



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

Elias José da Silva

**CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOSSURFACTANTE
PRODUZIDO POR *Pseudomonas cepacia* CCT6659 E
SUA APLICAÇÃO EM SOLO IMPACTADO POR
DERIVADOS DE PETRÓLEO**

Recife
2014

ELIAS JOSÉ DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM BIOSURFACTANTE
PRODUZIDO POR *Pseudomonas cepacia* CCT6659 E
SUA APLICAÇÃO EM SOLO IMPACTADO POR
DERIVADOS DE 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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

**Recife
2014**

Silva, Elias José

Caracterização de um Biossurfactante Produzido por *Pseudomonas cepacia* CCT5569 e sua Aplicação em Solo Impactado por Derivados de Petróleo. Recife, 2014. 121p.

Dissertação(Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

1. Biossurfactantes. 2. *Pseudomonas cepacia*. 3. Resíduo Industrial. 4. Contaminação por Petróleo. I. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP

Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos
Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE

Defendida em _____

Coordenadora: Profa. Dra.

“A existência na Terra é um livro que estás escrevendo...”

Cada dia é uma página...

Cada hora é uma afirmação de tua personalidade, através das pessoas e das situações que te buscam.”

Emmanuel.

Dedico as minhas duas Marias: Maria de Lourdes, minha mãe (*in memoriam*), e Maria da Saúde, minha esposa.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, inteligência suprema. JESUS CRISTO, guia e modelo para a humanidade e aos bons espíritos que nos assistem.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo e Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (UFPE).

À Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, Coordenadora do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP.

Ao CGTI (Centro de Gestão de Tecnologia e Inovação) pela oportunidade em participar dos projetos de pesquisa desenvolvidos junto à Prof^a Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo.

Ao Prof. Dr. Humberto Bezerra de Souza Sobrinho que através do qual, eu tive o privilégio de conhecer o grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Leonie Asfora Sarubbo e do Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos.

À Universidade Católica de Pernambuco na pessoa do Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira.

Aos meus amigos de trabalho da Central Analítica do DQF-UFPE, Abene Ribeiro, Conceição Pereira, Dayse Valéria, Elaine Patrícia, Eliana Falcão, Eliete Barros, Érida Pequeno, Jacqueline Morais, Lúcio Flávio, Margarete Fernandes e Severino Leite e ao meu amigo e doutorando Rogério Silva (Roger) pelas orientações no LCMS-IT-TOF e pelas caronas.

Às Coordenadoras da Central Analítica do DQF-UFPE Prof^a Dr^a Giovannia Araújo e Prof^a Dr^a Ivani Malvestiti. e ao Chefe do Departamento de Química Fundamental Prof. Dr. Paulo Menezes.

À 8^a turma do mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais da UNICAP pela garra e perseverança, em especial a Fernanda Cristina Padilha e Paulo Cisneiros (FRACTAL).

A todos os colegas do grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Leonie Asfora Sarubbo e do Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos.

Ao CNPq, FACEPE e FINEP pelo suporte financeiro aos laboratórios do Centro de Ciências e Tecnologia da UNICAP.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	Viii
SUMÁRIO.....	Ix
LISTA DE FIGURAS.....	Xiii
LISTA DE TABELAS	Xiii
LISTA DE SÍMBOLOS	Xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	Xv
RESUMO	Xvi
ABSTRACT	Xviii
CAPÍTULO 1	
1.1 Introdução	20
1.2 Objetivos	24
1.2.1 Objetivo Geral	24
1.2.2 Objetivos Específicos	24
1.3 Revisão da Literatura	25
1.3.1 Surfactantes	25
1.3.2 Biossurfactantes	26
1.3.3 Classificação	28
1.3.3.1 Biossurfactantes glicolipídicos	29
1.3.4 Micro-organismos Produtores	34
1.3.5 Propriedades	36
1.3.6 Aplicações	38

1.3.6.1 Aplicação de Biossurfactante na Biorremediação	39
1.3.6.2 Aplicação de Biossurfactantes na Limpeza de Reservatórios de Óleos	40
1.3.6.3 Aplicação de Biossurfactantes na Recuperação Avançada de Petróleo – MEOR	41
1.3.6.4 Aplicação de Biossurfactantes na Dispersão de Manchas de Petróleo	41
1.3.6.5 Aplicação de Biossurfactantes na Indústria de Alimentos	42
1.3.6.6 Aplicação de Biossurfactantes na Indústria Farmacêutica	43
1.3.6.7 Aplicação de Biossurfactantes na Mineração	44
1.3.6.8 Aplicação de Biossurfactantes na Agricultura	44
1.3.6.9 Aplicação de Biossurfactantes na Medicina	44
1.3.7 Utilização de Resíduos Industriais na Produção de Biossurfactantes	46
1.3.8 Desenvolvimento de Bioprocessos para a Produção e Recuperação de Biossurfactantes	49
1.4 Métodos de Extração de Biossurfactantes	52
1.4.1 Extração de biossurfactantes	53
1.4.2 Detecção colorimétrica	53
1.4.3 Detecção e/ou purificação por Cromatografia em Camada Delgada	53
1.4.4 Cromatografia em Coluna de Sílica Gel	54
1.4.5 Análise de biossurfactantes	54

1.4.5.1	Análise de lipídeos	54
1.4.5.2	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	54
1.4.5.3	Espectrometria de massa (MS)	55
1.4.5.4	Análise por MALDI	55
1.4.5.5	Análise por Ressonância Magnética nuclear (RMN)	56
1.4.5.6	Considerações sobre os processos de extração de biossurfactantes	56
1.5	Economia na Produção de Biossurfactantes	57
1.6	Referências bibliográficas	59
CAPÍTULO 2		
	Characterization of biosurfactant produced from industrial wastes by <i>Pseudomonas cepacia</i> CCT6659 and application in biodegradation of hydrophobic compounds in soil	69
	Abstract	70
1.	Introduction	71
2.	Materials and methods	73
2.1.	Materials	73
2.2.	Soil	73
2.3.	Bacterial strain and preparation of seed culture	74
2.4.	Fermentation media	74
2.5.	Determination of surface tension	75
2.6.	Biosurfactant isolation	75
2.7.	Biosurfactant composition	76

2.8. Determination of biosurfactant ionic character	76
2.9. Biosurfactant characterisation by thin-layer chromatography	77
2.10. Biosurfactant characterization by Nuclear magnetic resonance (NMR)	77
2.11. Evolution of oil-degrading ability in a contaminated soil	78
2.12. Analysis of hydrophobic organic compounds	78
3. Results and discussion	79
3.1 Biosurfactant characterization	79
3.2 Degradation of hydrophobic organic compounds	82
4.0 Conclusions	85
Acknowledgments	86
References	87
Figures captions	90
Tables	91
CONCLUSÕES GERAIS	96
ANEXOS	97

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Formação da Micela.....	26
Figura 2: Diferentes tipos de raminolipídeos produzidos por <i>P. aeruginosa</i>	31
Figura 3: Estrutura de soforolipídeos. (a) forma ácida livre e (b) forma lactônica	32
Figura 4: Estrutura de trealolipídeos. (a) forma micolato e (b) forma dimicolato ...	33
Figura 5: Estrutura de trealolipídeos. (a) forma micolato e (b) forma dimicolato ...	34

CAPÍTULO 2

Figura 1: Biosurfactant components detected by thin layer chromatography; the samples were applied in 20 µl volumes in TLC plates and developed with a CHCl ₃ :MeOH:H ₃ COOH (65:15:2, v/v) solvent system.....	92
Figura 2: ¹³ C NMR spectrum (APT, CD ₃ OD, 100 MHz) of the biosurfactant from <i>P. cepacia</i> CCT6659 grown in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil and 2.0% corn steep liquor.....	93
Figura 3: ¹ H NMR spectrum (CD ₃ OD, 300 MHz) of biosurfactant from <i>P.cepacia</i> CCT6659 grown in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil and 2.0% corn steep liquor.....	94
Figura 4: Percentage of HOCs degradation from ¹ H NMR spectra data. Set 1 – soil + <i>P. cepacia</i> cells; Set 2 –soil + <i>P. cepacia</i> biosurfactant; Set 3 – soil + <i>P. cepacia</i> cells + <i>P. cepacia</i> biosurfactant. SD of 0.50.....	95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Exemplos de Concentração Micelar Crítica de biossurfactantes e surfactantes químicos.	28
Tabela 2: Matérias-primas de baixo custo e respectivos micro-organismos utilizados na produção de biossurfactantes.	48
Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos métodos de recuperação de biossurfactantes e suas vantagens relativas.	51
Tabela 4: Processos de recuperação de biossurfactantes.	58

