



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

POLLYANA PEREIRA DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTE POR
CANDIDA BOMBICOLA E APLICAÇÃO EM
SOLOS CONTAMINADOS POR DERIVADO DE
PETRÓLEO**

Recife
2023

POLLYANA PEREIRA DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *CANDIDA*
BOMBICOLA E APLICAÇÃO EM SOLOS
CONTAMINADOS POR DERIVADO DO PETRÓLEO**

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. Raquel Diniz Rufino

Co-orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Recife

2023

Produção de biossurfactante por *Candida Bombicola* e aplicação em solos contaminados por derivado de petróleo. © 2023 by Pollyana Pereira do Nascimento is licensed under CC BY-NC-ND 4.0

N244p

Nascimento, Pollyana Pereira do.

Produção de biossurfactante por *Candida Bombicola* e aplicação em solos contaminados por derivado de petróleo / Pollyana Pereira do Nascimento, 2023.

81 f.: il.

Orientadora: Raquel Diniz Rufino.

Coorientadora: Leonie Asfora Sarubbo.

Mestrado (Dissertação) - Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2023.

1. Biotecnologia. 2. Biorremediação. 3. Leveduras.
4. Biossurfactantes. 5. Resíduos industriais. I. Título.

CDU 574.6

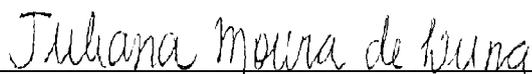
**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *CANDIDA*
BOMBICOLA E APLICAÇÃO EM SOLOS
CONTAMINADOS POR DERIVADO DE PETRÓLEO**

POLLYANA PEREIRA DO NASCIMENTO

Examinadores:



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



Profa. Dra. Juliána Moura de Luna
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

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

Defendida em: __/__/__

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

DEDICATÓRIA

À Deus.

Aos meus pais, Edna Pereira Do Nascimento e José Pedro do Nascimento.

À minha orientadora, Raquel Diniz Rufino.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar força nos momentos em que mais precisei. Por me ensinar sobre a importância da perseverança para alcançar os meus objetivos e sonhos.

Aos meus pais que sempre me incentivaram nos estudos e colocaram a educação como um pilar em minha vida. Gostaria de agradecer por me apoiarem incondicionalmente.

À Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino, sua presença foi essencial para a realização desse trabalho. Agradeço por tudo que me ensinou e por me guiar durante toda essa jornada. Sua vocação científica é incrível. Foi uma honra poder aprender tanto com você. Muito obrigada.

À minha co-orientadora Profa. Dra Leonie Asfora Sarubbo pelo suporte e atenção.

Ao meu marido Leandro Souza da Silva, por todo o amor, carinho, cuidado e compreensão durante esses 2 anos. Seu apoio foi essencial, muito obrigada.

Ao meu grande amigo, Bruno Júnior Paz Barreto, ser de muita luz, primeira pessoa a mim falar da existência desse programa de Mestrado e que mim deu total incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Sérgio Mendonça de Almeida, e todos os professores do Programa de Mestrado.

Aos meus amigos de pesquisa, em especial Hozana Ferreira, Jessyca Camilla, pela ajuda, atenção e incentivo.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial Ítalo Durval, Yslla Faccioli, Hugo Moraes, Alexandre Paredes e Izabelle, pela ajuda e contribuição ao longo da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais pelos conhecimentos transmitidos e suporte.

Ao técnico do laboratório Lucas Rocha por toda assistência durante a pesquisa.

À FACEPE, pela concessão da Bolsa para realização da pesquisa.

Por fim, especialmente à Banca Examinadora, composta pela profa. Dra. Juliana Moura de Luna, profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, muito obrigada por terem aceitado o convite.

A presente dissertação de mestrado não poderia ter sido concluída sem a presença de todos vocês. Obrigada!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Surfactantes.....	17
3.2 Biossurfactantes.....	18
3.2.1 Classificação.....	18
3.2.2 Propriedades e características do biossurfactante.....	20
3.3 Leveduras produtoras de biossurfactante.....	21
3.4 Resíduos industriais aplicados à produção de biossurfactantes.....	23
3.5 Fatores que afetam a produção de biossurfactante.....	25
3.5.1 Fonte de Carbono.....	26
3.5.2 Fonte de nitrogênio.....	27
3.5.3 Condições de Crescimento.....	28
3.6 Aplicações ambientais do biossurfactantes.....	29
3.6.1 Aplicação na biorremediação.....	29
3.6.2 Aplicação na limpeza de reservatórios de óleos.....	30
3.6.3 Aplicação na recuperação avançada de petróleo (MEOR).....	31
3.7 Desastre da mancha de óleo no Litoral nordestino no ano de 2019.....	32
REFERÊNCIAS	34

CAPÍTULO II

PATENTE I: NUTRIENTE ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Candida Bombicola* EM TEMPO REDUZIDO

Pedido nacional de patente.....	44
---------------------------------	----

CAPÍTULO III

POTENCIAL DE APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE POR *C. BOMBICOLA* EM SOLOS CONTAMINADOS POR DERIVADO DE PETRÓLEO

Abstract.....	48
Introdução.....	49
Materiais e métodos.....	50
Resultados.....	54
Discussão.....	62
Conclusão.....	67
Reconhecimentos.....	67
Referências.....	68
Lista de figuras.....	71
Lista de tabelas.....	72
CAPÍTULO IV	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
ANEXOS.....	74

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 – Representação esquemática de um surfactante.....17
- Figura 2 – Tensão superficial em função da concentração do biossurfactante21
- Figura 3 – Aplicação do biossurfactante na recuperação avançada de petróleo.....32

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.....	19
Tabela 2 – Principais leveduras produtoras de biossurfactante.....	22
Tabela 3 – Resíduos industriais utilizados para produção de biossurfactante.....	25

RESUMO

A crescente contaminação ambiental tem impactado significativamente os ecossistemas. Em resposta a essa problemática, as iniciativas de preservação ambiental e as legislações vigentes têm impulsionado o desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis, como produtos naturais em substituição aos derivados do petróleo. Nesse contexto, os biossurfactantes, são detergentes naturais que surgem como uma alternativa promissora para substituir os produtos convencionais derivados do petróleo. Frente a esta situação, o objetivo principal deste estudo foi gerar biossurfactante através da *Candida bombicola*, empregando resíduo industrial visando uma produção sustentável. bem como, investigar os processos de remoção do derivado de petróleo em solos. Para isso, foi utilizado um meio mineral composto por NH_4NO_3 (0,1%), KH_2PO_4 (0,02%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%), suplementado com 6,0% de resíduo da indústria de óleos vegetais e 1% de ácido glutâmico. Os resultados indicaram que o biossurfactante produzido reduziu a tensão superficial do meio de produção de 50 mN/m para 30 mN/m, com um rendimento de 2 g/L em um período de 72 horas de fermentação. A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante foi de 0,03%, e testes de genotoxicidade não demonstraram efeitos adversos para as raízes de cebola (*Allium cepa*). Análises de espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética corroboraram para observação da natureza do produto obtido. Testes de estabilidade da tensão superficial do biossurfactante bruto foram conduzidos em diferentes condições, incluindo variações de pH (2, 4, 6, 8 e 10), concentrações de salinidade (2%, 4%, 6%, 8% e 10%), temperaturas (5°C, 70°C, 100°C e 120°C), e tempos de exposição à temperatura de 90°C (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos). Os resultados demonstraram que o biossurfactante manteve sua estabilidade nessas condições variadas. Além disso, o índice de emulsificação após 24 horas (IE24) revelou que o biossurfactante foi capaz de formar emulsões de até 95% com óleo de motor queimado e até 60% com óleo de soja. Para avaliar a eficácia do biossurfactante na remoção de óleo de motor em diferentes tipos de solo (arenoso, siltoso e argiloso), foram realizados ensaios estáticos e dinâmicos com diferentes concentrações do biossurfactante (CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2xCMC). No ensaio estático, o maior percentual de remoção foi observado no solo arenoso, alcançando 65,32% de remoção. No ensaio dinâmico, o maior percentual de remoção foi de 95,60%, utilizando o biossurfactante na concentração de 2xCMC em ambos os testes. Esses resultados destacam a viabilidade e eficácia do biossurfactante produzido, sugerindo sua aplicação prática na recuperação ambiental de áreas contaminadas por derivados de petróleo.

Palavras-chave: Biorremediação. Levedura. Biotensoativo. Resíduo industrial.

ABSTRACT

Increasing environmental contamination has significantly impacted ecosystems. In response to this problem, environmental preservation initiatives and current legislation have driven the development of more sustainable alternatives, such as natural products to replace petroleum derivatives. In this context, biosurfactants are natural detergents that emerge as a promising alternative to replace conventional petroleum-derived products. In this context, biosurfactants are natural detergents that emerge as a promising alternative to replace conventional petroleum-derived products. Faced with this situation, the main objective of this study was to generate biosurfactant through *Candida bombicola*, using industrial waste aiming at sustainable production. as well as investigating the processes of removing petroleum derivatives from soils. For this, a mineral medium composed of NH_4NO_3 (0,1%), KH_2PO_4 (0,02%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%), supplemented with 6.0% residue from the vegetable oil industry and 1% glutamic acid. The results indicated that the biosurfactant produced reduced the surface tension of the production medium from 50 mN/m to 30 mN/m, with a yield of 2 g/L in a period of 72 hours of fermentation. The critical micellar concentration (CMC) of the biosurfactant was 0.03%, and genotoxicity tests demonstrated no adverse effects on onion roots (*Allium cepa*). Infrared spectroscopy and magnetic resonance analyzes corroborated the observation of the nature of the product obtained. Surface tension stability tests of the raw biosurfactant were conducted under different conditions, including pH variations (2, 4, 6, 8 and 10), salinity concentrations (2%, 4%, 6%, 8% and 10%), temperatures (5°C, 70°C, 100°C and 120°C), and exposure times at 90°C (10, 20, 30, 40, 50, 60 and 120 minutes). The results demonstrated that the biosurfactant maintained its stability under these varied conditions. Furthermore, the emulsification index after 24 hours (IE24) revealed that the biosurfactant was capable of forming emulsions of up to 95% with burnt engine oil and up to 60% with soybean oil. To evaluate the effectiveness of the biosurfactant in removing engine oil from different types of soil (sandy, silty and clayey), static and dynamic tests were carried out with different concentrations of the biosurfactant (CMC, $\frac{1}{2}$ CMC and 2xCMC). In the static test, the highest percentage of removal was observed in sandy soil, reaching 65.32% removal. In the dynamic test, the highest percentage of removal was 95.60%, using the biosurfactant at a concentration of 2xCMC in both tests. These results highlight the viability and effectiveness of the biosurfactant produced, suggesting its practical application in the environmental recovery of areas contaminated by petroleum derivatives.

Keywords: Bioremediation. Yeast. Biosurfactant. Industrial waste.

CAPÍTULO I

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são utilizados em diversos setores industriais. São formados por estruturas moleculares contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água), promovendo a redução da tensão superficial/interfacial e conferindo capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases. A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a preocupação ambiental combinada a novas legislações de controle do meio ambiente tem levado ao desenvolvimento de pesquisas voltadas à produção de surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. Os compostos que exibem propriedades surfactantes são denominados biossurfactantes e consistem em biomoléculas derivadas de subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Durval *et al.*, 2021). Leveduras do gênero *Candida* têm sido utilizadas com sucesso na produção de biossurfactantes (Rocha Junior *et al.*, 2019).

As leveduras podem crescer tanto em substratos imiscíveis em água, como óleos vegetais e hidrocarbonetos, quanto em compostos solúveis em água, como carboidratos e glicerol. As condições de cultura e a composição do meio determinam a produção e composição do biossurfactante, o que afeta a sobrevivência dos microrganismos produtores, aumenta a solubilidade dos compostos insolúveis em água e facilita o seu transporte para o interior da célula (Ribeiro *et al.*, 2021).

Os biossurfactantes constituem uma solução em potencial para a remediação de ambientes terrestres e aquáticos contaminados por óleos e metais pesados. Essas biomoléculas atuam na solubilização e dispersão dos contaminantes, permitindo ainda sua reutilização. O sucesso da produção de surfactantes microbianos, e sua posterior aplicação no meio ambiente, entretanto, depende do desenvolvimento de processos economicamente viáveis, especialmente em relação aos substratos utilizados para fermentação, que representam cerca de 10 a 30% do custo total de produção (Almeida *et al.*, 2016). Com relação aos processos de purificação, que representam cerca de 60% do custo total de produção, estes não serão computados, uma vez que a área ambiental permite a aplicação do

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

biossurfactante na forma bruta, eliminando essa dispendiosa etapa (Sarubbo *et al.*, 2015).

Considerando a habilidade dos biossurfactantes atuarem na redução da tensão superficial dos líquidos, surge a proposta de produção de um biossurfactante, bem como a investigação do processo de remoção de um composto derivado do petróleo em solos contaminados, representando considerável contribuição à saúde pública e ao meio ambiente, tendo em vista a persistência e toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados do petróleo. Justifica-se, a aplicação de um produto biotecnológico efetivo, não só na descontaminação ambiental, mas também nos diversos segmentos industriais do país, com vantagens econômicas e sociais, que possibilitarão a melhoria da qualidade de vida e do bem-estar social.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar o biossurfactante produzido pela *Candida bombicola* utilizando resíduo sustentável e aplicar em processos de remoção do derivado de petróleo em solos.

2.2 Objetivos Específicos

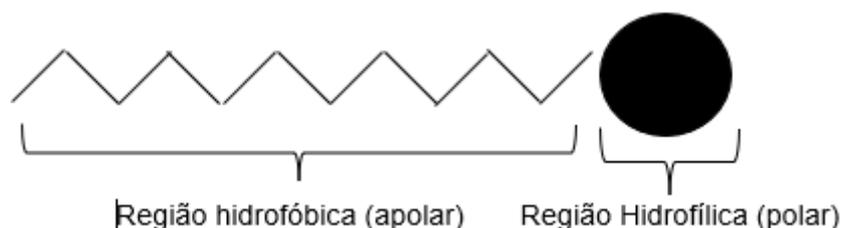
- Produzir o biossurfactante utilizando resíduo da indústria de óleos vegetais.
- Determinar a tensão superficial e Concentração Micelar Crítica.
- Isolar o biossurfactante produzido e determinar o rendimento de produção.
- Caracterizar o biossurfactante; determinar a estrutura química do biossurfactante.
- Caracterizar físico-quimicamente o solo contaminado por derivado de petróleo.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante formulado frente a condições específicas de pH, temperatura e presença de sal.
- Avaliar a capacidade emulsificante do biossurfactante formulado frente a condições específicas de pH, temperatura e presença de sal.
- Investigar o processo de remoção do óleo no solo impactado.
- Avaliar o percentual de remoção do contaminante derivado do petróleo.
- Caracterizar o perfil de genotoxicidade das soluções de biossurfactante utilizadas nos processos de remoção do composto oleoso do solo contaminado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Surfactantes

Os surfactantes são compostos tensoativos anfifílicos, constituídos por moléculas que contêm uma porção polar (cabeça), denominado como hidrofílica e outra apolar (cauda), denominada hidrofóbica (figura 1). A fração apolar é constituída por hidrocarbonetos de cadeia alifática, grupos aromáticos e policíclicos que pode variar de 8 a 18 átomos e a fração polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não aniônica ou anfotérica. Temos como exemplos de grupos hidrofílicos catiônicos os sais de amônio, enquanto os aniônicos podem ser derivados de grupos sulfatos e sulfonatos. Os agentes tensoativos catiônicos possuem carga positiva, os aniônicos apresentam carga negativa, os não iônicos não possuem carga e os tensoativos anfóteros têm carga positiva ou negativa variando conforme o pH da mistura. Os surfactantes são responsáveis por reduzir a tensão superficial e interfacial de misturas imiscíveis, solubilizando hidrocarbonetos em (óleo/água e água/óleo). Possuem propriedades como adsorção, formação de micelas, antiestático, emulsionante, lubrificação, ação espumante ou antiespumante, capacidade molhante, solubilização e detergência (Lira, 2020).

