de vidro

Os biossurfactantes podem aumentar a remoção de poluentes hidrofóbicos através da solubilização dos constituintes hidrofóbicos na fase aquosa (Sarubbo *et al.*, 2015).

Os resultados de remoção do composto oleoso adsorvido em superfície de vidro pelo biossurfactante formulado na CMC mostraram que o tensoativo tem habilidade de solubilizar o óleo de motor por apresentar uma remoção de 98,42 ± 1,02% (Figura 14).

Figura 14 - Ilustração da remoção de óleo motor em superfície sólida pelo biossurfactante formulado obtido de *Bacillus invictae* UCP1617. (A) Lâmina contaminada e solução de biossurfactante; (B) Processo de lavagem por imersão e (C) Lâmina lavada e solução de biossurfactante pós-lavagem



Fonte: O autor, 2023.

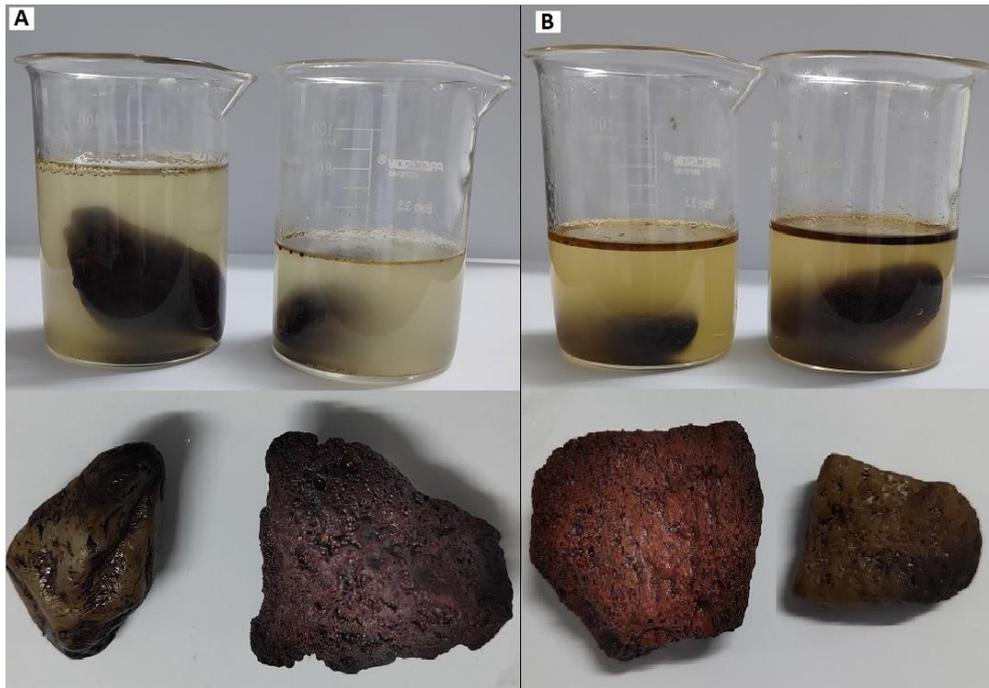
3.13. Teste de lavagem de composto hidrofóbico adsorvido à superfície porosa com o biossurfactante formulado

As regiões costeiras apresentam uma grande variedade de características distintas, desde regiões arenosas até regiões rochosas. Devido a estas diferenças nas superfícies, contaminantes hidrofóbicos que têm caráter recalcitrante no meio ambiente podem ser facilmente aderidos, impactando significativamente a paisagem e a ecossistemas dessas áreas (Pereira *et al.*, 2022; Verma *et al.*, 2021).

Considerando a importância da preservação destas formações rochosas, a capacidade de remoção de óleos contaminantes em rochas e pedras foi avaliada utilizando amostras de rochas do ambiente costeiro foram impregnadas com óleo de motor e lavadas, sem fricção, com diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *Bacillus invictae* UCP1617. Foi possível observar que o uso do biossurfactante, na metade de sua CMC, contribuiu para a remoção de $30 \pm 1,2\%$ do contaminante hidrofóbico aderido à rocha. Os maiores valores de remoção, de $75 \pm 2,2\%$ foram obtidos na CMC, taxas que corroboram com os estudos descritos na literatura (Figura 15).