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Formulated mixtures for HOCs biodegradation experiments in soil .	91
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
G	Grama
L	Litro
Rpm	Rotação por minuto
Mg	Miligrama
M	Metro
N	Newton
µL	Microlitro
mN/m	Mili Newton por metro deslocamento químico
\$/mg	Valor por miligrama
\$/kg	Valor por quilograma
mg/L	Miligrama por litro
COD/m ³	Demanda química de oxigênio por metro cúbico
Kg	Quilograma
mg/Kg	Miligrama por quilograma
g/L	Grama por Litro
mL	Mililitro
U.S.	Dólar

LISTA DE ABREVIATURAS

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight (Ionização Por Dessorção A Laser Assistida Por Matriz- Tempo de Voo).

MS: Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas);

ESI-MS: Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas com Fonte Electrospray);

LC-MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas);

RMN ¹H : Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

RMN ¹³C : Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

UV: VIS Ultraviolet

FT-IR: Infravermelho por Transformada de Fourier

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

YMA: Yeast Mold Agar

YMB: Yeast Mold Broth

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Cromatografia Gasosa Acoplada À Espectrometria de Massas);

APCI: Atmospheric Chemical Pressure Ionization (Ionização Química A Pressão Atmosférica);

ESI: Electrospray Ionization (Ionização Por Spray de Elétrons);

MS/MS: Espectro de Fragmentação de Massa (Tandem-MS)

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografia Em Camada Delgada);

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

COSY: Correlation Spectroscopy

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HMQC-TOCSY: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy-Total Correlation Spectroscopy

NMR: Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)

ROESY: Rotational Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy

RESUMO

Os biossurfactantes são compostos anfipáticos capazes de exibir uma variedade de propriedades tensoativas que, entre outras funções, auxiliam os micro-organismos a solubilizar e degradar substratos hidrofóbicos. Nos últimos anos, os biossurfactantes têm sido investigados como possíveis substitutos para os surfactantes sintéticos, especialmente por possuírem vastas aplicações ambientais. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas cepacia* CCT6659 cultivada em 2% de óleo de soja residual e 2% de milhocina e aplicar a biomolécula na remediação de solo contaminado por derivados de petróleo. O biossurfactante foi inicialmente produzido, isolado e submetido à técnica de Cromatografia em Camada Delgada, sendo classificado como uma biomolécula predominantemente hidrofóbica e aniônica contendo lipídeos e carboidratos nas proporções de 75 e 25%, respectivamente. A caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (^1H e ^{13}C NMR) revelou a presença de grupos carbonílicos, olefínicos e alifáticos, tipicamente observados em espectros de lipídeos. Experimentos de biodegradação foram posteriormente conduzidos em solo contaminado com compostos orgânicos hidrofóbicos coletado de uma antiga região portuária na presença de um consórcio autóctone. As amostras de solo, enriquecidas inicialmente com melaço de cana, foram submetidas aos seguintes tratamentos: condição 1 – solo + células bacterianas, condição 2 – solo + biossurfactante, condição 3 – solo + células bacterianas + biossurfactante, condição 4 – solo sem adição de células e biossurfactante (controle). Os resultados obtidos demonstraram 83% de degradação dos contaminantes na presença de ambos surfactante e micro-organismo produtor (condição 3) após os primeiros dez dias de experimento, enquanto que percentuais de degradação acima de 95% foram observados nas condições 1, 2 e 3 entre 35 e 60 dias. Os resultados obtidos demonstram o potencial do biossurfactante e de seu micro-organismo produtor como coadjuvantes dos processos de remediação em solos contaminados com derivados de petróleo.

Palavras-chave: biossurfactante, *Pseudomonas cepacia*, resíduos industriais, biodegradação, contaminação por petróleo.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic compounds capable of displaying a variety of surface-active properties that, among other functions, assist microorganisms that degrade and solubilize hydrophobic substrates. In recent years, the biosurfactants have been investigated as possible replacements for synthetic surfactants, especially because they have large environmental applications. In this sense, the bacterium *Pseudomonas cepacia* CCT6659 cultured with 2% soybean waste frying oil and 2% corn steep liquor as substrates produced a biosurfactant with potential to be applied in bioremediation of soils. Firstly, the biosurfactant was produced, isolated and submitted to Thin Layer Chromatography, being classified as an anionic biomolecule with lipid and carbohydrate combination of 75 and 25% respectively. The characterization by proton nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR) revealed the presence of carbonyl, olefinic and aliphatic groups, being observed typical spectra of lipids. Four sets of biodegradation experiments were carried out with a soil contaminated by hydrophobic organic compounds amended with sugar cane molasses in the presence of indigenous consortium as follows: set 1 – soil + bacterial cells, set 2 –soil + biosurfactant, set 3 – soil + bacterial cells + biosurfactant, set 4 – soil without bacterial cells and biosurfactant (control). Interestingly, when biosurfactant and bacterial cells were used (set 3), significant oil biodegradation activity occurred (83%) in the first ten days of experiments, while maximum degradation of the organic compounds (above 95%) was observed in sets 1 , 2 and 3 between 35 and 60 days. It is evident from the results that the biosurfactant alone or its producer specie is capable of promoting biodegradation to a large extent.

Key-words: biosurfactant, *Pseudomonas cepacia*, industrial residues, biodegradation, petroleum contamination.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

As refinarias são grandes geradoras de poluição, uma vez que consomem enormes quantidades de água e de energia, produzem muitos despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição. Em decorrência desses fatos, a indústria de refino de petróleo, pode ser, e é, muitas vezes, uma grande degradadora do meio ambiente, pois tem potencial para afetar o mesmo em todos os níveis: ar, água e solo (GONZINI et al., 2010; SEN, 2008).

Os acidentes ocorridos com derramamentos de petróleo e seus derivados no Brasil, no período de 1975 a 2005, atingiram milhões de litros que contaminaram solos, rios e mares. Diante dessa realidade, a possibilidade de contaminação ambiental torna-se real e iminente, havendo necessidade urgente de desenvolvimento de novas tecnologias que possam conter possíveis contaminações (SILVA et al., 2009).

A contaminação por petróleo e derivados normalmente é tratada através de metodologias físicas, químicas ou biológicas. Entretanto, as novas diretrizes de recuperação de águas e solos têm restringido o uso de produtos químicos (MUTHUSAMY et al., 2008; SINGH et al., 2007). Dentre as técnicas de remediação disponíveis, a biorremediação tem se destacado, embora a solubilidade reduzida dos hidrocarbonetos dificulte o acesso dos microrganismos e a consequente biodegradação do poluente. (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; CALVO et al., 2009).

A biorremediação teve um importante papel na limpeza do derramamento de 41 milhões de litros de petróleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989, dando início ao desenvolvimento dessa tecnologia. No citado acidente, a medida inicial foi a lavagem física com jatos de água a alta pressão. Subsequentemente, surfactantes foram aplicados nas áreas poluídas para acelerar o crescimento e a atividade dos microrganismos degradadores de petróleo. Cerca de três semanas depois as regiões tratadas com surfactantes estavam

significativamente mais limpas do que as áreas controle, demonstrando a importância do uso de surfactantes para aumentar a biodegradação do petróleo (CONNOLLY et al., 2011; SAPTURE et al., 2010).

Os surfactantes são compostos anfipáticos que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, apresentando várias aplicações industriais (FRANZETTI et al., 2011). Os surfactantes possuem estrutura molecular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que exibem propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou micro emulsões, ação espumante, solubilidade e detergência, todas ligadas à capacidade de redução da tensão superficial por essas moléculas (BURGHOFF, 2012).