Figura 1 – Representação esquemática de um surfactante



Fonte: o Autor

Embora os surfactantes sintéticos e seus derivados estejam disponíveis em muitos setores industriais, eles são altamente tóxicos e devem ser usados com

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

cautela porque representam riscos para muitos ecossistemas e causam muitas alterações no ambiente e nos organismos, tais como: Eutrofização em ambientes aquáticos e inibição de enzimas biológicas (Nagtode *et al.*, 2023).

Apesar dos surfactantes terem uma vasta área de aplicação 54% como detergentes 13% nas indústrias têxteis, de couro e de papel, 10% em processos químicos, outros 10% nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos, 3% na indústria de alimentos, 2% na agricultura e os 2% restantes em outras aplicações sua utilização é limitada por questões ambientais, pois a grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente tem sua origem advinda do petróleo e seus derivados. Por isso, com a crescente preocupação ambiental, juntamente com as legislações, tem levado à busca por surfactantes naturais (Silva *et al.*, 2022; Maia Neto, 2021).

3.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes microbianos ou surfactantes naturais, são compostos originados de bioprocessos realizados por microrganismos como fungos, bactérias e leveduras. Cada vez mais essa biomolécula vem ganhando espaços como substitutos dos surfactantes sintéticos devido à sua melhor biocompatibilidade, além de ser biodegradável e menos tóxico ao meio ambiente comparado aos surfactantes tradicionais, tornando-os mais atrativos do ponto de vista ecológico (Sarubbo *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens vinculadas à sua utilização, os biossurfactantes apresentam uma baixa participação de mercado devido aos seus altos custos de produção, deste modo, diversas alternativas vêm sendo estudadas para reverter esse cenário, dentre elas podem ser citadas a busca por matéria-prima de baixo custo, como resíduos industriais, otimização dos meios de cultura, desenvolvimento de tecnologias de extração e purificação e busca por microrganismos com alto rendimento produtivo (Sarubbo *et al.*, 2022).

3.2.1 Classificação

Ao contrário dos surfactantes sintetizados quimicamente, que são classificados de acordo com sua dissociação em água, os biossurfactantes são

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana (Felix, 2020).

Os biotensoativos são divididos em cinco principais grupos, conforme sua massa molecular são eles: glicolipídios, fosfolipídios e lipopeptídeos (baixa massa molecular) e em biossurfactantes/bioemulsificante (alta massa molecular): polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (tabela 1) (Fenibo *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Classificação dos biossurfactantes e microrganismos produtores.

Peso molecular	Biossurfactante	Microrganismo	Referências
Baixo peso molecular	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas sp.</i> ¹	Phulpoto et al. (2021)
	lipídios (MELs)	<i>Ustilago maydis</i> ³	Becker et al. (2021)
		<i>Planococcus spp.</i> ¹	Gaur et al. (2020)
	Soforolipídios	<i>Starmerella bombicola</i> ²	Ceresa et al. (2020)
	Trehalolipídios	<i>Rhodococcus sp.</i> ¹	Bages-Estopa et al. (2018)
	Manosileritritol	<i>Pseudozyma tsukubaensis</i> ²	Andrade et al. (2017)
	Celobiose lipídios	<i>Pseudozyma aphidis</i> ² ,	Morita et al. (2013)
		<i>P. hubeiensis</i> ²	
		<i>Aspergillus sp.</i> ³	Kiran et al. (2010)
	Glicose lipídios	<i>Alcanivorax borkumensis</i> ¹	Yakimov et al. (1998)
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i> ¹	Cooper et al. (1979)	
Alto peso molecular	Surfactina/ Fengicina	<i>Paenibacillus polymyxa</i> ¹	Yalaoui-Guellal et al. (2021)
	Serrawetina	<i>Acinetobacter venetianus</i> ¹	Clements et al. (2019)
	Viscosina	<i>Serratia marcescens</i> ¹	Bonnichsen et al. (2015)
	Polimixina	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	Deng et al. (2011)
	Fosfolipídios	<i>Sphingobacterium sp.</i> ¹	Burgos-Díaz et al. (2011)
	Emulsan	<i>Candida lipolytica</i> ²	Castro et al. (2008)
	Liposan	<i>Acinetobacter sp.</i> ¹	Cirigliano et al. (1985)
	Vesículas		Kappeli et al. (1979)
Surfactina/ Iturina/	<i>Bacillus subtilis</i> ¹	Arima et al. (1968)	

*Alcaligenes aquatilis*¹

Fengicina

Bactérias¹; leveduras²; fungos filamentosos³. Fonte: Santos, (2022).**3.2.2 Propriedades físico-químicas dos biossurfactantes**

Certas propriedades físico-químicas como redução da tensão superficial, capacidade de formação de espuma, emulsificação e estabilização, baixas concentrações micelares críticas, solubilidade e poder de detergência são usadas para avaliar o desempenho do biossurfactantes e são importantes na seleção de microrganismos que sintetizam essas substâncias (Karlapudi *et al.*, 2018).

A propriedade mais importante dos biossurfactantes está relacionada a capacidade de diminuir a tensão superficial da água. Portanto, este parâmetro pode ser definido como força por unidade de comprimento ou como energia por unidade de área gerada da diferença nas forças das moléculas que atuam na interface (líquido-líquido ou líquido-gás) (Karlapudi *et al.*, 2018).

A tensão superficial (TS) da água destilada é de 72 mN/m, e esse valor diminui após a adição do biossurfactante. Assim, uma queda de tensão na faixa de 30 mN/m a 40 mN/m indica que o microrganismo é promissor na produção destes compostos e abaixo de 35 mN/m que o microrganismo pode ser considerado um produtor eficiente. No entanto, a tensão interfacial (IT) entre a água e o n-hexadecano pode ser reduzida de 40 mN/m para 1 mN/m. Portanto, as medições de TS e TI entre fases líquidas são medidas úteis para determinar se uma cultura microbiana está produzindo biossurfactante, mas não podem ser utilizadas de forma quantitativa, pois uma vez atingido o TS ou TI mínimo, a produção adicional de biossurfactante não leva a qualquer alteração no valor (Ribeaux, 2020)

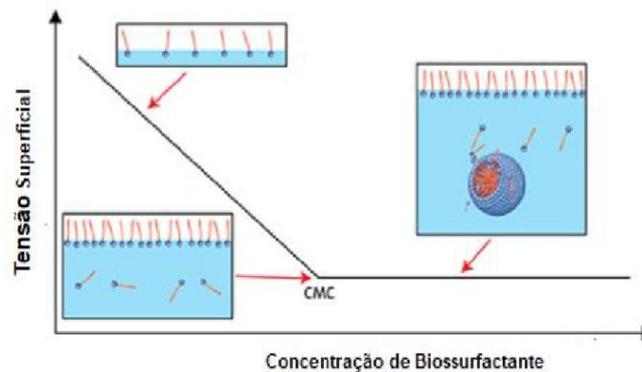
Por outro lado, a atividade dos biossurfactantes depende da sua concentração micelar crítica (CMC), que é definida como a concentração mínima necessária para atingir a menor tensão superficial. Em concentrações acima da CMC, as moléculas do biossurfactante associam-se para formar micelas, bicamadas e vesículas. Porém, abaixo do CMC, o surfactante está predominantemente na forma monomérica (Figura 2) (Fenibo *et al.*, 2019).

A intensidade da adsorção do biossurfactante à superfície depende da sua concentração. À medida que a concentração do biossurfactante aumenta, a área superficial disponível para as moléculas diminui, desencadeando o processo de

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

organizá-las para formar micelas. Assim, essas estruturas permitem que os biossurfactantes reduzam a tensão superficial e interfacial e aumentem a solubilidade e a biodisponibilidade de compostos orgânicos hidrofóbicos. Portanto, biossurfactantes eficazes têm um baixo valor de CMC, o que significa que é necessário menos biossurfactante para diminuir a tensão superficial (Perfumo et al., 2018).

Figura 2 – Tensão superficial em função da concentração do biossurfactante



Fonte: Silva et al (2022)

Os valores de CMC são importantes em praticamente todas as aplicações de biossurfactantes na indústria, desde o processamento de minerais até a formulação de produtos e alimentos para cuidados pessoais, sistemas de liberação de medicamentos e novas tecnologias de remediação de surfactantes (Perfumo et al., 2018).

3.3 Leveduras produtoras de biossurfactante

Embora a maioria dos estudos se concentre em biossurfactantes de origem bacteriana, especialmente nos gêneros mais comumente reportados, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Arthrobacter*, as leveduras estão gradualmente recebendo uma atenção crescente da comunidade científica mundial. Isso ocorre devido à natureza patogênica dos gêneros bacterianos mencionados, o que limita sua aplicação em setores como a indústria alimentícia. Em contraste, as

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

leveduras apresentam uma vantagem significativa, pois algumas espécies possuem o status de GRAS (Generally Recognized as Safe), indicando que esses microrganismos não são patogênicos nem tóxicos. Essa característica faz com que as leveduras sejam adequadas para aplicação em produtos medicamentosos e alimentícios (Marcelino *et al.*, 2020).

Os estudos sobre a produção de biossurfactantes utilizando leveduras, incluindo aquelas dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Pseudozyma*, *Yarrowia* e *Starmerella*, estão em crescimento. Além desses, diversos outros gêneros têm sido investigados e documentados na literatura, tais como *Pichia*, *Ustilago*, *Schizonella*, *Kluyveromyces*, *Wickerhamiella*, *Kurtzmanomyces*, *Debaryomyces*, *Cutaneotrichosporon*, *Spathaspora*, *Scheffersomyces* e *Meyerozyma* (Fenibo *et al.*, 2019). Na Tabela 2 são apresentados alguns exemplos das principais leveduras que têm a capacidade de produzir biossurfactantes.

Tabela 2 – Principais leveduras produtoras de biossurfactante.

Biossurfactant e	Microrganismos Produtores	Referências
Glicolipídios	<i>Starmerella batistae</i>	Kim <i>et al.</i> (2021)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ribeiro <i>et al.</i> (2020)
	<i>Starmerella bombicola</i>	Konishi <i>et al.</i> (2016)
	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	Elshafie <i>et al.</i> (2015) Accorsini <i>et al.</i> (2012)
	<i>Candida antártica</i>	Alejandro <i>et al.</i> (2011)
	<i>Ustilago maydi</i>	Chandran and Das (2010)
	<i>Trichosporon ashii</i> <i>Pichia anômala</i>	Thaniyavarn <i>et al.</i> (2008)
Lipopeptídios e	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Amaral <i>et al.</i> (2006)
Lipoproteínas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2031	Alcantara <i>et al.</i> (2010)
Fosfolipídios	<i>Candida sp.</i> SY16	Kim <i>et al.</i> (2006)
Polimérico	<i>Candida lipolytica</i>	Sarubbo <i>et al.</i> (2007)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saha and Rao (2017)

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

<i>Candida tropicalis</i>	Saha and Rao (2017)
Fonte: Santos, (2022)	

3.4 Resíduos industriais aplicados à produção de biossurfactantes

O setor agrícola é o maior produtor de biomassa, portanto, os resíduos gerados após o processamento industrial desse setor englobam subprodutos como bagaços, talos, folhas, cascas e sementes (Sivakumar *et al.*, 2022). Os resíduos da indústria alimentar representam aproximadamente 44% dos resíduos globais. Isto pode ser visto facilmente no processamento de frutas, onde 20-50% do peso da fruta processada é residual, como casca, polpa, sementes etc. (Manhogo *et al.*, 2022).

Portanto, a utilização de resíduos da indústria na composição do meio de cultura como substrato alternativo no processo fermentativo é plenamente justificada, uma vez que sua composição é rica em celulose e hemicelulose, formadas principalmente a partir de açúcares e sais minerais essenciais para produção de biossurfactantes. Além disso, o valor acrescentado da produção de novos produtos provenientes da reciclagem de resíduos representa um exagero das possibilidades econômicas, uma vez que os compostos bioativos contidos em diversos resíduos como vitaminas, minerais, polifenóis e probióticos, podem ser usados para sintetizar vários bioprodutos (Liu *et al.*, 2023).

Os biossurfactantes têm várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos e podem ser usados em uma variedade de processos industriais. No entanto, do ponto de vista econômico, os biossurfactantes ainda não conseguem competir com os surfactantes químicos principalmente devido aos seus altos custos. No entanto, devido ao aumento dos problemas ambientais, é necessário desenvolver biossurfactantes como uma alternativa aos produtos existentes (Santos, 2022).

A capacidade de produzir biossurfactantes a partir de substratos renováveis e diferentes espécies microbianas, bem como a capacidade de variar vários parâmetros de cultivo, como tempo de cultivo, velocidade de mistura, pH médio e nutrientes adicionados, permite a criação de compostos com propriedades estruturais e físicas distintas, tornando-os comparáveis ou mais eficazes que os

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

tensoativos sintéticos, embora os custos de produção do ainda não permitam uma melhor competitividade com sínteses semelhantes (Campos *et al.*, 2013).

O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido usando fontes alternativas de alimentos prontamente disponíveis e baratas, como resíduos agroindustriais. O principal problema no uso de resíduos em processos biotecnológicos é a seleção de um substrato que contenha a proporção correta de nutrientes que suportem tanto o crescimento celular quanto a produção do composto de interesse (Durán *et al.*, 2020).

Como o Brasil é um país essencialmente agrícola, a quantidade e fácil disponibilidade de subprodutos da agroindústria é bastante significativa. A quantidade e concentração de biossurfactantes no ambiente é o que determina a viabilidade de produção em larga escala. Em geral, a baixa concentração e estrutura do biossurfactante limita a extração (Sarubbo *et al.*, 2015). Nesse sentido, é muito importante desenvolver estratégias que viabilizem a produção e posterior utilização de biossurfactantes em escala industrial. Para o efeito, foram utilizados substratos baratos, seleção de microrganismos altamente produtivos e melhoria dos processos de produção e limpeza (Almeida, 2018).

Uma possível solução seria a utilização de subprodutos industriais, por ex. lodo residual da indústria de óleos vegetais. O glicerol, subproduto de muitos processos industriais como a produção de biodiesel, é produzido em grandes quantidades e pode ser utilizado como fonte de carbono, reduzindo os custos de produção. Além disso, a manipulação da composição do meio também pode aumentar a produtividade, o que otimiza as condições de cultivo (Silva *et al.*, 2020).

A seleção do substrato depende da escolha de um resíduo com um equilíbrio específico de nutrientes para crescimento e produção. Resíduos industriais ricos em carboidratos e lipídios são elementos importantes para uso como substratos na produção de biossurfactantes (Jimoh e Lin, 2019).

Nesse contexto, a produção de biossurfactante por microrganismos a partir de resíduos industriais é uma alternativa para a produção de biopolímeros ativos emulsificantes, o que permite futura aplicação no gerenciamento da poluição causada por óleo e seus derivados em ecossistemas terrestres e corpos d'água. Assim, as concentrações ideais de substratos para minimizar os altos custos de produção são determinadas por planejamento fatorial. Sabe-se também que

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

atualmente muitos estudos têm sido realizados sobre a seleção de microrganismos que produzem biossurfactantes para as indústrias alimentícias e petroquímicas (Patowary, 2017).