Durval *et al.* (2021) avaliando o biossurfactante de *Bacillus cereus* produzido em um meio mineral suplementado com 2% de óleo de soja pós fritura e 0,12% de peptona, observou um percentual de $69 \pm 2,1\%$ de remoção de óleo de motor aderido à rocha com o biossurfactante na concentração duas vezes a CMC. Experimentos realizado por Ostendorf *et al.* (2019), utilizando o biossurfactante isolado de *Bacillus cereus* na CMC, mostrou taxas de remoção de óleo de motor aderido à rocha de aproximadamente 60%. Comparando o presente estudo com resultados descritos na literatura, a aplicação desta biomolécula como agente de lavagem em regiões costeiras pode ser considerada promissora.

Figura 15 - Ilustração da remoção de óleo motor em rochas porosa pelo biossurfactante formulado obtido de *Bacillus invictae* UCP1617 na metade da CMC (A) e na CM (B).



Fonte: O autor, 2023.

4. CONCLUSÕES

O *Bacillus invictae* UCP1617 é capaz de produzir um biossurfactante eficiente em meio contendo substratos de baixo custo, demonstrando grande potencial biotecnológico. O biossurfactante demonstrou estabilidade frente a condições ambientais extremas, indicando a possibilidade de aplicação sob condições adversas, como em derramamentos de petroderivados no mar, na recuperação de petróleo a elevadas profundidades ou em processos industriais a altas temperaturas. Além disso, as propriedades tensoativas, de emulsificação e a ausência de toxicidade, assim como a capacidade de dispersão de óleo em meio aquoso demonstram claramente a viabilidade de aplicação do biossurfactante formulado como aditivo biotecnológico para os processos de remediação de ambientes aquáticos e terrestres contaminados com petróleo e derivados.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Programa de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), a Termelétrica EPASA (Centrais Elétricas da Paraíba), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Fundação Nacional de Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brasil.

5. REFERÊNCIAS

ABBOT, V.; PALIWAL, D.; SHARMA, A.; SHARMA, P. A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals. **Heliyon**, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10149>

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; Al-Bahry, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.022>

ALMEIDA, D.G.; SOARES DA SILVA, R. de C.F.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1718, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BARBOSA, F.G.; MARCELINO, P.R.F.; LACERDA, T.M.; PHILIPPINI, R.R.; GIANCATERINO, E.T.; MANCEBO, M.C.; SANTOS, J.C.d.; DA SILVA, S.S. Production, physicochemical and structural characterization of a bioemulsifier produced in a culture medium composed of sugarcane bagasse hemicellulosic

hydrolysate and soybean oil in the context of biorefineries. **Fermentation**, v. 8, n. 11, p. 618, 2022. <https://doi.org/10.3390/fermentation8110618>

CHAPRÃO, M.J.; DE CÁSSIA FREIRE SOARES DA SILVA, R.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 15-22, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.016>

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>

DIEZ, M.C.; LAFQUEN, C.; FINCHEIRA, P.; LAMILLA, C.; BRICEÑO, G.; SCHALCHLI, H. Biosurfactant Production by *Bacillus amyloliquefaciens* C11 and *Streptomyces lavendulae* C27 Isolated from a Biopurification System for Environmental Applications. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1892, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101892>

DUBOIS M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.R. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60111a017>

DURVAL, I.J.B.; RESENDE, A.H.M.; FIGUEIREDO, M.A.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D., Sarubbo, L.A., 2019. Studies on biosurfactants produced using *Bacillus cereus* isolated from seawater with biotechnological potential for marine oil-spill bioremediation. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, n. 2, p. 349-363, 2019. <https://doi.org/10.1002/jsde.12218>

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. **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, p. 111357, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.1113>