A grande maioria dos surfactantes disponível comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, a necessidade de preservação ambiental e as legislações de controle do ambiente têm motivado pesquisas para o desenvolvimento de compostos naturais como alternativas aos produtos existentes. Nesse contexto, destacam-se os surfactantes de origem microbiológica, produzidos principalmente por bactérias e leveduras (MARCHANT; BANAT, 2012).

Os biossurfactantes incluem uma grande variedade de estruturas químicas (glicolípídeos, lipopeptídeos, complexos proteínas-polissacarídeos e fosfolípídeos) produzidas por microrganismos quando cultivados em substratos insolúveis (óleos, resíduos e hidrocarbonetos) e solúveis (carboidratos) (BANAT et al., 2010; GAUTAM; TYAGI, 2006).

Extensas pesquisas para elucidar as estruturas químicas dessas biomoléculas têm sido realizadas especialmente para glicolípídeos. O estudo desses glicolípídeos é extremamente importante do ponto de vista científico e comercial. As informações obtidas das análises estruturais fornecem dicas para a otimização dos rendimentos de produção e para a “montagem” de glicolípídeos com características estruturais diferentes. As técnicas experimentais utilizadas para isolar e purificar biossurfactantes são extremamente variadas, envolvendo desde ensaios colorimétricos que dão indicação aproximada do rendimento da produção, à complexas técnicas espectrais de massa (SMYTH et al., 2010).

Os primeiros estudos na área de biossurfactantes ocorreram na década de 80 e, desde então, as pesquisas permitiram o desenvolvimento e a comercialização de dois produtos, a Surfactina, uma lipoproteína produzida pela bactéria *Bacillus subtilis*, e os Raminolipídeos, grupo de glicolipídeos produzidos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e comercializados pela Jeneil Biosurfactants Company (USA). Esses dois biossurfactantes, embora extremamente eficientes, são comercializados a um alto custo em função dos substratos utilizados para suas produções e do nível de pureza exigido para aplicações nas áreas farmacêutica e médica (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; BARROS et al., 2007; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

Segundo a literatura, os custos típicos dos biossurfactantes variam de cerca de 10 \$/mg para Surfactina pura (98% de pureza), utilizada em pesquisas médicas, a U.S. 24 \$/kg para fórmulas propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo (MARCHANT; BANAT, 2012). Estimativas realizadas na década passada situaram os custos dos biossurfactantes em U.S. 3-20 \$/kg, enquanto o custo de produção de surfactantes sintéticos como etoxilatos e alquil-poliglicosídeos pelas indústrias químicas estão na faixa de U.S. \$ 1-3/Kg (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

Uma das alternativas para reduzir os custos relacionados aos biossurfactantes, consiste na substituição dos substratos comumente utilizados por matérias-primas de baixo custo, como os resíduos industriais (MAKKAR et al., 2011; MANEERAT, 2005). Nesse sentido, propõe-se o uso de resíduos de óleos lubrificantes, óleos residuais de fritura, resíduos de amido, de destilaria de óleos, de indústrias lácteas, de melado de cana-de-açúcar e de glicerina, esta última gerada na obtenção de biodiesel, na produção de novos biossurfactantes com potencial de aplicação industrial (RUFINO et al., 2007; 2008; SOBRINHO et al., 2008; COIMBRA et al., 2009; SILVA et al., 2009; GUSMÃO et al., 2010). Vale ressaltar que a disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 % a 30 % da matéria-prima representem o custo total de um produto biotecnológico. Por outro lado, resíduos poluentes são gerados a cada ano por todo o mundo (MULLIGAN, 2009). O tratamento e a

remoção destes resíduos também se traduzem em um alto custo para várias indústrias. Com relação aos processos de purificação, que representam cerca de 60% do custo total de produção, estes não serão computados uma vez que os biossurfactantes a serem produzidos poderão ser aplicados no meio ambiente na forma bruta, eliminando essa dispendiosa etapa (MAKKAR et al., 2011; SHAH et al., 2007).

Nos últimos anos, os estudos voltados para a produção de biossurfactantes têm se intensificado em função das características desses compostos como biodegradabilidade, baixa toxicidade, especificidade e estabilidade sob condições ambientais extremas de temperatura, pH e salinidade (BANAT et al., 2010; FELSE et al., 2006; MUKHERJEE et al., 2006). Nesse contexto, as indústrias de petróleo e petroquímica destacam-se como os maiores campos de aplicação dessas biomoléculas. A limpeza de solos e águas contaminados por derramamentos de petróleo, a remoção da borra oleosa de tanques de estocagem assim como um aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios são possíveis aplicações para os biossurfactantes, que atuam permitindo a ocorrência de interações entre os resíduos e a célula microbiana, devido à redução da tensão superficial mediada entre o óleo e a fase aquosa (PERFUMO et al., 2010; FRANZETTI et al., 2011).

Considerando a habilidade das bactérias do gênero *Pseudomonas* em produzir surfactantes atóxicos e biodegradáveis, estudos dirigidos para a caracterização e aplicação de um biossurfactante de baixo custo na despoluição de solos contaminados por derivado de petróleo foram conduzidos. O biossurfactante foi inicialmente obtido a partir do cultivo da bactéria em meio contendo resíduos industriais, sendo o processo de produção, isolamento e caracterização acompanhados por metodologias microbiológicas e analíticas. Após a caracterização da composição e da estrutura molecular do biossurfactante, seu potencial de aplicação como coadjuvante dos processos de remediação de contaminantes hidrofóbicos adsorvidos em solo foi avaliado na presença de um consórcio autóctone.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Caracterizar e aplicar um biossurfactante de baixo custo na descontaminação de derivados de petróleo em solo.

1.2.2 Específicos

- Produzir o biossurfactante a partir da bactéria *Pseudomonas cepacia* em meios e condições previamente estabelecidos.
- Isolar o biossurfactante produzido.
- Caracterizar bioquimicamente o biossurfactante isolado utilizando a técnica de Cromatografia em Camada Delgada.
- Determinar os grupos funcionais do biossurfactante isolado utilizando a técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear.
- Investigar a aplicação do biossurfactante produzido no processo de biodegradação de derivados de petróleo em consórcio autóctone em solo.
- Investigar a ação conjunta do biossurfactante e do seu micro-organismo produtor na biodegradação de derivados de petróleo em consórcio autóctone em solo.
- Investigar o potencial de degradação das células de *P. cepacia* na biodegradação de derivados de petróleo em consórcio autóctone em solo.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Surfactantes

Os surfactantes são compostos anfipáticos contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que se particionam, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água (MARCHANT; BANAT, 2012). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (SINGH et al., 2007; MUKHERJEE et al., 2006).

Essas características permitem aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial e com isso formar microemulsões onde os hidrocarbonetos possam se solubilizar em água ou onde a água possa se solubilizar em hidrocarbonetos (BURGHOFF, 2012; RON; ROSENBERG, 2002). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (AL-ARAJI et al., 2007).

A propriedade de maior importância para os agentes tensoativos é a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos. A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (BURGHOFF, 2012). A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC) (BANAT et al., 2010). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (Figura 1). Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007; VAN-HAMME et al., 2006).

A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto que a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007).

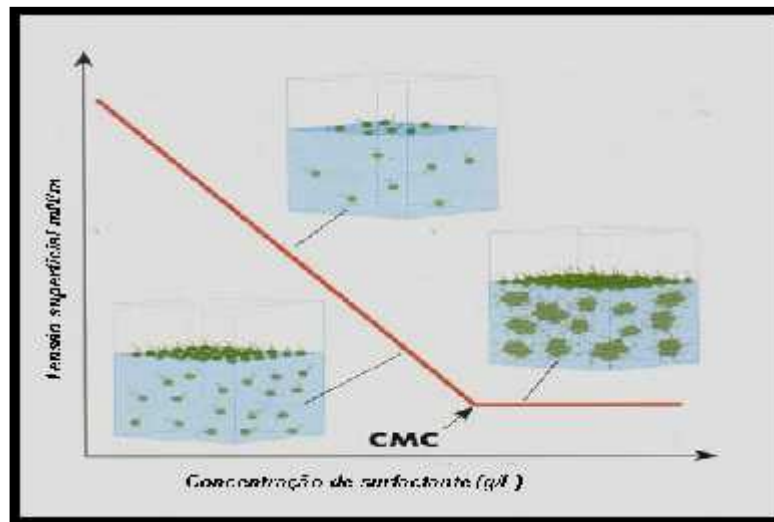


Figura 1: Formação da Micela.