Mais e mais trabalhos sobre o uso de resíduos industriais para a produção de biossurfactantes podem ser encontrados na literatura. Do ponto de vista industrial, a produção em larga escala é extremamente importante, pois permite que a biomolécula seja produzida em larga escala, além de ser ecologicamente correto, como mencionado anteriormente, evitando a exposição a grandes quantidades de resíduos (PS da Silva Marinho et al., 2022). A Tabela 3 mostra estudos sobre a utilização de resíduos industriais na produção de biossurfactantes.

Tabela 3. Resíduos industriais utilizados para produção de biossurfactante

Resíduos industriais	Referência
Glicerol Bruto	Rulli et al. (2019)
Óleo de soja residual e milhocina	Santos et al. (2019)
Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana	Marcelino et al. (2019)
Cascas de batata e bagaço de cana-de-açúcar	Das; Kumar (2018)
Resíduo de óleo vegetal e milhocina	Silva et al. (2018)
Óleo de girassol residual	Kumar et al. (2017)
Milhocina	Santos et al. (2017)
Óleo de canola residual e Milhocina	Silva et al. (2017)
Águas residuais de fábrica de óleo, milhocina e melação de cana-de-açúcar	Gudiña et al. (2016)
Suco de maçã de caju clarificado	Oliveira et al. (2013)

Fonte: Marinho *et al.*, 2022

3.5 Fatores que afetam a produção dos biossurfactantes

A produção de biossurfactantes é influenciada por vários fatores além do ambiente e do crescimento de microrganismos. Entre eles: origem de fontes de carbono, nitrogênio, relação nitrogênio-carbono, restrições alimentares. Ambos os

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

parâmetros físicos: pH, salinidade, circulação de ar e cátions influenciam a produção de e o tipo de polímero sintetizado pelo microrganismo (Roy, 2018).

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos por meio de mudanças no pH, temperatura, aeração e taxas de agitação, ou quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse com baixas concentrações de fonte de nitrogênio (Desai; Banat, 1997).

3.5.1 Fonte de carbono

A fonte de carbono desempenha um papel crucial no crescimento e na produção de biossurfactantes por micro-organismos, e sua importância varia de uma espécie para outra. Em seguida, o nitrogênio surge como o segundo suplemento mais significativo para a produção desses compostos por micro-organismos. Em processos fermentativos, a relação entre carbono e nitrogênio desempenha um papel crucial na acumulação de metabolitos. Valores elevados dessa relação (ou seja, níveis baixos de nitrogênio) restringem o crescimento microbiano, direcionando o metabolismo das células para a produção de metabolitos. Em contrapartida, um excesso de nitrogênio leva à síntese de material celular e limita a acumulação de produtos desejados (Santos *et al.*, 2016).

A fonte de carbono desempenha um papel importante não apenas no crescimento microbiano, mas também na produção de biossurfactantes por diversos microrganismos. Quando apenas glicose ou óleo vegetal foi usado separadamente para a produção de biossurfactante de *T. bombicola*, foram obtidos rendimentos muito baixos, mas quando ambas as fontes de carbono foram usadas juntas, o rendimento aumentou para 70 g/L (Cooper; Paddock, 1984). Os rendimentos máximos de sofrorolipídios de *T. bombicola* foram obtidos quando foram utilizados 80 e 40 g/L de glicose e óleo de soja (KIM *et al.*, 1997); com rendimento ainda maior a *Candida bombicola* obteve 120 g/l de sofrorolipídios quando açúcar e óleo foram usados juntos (Casas *et al.*, 1997).

Quando se utilizou óleo de canola para produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* e glicose como fontes de carbono, foram obtidos 8 g/l de

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

soforolipídeos (Sarubbo *et al.*, 2007). Embora a maior produção de bioemulsificação tenha sido observada por *Candida lipolytica* em meio contendo 1,5% de glicose (Sarubbo *et al.*, 2001), *Candida Antarctica* e *Candida apicola* forneceram 13,4 e 7,3 g/l de soforolipídeos, respectivamente, suplementado de resíduo da indústria de sabão com concentração de 5% (Bednarski *et al.*, 2004). *Pseudozyma (Candida Antarctica)* foram capazes de converter manosileritritol (MEL) em lipídios de C12 a C18 n-alcanos. O rendimento de MEL foi de 140 g/l após semanas (Kitamoto *et al.*, 2001).

3.5.2 Fonte de nitrogênio

É o segundo suplemento mais importante na produção de biossurfactantes de microrganismos. Em muitos processos de fermentação, a relação C/N é um parâmetro muito sensível que afeta a quantidade de metabólitos produzidos. Uma alta relação C/N, ou baixo nível de nitrogênio, limita o crescimento de bactérias e direciona o metabolismo celular para a produção de produtos metabólicos. Por outro lado, uma fonte excessiva de nitrogênio direciona o substrato para a síntese de material celular, o que limita proporcionalmente o acúmulo de produtos (Robert *et al.*, 1989). Várias fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio têm sido utilizadas na produção de biossurfactantes. Santa Ana e outros. (2002) investigaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 cultivada em meio mineral contendo 3% de glicerol. Neste trabalho, o NaNO_3 foi mais efetivo que o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e verificou-se que a restrição alimentar direcionou o metabolismo para a formação de biossurfactantes.

Pseudomonas aeruginosa utiliza amônia, nitratos e aminoácidos como fontes de nitrogênio. A glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.4) pode assimilar amônia para formar glutamato ou glutamato com glutamina sintetase (EC 6.3.1.2) em glutamina. A glutamina e o alfa-cetoglutarato são então convertidos em glutamatos pela L-glutamina-2-oxiglutarato aminotransferase (EC 1.4.1.13). Os nitratos, por outro lado, devem ser reduzidos a nitritos e depois a amônia. Como resultado, a assimilação de nitrato é mais lenta em comparação com a amônia, simulando um estado limitante de nitrogênio favorável para a formação de raminolipídeos. Por outro lado, a

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

formação de lipídios é uma etapa crítica durante a síntese de raminolipídeos e a limitação de nitrogênio pode promover o acúmulo de lipídeos. Assim, a assimilação do nitrato como fonte de nitrogênio em relação à amônia (Deshpande; Daniels, 1995; Casas *et al.*, 1997), embora *Candida sp.* SY16, *C. lipolytica* e *C. glabrata* UCP 1002 foi identificada com nitrato de amônio e extrato de levedura (Kim *et al.*, 1999; Rufino *et al.*, 2007; 2008; Sarubbo *et al.*, 2006; 2007).

3.5.3 Condições de crescimento

Condições de crescimento como pH, temperatura, mistura e disponibilidade de oxigênio também afetam a produção de biossurfactantes devido ao seu efeito no crescimento ou atividade celular (Desai; Banat, 1997).

Espécies de *Candida* produzem biossurfactantes máximos em uma ampla faixa de pH, como observado para *Candida glabrata* UCP 1002, que produziu biossurfactante máximo em pH 5,7, *Candida sp.* SY16. Em pH 7,8, *Candida lipolytica* pH 5,0 e *Candida batistae* pH 6,0 (Cirigliano; Carman, 1984; KIM *et al.*, 1999; Sarubbo *et al.*, 2006; Konishi *et al.*, 2008), enquanto *Aspergillus ustus* e a *Pichia anamola* deu o maior rendimento de biossurfactante em pH 7,0 e 5,5 (Kiran *et al.*, 2009).

Os microrganismos também dependem da temperatura. A temperatura mais favorável para a produção de biossurfactantes de vários fungos é em torno de 30 °C, como é o caso de várias espécies de *Candida*, como *Candida sp.* SY16, *C. bombicola* e *T. batistae* (Cooper; Paddock, 1998; Deshpande; Daniels, 1995; Kim *et al.*, 1999; Konishi *et al.*, 2008).

O tempo de incubação também afeta significativamente a produção de biossurfactantes. Diferentes microrganismos podem produzir biossurfactantes em diferentes intervalos. A produção máxima de biossurfactante de *Aspergillus ustus* MSF3 foi observada após 5 dias de incubação, enquanto para *C. bombicola* os melhores tempos de incubação foram observados após 7, 8 e 11 dias (Casas *et al.*, 1997; Cavalero *et al.*, 2003; Felse *et al.*, 2007). Por outro lado, a maior produção de biossurfactante foi observada para *C. bombicola* utilizando gordura animal após 68 horas de incubação (Deshpande; Daniels, 1995). O aumento da agitação promoveu o acúmulo do biossurfactante *P. aeruginosa* UCP 0992 cultivado em glicerol (Silva *et*

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

al., 2010). A agitação entre 50 e 200 rpm foi estudada por Oliveira *et al.*, (2009) para *P. alcaligenes* cultivado em óleo de palma. Os autores constataram que o aumento da velocidade de rotação promoveu uma diminuição da tensão superficial do líquido metabólico livre de células para 27,6 mN/m. Cunha *et al.*, (2004) descobriram que a agitação teve um efeito negativo sobre *Serratia sp.* SVGG16 crescido em meio contendo hidrocarbonetos.

3.6 Aplicações ambientais do biossurfactante

Vários microrganismos como bactérias, fungos e leveduras são capazes de produzir biossurfactantes de fontes renováveis a partir de resíduos agroindustriais. Devido a muitas propriedades e diferenças estruturais. Os biossurfactantes têm muitas aplicações nas indústrias de petróleo, alimentos, farmacêutica e cosmética e desempenham um papel importante na proteção ambiental, controle de derramamento de óleo, biodegradação e remediação de solo contaminado por metais pesados (Gaur *et al.*, 2019).

O interesse em biossurfactantes aumentou significativamente, porque eles podem remediar áreas poluídas por óleo, remover poluentes de metais pesados e limpar esgotos, porque suas propriedades emulsificantes podem contribuir para a degradação de hidrocarbonetos (Karlapudi *et al.*, 2018).

As propriedades de detergência, umectação, emulsificação, dispersão de fases, solubilidade, formação de espuma, de emulsificação e lubrificação são importantes na aplicação biossurfactantes nas áreas mencionadas (Santos, Silva, Costa, 2016).

Cada vez mais tem aumentado a demanda por biossurfactantes. Aproximadamente são produzidos 13 milhões de toneladas/ano de biossurfactantes indicando sua importância e demanda na produção (Kaur, 2017).

3.6.1 Aplicação na biorremediação

A maior parte dos relatórios na literatura sobre esses compostos aborda sua aplicação na indústria petrolífera. Nesse contexto, sua natureza não tóxica e biodegradável tem contribuído para torná-los alternativas sustentáveis e amigáveis ao meio ambiente (Perfumo, 2018). A biorremediação envolve a decomposição

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

biológica de hidrocarbonetos por micro-organismos que utilizam esses poluentes como fonte de carbono para obter energia, resultando na degradação até dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (Hazen, 2019).

Quanto maior for a quantidade de micro-organismos degradadores, mais rápido e eficiente será o processo de biorremediação. Pesquisas indicam que fungos e bactérias são os principais micro-organismos eficazes na degradação de poluentes, apresentando um considerável potencial para a recuperação de ambientes contaminados (DONATI, 2019). Dessa forma, a eficácia de um micro-organismo degradador frequentemente depende da estrutura molecular do contaminante e da presença de enzimas específicas capazes de degradar o produto. Além disso, a ocorrência desse mecanismo é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura de moléculas naturais (Angelucci *et al.*, 2019).

Contudo, ao abordar os desafios relacionados à biodegradação de compostos hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos do petróleo, é possível destacar a baixa solubilidade e alta hidrofobicidade dessas substâncias. Essas características reduzem a disponibilidade para os micro-organismos, podendo retardar ou até mesmo interromper o processo de degradação. Diante dessa situação, uma alternativa viável tem sido a utilização de compostos surfactantes (Ribeaux, 2020).

Assim, surfactantes naturais ou biossurfactantes são produzidos por micro-organismos na presença de compostos hidrofóbicos, aumentando a solubilidade desses compostos no meio (Sajna, Gottumukkala, 2019). Esses compostos melhoram a interação entre água e óleo ao reduzir a tensão superficial acelera a degradação de diversos hidrocarbonetos por micro-organismos e facilitam a biorremediação de águas e solos contaminados (Joe *et al.*, 2019). Estudos conduzidos com micro-organismos que produzem biossurfactantes destacaram o potencial dessas substâncias na biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em solos e areia (Ribeaux, 2020).

3.6.2 Aplicação na limpeza de reservatório de óleos

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Algumas das aplicações industriais mais comuns de biossurfactantes estão relacionadas ao petróleo e mineração, bem como processos de limpeza industrial (Rocha e Silva *et al.*, 2018).

Grandes volumes de petróleo bruto são enviados diariamente, entregues às refinarias e adicionados aos tanques de armazenamento. Porém, lavagens periódicas são necessárias para manter esses tanques (Singh *et al.*, 2020). No entanto, alguns resíduos e uma pequena porção de óleo pesado acumulam-se no fundo e nas laterais do tanque de combustível. armazenamento e por possuírem alto teor de viscosidade acabam se transformando em resíduo sólido e não podem ser removido por bombeamento convencional. Para remover esses resíduos, é realizada uma lavagem, o uso de solventes e a limpeza manual, torna-se uma tarefa perigosa, demorada e cara (Almeida *et al.*, 2016).

O processo de limpeza de tanques de petróleo através do uso de biossurfactantes é realizado de forma a reduzir a viscosidade do óleo formando uma emulsão óleo em água, permitindo um melhor bombeamento de resíduos. Além disso, este processo também ajuda a restaurar o petróleo bruto após o rompimento da emulsão (Ren *et al.*, 2020).

3.6.3 Aplicação na recuperação avançada de petróleo (MEOR)

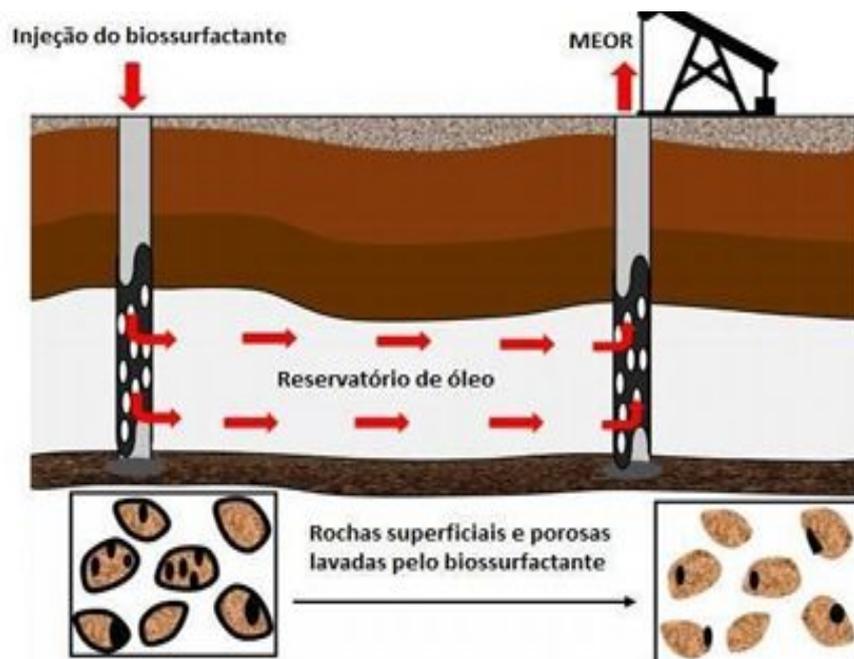
A recuperação avançada de petróleo (EOR) utiliza uma variedade de processos. Na indústria do petróleo, utiliza-se como métodos térmicos, físicos e químicos. Os surfactantes químicos é usado de diversas maneiras na indústria do petróleo, especialmente em EOR. Mas este método tem um custo alto e ao mesmo tempo perigoso para o ambiente (Akbari *et al.*, 2018).