DURVAL, I.; RUFINO, R.; SARUBBO, L. Biosurfactant as an environmental remediation agent: Toxicity, formulation, and application in the removal of petroderivate in sand and rock walls. **Biointerface Res. Appl. Chem**, v. 12, p. 34-48, 2021. <https://doi.org/10.33263/BRIAC121.034048>

DU, Y.; WANG, Y.; CUI, T.; GE, L.; YU, F.; ZHAO, M.; XU, Q.; JIN, M.; CHEN, B.; LONG, X. Efficient production of biosurfactant surfactin by a newly isolated *Bacillus subtilis* (sp.) 50499 strain from oil-contaminated soil. **Food and Bioprocess Processing**, v. 142, p. 40-49, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.09.002>

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 61-69, 2001.

ERAS-MUÑOZ, E.; FARRÉ, A.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X.; GEA, T., 2022. Microbial biosurfactants: A review of recent environmental applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 5, p. 12365-12391, 2022. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>

FARIAS, C.B.B.; ALMEIDA, F.C.G.; SILVA, I.A.; SOUZA, T.C.; MEIRA, H.M.; SOARES DA SILVA, R.C.F.; SARUBBO, L.A., 2021. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 51, p. 28–39, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.02.002>

FELIX, A.K.N.; MARTINS, J.J.L.; ALMEIDA, J.G.L.; GIRO, M.E.A.; CAVALCANTE, K.F.; MELO, V.M.M.; PESSOA, O.D.L.; ROCHA, M.V.P.; GONÇALVES, L.R.B., AGUIAR, R.S.S. 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 and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256-263, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.062>

GEETHA, S.J.; BANAT, I.M.; JOSHI, S.J. Sanket J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23-32, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>

GOMES, M.B.; GONZALES-LIMACHE, E.E.; SOUSA, S.T.P.; DELLAGNEZZE, M.; SARTORATTO, A.; SILVA, L.C.F.; GIEG, L M.; VALONI, E.; SOUZA, R.S.; TORRES, A.P.R.; SOUSA, M.P.; DE PAULA, S.O.; SILVA, C.C.; OLIVEIRA, V.M., Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 231-242, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.014>

HAQUE, E.; RIYAZ, M.A.B.; SHANKAR, S.; HASSAN, S. Physicochemical and structural characterization of biosurfactant produced by Halophilic *Pseudomonas aeruginosa* ENO14 isolated from seawater. **Int. J. Pharm. Investig**, v. 10, p. 437-444, 2020. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2020.4.77>

HUIQING, C. QINGXIN L., 2017. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. **Microbial cell factories**, v. 16, p. 1-12, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2>

KARLAPUDI, A.P.; VENKATESWARULU, T.C.; TAMMINEEDI, J.; KANUMURI, L.; RAVURU, B.K.; DIRISALA, V. R.; Kodali, V.P. Role of biosurfactants in bioremediation of Oil Pollution—a review. **Petroleum**, v. 7, n. 2, p. 230, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>

KOURMENTZA, C.; ARAUJO, D.; SEVRIN, C.; ROMA-RODRIGUES, C.; FERREIRA, J.L.; FREITAS, F.; DIONISIO, M.; BAPTISTA, P.V.; FERNANDES, A.R.; GRANDFILS, C.; REIS, M.A.M. Occurrence of non-toxic bioemulsifiers during polyhydroxyalkanoate production by *Pseudomonas strains* valorizing crude glycerol by-product. **Bioresource technology**, v. 281, p. 31-40, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.066>

LI, J-Y.; LIU, Y-F.; ZHOU, L.; GANG, H-Z.; LIU, J-F.; SUN G-Z.; WANG, W-D.; YANG, S-Z.; MU, B-Z. Structural diversity of the lipopeptide biosurfactant produced by a newly isolated strain, *Geobacillus thermodenitrificans* ME63. **ACS Omega**, 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c02194>

LIU, K.; SUN, Y.; CAO, M.; WANG, J.; LU, J.R.; XU, H. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.005>

MANOCHA, M.S.; SAN-BLAS. G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 147-154, 1980. <https://doi.org/10.1099/00221287-117-1-147>