1.3.2 Biossurfactantes

Os estudos relacionados aos biossurfactantes iniciaram-se em 1960 e a utilização desses compostos se estendeu nas últimas décadas, surgindo como alternativa aos surfactantes sintéticos, especialmente em indústrias farmacêuticas, alimentícias e na petrolífera (MARCHANT; BANAT, 2012). A razão desta notoriedade está relacionada à baixa toxicidade, biodegradabilidade, habilidade de produção a partir de fontes renováveis, capacidade de ação em ambientes extremos, como pH, temperatura e salinidade, além de estruturas químicas variadas (MUTHUSAMY, et al., 2008).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, as novas legislações de controle ambiental têm incentivado o desenvolvimento de surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até micro-organismos (glicolipídeos) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais (MANEERAT, 2005).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SINGH et al., 2007).

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis, ou pela combinação destes (BANAT et al., 2010).

A possibilidade de produção dos biossurfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes espécies microbianas, além da possibilidade de variação de inúmeros parâmetros culturais como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH do meio e nutrientes adicionados, permite a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência, embora os custos de produção ainda não permitam uma maior competitividade com seus similares petroquímicos (CANET et al., 2002). A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial ficam em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente.

Dados sobre a CMC são escassos e, mais uma vez, difíceis de interpretar ou correlacionar. A comparação entre os valores de CMC de biossurfactantes e de seus equivalentes químicos está apresentada na Tabela 1 e mostra CMCs muito mais baixas no caso dos biossurfactantes. Em princípio, quanto menor a CMC, mais eficaz o surfactante e mais favorável, do ponto de vista econômico, a sua utilização em processos industriais ((MARCHANT; BANAT, 2012; BOGNOLO, 1999).

Tabela 1: Exemplos de Concentração Micelar Crítica de biossurfactantes e surfactantes químicos.

Agente surfactante	CMC (mg/L)
Fosfatidil etanolaminas	30
Ácidos fosfatídicos	70
Raminolípídeo	20
Surfactina	11
Alquil benzeno sulfonato	590
Lauril sulfato de sódio	2 000 – 2 900

Fonte: BOGNOLO, 1999.

1.3.3 Classificação

Os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a carga iônica que reside na parte polar da molécula. Em função da presença ou ausência de cargas elétricas, podem ser aniônicos, catiônicos, não-iônicos ou anfotéricos (MANEERAT, 2005; RON; ROSENBERG, 2001).

A maioria dos biossurfactantes é aniônica ou neutra. Apenas alguns são catiônicos, como os que contêm grupamentos amina. A parte hidrofóbica é caracterizada por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que a porção hidrofílica pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, fosfato, um ácido carboxílico ou um álcool (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes são comumente classificados de acordo com a natureza bioquímica ou com a espécie microbiana produtora, quanto à estrutura, podem ser classificados em cinco grandes grupos (RAHMAN; GAKPE, 2008).

- Glicolípídeos, cujo grau de polaridade depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos. São exemplos os raminolípídeos

produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, e os soforolipídeos produzidos por espécies de *Candida*.

- Lipossacarídeos, os quais normalmente possuem massa molar elevada e são solúveis em água, como o conhecido Emulsan, emulsificante extracelular produzido por hidrocarbonetos a partir da bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*.
- Lipopeptídeos, como a surfactina, produzida por *Bacillus subtilis*, um dos biossurfactantes mais poderosos já relatados na literatura.
- Fosfolipídeos, estruturas comuns a muitos micro-organismos, como o biossurfactante de *Corynebacterium lepus*.
- Ácidos graxos e lipídeos neutros (alguns classificados como glicolipídeos) e proteínas hidrofóbicas.

1.3.3.1 Biossurfactantes glicolipídicos

Existem quatro grandes grupos de glicolipídios microbianos, os raminolipídeo e soforolipídios, os trealolipídios e manosileritritolipídios.

Os raminolipídeos estão entre os surfactantes mais eficientes conhecidos. Eles possuem tensões superficiais reduzidas (32-27 mN/m), baixa Concentração Micelar Crítica, atingindo 5 mg/L, alta capacidade emulsificante, alta afinidade por moléculas orgânicas hidrofóbicas, além de reduzir a tensão interfacial óleo /água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m (MÜLLER et al., 2012; LANG, WULLBRANDT, 1999). Tais propriedades conferem aos raminolipídeos características atrativas para aplicação na despoluição de sistemas de solos. Outra vantagem frente aos biossurfactantes consiste na facilidade de isolamento desses do líquido metabólico, uma vez que são extracelulares, além de poderem ser produzidos a partir de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos de baixo custo, incluindo hidrocarbonetos, óleo vegetais, carboidratos ou resíduos das indústrias de alimentos (MAIER, SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000; MULLIGAN, 2005; MONTEIRO et al., 2007).

Em 1949, Jarvis e Johnson reportaram que o raminolípídeo produzido por *P. aeruginosa* cultivada em glicerol como fonte de carbono possuía duas moléculas de raminose ligadas a uma cadeia -hidroxidecanoil- -hidroxidecanoato. Desde então, a compreensão acerca das complexas misturas desses compostos tem aumentado (MONTEIRO et al., 2007). Em 1963, uma rota metabólica para a síntese dos raminolípídeos por transferência seqüencial de glicosila foi proposta (BURGUER et al., 1966). Em 1994, Ochsner et al., isolaram e analisaram o gene envolvido na regulação da síntese dos raminolípídeos.

Os raminolípídeos produzidos pela *P. aeruginosa* têm sido tradicionalmente reportados como misturas dos homólogos R1 [3-(α -L-raminopiranosil)- -hidroxidecanoato] ou L-raminopiranosil- -hidroxidecanoato (Rha-C₁₀), R2 [3-(2'-O- α -L-raminopiranosil- α -L-raminopiranosiloxi)- β -hidroxidecanoato] ou 2-O-L-raminopiranosil- -L-raminopiranosil- -hidroxidecanoil- -hidroxidecanoato (Rha₂-C₁₀), R3 3-[3'-(α -L-raminopiranosil-hidroxidecanoil)- β -hidroxidecanoato] ou L-raminopiranosil- -hidroxidecanoil- -hidroxidecanoato (Rha-C₁₀-C₁₀) e R4 3-[3'-(2''-O- α -L-raminopiranosil- α -L-raminopiranosil-hidroxidecanoil)- β -hidroxidecanoato] ou (2-O-L-raminopiranosil- -L-raminopiranosil- -hidroxidecanoato (Rha₂-C₁₀-C₁₀), como classificados por Sylatk e Wagner (1987). Vários autores reportam que o raminolípídeo é produzido por *P. aeruginosa* como misturas de diferentes homólogos onde o raminolípídeo Rha-C₁₀-C₁₀ predomina. Outros autores reportaram a presença de outros raminolípídeos com diferentes cadeias de ácidos graxos (C₁₈, C₂₂ e C₂₄) em menor quantidade (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). De fato, mais de 28 diferentes homólogos têm sido reportados, com cadeias saturadas e insaturadas variando de C8 a C14 e com porções de carboidratos acopladas (NITSCHKE et al., 2005; MULLIGAN, 2005; MÜLLER et al., 2012).

A Figura 2 ilustra a estrutura química dos raminolípídeos produzidos por *P. aeruginosa*.