No entanto, o desenvolvimento de novas tecnologias para converter produtos derivados do petróleo em energia renovável; biodegradável e sustentável são desafios sociais atuais. Os biossurfactante possui diversas vantagens sobre os surfactantes químicos: são biodegradáveis e possuem menor concentração micelar crítica (CMC). Eles podem ser produzidos a partir de recursos renováveis, mantendo o desempenho mesmo sob condições ambientais adversas e são menos tóxicos (Ren *et al.*, 2020).

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Estes compostos microbianos têm a capacidade de emulsionar o petróleo cru e reduzir sua viscosidade, tornando-o seu acesso mais fácil para aplicações avançadas de recuperação de petróleo, como pode ser visto na (figura 3) sem perder suas propriedades físico-químicas em extremos de temperatura, pH e salinidade. A utilização de microrganismos para recuperação aprimorada de petróleo (EOR) é entendida como recuperação de óleo aprimorada microbiana (MEOR) (Das *et al.* 2018).

Figura 3 – Aplicação do biossurfactante na recuperação avançada de petróleo



Fonte: Santos et al. (2021)

3.7 O Desastre da Mancha de Óleo no Litoral Nordestino em 2019

O ano de 2019 marcou um dos maiores desastres ambientais na história do litoral nordestino brasileiro, com o vazamento de petróleo cru que se transformou em

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

uma extensa mancha de óleo. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) desempenhou um papel fundamental na resposta a essa crise, coletando dados cruciais que permitem uma análise mais aprofundada dos eventos. O vazamento teve origem ainda não completamente identificada, desafiando os esforços iniciais para conter e mitigar seus impactos. A análise das trajetórias das manchas de óleo revelou uma disseminação ao longo das extensas praias do nordeste, afetando ecossistemas marinhos e costeiros de nove estados (IBAMA, 2022).

Os dados do IBAMA também evidenciam os desafios enfrentados durante a resposta ao desastre. A dificuldade em identificar a fonte do vazamento e a falta de um sistema de monitoramento eficiente inicialmente complicaram os esforços de contenção. Além disso, a extensão geográfica da mancha de óleo e a complexidade dos ecossistemas afetados aumentaram a complexidade da resposta (IBAMA, 2022).

Os dados do IBAMA destacam os impactos devastadores do vazamento na vida marinha. Tartarugas, aves marinhas, e diversas espécies de peixes foram afetadas, resultando em um desequilíbrio ecológico significativo. Os dados também indicam a extensão dos danos aos habitats costeiros e à biodiversidade marinha (IBAMA, 2022).

A experiência de 2019, documentada pelo IBAMA, ressalta a necessidade urgente de melhorar a capacidade de prevenção, resposta e monitoramento em situações de desastres ambientais. A cooperação entre entidades governamentais, organizações não governamentais e a comunidade internacional é fundamental para proteger os ecossistemas marinhos vulneráveis (IBAMA, 2022).

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).

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

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).

REFERÊNCIAS

SILVA, Rita de Cássia Freire Soares da., *et al.* Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. **Biodegradation**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 191-201, 2019.

ALMEIDA, *et al.* Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances.: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Frontiers In Microbiology*, [s.l.], v. 7, n. 8, p. 7-7, 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>.

AKBARI, *et al.* Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research And Innovation**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 81-90, jan. 2018. Editora Cubo. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>.

BEDNARSKI, *et al.* Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glicolipids by yeast. **Bioresource technology**, v. 95, n. 1, p. 15-18, 2004).

CAMPOS, *et al.* (2013). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108.

CAMPOS, *et al.* (2015). Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicology Reports*, 2, 1164-1170.

CHAPRAO, *et al.* Formulation and application of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* as collector in the flotation of oily water in industrial environment. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 285, p.15-22, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.08.016>.

CASAS, J. A.; DE LARA, S.G.; GARCIA-OCHOA, F. Otimization of a synthetic médium for *Candida bombicola* growth using factorial desing of experiments. **Enzyme and microbial technology**, v.21, n.3, p. 221-229, 1997.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

CAVALERO, da; COOPER, Dg. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal Of Biotechnology*. Canada, p. 31-41. jun. 2003.

CIRILIANO, C; CARMAN, G. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPOSAN, A BIOEMULSIFIER FROM *CANDIDA LIPOLYTICA*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 50, n., p.846-850, 1985.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 47, n., p.173-176, 1984.

CUNHA, C. D. et al. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry**, v.39, n. 12, p. 2277-2282, 2004.

DAMIÃO, Aldinéia Oliveira. **Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

DA SILVA MARINHO, PATRÍCIA SUZANNE, RENATA RAIANNY DA SILVA, and JULIANA MOURA DE LUNA. "Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa." *Research, Society and Development* 11.12 (2022): e103111234123-e103111234123.

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

DEBON, Janaina. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbia. 2015. 165 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

DESAI, J D; BANAT, I M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology And Molecular Biology Reviews: MMBR*, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource technology**, v. 54, n. 2, p. 143-150, 1995.

DOS SANTOS, Yasmim Senden et al. Produção e caracterização de biossurfactantes por novas espécies de leveduras do gênero *starmerella*. 2022.

DURÁN, S.M., PORRAS-REYES, L., & SCHMIDT-DURÁN, A. (2020). Evaluation of agroindustrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168. *Revista Tecnología en Marcha*, 33(4), 15-25.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

DURVAL, *et al.* Application of a Biosurfactant Produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 from Waste Frying Oil as an Emulsifier in a Cookie Formulation. **Fermentation**, v. 7, p.1-14, 2021.

DRAKONTIS, C. E., & AMIN, S. (2020). Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Scien*

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>

FELIX, Juliana Rodrigues. Estudo da adsorção de tensoativos não-iônicos na interface líquido-gás e sua relação com a estabilidade de espumas líquidas /Juliana Rodrigues Felix. - Natal: UFRN, 2020.

FELSE, P. A. *et al.* Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 2, p. 316-323, 2007.

FENIBO E. O., DOUGLAS S. L. and STANLEY H. O. (2019). A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. *JAMB*. 18, 1-22. [doi:org/10.9734/jamb/2019/v18i330170](https://doi.org/10.9734/jamb/2019/v18i330170).

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

GAUTAM, K.K.; TYAGI, V.K. Microbial Surfactants: a review. *Journal Of Oleo Science*, v. 55, n. 4, p. 155-166, 2006.

GUERRA, Alaine B. *et al.* Metagenome enrichment approach used for selection of oildegrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 869–880, 2018

IBAMA. Manchas de Óleo: litoral brasileiro. Litoral Brasileiro. 2019. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/emergenciasambientais/2020/manchasdeoleo/ibama-manchasdeoleo-desmobilizacao-cartilha_v2.pdf. Acesso em: 07 nov. 2023.

JIMOH, A. A., & LIN, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184, 109607

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

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

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

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

KIM, B. H. *et al.* Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 7, p. 475-478, 1999.

KIM, S. Y. *et al.* Effect of soybean oil and glucose on shoforose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. **Applied Microbiology na biotechnology**, v. 48, n.1, p.23-26, 1997.

Kiran, G. S., Hema, T. A., Gandhimathi, R., Selvin, J., Thomas, T. A., Ravji, T. R., & Natarajaseenivasan, K. (2009). Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 250-256.

KITAMOTO, *et al.* Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)*. **Biotechnology letters**, v. 3, n. 20, p. 1709-1714, 2001.

KONISHI, M. *et al.* Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. **Journal of oleo Science**, v. 57, n. 6, p. 359-369, 2008.

LIMA, Cristian Jacques Bolner de. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas Aeruginosa* empregando óleo de soja residual. 2007. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

LIMA, *et al.* Production and characterization of biosurfactant isolated from *Candida glabrata* using renewable substrates. *African journal of microbiology research*, 11(6), 237-244, 2017.

LIU, *et al.* Valorization of Food Waste to Produce Value-Added Products Based on Its Bioactive Compounds. *Processes*, v.11, n.840, 2023.

LIRA, Isabela Regina Alvares da Silva. Produção e aplicação de biossurfactantes para uso em molhos para saladas. 2020. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2020.

LOURENÇO, Rafael André *et al.* Mysterious oil spill along Brazil's northeast and southeast seaboard (2019–2020): Trying to find answers and filling data gaps. *Marine Pollution Bulletin*, v. 156, p. 111219, 1 jul. 2020.

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

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

LUNA, *et al.* A New biosurfactante produced by *Candida Glabrata* UCP 1002: characteristic of stability and application in oil recovery. Brazilian archives of biology and technology, v. 52, n.4, p. 745-793, 2009

MAIA NETO, André Moreira. Resíduos agroindustriais aplicados à produção de biossurfactantes: uma revisão / André Moreira Maia Neto. – 2021.

MANO, Mario Cezar Rodrigues. Estudo da recuperação, concentração e purificação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. 100p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 2008.

MANHOGO, T. T.; CHIMPHANGO, A. F. A.; THORNLEY, P.; RÖDER, M. Current status and opportunities for fruit processing waste biorefineries. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.155, p.111823, 2022.

MATSUURA, Ani Beatriz Jackisch. Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. 98 f. Tese (Doutorado) -Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MARCELINO, *et al.* Sustainable production of biosurfactants and their applications. Lignocellulosic Biorefining Technologies, 159-183. <https://doi.org/10.1002/9781119568858.ch8>, 2020.

MELO, *et al.* Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. Revista Saúde & Ciência Online, 7(2), 413-425, 2018.

MNif, I., & Ghribi, D. (2016). Glycolipid biosurfactants: main properties and potential applications in agriculture and food industry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(13), 4310-4320.

NAGY, Géssika Marçal. Produção de biossurfactante de baixo custo a partir de resíduos agroindustriais. 2018. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.778>.

NAGTODE, *et al.* Green Surfactants (Biosurfactants): A Petroleum-Free Substitute for Sustainability—Comparison, Applications, Market, and Future Prospects. ACS Omega, v.8, n.13, p.11674–11699, 2023.

NASER, A. Z.; DEIAB, I.; DARRAS, B. M. Poly (lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. RSC Advances, v. 11, n. 28, p. 17151–17196, 2021.

NOGUEIRA FELIX, Anne Kamilly *et al.* Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

in the 118 remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 175, p. 256–263, 2019.

PARVAN, L.G.; LEITE, T.G.; FREITAS, T.B.; PEDROSA, P.A.A.; CALIXTO, J.S.; AGOSTINHO, L.A.; Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Ver. Pan. Amaz. Saude**, v. 11, p. 1-10, 2020.

PATOWARY, K., PATOWARY, R., KALITA, M. C., & DEKA, S. (2017). Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in microbiology*, 8, 279.

PATOWARY, Rupshikha et al. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 129, p. 50–60, 1 abr. 2018.

PELE, M. A., Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by *Rhizopus arrhizus* UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 40-48.

PERFUMO, A. et al. Biodiversity of Biosurfactants and roles in enhancing the (bio)availability of hydrophobic substrates. *Cellular Ecophysiology of Microbe*, p. 1–29, 2018.

REIS, et al. First report of the production of a potent biosurfactant with α , β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. *Brazilian journal of microbiology*, 49, 185-192, 2018.

ROBERT, et al. Effect of the carbon source of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871-874, 1989.

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

ROCHA e SILVA, et al. Natural surfactants and their applications for heavy oil removal in industry. *Separation & Purification Reviews*, 48(4), 267-281

ROY, A. A review on the biosurfactants: Properties, types and its applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, v. 8, p. 1-14, 2017.

ROY, Arpita. A Review on the Biosurfactants: properties, types and its applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy And Applications*, [S.L.], v. 08, n. 01, 2018.

Ribeaux, Daylin Rubio Produção, otimização, caracterização e atividade antifúngica do biossurfactante produzido por *Candida tropicalis* UCP 1613 / Daylin Rubio Ribeaux - 2020. 109 folhas: il., fig., tab.

Nascimento, P.P. Produção de biosurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

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

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

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*. [S.l: s.n.], 2012.

SANTA ANNA, *et al.* Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical engineering**, v. 19, n. 2, p. 159-166, 2002.

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

SANTOS, Danyelle Khadydja Felix dos. Produção de biosurfactante comercial por *Candida lipolytica* UCP 0998 cultivada em resíduos agroindustriais para aplicação na indústria de petróleo e metais pesados. 223 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio)) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

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

SANTOS, *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401, 2016.

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

SANTOS, *et al.* Enhanced oil removal by a non-toxic biosurfactant formulation. *Energies*, 14(2), 467, 2021.

SANTOS SFM *et al.* Avaliação da Produção de Biosurfactante a Partir de Diferentes Fontes de Carbono por *Candida Guilliermondii*. *Revista Saúde e Ciência online*, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p.

SARUBBO, *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, v.181, p.108377, 2022.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

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

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

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 0-0, 2006.

SENA, H. H., SANCHES, M. A., ROCHA, D. F. S., SEGUNDO Filho, W. O. P., de Souza, É. S., & de SOUZA, J. V. B. (2018). Production of biosurfactants by soil fungi isolated from the Amazon forest. *International journal of microbiology*, 2018.

SILVA, *et al.* Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. *Energies*, 13(18), 4664, 2020.

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

SILVA, *et al.* Glycerol as substrate for the production of biosurfactante by *Pseudomonas aeruginosa* UCP 0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183, 2010.

SINGH, R., GLICK, B. R., & RATHORE, D. (2018). Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere*, 28(2), 170-189.

SIVAKUMAR, D.; SRIKANTH, P.; RAMTEKE, P. W.; NOURI, J. Agricultural waste management generated by agro-based industries using biotechnology tools. *Global Journal of Environmental Science and Management*, v.8, n.2, p.281–296, 2022.

SUN, Shengli *et al.* A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology*, v. 281, p. 421–428, 2019.

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>

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

CAPÍTULO II

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Patente depositada (INPI): NUTRIENTE ALTERNATIVO PARA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR *Candida bombicola* EM TEMPO REDUZIDO

Número do Processo: BR 10 2023 026658 4



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 026658 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 10847721000195

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50050-900

País: Brasil

Telefone: 81 21194088

Fax:

Email: nit@unicap.br

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 3

Nome: POLLYANA PEREIRA DO NASCIMENTO

CPF: 08330516440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua José Ramos de Vasconcelos, 186, casa 04, Pau Amarelo

Cidade: Paulista

Estado: PE

CEP: 53423-825

País: BRASIL

Telefone: (91) 981 880643

Fax:

Email: pollyanapereiradonascimento@gmail.com

Inventor 2 de 3

Nome: LEONIE ASFORA SARUBBO

CPF: 73580163434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Arthur Muniz, n. 147, Apto. 2001, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51111-190

País: BRASIL

Telefone: (81) 334 20581

Fax:

Email: leonie.sarubbo@unicap.br

Inventor 3 de 3

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Nome: RAQUEL DINIZ RUFINO

CPF: 03793888479

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielca: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua 24 de Junho, 279, apt. 1402, Encruzilhada

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52030-100

País: BRASIL

Telefone: (81) 998 037338

Fax:

Email: raquel.rufino@unicap.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00-pagamento_GRU_patente01.pdf
Reivindicação	01-REIVINDICAC_O-ES-ok.pdf
Relatório Descritivo	02-RELATÓRIO DESCRITIVO-ok.pdf
Resumo	03- RESUMO-ok.pdf
Desenho	04- DESENHOS-ok.pdf

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

CAPÍTULO III

**ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA WORLD
JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**

Fator de impacto: 4.2

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

POTENCIAL DE APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE POR *CANDIDA BOMBICOLA* EM SOLOS CONTAMINADOS POR DERIVADO DE PETRÓLEO

Nascimento¹, P.P.; Sarubbo², L.A; Rufino², R.D.