MCCLEMENTS, D.J.; JAFARI, S.M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55-79, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>

MENDOZA, I.C.; VILLAVICENCIO-VASQUEZ, M.; AGUAYO, P.; COELLO MONTOYA, D.; PLAZA, L.; ROMERO-PEÑA, M.; MARQUÉS, A.M.; CORONEL-LEÓN, J. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and application in cleaning out place system in a pilot sausages processing. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1518, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081518>

Mohanty, S.S., Koul, Y., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H.N., Chang, J-S., Wong, J.W.C., Bui, X-T. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3>

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactants: Properties and applications. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

OSTENDORF, T.A.; SILVA, I.A.; CONVERTI, A.; SARUBBO, L.A. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. **Journal of Biotechnology**, v. 295, p. 71-79, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.025>

PENDYALA, S.; KULKARNI, M., 2022. Statistical evaluation of chicken feather wastes as substrate for biosurfactant production by *Bacillus vallismortis* RMS25. **Journal of Xi'an Shiyou University**, v. 65, p. 66-78. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/UWNCS>

PEREIRA, B.L.; DA GLÓRIA M.G.M.; MARIA DE ALMEIDA L.R.L., Combined assessment of geodiversity as a tool to territorial management: Application to southeastern coast of state of São Paulo, Brazil. **Geoheritage**, v. 14, n. 2, p. 60, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12371-022-00696-7>

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Going green and cold: Biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. **Trends in Biotechnol**, v. 36, p. 277- 289, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.016>

RIBEIRO, B.G.; GUERRA, J.M.C.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: production and application prospects in the food industry. **Biotechnology progress**, v. 36, n. 5, p. e3030, 2020. <https://doi.org/10.1002/btpr.3030>

ROCHA E SILVA, N.M.P.; ALMEIDA, F.C.G.; ROCHA E SILVA, F.C.P.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Formulation of a biodegradable detergent for cleaning oily residues generated during industrial processes. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 23, n. 6, p. 1111-1123, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsde.12440>

ROCHA E SILVA, N.M.P.; MEIRA, H.M.; ALMEIDA, F.C.G.; SOARES DA SILVA, R.; DE, C.F.; ALMEIDA, D.G.; LUNA, J.M.; RUFINO R.D.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 48, n. 4, p. 267-281, 2019. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1474477>

ROCHA E SILVA, N.M.P., MEIRA, H.M., ALMEIDA, F.C.G., SOARES DA SILVA, R., DE, C.F., ALMEIDA, D.G., LUNA, J.M., RUFINO, R.D., SANTOS, V.A., SARUBBO, L.A. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 48, n. 4, p. 267-281, 2019. <https://doi.org/10.1080/15422119.2018.1474477>

SAEKI, A., SEKI, S., TAKENOBU, T., IWASA, Y., TAGAWA, S. Mobility and dynamics of charge carriers in rubrene single crystals studied by flash-photolysis microwave conductivity and optical spectroscopy. **Advanced Materials**, v. 20, n. 5, p. 920-923, 2008. <https://doi.org/10.1002/adma.200702463>

SANTOS, D.K.; RUFINO, R.; LUNA, J.; SANTOS, V.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

Sarubbo, L.A., Rocha Junior, R.B., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Banat, I.M., 2015. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**. v. 31, n. 8, p. 707-723, 2015. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1095293>

SARUBBO, L.A.; SILVA, M.G.C.; DURVAL, I.J.B.; BEZERRA, K.G.O.; RIBEIRO, B.G.; SILVA, I.A.; BANAT, I.M. Biosurfactants: production, properties, applications, trends, and perspectives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 181, p. 108377, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.

SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*.