Enquanto um anel extra de raminose confere mais hidrofiliabilidade aos raminolípídeos (monoraminoilípídeos versus diraminolípídeos), carbonos adicionais na cadeia de ácidos graxos podem aumentar a hidrofobicidade aos mesmos. Estas propriedades podem afetar a estabilidade dos raminolípídeos na fase aquosa (na

forma monomérica ou como aglomerados micelares), suas capacidades em solubilizar compostos orgânicos hidrofóbicos e suas biodisponibilidades. Raminolipídeos mais hidrofílicos como Rha-C₁₀ e Rha₂-C₁₀ apresentam valores de CMC na faixa de 200 mg/L, enquanto que valores menores, entre 5 e 60 mg/L têm sido reportados para misturas contendo principalmente o monoraminoilpídeo Rha-C₁₀-C₁₀. O diraminoilpídeo Rha₂-C₁₀-C₁₀.apresenta valores intermediários de CMC, entre 40-65 mg/L. A literatura descreve que a composição da mistura de raminolipídeos irá influenciar de forma marcante sua performance como carreador de contaminantes (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010).

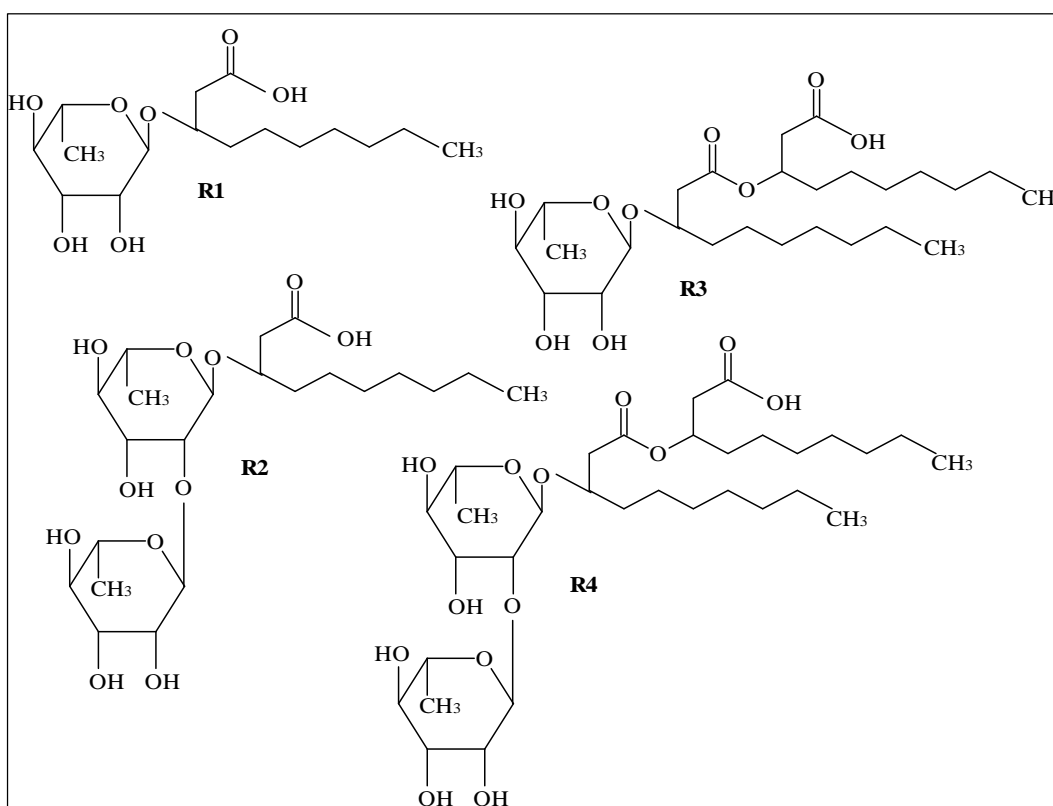


Figura 2:- Diferentes tipos de raminolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*

Fonte: KOCH et al., 1991.

Os sofrorolipídeos são glicolipídeos extracelulares produzidos principalmente por espécies de *Candida* cultivadas em carboidratos ou ácidos graxos ou em ambos. As leveduras *Candida bombicola* e *Candida apicola* se destacam como produtoras.

Tipicamente, os soforolipídeos consistem de uma glicose dimérica (também chamada soforose) ((1-2)glicose) ligada através de uma ligação glicosídica ao penúltimo grupo hidroxila de um ácido graxo contendo 18 átomos de carbono. Os soforolipídeos ocorrem como uma mistura de macrolactonas (Figura 3b) e ácidos livres (Figura 3a) que são acetilados a várias extensões nas posições hidroxilas primárias, ou seja, podem ter estruturas cíclicas e acíclicas. Na maioria dessas estruturas, o ácido está ligado ao carboidrato pelo grupo hidroxila, deixando uma função carboxila livre (estrutura aberta ou ácida); quando essa função carboxila também está ligada à molécula de soforose, uma estrutura cíclica ou lactona é formada. Ambas as estruturas mostram propriedades tensoativas semelhantes (FELSE et al., 2006; SMYTH et al., 2010).

A soforose está sempre presente nos soforolipídeos, mas o comprimento e/ou a natureza dos ácidos graxos pode variar dependendo da composição do meio, embora a presença de ácidos graxos de 16 a 18 carbonos seja muito comum.

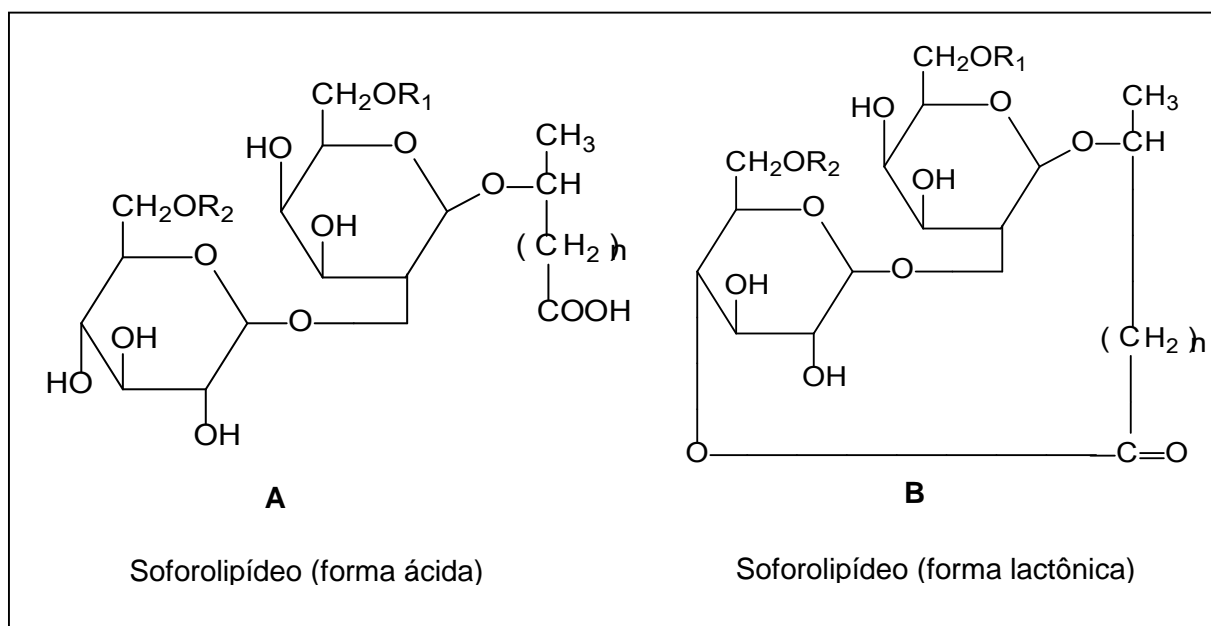


Figura 3: Estrutura de soforolipídeos. (a) forma ácida livre e (b) forma lactônica

Fonte: SMYTH et al., 2010.

Os trealolípídeos são constituídos de um dissacárido, a trealose, ligado por uma ligação éster a um b-hidroxi ácido graxo de cadeia a ramificada (LANG; PHILP,

1998). Os b-hidroxi-ácidos graxos a-ramificados são ligados ao C6 e C6 da estrutura do carboidrato, no caso das trealoses dimicolatas e ao C6 para os monomicolatos (Figura 4); outros tipos de estruturas também têm sido reportadas. A produção de trealolípídeos está associada com a maioria das espécies de *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Corynebacterium* (SMYTH et al., 2010).