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais-UNICAP

² Professor Escola ICAM-Tech. Universidade Católica de Pernambuco– UNICAP

Abstract

O potencial de aplicação do biossurfactante produzido pela *Candida bombicola* em solos contaminados por derivados de petróleo é um campo de estudo promissor e relevante. Os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos que possuem propriedades de redução de tensão superficial, emulsificação e solubilização de compostos lipofílicos, tornando-os agentes eficazes na remediação de solos contaminados. A *Candida bombicola* é uma levedura capaz de produzir biossurfactantes que demonstraram eficácia na remoção de contaminantes derivados de petróleo em diferentes condições ambientais. A utilização desses biossurfactantes em solos contaminados por derivados de petróleo pode representar uma abordagem sustentável e eficaz para a remediação desses ambientes, proporcionando benefícios ambientais e econômicos significativos. Neste contexto, os biossurfactantes emergem como uma alternativa promissora aos dispersantes químicos, apresentando diversas vantagens, tais como baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e aceitação ecológica substancial. Diante disso, o presente estudo foi conduzido com o propósito de investigar a produção de biossurfactantes por *Candida bombicola* e posterior aplicação em amostras de solos contaminados com óleo de motor. Testes de estabilidade da tensão superficial e da capacidade de emulsificação foram realizados, a tensão superficial se mostrou estável diante das condições expostas, quanto aos ensaios de emulsificação,

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

utilizando óleo de soja e óleo motor, o biossurfactante foi capaz de emulsionar até 95% com óleo motor e 60% com óleo de soja. Os testes de remoção do óleo de motor queimado foram feitos em colunas de vidro (ensaio estático) e no shaker (ensaio cinético), utilizando o biossurfactante na forma isolada e em diferentes concentrações (CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2x CMC). Foram utilizados diferentes tipos de solos, e os percentuais de remoção foram para o ensaio estático de até 65,32% para o solo arenoso, 59,04% para o solo siltoso e 57,42% para o solo argiloso e para o ensaio cinético nas concentrações (CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2x CMC) os resultados foram de até 98,60 para o solo arenoso, para o solo siltoso foi 93,22 e para o solo argiloso foi 92,55. Foi avaliado posteriormente o perfil de genotoxicidade do biossurfactante, utilizando raízes de cebola (*Allium cepa*), no qual não foi visualizado presença de necrose nas raízes e nem a presença de micronúcleos nas células da cebola, confirmando ser um biossurfactante atóxico. Contudo, é notório o potencial sustentável do biossurfactante por *C. bombicola*, que se estendem desde a produção até a aplicabilidade no processo de biorremediação.

Palavras-chave: *Candida bombicola*. Petróleo. Genotoxicidade. Acidentes ambientais.

Introdução

A crescente preocupação com a poluição ambiental e a necessidade de tecnologias sustentáveis para enfrentar esse desafio tornam imperativa a busca por alternativas inovadoras. Em contrapartida, o aumento do consumo na sociedade impõe uma ameaça à integridade de diversos ecossistemas. Nesse contexto, os biossurfactantes, compostos com propriedades tensoativas produzidos por microrganismos como leveduras, fungos e bactérias, emergem como protagonistas em diversas aplicações, desde a indústria alimentícia e cosmética até a biorremediação de áreas contaminadas por derivados de petróleo e remoção de metais do solo (Sarubbo *et al.*, 2022).

Apesar de compartilharem semelhanças com emulsificantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam vantagens cruciais, como menores concentrações micelares críticas, redução significativa da tensão superficial do meio, solubilização de compostos hidrofóbicos, atoxicidade e biodegradabilidade. Contudo, seu custo mais elevado, especialmente devido ao processo de produção, limita sua adoção no mercado global (Silva *et al.*, 2022).

Nesse contexto, diversas alternativas têm sido investigadas para viabilizar economicamente a produção de biossurfactantes, incluindo o uso de matérias-

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

primas acessíveis, como resíduos agroindustriais, o desenvolvimento de técnicas eficientes de extração e purificação, e a identificação de microrganismos de alto rendimento. A utilização de subprodutos agrícolas não apenas reduziria os custos de produção desses compostos valiosos, mas também permitiria o reaproveitamento sustentável desses resíduos (Durán *et al.*, 2020).

Este estudo teve como objetivo principal produzir um biossurfactante microbiano, isoladamente aplicado na remoção de óleo de motor em solos contaminados. Posteriormente, foram conduzidos testes de genotoxicidade utilizando raízes de cebola (*Allium cepa*). A proposta destaca a viabilidade de um biossurfactante sustentável e ecologicamente correto, capaz de realizar a remoção de contaminantes de maneira eficiente, sem comprometer as propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo.

Materiais e métodos

Microrganismo

A levedura avaliada como produtora de biossurfactante foi a *Candida bombicola* URM 3718, a qual foi depositada na Coleção de Culturas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo Yeast Mold Agar (YMA), um meio composto por extrato de levedura (0,3%), extrato de malte (0,3%), D-glicose (1%), triptona (0,5%), e ágar (2%), sendo armazenadas sob refrigeração a 5 °C.

Produção de Biossurfactante

O processo de produção da biomolécula está em sigilo de patente, cadastrado sob o código: BR 10 2023 026658 4.

Determinação da tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial e a Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante foram determinadas em tensiômetro automático (KSV Sigma 700, Finland) através do método do anel de Du Noüy. A grandeza foi medida através da imersão do anel

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

de platina no líquido metabólico, registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido.

Determinação da estabilidade do biossurfactante

Os efeitos de diferentes temperaturas (5, 70, 100 e 120°C), de diferentes concentrações de NaCl (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0%), de diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0) e 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 e óleo de soja como substrato hidrofóbico (Cooper e Goldenberg, 1987).

A influência do tempo na estabilidade do biossurfactante mantido a 5, 70, 100 e 120°C durante 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos também foi avaliada.

Isolamento do Biossurfactante

Ao final da fermentação, o biossurfactante foi extraído a partir do sobrenadante do meio fermentado após centrifugação 4700 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi adicionada uma solução de HCL 37% para ajustar o pH para 2,0, com o objetivo de atingir a hidrólise e precipitação do biossurfactante. As amostras foram armazenadas a uma temperatura de 4°C durante 24h. Os precipitados obtidos foram suspensos em acetato de etila (1:1), em funil de separação com capacidade de 1000 mL. O processo de suspensão em acetado de etila foi repetido e posteriormente as amostras foram submetidas a evaporação em chapa aquecedora por 1h a 100°C, tendo sua concentração determinada por gravimetria e expressa em g/L.

Caracterização do Biossurfactante

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

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

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

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

Solos

Amostras representativas de três tipos distintos de solo foram coletadas. As coletas foram realizadas conforme Rufino *et al.* (2013).

Caracterização físico-química dos solos

Para a caracterização física dos solos foram realizados os seguintes ensaios: Granulometria (ABNT, 1984a), Limites de Liquidez (ABNT, 1984b) e Plasticidade (ABNT, 1984c), Peso Específico dos Grãos (ABNT, 1984d) e Ensaio de Compactação (ABNT, 1986), obedecendo às recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

A caracterização química dos solos foi realizada no Laboratório de Química do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Católica de Pernambuco conforme a metodologia do Manual de Métodos de Análise de Solos da Embrapa (1997). Foram determinados os valores do pH, em H₂O e KCl 1M, as bases extratíveis Sódio (Na⁺), Potássio (K⁺), Cálcio (Ca²⁺) e Magnésio (Mg²⁺), a Acidez extratível Alumínio (Al³⁺) e Hidrogênio (H⁺), a Condutividade elétrica no extrato de saturação (CE), e superfície específica

Preparação dos solos

Os solos utilizados foram peneirados em peneira granulométrica de 0,25 mm de mesh, e com o objetivo de atingir uma umidade higroscópica de 9,5%, adicionou-se água de maneira uniforme. Para realização dos ensaios em coluna as amostras de solos foram pesadas e. Realizou-se a saturação das amostras com água, para saturar as amostras de forma a garantir a retirada de todo o ar existente nos poros dos solos. Inicialmente, percolou-se um volume de água correspondente a aproximadamente 2x o volume de vazios do solo, para estimular a saída do ar.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Fluidos percolantes e contaminante

O biossurfactante produzido foi usado nos testes de remoção. O biossurfactante foi utilizado na forma bruta (líquido metabólico livre de células) e isolado, em soluções na CMC (0,03%), $\frac{1}{2}$ CMC (0,015%) e em concentração duas vezes superior à CMC (0,06%). O Tween 80 (mono oleato de sorbitana polioxietileno 20), um surfactante comercial não iônico (CMC de 0,0013%), foi utilizado para fins comparativos, na concentração de 0,03% e a água destilada, como controle.

O óleo lubrificante de motor foi obtido em um estabelecimento de manutenção automotiva localizado na cidade do Recife.

Remoção do derivado de petróleo em solos pelo biossurfactante em ensaio estático

Colunas empacotadas de vidro (55 x 6 cm) foram inicialmente preenchidas com 200g de solo contaminado com 10% do contaminante hidrofóbico. Em seguida, à superfície foi inundada por 200 ml das soluções do biossurfactante isolado em diferentes concentrações correspondente a metade da CMC ($\frac{1}{2}$ CMC), à CMC e no dobro da CMC (2xCMC). As percolações foram monitoradas ao longo de 24 horas. As amostras de solo foram retiradas para a estimativa de óleo de motor por análise de gravimetria. O óleo de motor residual foi extraído num Becker previamente pesado com hexano em funil de decantação. A extração foi repetida duas vezes pra assegurar uma recuperação completa do óleo. Em seguida o hexano foi evaporado e óleo retirado da areia pesado (Rufino et al. 2013).

O percentual de remoção foi calculado usando a equação: óleo de motor removido (%) = $[(o \text{ inicial} - o \text{ remanescente}) / o \text{ inicial}] \times 100$, onde o inicial é o óleo na areia contaminada e o remanescente é o óleo que permanece na areia (g) após a lavagem (Rufino et al. 2013).

Remoção do derivado de petróleo em solos pelo biossurfactante em ensaio cinético

A remoção do óleo de motor queimado no solo contaminado foi testada através da saturação de 50g de solo com 10% do óleo de motor queimado. O solo previamente contaminado em laboratório foi colocado em frascos de Erlenmeyer de

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

250 ml de capacidade, adicionado de 50 ml de água destiladas ao frasco controle e 50 ml das soluções do biossurfactante nas concentrações (CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2xCMC). Os frascos foram agitados a 150 rpm, 28°C, durante 24 horas. Após esse período todo o conteúdo foi centrifugado a 4700 rpm durante 20 minutos. O óleo residual foi determinado por gravimetria (Luna, *et al.*, 2011).

Teste de genotoxicidade com cebola (*Allium cepa*)

A genotoxicidade do biossurfactante isolado foi avaliada utilizando-se cebola (*Allium cepa*) como indicador. Nos testes, os bulbos das cebolas são colocados em frascos contendo água destilada (controle) por um período de 72 horas, para que suas raízes sejam emitidas. Em seguida são colocadas em frascos contendo biossurfactante nas concentrações CMC, $\frac{1}{2}$ CMC e 2xCMC, por igual tempo. Em seguida, as raízes são seccionadas e fixadas em solução Carnoy, por 24h. Posteriormente preparou e observou as células da ponta das raízes em lâminas de microscopia. Na preparação das lâminas, as raízes são coradas com solução deorceína-acética (1%) e preparadas em uma lâmina de microscopia por esmagamento manual. A observação é feita em microscópio óptico (aumento de 400x ou 1000x). (Parvan, 2020).

Resultados

O processo de obtenção do biossurfactante a partir da levedura *Candida bombicola* URM 3718 está em processo de patente, cadastrado com o código: BR 10 2023 026658 4. As características do biossurfactante obtido foram avaliadas, tais como tensão superficial e Concentração Micelar Crítica (CMC). Os resultados obtidos demonstraram que o biossurfactante produzido exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial do meio de cultivo de 50 para 30 mN/m, com uma CMC de 0,03%.

Avaliação da Estabilidade do Biossurfactante

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos para os índices de emulsificação do biossurfactante bruto, frente a diferentes condições de pH (2,4,6,8,10), diferentes concentrações salinas (2%,4%,6%,8% e 10%), diferentes temperaturas (5°, 7°C, 100°C e

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

120°C) e diferentes tempos na temperatura de 90°C (10min, 20min, 30min, 40min, 50min, 60min e 120min) onde pode-se observar que o óleo com maior percentual de emulsificação foi o óleo de motor, com percentuais de emulsificação com 24 horas (IE24) de até 95%. O presente resultado demonstra o potencial de atuação do biossurfactante estudado como emulsificante.

A tensão superficial mostrou-se estável, independentemente das concentrações de sal (2%,4%,6%,8% e 10%, da variação de pHs (2,4,6,8,10), de temperatura (5°, 7°C, 100°C e 120°C) e de diferentes tempos na temperatura de 90°C (10min, 20min, 30min, 40min, 50min, 60min e 120min) com valores menores que 31 mN/m em todos os ensaios como mostra na Tabela 1.

Figura 1: Avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante por *C. bombicola*, frente a diferentes condições de pH, temperatura, tempos na temperatura de 90°C e em diferentes concentrações de salinidade.

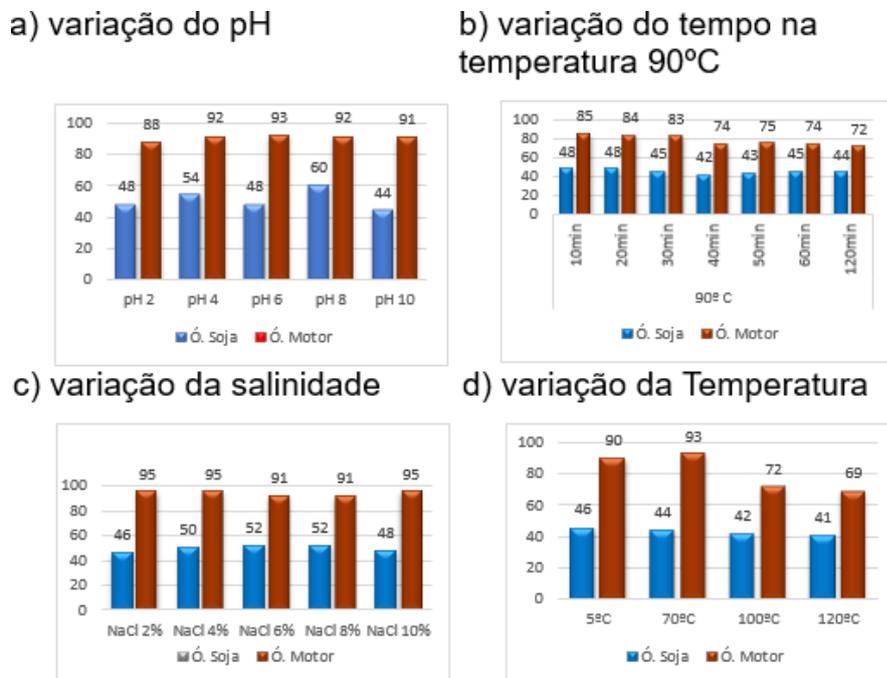


Tabela1: Teste de estabilidade da tensão superficial, frente a diferentes condições de pH, temperatura, tempos na temperatura de 90°C e em diferentes concentrações de salinidade, do biossurfactante bruto produzido pela *Candida bombicola*.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

(a)		(b)	
NaCl (%)	Tensão superficial (mN/m)	Temperatura (°C)	Tensão superficial (mN/m)
2	29,99 ± 0,20	5	29,78 ± 0,19
4	30,14 ± 0,31	70	30,07 ± 0,51
6	30,13 ± 0,15	100	30,04 ± 0,30
8	30,29 ± 0,10	120	30,11 ± 0,28
10	30,21 ± 0,25		

(c)		(d)	
pH	Tensão superficial (mN/m)	Tempo (min)	Tensão superficial (mN/m)
2	30,45 ± 0,10	10	30,49 ± 0,30
4	30,35 ± 0,32	20	30,89 ± 0,15
6	29,85 ± 0,18	30	30,61 ± 0,22
8	29,64 ± 0,26	40	30,91 ± 0,33
10	29,50 ± 0,35	50	30,88 ± 0,44
		60	30,34 ± 0,52
		120	30,50 ± 0,14

Caracterização física dos solos

Os resultados dos ensaios de granulometria e de compactação realizados com energia do Proctor Normal para os três solos estão apresentados na tabela 2. O solo arenoso foi classificado como uma areia siltosa mal graduada (SM-SP) e não apresentou limite de liquidez e de plasticidade. Os solos siltoso (ML) e argiloso (CL), apresentaram baixa compressibilidade. De acordo com os valores de LP e LL foram classificados como mediamente plásticos – IP entre 7 e 15 (Caputo, 1988). Segundo Oliveira *et al.* (2004) para solos do grupo CL são esperadas características de baixa permeabilidade e com características ruins de drenagem.