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 16, p. 132-139, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.07.028>

SILVA, I.A., ALMEIDA, F.C.G., SOUZA, T.C., BEZERRA, K.G.O., DURVAL, I.J.B., CONVERTI, A., SARUBBO, L.A. 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. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-09813-z>

SILVA, M.G.C.; MEDEIROS, A.O.; CONVERTI, A.; ALMEIDA, F.C.G.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Promising Biomolecules for Agricultural Applications. **Sustainability**. v. 16, n. 1, p. 449, 2024. <https://doi.org/10.3390/su16010449>

SILVA, S.N.R.L., FARIAS, C.B.B., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A. 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. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>

SILVA, R.R.; SANTOS, J.C.V.; MEIRA, H.M.; ALMEIDA, S.M.; SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M. Microbial Biosurfactant: *Candida bombicola* as a Potential Remediator of Environments Contaminated by Heavy Metals. **Microorganisms**. v. 11, p. 2772, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112772>

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. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>

TIQUIA, S.M.; TAM, N.F.T.; HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental pollution**, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(96\)00052-8](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(96)00052-8)

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: production, characterization and surface active properties of biosurfactant. **Bioresource technology**, v. 221, p. 510-516, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.080>

VERMA, C.; EBENSO, E.E.; QURAIISHI, M.A.; HUSSAIN. Recent developments in sustainable corrosion inhibitors: design, performance and industrial scale applications. **Materials Advances**, v. 2, n. 12, p. 3806-3850, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0ma00681e>

VERMA, A., SHARMA, S., KUNDU, L.M., MAITI, S.K., PANDEY, L.M. Enhanced production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL2 in semicontinuous bioreactor utilizing molasses as a sole substrate. **Journal of Biotechnology**, v. 362, p. 24-35. *in press*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.12.007>.

ZAHED, M.A.; MATINVAFA, M.A.; AZARI, A.; MOHAJERI, L. Biosurfactant, a green and effective solution for bioremediation of petroleum hydrocarbons in the aquatic environment. **Discover Water**, v. 2, n. 1, p. 5, 2022. <https://doi.org/10.1007/s43832-022-00013-x>

ZARGAR, A.N.; LYMPERATOU, A.; SKIADAS, I.; KUMAR, M.; SRIVASTAVA, P. Structural and functional characterization of a novel biosurfactant from *Bacillus* sp. IITD106. **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, p. 127201, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127201>.

CAPÍTULO III

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados com a linhagem de *Bacillus invictae* UCP1617 permitem as seguintes conclusões:

- o *Bacillus invictae* UCP1617 apresenta potencial como microrganismo produtor de compostos com atividades surfactante e emulsificante a partir do uso de um substrato de baixo custo.
- a utilização de milhocina apresenta-se como alternativa vantajosa de formulação de um meio de baixo custo para a produção de biossurfactantes.
- a utilização de ferramentas estatísticas é vantajosa para a maximização da produção do biossurfactante.....
- o *scale-up* de produção do biossurfactante permitiu a obtenção de quantidades satisfatórias da biomolécula para sua possível aplicação industrial.
- o potencial de aplicação do biossurfactante produzido como agente tensoativo foi evidenciado considerando que o menor valor de tensão superficial atingido foi semelhante a valores descritos na literatura para bactérias super produtoras de surfactantes;
- o biossurfactante produzido pode ser utilizado como emulsificante de óleos e hidrocarbonetos de petróleo, indicando o uso dessa biomolécula no tratamento de diferentes ambientes contaminados com óleos pesados.
- a utilização do biossurfactante bruto indica a possibilidade de aplicação na área ambiental com redução dos custos do processo de produção;
- o biossurfactante demonstrou estabilidade frente a condições ambientais extremas, indicando a possibilidade de aplicação do sob condições adversas, como acontece nos derramamentos de petroderivados no mar, na recuperação de petróleo a elevadas profundidades ou em processos industriais a altas temperaturas.
- o biossurfactante formulado não apresenta toxicidade nas concentrações comumente utilizadas para máxima eficiência.

- a possível utilização comercial do biossurfactante formulado como aditivo biotecnológico *eco-friendly* está em consonância com as políticas de preservação e redução dos impactos ambientais sobre os ecossistemas.

Anexo 1: Normas da revista

2. ANEXO 2

ARTIGO: Production of Biosurfactant by *Bacillus invictae* UCP 1617 for the formulation of an Ecofriendly Detergent for Remediation of Petroderivatives.