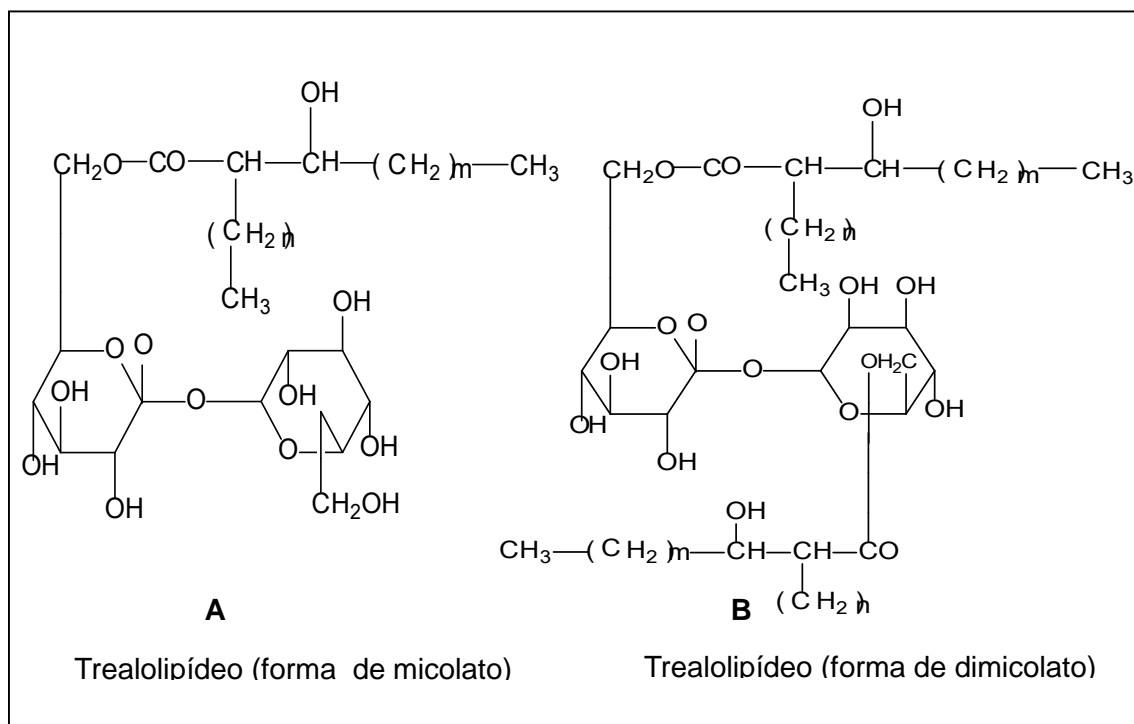


Figura 4: Estrutura de trealolípídeos. (a) forma micolato e (b) forma dimicolato

Fonte: SMYTH et al., 2010.

Os mansileritritolípídeos (MEL) têm quatro principais grupos estruturais e compreendem geralmente 4-O-b-D-manopiranosil-D-eritritol ligado a duas cadeias médias de ésteres de ácidos graxos (FUKUOKA et al., 2007). MEL são geralmente produzidos por espécies das leveduras *Pseudozyma*, como a *P. rugulosa*, *P. aphidis* e *P. Antarctica* (Figura 5)

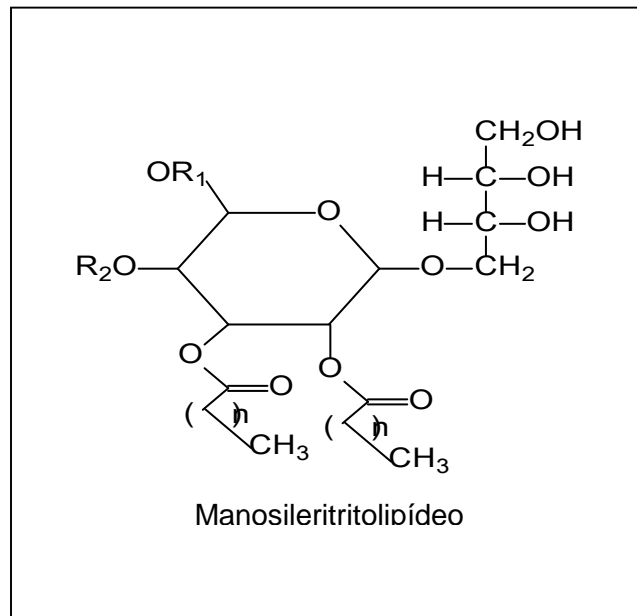


Figura 5: Estrutura de trealolípídeos. (a) forma micolato e (b) forma dimicolato

Fonte: SMYTH et al., 2010.

1.3.4 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES

Os micro-organismos utilizam uma série de fontes de carbono e energia para seu crescimento. A associação de fontes de carbono com substratos insolúveis facilita a difusão intracelular e a produção de várias substâncias, dentre elas os biossurfactantes (BANAT et al., 2010).

Alguns micro-organismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, variando desde carboidratos até hidrocarbonetos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, conseqüentemente, suas propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se deseja propriedades específicas para uma aplicação direcionada (COOPER, 1986). Diversos são os estudos realizados por vários autores (GUSMÃO et al., 2010; SILVA et al., 2010; SOBRINHO et al., 2008; LUNA et al., 2009; LUNA et al., 2008; AMARAL et al., 2006; SARUBBO et al., 2006; KIM et al., 2006) na produção de biossurfactantes, envolvendo propriedades físico-químicas.

Uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos é capaz de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (DELEU, PAQUOT, 2004).

A grande maioria podem ser produtores de biossurfactantes, dentre as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes (SILVA et al., 2010; GUERRA SANTOS et al., 1986).

Os *Bacillus subtilis* são produtores de lipopeptídeos, como a chamada surfactina, a qual contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxila e hidroxila do ácido C14 (KAKINUMA et al., 1969). Concentrações de surfactina menores que 0,005 % reduzem a tensão superficial para 27 mN/m, tornando a surfactina um dos mais poderosos biossurfactantes. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, por outro lado, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (HUE et al., 2001).

Entre as leveduras, espécies de *Candida* têm sido largamente empregadas com sucesso na fermentação de hidrocarbonetos e, conseqüentemente, para produção de biossurfactantes (FONTES et al., 2008). Em 1979, Pareilleux observou a presença de um polímero extracelular por *C. lipolytica* com propriedades emulsificantes, quando esta foi cultivada em n-tetradecano ou na mistura de hidrocarbonetos lineares. Os polímeros recuperados do líquido metabólico demonstraram ser moléculas complexas, constituídas por uma fração lipídica, uma protéica e outra carboidratos, sendo esta última, em maior quantidade. Cirigliano e Carman (1985) isolaram, inicialmente, um bioemulsificante produzido por *C. lipolytica* cultivada em meio contendo n-hexadecano, demonstrando perspectivas e potencial para uso em sistemas alimentares, enquanto que Marçal (1991) demonstrou a produção de biopolímeros por *C. lipolytica* com alta atividade de emulsificação utilizando substratos regionais. Sarubbo et al. (1999; 2001) também utilizaram a *C. lipolytica* na produção de agentes surfactantes em meios contendo óleo vegetal de babaçu e glicose como substratos. Sarubbo et al. (2006; 2007) demonstraram a possibilidade de combinação entre duas fontes, uma solúvel e outra insolúvel, para a produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* enquanto que Rufino et al.

(2007; 2008), Coimbra et al. (2009) e Sobrinho et al. (2008) aplicaram com sucesso um resíduo industrial de óleo de soja na produção de um biossurfactante por *C. lipolytica*.

1.3.5 Propriedades

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

Apesar da diversidade de composição química e de propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas dessas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (NITSCHKE et al., 2007):

- Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial a menores concentrações. A CMC dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000 mg/L, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN/m respectivamente.
- Tolerância à temperatura, pH e força iônica: muitos biossurfactantes podem ser utilizados sob condições extremas. O lipopeptídeo de *Bacillus licheniformis* JF-2, por exemplo, é estável a temperaturas em torno de 75 °C, por até 140 horas e pHs entre 5 e 12. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10 % de sal, enquanto que 2 % de NaCl são suficientes para inativar surfactantes convencionais.
- Biodegradabilidade: os biossurfactantes são facilmente degradados por bactérias e outros micro-organismos microscópicos na água e no solo,

o que os torna adequados para aplicações na biorremediação e tratamento de resíduos.