Tabela 2 - Granulometria, consistência e classificação unificada dos solos

Parâmetros	Solos		
	Arenoso	Siltoso	Argiloso
Gramulometria (%)			
Areia	88	43	50
Silte	3	18	2
Argila	9	39	48
% LP < 2µm	8	23	47
Consistência			
Limite de liquidez (LL) (%)	NL	38	40

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Índice de plasticidade (IP) (%)	NL	11	13
la ^a	-	0,48	0,28
Compactação			
Umidade ótima (%)	8,70	14,70	19,00
μ_{dmax}^b (kN/m ³)	18,20	18,40	17,00
Classificação Unificada	SP-SM	ML	CL

^ala = IP/< 2 μ m - Atividade, ^b μ_{dmax} : peso específico aparente seco máximo

Caracterização química dos solos

A caracterização química dos solos está apresentada na tabela 3. O pH de um solo não constitui um valor constante e característico como em soluções aquosas, já que solos são sistemas dinâmicos. Os solos naturais estudados apresentaram pH ácido, sendo o solo siltoso o de maior acidez. A capacidade de troca catiônica (CTC) é obtida, segundo metodologia da Embrapa Solos (1997), pela soma das bases Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ e Na⁺, que representa o valor S, mais o H⁺, mais o valor de Al³⁺ extraível. A Capacidade de Troca Catiônica também foi considerada baixa (valor T = CTC < 27cmolc/kg) nos três solos, indicando a predominância do mineral argílico caulinita. Os valores da Superfície Específica encontrados também confirmaram a presença caulinita. A saturação por base média expressa em porcentagem (valor V) foi superior a 50 % para o solo argiloso, indicando tratar-se de um solo Eutrófico, fértil para a agricultura. Já o solo arenoso e o siltoso apresentaram características distróficas. A condutividade elétrica é uma determinação utilizada na classificação de solos salinos em zonas semiáridas, áreas costeiras e nas interpretações de uso e manejo dos solos para determinação da quantidade de sais presentes. A condutividade elétrica do extrato de saturação foi alta para o solo argiloso. Já o valor da matéria orgânica obtida a partir do carbono orgânico foi baixo nos três solos.

Tabela 3 - Caracterização química dos solos naturais

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

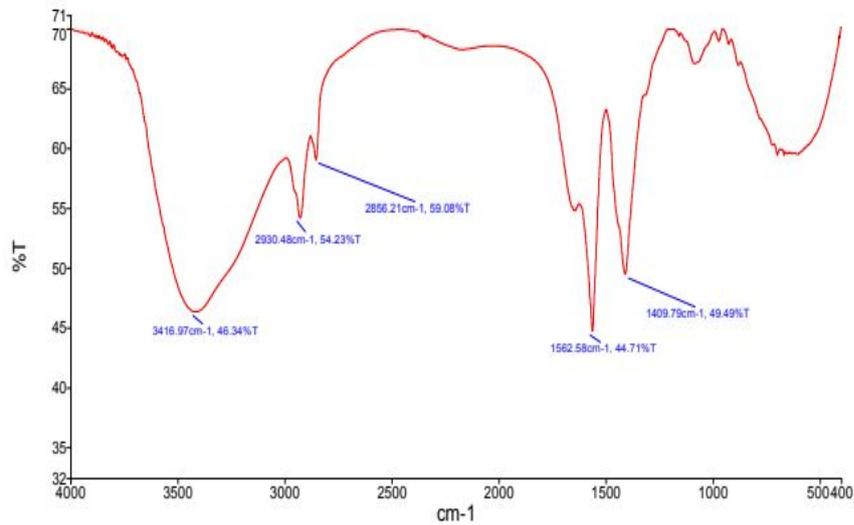
Determinações	Arenoso	Siltoso	Argiloso
pH em água	6,08	5,2	6,23
Carbono Orgânico (g/Kg)	1,07	0,00	1,11
Matéria Orgânica (g/Kg)	1,85	0,00	1,91
Hidrogênio extraível (H ⁺) (cmolc/kg)	7,70	5,85	7,65
Alumínio Extraível (Al ⁺⁺⁺) (cmolc/kg)	0,40	0,35	0,10
Valor de S (soma de cátions) (cmolc/kg)	4,93	5,80	13,10
Valor de T (Cap. Troca Cátions) (cmolc/kg)	13,03	12,00	20,85
Valor de V (% Sat. de Base)	37,83	48,33	62,82
% Fe ₂ O ₃ no Ext. sulfúrico (g/Kg)	0,50	4,63	5,75
% SiO ₂ na terra fina (g/Kg)	71,20	73,0	69,5
% Al ₂ O ₃ no Ext. Sulfurico (g/Kg)	1,50	13,0	17,1
% água no extrato saturação	39,5	44,2	49,4
Cond. Elétrica no ext. sat. (μS/cm a 25°C)	10	12	460
Superfície específica (m ² /g)	18,4	14,7	14,7

Caracterização estrutural do biossurfactante

A Figura 2 mostra os espectros de FT-IR obtidos pelo biossurfactante isolado de *C. bombicola*. O pico de absorção em 3416cm⁻¹ é característico de estiramento (O-H), podendo ser indício da presença de H₂O. Os picos em 2930cm⁻¹ e 2856cm⁻¹ são devido ao estiramento assimétrico entre C-H do grupo CH₃, CH₂ e estiramento simétrico do grupo CH₂. O pico em 1562cm⁻¹ indicam a presença do grupo carbonila (C=O) dos ésteres e ácidos carboxílicos. O pico em 1409 revela a presença do estiramento C-H. Diante das informações traduzidas pela FT-IR, pode-se prever se tratar de uma estrutura, predominantemente, de ácidos graxos.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Figura 2. Espectro FTIR do biossurfactante isolado produzido por *Candida bombicola*, utilizando meio mineral suplementado com 6,0% de resíduos da refinaria de óleos de soja e 1,0% de ácido glutâmico.



O espectro de RMN de ^1H obtido, como mostra na Figura 3 revelou a presença de hidrogênios ligados à cadeia carbônica do biossurfactante na região entre 0 - 1,5 ppm, esse sinal é responsável pela região apolar da estrutura molecular. Os picos encontrados na região entre 2 – 3 ppm são provenientes dos hidrogênios ligados aos carbonos próximos de regiões mais eletronegativas. Os picos presentes entre a região de 3 – 5 ppm, indica a presença da função álcool, responsável pela fração polar do biossurfactante. O sinal presente entre 5 – 6 ppm sugere a presença de hidrogênios ligado aos carbonos da dupla ligação. O sinal presente na região entre 7 – 8 ppm se deve ao hidrogênio presente clorofórmio utilizado como solvente para a realização dessa análise.

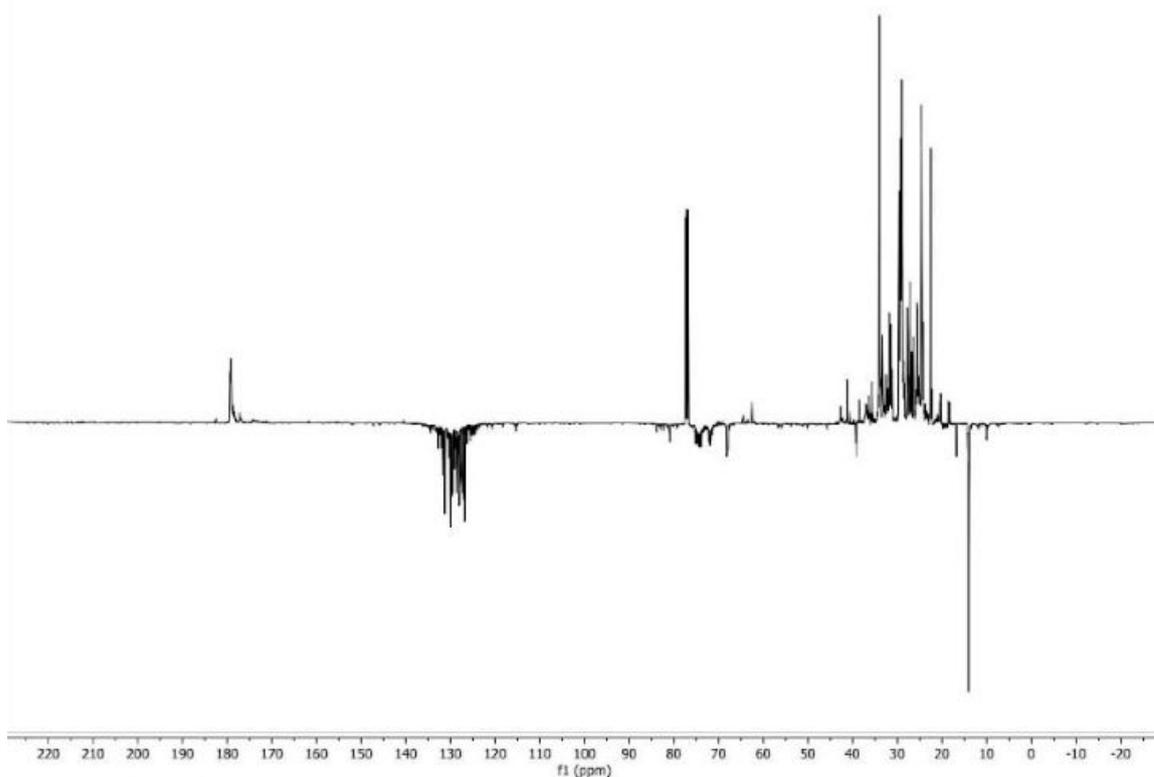
Figura 3: Espectro do ^1H NMR do biossurfactante isolado de *Candida bombicola* em meio mineral suplementado com 6% de resíduo da refinaria de óleo de soja e 1% de de ácido glutâmico.



Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

O espectro de RMN de ^{13}C , como mostra na Figura 4, apresentou na região entre 0 – 40 ppm os sinais responsáveis pelas ligações carbono-carbono da cadeia alifática. Os picos encontrados entre 50 – 75 ppm são responsáveis por possíveis carbonos ligados aos oxigênios. Os sinais encontrados entre 120 – 150 ppm são derivados das duplas ligações presentes na estrutura molecular. O pico encontrado próximo a região de 180 ppm, advém da função de ácido carboxílico, presente nas moléculas do biossurfactante obtido.

Figura 4: Espectro do ^{13}C NMR do biossurfactante isolado de *Candida bombicola* em meio mineral suplementado com 6% de resíduo da refinaria de óleo soja e 1% de de ácido glutâmico.



Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Remoção de óleo motor em colunas de vidro por meio de ensaio estático

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos a partir dos experimentos de descontaminação de óleo de motor adsorvido em solos contidos em colunas de vidro. O biossurfactante isolado, produzido pela cepa *C. bombicola*, foi capaz de remover o óleo de motor nas referidas colunas, utilizando o biossurfactante isolado em diferentes concentrações, CMC, 1/2CMC e 2xCMC.

Tabela 4 – Remoção do óleo de motor por biossurfactante produzido pela *Candida bombicola* adsorvido em diferentes tipos de solos em Erlenmeyer (ensaio estático)

Solos	Remoção de óleo motor por percolação de líquidos %			
	Água destilada	Biossurfactante na CMC	Biossurfactante na 1/2 CMC	Biossurfactante em 2x CMC
Arenoso	9,2 ± 0,6	61,83 ± 1,0	62,44 ± 0,5	65,32 ± 0,5
Siltoso	8,6 ± 0,2	57,22 ± 0,4	54,50 ± 0,7	59,04 ± 0,5
Argiloso	6,0 ± 0,5	54,64 ± 0,6	52,15 ± 0,3	57,42 ± 1,0

Remoção do derivado de petróleo em solos pelo biossurfactante em ensaio cinético

A Tabela 5 apresenta os resultados dos experimentos realizados em Erlenmeyer para a remoção de óleo de motor adsorvido a diferentes tipos de solos. Altas taxas de remoção de óleo foram alcançadas com as soluções contendo biossurfactante na CMC (0,03%) e duas vezes o CMC (0,06%) e na 1/2 CMC (0,015%). Tamanho de partículas do solo e concentração de biossurfactante não exerceu influência na taxa de remoção de óleo.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

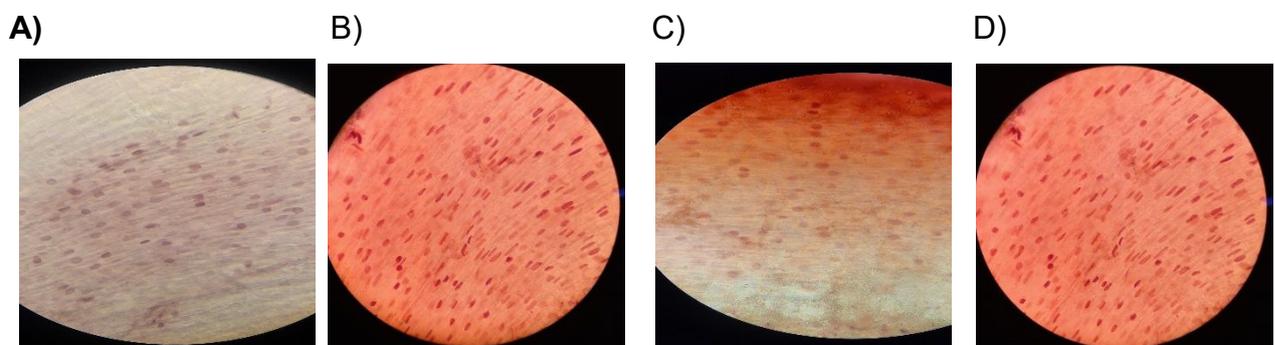
Tabela 5 – Remoção do óleo de motor por biossurfactante produzido pela *Candida bombicola* adsorvido em diferentes tipos de solos em Erlenmeyer (ensaio cinético)

Solos	Remoção de óleo motor por percolação de líquidos %			
	Água destilada	Biossurfactante na CMC	Biossurfactante na 1/2 CMC	Biossurfactante em 2x CMC
Arenoso	41,23 ± 0,7	85,62 ± 0,6	78,75 ± 0,2	95,60 ± 1,0
Siltoso	40,33 ± 1,0	82,46 ± 0,5	75,66 ± 0,6	93,22 ± 0,6
Argiloso	40,00 ± 0,4	81,69 ± 0,5	72,52 ± 0,5	92,55 ± 0,6

Avaliação da genotoxicidade do biossurfactante

Os resultados obtidos na Figura 5(A) onde foi utilizado água destilada (controle), figura 5(B) biossurfactante isolado na CMC (0,03%), na figura 5(C) o biossurfactante isolado na 1/2 CMC (0,015%) e na figura 5(D) foi utilizado o biossurfactante isolado em duas vezes a CMC (0,06%), mostram que nos bioensaios com cebolas (*Allium cepa*) pode se observar que o biossurfactante por *C. bombicola* apresentou ausência de micronúcleos nas células, não apresentando efeito citotoxicidade para a linhagem celular avaliada, confirmando a sua biocompatibilidade para diversos seguimentos industriais.