- **Baixa toxicidade:** os biossurfactantes têm recebido maior atenção devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais; além disso, sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, em cosméticos e em produtos farmacêuticos.
- **Disponibilidade:** biossurfactantes podem ser produzidos a partir de matérias-primas largamente disponíveis, além da possibilidade de serem produzidos a partir de resíduos industriais.
- **Especificidade:** biossurfactantes, sendo moléculas orgânicas complexas com grupos funcionais específicos também serão específicos em suas ações. Essa propriedade pode ser de grande interesse da detoxificação de poluentes específicos ou em determinadas aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética ou alimentícia.
- **Biocompatibilidade e digestibilidade,** o que garante a aplicação dessas biomoléculas nos mais diversos setores industriais, destacando as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.

A despeito das vantagens, alguns pontos desfavoráveis devem ser citados, como (RAHMAN; GAKPE, 2008):

- A produção em grande escala de biossurfactantes pode ser dispendiosa. Esse problema, entretanto, pode ser resolvido pela combinação de substratos de baixo custo.
- A obtenção de produtos com elevado grau de pureza, que se torna difícil em virtude da necessidade de etapas consecutivas de purificação do líquido metabólico.
- A existência de espécies super produtoras é rara e as conhecidas não são capazes de produzir altos rendimentos em surfactantes, além de necessitarem de meios de cultivo complexos.

- A regulação da síntese de biossurfactantes não está totalmente compreendida, uma vez que essas biomoléculas podem ser produzidas como metabólitos secundários ou em associação ao crescimento microbiano.
- O aumento da produtividade é muitas vezes prejudicado pela formação de espuma, o que requer a utilização de meios diluídos.

1.3.6 Aplicações

A produção mundial de surfactantes somou 17 milhões de toneladas em 2000, esperando-se um aumento de ordem de 3-4 % ao ano. As aplicações industriais são classificadas de acordo com seus usos: 54 % como detergentes, 13 % nas indústrias têxteis, de couro e de papel, 10 % em processos químicos, outros 10 % nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, 3 % na indústria de alimentos, 2 % na agricultura e os 2 % restantes em outras aplicações (FRACCHIA et al., 2012; MUTHUSAMY et al., 2008).

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicações em vários processos industriais, além da possibilidade de novas aplicações para estas biomoléculas. Acredita-se que os biossurfactantes ficarão conhecidos como os “materiais multifuncionais” do novo século (MUTHUSAMY et al., 2008).

Atualmente, os biossurfactantes têm sido utilizados principalmente nas indústrias de óleos, incluindo a limpeza de derramamento de óleos, a remoção de óleos

de tanques de estocagem, a recuperação avançada de petróleo e a biorremediação de solos (CONNOLLY et al., 2011; GAUTAM; TYAGI, 2006; SINGH et al., 2007).

1.3.6.1 Aplicação de Biossurfactante na Biorremediação

Biorremediação é a habilidade de organismos vivos em transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos gerando substâncias menos nocivas, que possam ser integradas ao ciclo biogeoquímico natural. Contudo, a biodegradabilidade desses contaminantes é influenciada por fatores como oxigênio, pH, presença de macro e micro nutrientes, características físico-químicas do histórico da poluição ambiental e das partículas de solo ou outras às quais os organismos e contaminantes possam estar adsorvidos (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MARGESIN; SCHINNER, 2002).

As substâncias contaminantes apresentam diferentes grupos funcionais tais como OH, Cl, NH₂, NO₂ e SO₃. Esses, por sua vez, comportam-se como doadores de elétrons sendo oxidados ou em alguns casos mineralizados por diferentes espécies microbianas. Alguns dos metabólitos intermediários produzidos nessas reações são assimiladas como fonte de carbono para o crescimento microbiano (MARGESIN; SCHINNER, 2002).

A biorremediação utilizando micro-organismos ou processos microbianos em ambientes contaminados tem inúmeras aplicações incluindo a limpeza de águas subterrâneas, solos, lagos e processos de tratamento de esgotos. Essa é uma tecnologia bem aceita pela opinião pública na recuperação de ambientes poluídos não afetando o equilíbrio ecológico, já que as bactérias, os fungos filamentosos e as leveduras são agentes transformadores eficazes, face as suas habilidades em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas (PERFUMO et al., 2010; CALVO et al.; 2009; DESAI; BANAT, 1997).

Como os biossurfactantes aumentam a interação água/óleo, aceleram a degradação de vários óleos por micro-organismos e promovem a biorremediação de águas e solos contaminados (MULLIGAN, 2005). A capacidade dos surfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água aumenta a degradação desses compostos no ambiente. Os biossurfactantes também são úteis na biorremediação de locais contaminados com metais pesados tóxicos como urânio, cádmio e chumbo e na remoção de piche após a introdução de *Pseudomonas*, *Arhtrobacter*, e *Bacillus*

subtilis, demonstrando resultados promissores (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Pesquisas com consórcios microbianos e raminolípídeos demonstraram o potencial de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo (RAHMAN et al., 2006). A aplicação do raminolípídeo de *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 aumentou a biorremediação de gasolina adsorvida em solo (RAHMAN et al., 2002).

Alguns estudos demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAS) pelo uso de biossurfactantes (MULLIGAN, 2005; SINGH et al., 2007).

A utilização de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. A degradação de hexaclorociclohexano por surfactantes produzidos por *Pseudomonas* foi primeiramente relatada, bem como a dos organosclorados como DDT e ciclodienos (KARANTH et al., 1999).

1.3.6.2 Aplicação de Biossurfactantes na Limpeza de Reservatórios de Óleos

A aplicação de biossurfactantes no tratamento de resíduos oleosos torna-se um dos pré-requisitos importantes para que ocorram interações entre os resíduos e a célula microbiana, devido à redução da tensão superficial existente entre o óleo e a fase aquosa (HUE et al., 2003; CALVO et al., 2009).

A utilização de biossurfactantes para a limpeza de tanques, em substituição aos surfactantes convencionais, promoveu a limpeza e recuperação de 90 % dos hidrocarbonetos presentes no resíduo (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; MULLIGAN, 2004). A remoção de resíduos e frações de óleos pesados requer lavagens com solventes ou mesmo manuais, ambas perigosas, demoradas, e caras já que os resíduos e as frações de óleos pesados que sedimentam no fundo dos tanques são altamente viscosos e podem não ser removidos através de bombeamento convencional. Um processo alternativo a esta limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água, facilitando o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru, após quebra da emulsão (SINGH et al., 2007; MULLIGAN, 2004).

1.3.6.3 Aplicação de Biossurfactantes na Recuperação Avançada de Petróleo – MEOR

Segundo Desai e Banat (1997), a recuperação de óleos utilizando biossurfactantes constitui atualmente uma importante estratégia para a indústria do petróleo, uma vez que micro-organismos e produtos de seu metabolismo são utilizados para aumentar a recuperação do petróleo. Este processo conhecido como “MEOR” (Microbial Oil Recovery Enhancement), recuperação avançada de óleo, apresenta vantagens importantes em relação aos métodos convencionais. Os surfactantes alteram algumas características físico-químicas do petróleo, facilitando ou aumentando sua remoção nos poços (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011; SINGH et al., 2007).

1.3.6.4 Aplicação de Biossurfactantes na Dispersão de Manchas de Petróleo

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

Uma das técnicas de remediação de derramamentos de óleo é a aplicação de dispersantes de manchas de óleo. Os dispersantes utilizados para este fim são compostos de misturas complexas de surfactantes, solventes e aditivos que aumentam a taxa de dispersão natural do óleo e sua retirada da superfície contaminada (PERFUMO et al., 2010). A aplicação de dispersantes minimiza o impacto do derramamento de óleo em aves e mamíferos marinhos, pois remove o óleo da superfície da água. Além disso, o uso de dispersantes minimiza o impacto de derramamento de óleo sobre os recursos sensíveis na orla costeira, reduzindo a quantidade de óleo derramado. O aumento da área superficial do petróleo como resultado da sua dispersão em pequenas gotículas facilita também sua biodegradação através da atividade de micro-organismos de ocorrência natural (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011).