Figura 3. Avaliação da genotoxicidade do biossurfactante por *Candida bombicola*, utilizando raízes da cebola (*Allium cepa*). (A) água destilada (controle); (B) o biossurfactante isolado na CMC (0,03%); (C) biossurfactante isolado na 1/2 CMC (0,015%); (D) biossurfactante isolado em 2x CMC (0,06%).



Discussões

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Avaliação da capacidade emulsificante e de estabilidade do biossurfactante

Um biossurfactante precisa manter suas características tensioativas sob quaisquer condições ambientais. Caso contrário, ele será descartado pela indústria. Assim, o estudo da estabilidade é necessário para a determinação da aplicabilidade de um biossurfactante na melhora da recuperação microbiana de óleo (Durval, 2021). Alguns gêneros de leveduras destacam-se na produção de bioemulsificantes, como *Candida*, *Yarrowia*, *Galactomyces*, *Trichosporon* e *Geotrichum* (Monteiro *et al.*, 2010). Um tipo de bioemulsificante é o yansan, um complexo lipídio-carboidrato-proteína sintetizado pela levedura *Y. lipolytica* (IMUFRJ 50682) na presença de glicose. Esse emulsificante foi capaz de formar emulsões de água em óleo, no meio com hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e com perfluorocarbonos, indicando seu uso potencial nos processos de biorremediação (Amaral; Belo; Coelho, 2010). Outro emulsificante conhecido é o liposan, um composto extracelular solúvel em água sintetizado pela levedura *Candida lipolytica* (*Yarrowia lipolytica*), sendo constituído de 83% de carboidratos e 17% de proteínas (Santos *et al.*, 2016).

Determinação das características surfactantes da biomolécula

Comparando os resultados obtidos com a literatura as Leveduras são amplamente utilizadas como produtoras de biossurfactantes, sobretudo as do gênero *Candida*. Rufino *et al.* (2007) obteve redução da tensão superficial para 32 mN/m utilizando *C. lipolytica*; já *C. glabrata* foi utilizada em pesquisa por Sarubbo *et al.* (2006) onde obteve-se tensão superficial de 31 mN/m.

Santos *et al.* (2021) obtiveram tensão superficial de 25 mN/m com biossurfactante produzido por *C. sphaerica* em meio formulado com 9% de resíduo de refinaria de óleo vegetal e 9% de milhocina. Em estudos recentes, Lira *et al.* (2020) obteve uma redução da tensão superficial de biossurfactante produzido por *C. guilliermondii* de 28,6 mN/m em meio formulado com 5% de melaço, 5% de milhocina e 5% de óleo de fritura residual.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

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 (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 valores de CMC 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).

Caracterização estrutural do biossurfactante

Comparando-se os resultados obtidos com os espectros relatados na literatura, (Ribeiro, 2018) apresentaram espectro semelhante ao obtido com o produto de *C. bombicola*, utilizando-se *Candida utilis* cultivada em meio mineral contendo 6% de óleo de canola residual de fritura e 6% de glicose e *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em seis diferentes meios, tendo melhores resultados sendo cultivada no meio composto por 1% de óleo de fritura de soja e 1% de milhocina. O biossurfactante produzido por *Candida utilis* é um tipo de ácido carboxílico metabolizado e o biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* é caracterizado como um glicolipídeo, apresentando em sua estrutura ligações éster entre ácido graxos e carboidratos, confirmadas na análise físico-química.

Os espectros obtidos pelo biossurfactante por *Candida sphaerica* (Santos, 2019), apresentaram espectro semelhante ao obtido com o produto de *C. bombicola*.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Foi caracterizado com natureza glicolípídica, devido principalmente à grupo carboxílico encontrados, provavelmente relacionados à ácidos graxos metabolizados.

Resultados semelhantes aos espectros obtidos pelo biossurfactante por *Candida bombicola* foram publicados por Santos et al. (2017), em que obteve uma biomolécula surfactante com estrutura de ácido carboxílico a partir da levedura *Candida lipolytica*.

Caracterização físico-química do solo

Com base nos resultados da análise química do solo, foram calculados, de acordo com o novo sistema de classificação de solos da Embrapa (1997), a Soma das Bases (S), a Capacidade de Troca Catiônica (CTC ou T), o Grau de Saturação por Bases (V) a Saturação por Alumínio (m) e a Saturação por Sódio e óxidos (Rufino et al., 2013).

Remoção de óleo motor em solos utilizando colunas de vidro no ensaio estático

Os resultados obtidos demonstraram eficiência do biossurfactante isolado *C. bombicola* na remoção do óleo de motor. Comparando-se os resultados obtidos pelo biossurfactante por *C. bombicola* com a literatura (Batista et al., 2010) verificou-se que o biossurfactante bruto por *C. tropicalis* cultivado em óleo de fritura removeu 78 a 97% do petróleo e do óleo motor adsorvido em amostras de areia, enquanto o biossurfactante produzido a partir da *C. guilhiermondii* cultivada em resíduo industriais, removeu cerca de 90% do óleo motor adsorvido em amostras de areia.

Estudos realizados por (Rufino et al., 2013) utilizando biossurfactante isolado de *C. lipolytica*, em colunas empacotas, demonstraram a eficiência da concentração utilizada. Uma vez que as taxas de remoção apresentaram para água destilada 7%, tween 80 12%, biossurfactante na CMC 33% e em 3 vezes a CMC 37%.

Remoção de óleo motor em diferentes tipos de solos no ensaio cinético

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

O biossurfactante Rufisan de *Candida lipolytica* no CMC removeu 98% do óleo dos béqueres nos ensaios cinéticos e a concentração do biossurfactante não exerceu influência na taxa de remoção de óleo (Rufino *et al*, 2013). Por outro lado, o biossurfactante de *Candida sphaerica* a 0,1% removeu 65% do óleo de motor adsorvido ao solo, enquanto a solução surfactante no CMC (0,08%) removeu 55% do óleo e a solução a 0,05% removeu aproximadamente 30%, mostrando a influência da concentração do biossurfactante sobre as taxas de remoção (Luna *et al*, 2013).

A remoção de óleo nos solos está vinculada a dois mecanismos distintos: mobilização e solubilização. A mobilização se verifica em concentrações inferiores a CMC, englobando fenômenos como a redução da tensão superficial e interfacial. Já a solubilização se desencadeia acima do CMC, momento em que a solubilidade aparente do óleo apresenta um aumento significativo devido à sua agregação dentro das micelas dos surfactantes (Costa *et al*, 2010).

Os dados observados neste trabalho sugerem que a solubilização é o principal mecanismo associado à remoção de óleo de motor com o biossurfactante por *Candida bombicola*, pois o aumento na concentração do biossurfactante melhorou a remoção de óleo.

Genotoxicidade do biossurfactante

Diversos métodos de avaliação de genotoxicidade têm a capacidade de identificar aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e micronúcleos. No entanto, o ensaio cometa, um teste adicional complementar, é empregado para investigar danos no DNA de maneira mais específica. O bioensaio utilizando *Allium* cepa utiliza o surgimento de anormalidades cromossômicas como um de seus bioindicadores para analisar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de um composto químico nas raízes de cebolas. Destaca-se o uso de diferentes sistemas vegetais em ensaios para determinar possíveis danos causados por compostos químicos, sendo as espécies do gênero *Allium* as mais empregadas para estudar os mecanismos fundamentais e avaliar os efeitos de determinados agentes químicos. Embora existam diferenças no metabolismo entre plantas e animais, a ativação pró-mutagênica em plantas é relevante, pois os seres humanos

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

estão constantemente expostos a esses riscos ao consumir vegetais tratados com agentes químicos. No gênero *Allium*, a espécie *A. cepa* é considerada como organismo modelo e padrão ouro na avaliação de efeitos clastogênicos e aneugênicos sobre o material genético (Parvan, 2020).

As leveduras conseguem sintetizar biossurfactantes e algumas não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, podendo utilizar seus metabólitos em formulações alimentícias. Elas possuem grande potencial para utilização, visto que industrialmente são extremamente empregadas. Além disso, uma grande vantagem do uso de algumas leveduras consiste no fato de serem incluídas no status GRAS (em inglês, Generally Regarded As Safe – geralmente reconhecido como seguro), pois não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, permitindo, por exemplo, sua utilização na indústria de alimentos. Algumas leveduras incluídas neste status são: *Candida lipolytica*, *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* (Souza et al., 2017).

Conclusão

O biossurfactante gerado pela *Candida bombicola*, empregando resíduos provenientes da refinaria de óleos de soja como substrato, demonstrou notável eficácia na degradação de óleo em distintos tipos de solos. Essa capacidade promissora revela seu potencial como agente viável para mitigar a poluição ambiental associada aos compostos oleosos derivados do petróleo. A utilização desse biossurfactante pode contribuir significativamente para a redução dos impactos ambientais sobre os ecossistemas, representando uma abordagem sustentável e eficaz no controle da contaminação por hidrocarbonetos, além de fornecer uma alternativa promissora para a gestão ambiental. Portanto, este estudo ressalta a relevância do biossurfactante produzido por *Candida bombicola* como uma solução potencial na busca por estratégias ecologicamente responsáveis para combater a poluição causada por hidrocarbonetos em ambientes terrestres.

Reconhecimento

Os autores agradecem o apoio da Universidade Católica de Pernambuco, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Finanças 001

Referências

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1984a. NBR 7181: Solos: Análise granulométrica conjunta. Rio de Janeiro, Brasil. ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1984b. NBR 6459: Solos: determinação do limite de liquidez. Rio de Janeiro, Brasil.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1984c. NBR 7180: Solos: determinação do limite de plasticidade. Rio de Janeiro, Brasil.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1984d. NBR 6508: Massa Específica dos grãos dos solos. Rio de Janeiro, Brasil.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas (1986). NBR 7182: Solo-Ensaio de Compactação. Rio de Janeiro, Brasil.

AMARAL, *et al.* Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 672, p. 236-249, 2010.

BATISTA, *et al.* Effect of Medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* Applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil, water *Environ. Res* 82(2010) 418-425. Doi:10.2175/106143009x12487095237279.

CAMPOS, *et al.* Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108, 2013.

COSTA, *et al.* Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. ***Process Biochemistry***, 45: 1511-1516, 2010.

DURÁN, S.M., PORRAS-REYES, L., & SCHMIDT-DURÁN, A. (2020). Evaluation of agroindustrial residues produced in Costa Rica for a low-cost culture medium using *Bacillus subtilis* 168. *Revista Tecnología en Marcha*, 33(4), 15-25.

DURVAL, *et al.* Application of a Biosurfactant Produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 from Waste Frying Oil as an Emulsifier in a Cookie Formulation. ***Fermentation***, v. 7, p.1-14, 2021.

LUNA, *et al.* Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2463–2476, 2011.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

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

MONTEIRO, *et al.* Identification and characterization of bioemulsifier producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5186–5193, 2010

PARVAN, *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, [S.L.], v. 11, n. [], p. 1-10, set. 2020. Instituto Evandro Chagas. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000544>.

RUFINO, *et al.* Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 109, p. 117-122, 2013.

SANTOS, *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SANTOS, *et al.* Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. *Process Biochemistry*, v. 8, 2017, p. 1-11

SANTOS, EMÍLIA MENDES DA SILVA. Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo/EMÍLIA MENDES DA SILVA SANTOS, 2019. 106.:il.

SARUBBO, *et al.* Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, v.181, p.108377, 2022.

SARUBBO, L. A. (2013). Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 105, 43-50.

SOUZA, *et al.* New glycolipid biosurfactants produced by the yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 154, 2017, p. 373–382.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Lista de Figuras

- Figura 1 Avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante por *C. bombicola*, frente a diferentes condições de pH, temperatura, tempos na temperatura de 90°C e em diferentes concentrações de salinidade.....55
- Figura 2 Espectro FTIR do biossurfactante isolado produzido por *Candida bombicola*, utilizando meio mineral suplementado com 6,0% de resíduos da refinaria de óleos de soja e 1,0% de ácido glutâmico.....58
- Figura 3 Espectro do 1H NMR do biossurfactante isolado de *Candida bombicola* em meio mineral suplementado com 6% de resíduo da refinaria de óleo de soja e 1% de de ácido glutâmico.58
- Figura 4 Espectro do 13C NMR do biossurfactante isolado de *Candida bombicola* em meio mineral suplementado com 6% de resíduo da refinaria de óleo de soja e 1% de de ácido glutâmico.....60

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Figura 5 Avaliação da genotoxicidade do biossurfactante por *Candida bombicola*, utilizando raízes da cebola (*Allium cepa*). (A) água destilada (controle); (B) o biossurfactante isolado na CMC (0,03%); (C) biossurfactante isolado na $\frac{1}{2}$ CMC (0,015%); (D) biossurfactante isolado em 2x CMC (0,06%).....62

Lista de Tabelas

Tabela 1 Teste de estabilidade da tensão superficial, frente a diferentes condições de pH, temperatura, tempos na temperatura de 90°C e em diferentes concentrações de salinidade, do biossurfactante bruto produzido pela <i>Candida bombicola</i>	65
Tabela 2 Granulometria, consistência e classificação unificada dos solos.....	66
Tabela 3 Caracterização química dos solos naturais.....	67
Tabela 4 Remoção do óleo de motor por biossurfactante produzido pela <i>Candida bombicola</i> adsorvido em diferentes tipos de solos em Erlenmeyer (ensaio estático).....	69
Tabela 5 Remoção do óleo de motor por biossurfactante produzido pela <i>Candida bombicola</i> adsorvido em diferentes tipos de solos em Erlenmeyer (ensaio cinético).....	70

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação realizada neste estudo permite tirar as seguintes conclusões:

- O resíduo da refinaria de óleos de soja pode ser utilizados como matéria-prima na produção de produtos biotecnológicos de alto valor agregado.
- A levedura *C. bombicola* demonstra potencial como produtora de um agente surfactante altamente eficaz tanto em termos de atividade tensoativa quanto emulsificante.
- O biossurfactante demonstrou estabilidade frente a condições extremas de temperatura, pH na presença de NaCl
- O biossurfactante demonstrou capacidade emulsificante frente a condições extremas de temperatura, pH na presença de NaCl
- O biossurfactante por *Candida bombicola* brutos e isolados removeram efetivamente compostos hidrofóbicos no solo sob condições dinâmicas e estáticas, mostrando potencial para aplicações industriais.
- O biossurfactante não é tóxico para raízes da cebola (*Allium cepa*).
- O biossurfactante é bastante promissor para remediação de áreas contaminadas por derivados de petróleo.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

ANEXOS

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Resumo publicado no 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia

30/11/2023, 17:33

Congresso Brasileiro de Microbiologia 2023

[Imprimir Resumo](#)

Congresso Brasileiro de Microbiologia 2023

Resumo: 663-1

663-1 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR CANDIDA BOMBICOLA URM 3718

Autores:

Pollyana Pereira do Nascimento (UNICAP - UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO); Hozana de Souza Ferreira (UNICAP - UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO); Irialo José Batista Darval (UNICAP - UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO); Leonie Asfora Sarubbo (UNICAP - UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO); Raquel Diniz Rufino (UNICAP - UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO)

Resumo:

A contaminação do solo por derivados de petróleo é muito comum, principalmente em decorrência de vazamentos, derramamentos e acidentes durante a exploração, refino, transporte, armazenamento e distribuição, e representa um perigo tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana devido à sua alta toxicidade. Diante dessa realidade, estudiosos tem ido em busca de técnicas que reduzam os impactos causados por esses compostos. Uma das tecnologias que vem sendo amplamente utilizadas são os processos de biorremediação. Nesses processos micro-organismos, ou seus produtos, podem atuar na eliminação e/ou redução de compostos tóxicos presentes no meio ambiente. Os tensioativos biológicos são compostos sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos que possuem propriedades similares aos tensioativos químicos. Por serem moléculas anfífilas, ou seja, possuem uma parte polar e outra apolar em sua cadeia e, portanto, possuem a propriedade de reduzir a tensão superficial e formar emulsões. Além da vantagem de ser mais estável em ampla faixa de pH e temperatura, apresenta menor toxicidade, maior especificidade e biodegradabilidade em relação aos tensioativos químicos. Considerando o potencial das leveduras do gênero *Candida* em produzir surfactantes atóxicos e biodegradáveis, o presente estudo buscou avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido por *Candida bombicola* URM 3718. Estudos para avaliar o perfil de estabilidade do biossurfactante bruto, foram realizados para diferentes valores de pH, salinidade, temperaturas e tempo de exposição à temperatura elevada, através da determinação da atividade de emulsificação e da tensão superficial. Para determinar a capacidade emulsificante e a estabilidade da molécula, foram utilizados o óleo de soja e o óleo de motor queimado. Os resultados mostraram que o biossurfactante foi estável à temperaturas de 5°C, 70°C, 100°C e 120°C; valores de pH de 2, 4, 6, 8 e 10; temperaturas de 90°C em diferentes tempos: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100 e 120min; e concentrações salinas de: 2, 4, 6, 8 e 10%. Em relação ao índice de emulsificação com 24 horas (IE24), foram constatadas emulsões de 80 a 95% para óleo de motor queimado e de 41 a 60% para óleo de soja. Testes de remoção do óleo de motor queimado em colunas empacotadas através de ensaio estático, mostraram que o líquido metabólico livre de células removeu 56,36% do óleo motor queimado contido no solo arenoso; 37,75% no solo silteoso e 32,12% no solo argiloso. Todos os resultados obtidos demonstraram a importância do biossurfactante para potenciais aplicações futuras em processos de remediação de solos contaminados por derivados de petróleo.

Palavras-chave:

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Nascimento, P.P. Produção de biosurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Normas da Revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

Instruções para Autores

Submissão de manuscrito

Submissão de manuscrito

Folha de rosto

Certifique-se de que sua página de título contenha as seguintes informações.

Título

O título deve ser conciso e informativo.

Informação sobre o autor

- O(s) nome(s) do(s) autor(es)
- A(s) afiliação(ões) do(s) autor(es), ou seja, instituição, (departamento), cidade, (estado), país
- Uma indicação clara e um endereço de e-mail ativo do autor correspondente
- Se disponível, o ORCID de 16 dígitos do(s) autor(es)

Se as informações de endereço forem fornecidas com a(s) afiliação(ões), elas também serão publicadas.

Para autores que não sejam (temporariamente) afiliados, capturaremos apenas a cidade e o país de residência, e não o endereço de e-mail, a menos que seja especificamente solicitado.

Modelos de linguagem grande (LLMs), como ChatGPT, atualmente não atendem aos nossos critérios de autoria. Notavelmente, uma atribuição de autoria acarreta responsabilidade pelo trabalho, que não pode ser efetivamente aplicada aos LLMs. O uso de um LLM deve ser devidamente documentado na seção Métodos (e se uma seção Métodos não estiver disponível, em uma parte alternativa adequada) do manuscrito.

Abstrato

Forneça um resumo de 150 a 250 palavras. O resumo não deve conter abreviaturas indefinidas ou referências não especificadas.

Apenas para revistas de ciências biológicas (quando aplicável)

- Número de registro do ensaio e data de registro para ensaios registrados prospectivamente
- Número de registro do ensaio e data de registro, seguido de "registrado retrospectivamente", para ensaios registrados retrospectivamente

Palavras-chave

Forneça de 4 a 6 palavras-chave que possam ser usadas para fins de indexação.

- Use o editor de equações ou MathType para equações.
- Salve seu arquivo em formato docx (Word 2007 ou superior) ou formato doc (versões mais antigas do Word).

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Manuscritos com conteúdo matemático também podem ser submetidos em LaTeX. Recomendamos usar [o modelo LaTeX da Springer Nature](#).

Títulos

Utilize no máximo três níveis de títulos exibidos.

Abreviações

As abreviaturas devem ser definidas na primeira menção e usadas de forma consistente a partir de então.

Notas de rodapé

As notas de rodapé podem ser utilizadas para fornecer informações adicionais, que podem incluir a citação de uma referência incluída na lista de referências. Não devem consistir apenas em uma citação de referência e nunca devem incluir os detalhes bibliográficos de uma referência. Também não devem conter figuras ou tabelas.

As notas de rodapé do texto são numeradas consecutivamente; aqueles nas tabelas devem ser indicados por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos). As notas de rodapé do título ou dos autores do artigo não recebem símbolos de referência.

Sempre use notas de rodapé em vez de notas finais.

Agradecimentos

Agradecimentos a pessoas, subsídios, fundos, etc. devem ser colocados em uma seção separada na página de título. Os nomes das organizações financiadoras devem ser escritos por extenso.

Referências

Citação

Citar as referências no texto por nome e ano entre parênteses. Alguns exemplos:

- A pesquisa em negociação abrange muitas disciplinas (Thompson 1990).
- Este resultado foi posteriormente desmentido por Becker e Seligman (1996).
- Este efeito foi amplamente estudado (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso e Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

Lista de referência

A lista de referências deverá incluir apenas trabalhos citados no texto e que tenham sido publicados ou aceitos para publicação. Comunicações pessoais e trabalhos inéditos deverão ser mencionados apenas no texto.

As entradas da lista de referências devem ser organizadas em ordem alfabética pelos sobrenomes do primeiro autor de cada trabalho. Por favor, coloque-os em ordem alfabética de acordo com as seguintes regras: 1) Para um autor, por nome do autor e depois cronologicamente; 2) Para dois autores, por nome do autor, depois nome do

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

coautor e depois cronologicamente; 3) Para mais de dois autores, pelo nome do primeiro autor, depois cronologicamente.

Se disponível, inclua sempre DOIs como links completos de DOI em sua lista de referências (por exemplo, "https://doi.org/abc").

- artigo de jornal

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Efeito do treinamento intermitente de alta intensidade na variabilidade da frequência cardíaca em crianças pré-púberes. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Idealmente, os nomes de todos os autores devem ser fornecidos, mas também será aceito o uso de "et al" em longas listas de autores:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Futuro do seguro saúde. *N Engl J Med* 965:325-329

- Artigo por DOI

Slička MK, Wharton JL (2000) Implicações clínicas da produção desregulada de citocinas. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Livro

South J, Blass B (2001) O futuro da genômica moderna. Blackwell, Londres

- Capítulo de livro

Brown B, Aaron M (2001) A política da natureza. In: Smith J (ed) *A ascensão da genômica moderna*, 3ª ed. Wiley, Nova York, pp 230-257

- Documento on-line

Cartwright J (2007) As grandes estrelas também têm clima. Publicação IOP PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Acessado em 26 de junho de 2007

- Dissertação

Trent JW (1975) Insuficiência renal aguda experimental. Dissertação, Universidade da Califórnia

Sempre use a abreviatura padrão do nome de um periódico de acordo com a lista ISSN de abreviações de palavras de título, consulte

[ISSN LTDA](#)

Se não tiver certeza, use o título completo do periódico.

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

Declarações e Declarações

As seguintes declarações devem ser incluídas no manuscrito submetido sob o título 'Declarações e Declarações'. Deve ser colocado após a seção Referências. Observe que os envios que não incluírem as declarações obrigatórias serão devolvidos como incompletos.

Financiamento

Por favor, descreva quaisquer fontes de financiamento que apoiaram o trabalho. A declaração deve incluir detalhes de quaisquer subsídios recebidos (forneça o nome da agência financiadora e o número do subsídio).

Declarações de exemplo:

"Este trabalho foi apoiado por [...] (números de subvenções [...] e [...]). O autor AB recebeu apoio de pesquisa da Empresa A."

"Os autores declaram que nenhum fundo, subsídio ou outro apoio foi recebido durante a preparação deste manuscrito."

Tabelas

- Todas as tabelas devem ser numeradas com algarismos arábicos.
- As tabelas devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva.
- Para cada tabela, forneça uma legenda (título) explicando os componentes da tabela.
- Identifique qualquer material publicado anteriormente, fornecendo a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.
- As notas de rodapé das tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídas abaixo do corpo da tabela.

Diretrizes para arte e ilustrações

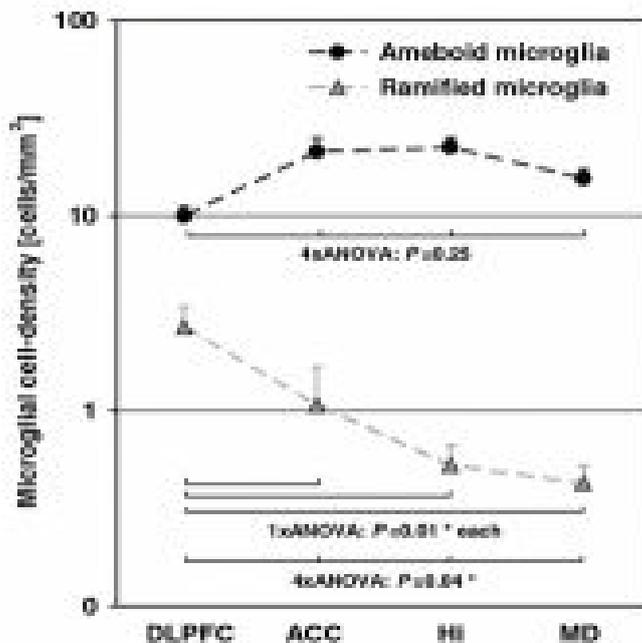
Envio de Figura Eletrônica

- Forneça todos os valores eletronicamente.
- Indique qual programa gráfico foi utilizado para criar a arte.
- Para gráficos vetoriais, o formato preferido é EPS; para meios-tons, use o formato TIFF. Arquivos MSOffice também são aceitáveis.
- Os gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.

Nascimento, P.P. Produção de biosurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

- Nomeie seus arquivos de figura com "Fig" e o número da figura, por exemplo, Fig1.eps.

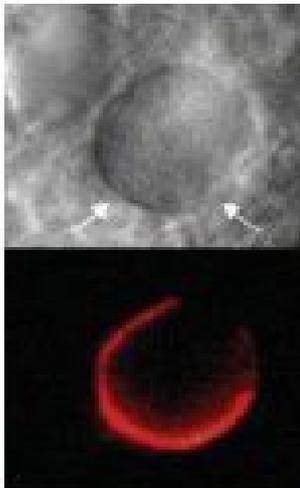
Arte linear



- Definição: Gráfico em preto e branco sem sombreamento.
- Não use linhas e/ou letras tênues e verifique se todas as linhas e letras dentro das figuras estão legíveis no tamanho final.
- Todas as linhas devem ter pelo menos 0,1 mm (0,3 pt) de largura.
- Os desenhos de linha digitalizados e os desenhos de linha em formato bitmap devem ter uma resolução mínima de 1200 dpi.
- Os gráficos vetoriais contendo fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.

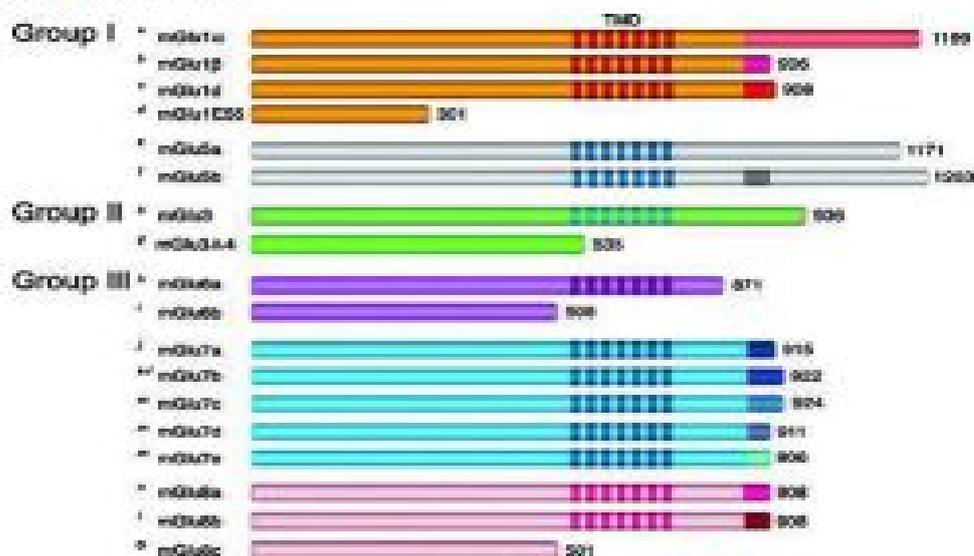
Arte em meio-tom

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...



- Definição: Fotografias, desenhos ou pinturas com sombreamento fino, etc.
- Se alguma ampliação for usada nas fotografias, indique-a usando barras de escala dentro das próprias figuras.
- Os meios-tons devem ter resolução mínima de 300 dpi.

Arte Combinada



- Definição: uma combinação de meio-tons e arte de linha, por exemplo, meio-tons contendo desenho de linha, letras extensas, diagramas de cores, etc.
- A arte combinada deve ter resolução mínima de 600 dpi.

Arte colorida

Nascimento, P.P. Produção de biossurfactante por *Candida bombicola* e aplicação em solos...

- A arte colorida é gratuita para publicação online.
- Se preto e branco for mostrado na versão impressa, certifique-se de que as informações principais ainda estarão visíveis. Muitas cores não são distinguíveis umas das outras quando convertidas para preto e branco. Uma maneira simples de verificar isso é fazer uma cópia xerográfica para ver se as distinções necessárias entre as diferentes cores ainda são aparentes.
- Caso as figuras sejam impressas em preto e branco, não faça referência à cor nas legendas.
- As ilustrações coloridas devem ser enviadas em RGB (8 bits por canal).

Letras de Figuras

- Para adicionar letras, é melhor usar Helvetica ou Arial (fontes sem serifa).
- Mantenha as letras com tamanhos consistentes em todo o seu trabalho artístico de tamanho final, geralmente cerca de 2–3 mm (8–12 pt).
- A variação do tamanho do tipo em uma ilustração deve ser mínima, por exemplo, não use fonte de 8 pt em um eixo e fonte de 20 pt para o rótulo do eixo.
- Evite efeitos como sombreamento, contorno de letras, etc.
- Não inclua títulos ou legendas em suas ilustrações.

Numeração de Figura

- Todas as figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos.
- As figuras devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva.
- As partes da figura devem ser indicadas por letras minúsculas (a, b, c, etc.).
- Caso apareça um apêndice em seu artigo que contenha uma ou mais figuras, continue a numeração consecutiva do texto principal. Não numere as figuras do apêndice, "A1, A2, A3, etc." As figuras nos apêndices online [Informações Suplementares (SI)] devem, no entanto, ser numeradas separadamente.

Legendas de figuras

- Cada figura deve ter uma legenda concisa descrevendo com precisão o que a figura representa. Incluir as legendas no arquivo de texto do manuscrito e não no arquivo de figuras.
- As legendas das figuras iniciam com o termo **Fig.** em negrito, seguido do número da figura, também em negrito.
- Nenhuma pontuação deve ser incluída após o número, nem qualquer pontuação deve ser colocada no final da legenda.
- Identifique todos os elementos encontrados na figura na legenda da figura; e usar caixas, círculos, etc., como pontos coordenados em gráficos.