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

1.3.6.5 Aplicação de Biossurfactantes na Indústria de Alimentos

Na indústria alimentícia, a emulsificação tem um papel importante na formação da consistência e textura, bem como na dispersão de fase e na solubilização de aromas (RAHMAN; GAKPE, 2008). De forma geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão, controlando a aglomeração de glóbulos de gordura e estabilizando sistemas aerados (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Por definição, uma emulsão é um sistema heterogêneo, consistindo de ao menos um líquido imiscível (fase interna descontínua) disperso em outro (fase externa contínua) em forma de pequenas gotas (SARUBBO, 1997). Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes, sólida finamente dividida que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia na superfície entre duas fases e prevenindo a coalescência das partículas através da formação de barreiras estéricas e eletrostáticas (VELIKONJA; KOSARIC, 1993). Exemplos de alimentos processados, que são emulsões, são creme de leite, manteiga, maionese, molhos para salada, salsicha, recheios entre outros (VELIKONJA; KOSARIC, 1993). Outras aplicações para os emulsificantes são descritas, entre elas melhorar a textura e vida de prateleira de produtos contendo amido, pela formação de complexos com os componentes destes, modificar as propriedades reológicas da farinha de trigo, pela interação com o glúten, melhorar a consistência e textura de produtos à base de gorduras, pelo controle de polimorfismo e da estrutura cristalina das gorduras (BANAT, 2000; SARUBBO, 1997).

Os biossurfactantes ainda podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, no controle de aglomeração de glóbulos de

gordura, na estabilização de sistemas aerados e para melhorar a consistência de produtos gordurosos. O uso de raminolipídeos para melhorar as propriedades emulsificantes da manteiga, de croissants e de produtos de confeitaria congelados também foi reportado (MUTHUSAMY et al., 2008). O bioemulsificante produzido por *Candida utilis* em sido utilizado em molhos prontos para saladas.

A manoproteína produzida por *Saccharomyces cerevisiae* pode estabilizar emulsões água/óleo para produção de maionese, biscoitos, sorvetes, entre outros. É produzida através de um processo biotecnológico simples, de larga escala e baixo custo. Além de ser estável em uma larga faixa de pH seu subproduto pode ser utilizado como ração animal (TORABIZADEH et al., 1996; BANAT, 2000).

Apesar da aplicação potencial, a indústria de alimentos não utiliza ainda os biossurfactantes como aditivos em larga escala. Muitas propriedades dos biossurfactantes, assim como sua regulamentação para aprovação como novo ingrediente para alimentos necessitam de aprovação.

1.3.6.6 Aplicação de Biossurfactantes na Indústria Farmacêutica

Os biossurfactantes são amplamente utilizados em vários produtos, como em cosméticos e em indústrias de medicamentos. Estima-se que num futuro próximo a maioria dos cosméticos seja “biocosméticos”. Vários produtos necessitam de surfactantes em seus ingredientes, incluindo repelentes de insetos, antiácidos, soluções para lentes de contato, desodorantes, produtos para unhas, pasta de dentes, etc. (FRACCHIA et al., 2012; MAYER; SOBERON-CHAVEZ, 2000).

Devido a sua compatibilidade com a pele, os biossurfactantes podem ser usados em produtos de higiene e cosméticos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Com essa finalidade, glicolipídeos obtidos de *Torulopsis bombicola* KSM 35 são usados no Japão, como agentes de limpeza facial (DELEU; PAQUOT, 2004). Soforolipídeos sofrem esterificação, resultando em um produto com aplicação em batons e como hidratante para pele e cabelos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A literatura também descreve a ação de sofrorolipídeos na estimulação da síntese de colágeno, podendo ser usados como medida preventiva do envelhecimento da pele e nas formulações para a pele (MUTHUSAMY et al., 2008).

1.3.6.7 Aplicação de Biossurfactantes na Mineração

Compostos tensoativos produzidos por *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram utilizados para flotação e separação de calcita. A recuperação foi de 95 % para CWO_4 e 30 % para CaCO_3 , ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais (NITSCHKE; PASTORE, 2002). O biodispersan, polissacarídeo aniônico produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* A2 foi utilizado na prevenção da floculação e dispersão de misturas de pedra calcárea e água (RON; ROSENBERG, 2002).

1.3.6.8 Aplicação de Biossurfactantes na Agricultura

Na agricultura, os biossurfactantes são utilizados na hidrofilição de solos argilosos para a obtenção de boa umidade e distribuição uniforme de fertilizantes (NITSCHKE et al., 2007). A formulação de herbicidas e pesticidas contendo bioemulsificantes também tem sido reportada (ROSENBERG; RON, 1999). Os compostos ativos dessas formulações são, geralmente, hidrofóbicos, sendo necessários agentes emulsificantes para dispersá-los em soluções aquosa. Stanguellini e Miller (1997) demonstraram a eficiência de raminolipídeos contra patógenos de plantas.

1.3.6.9 Aplicação de Biossurfactantes na Medicina

Os biossurfactantes também têm sido utilizados em várias aplicações biológicas (terapêuticas) como atividade fungicida, bactericida, inseticida e antiviral, agentes anti-adesivos e inibidores de enzimas (FRACCHIA et al., 2012; MEYLHEUC et al., 2001; MUTHUSAMY et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006).

Vários raminolipídeos podem exibir atividades antibacteriana e antifitoviral. Abalos et al. (2001), por exemplo, identificaram seis raminolipídeos em culturas de *P. aeruginosa* AT10 produzidos a partir de resíduo de refinaria de óleo de soja e avaliaram as propriedades antimicrobianas da mistura. Esses raminolipídeos

exibiram excelente propriedades antifúngicas contra vários fungos em concentrações variando de 16µg/mL- 32 µg/mL (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004).

A chamada atividade anti-aderente, ou seja, a capacidade de inibir a adesão de micro-organismos patogênicos em superfícies sólidas ou em sítios infecciosos também tem sido reportada em biossurfactantes, levando à diminuição de infecções hospitalares sem a necessidade de fármacos ou agentes químicos sintéticos (RODRIGUES et al., 2006; MUTHUSAMY et al., 2008). Meylheuc et al. (2001) estudaram um biossurfactante obtido de *P. fluorescens* dotado de propriedades inibidoras da adesão de *Listeria monocytogenes* LO28 as superfícies do politetrafluoroetileno e do aço inoxidável.

A deficiência do surfactante pulmonar, um complexo proteína-fosfolípido é responsável pela falência de respiração em bebês prematuros. O isolamento dos genes para as moléculas protéicas desse surfactante e a clonagem em bactérias permitiu sua produção fermentativa para aplicações médicas (FRACCHIA et al., 2012; MUTHUSAMY et al., 2008).

Soforolipídeos de *Candida bombicola* têm sido estudados por sua atividade espermicida, citotóxica e anti-HIV para reduzir a ploriferação do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a incidência de gravidez indesejada. Soforolipídeos também têm sido estudados como agentes antiinflamatórios para doenças imonológicas (RODRIGUES et al., 2006; MUTHUSAMY et al., 2008).

A iturina, lipopeptídeo produzido por *B. subtilis*, demonstrou atividade antifúngica, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras (MUTHUSAMY et al., 2008). Experimentos *in vitro* mostraram que a surfactina inativou eficazmente o vírus causador de herpes, assim como o retrovirus e outros vírus de RNA e DNA compactados. A atividade antiviral da surfactina foi determinada para uma larga gama de vírus. Os efeitos da surfactina da absorção de insulina em pulmão de ratos foram examinados (MUTHUSAMY et al., 2008).

1.3.7 Utilização de Resíduos Industriais na Produção de Biossurfactantes

A sociedade atual caracteriza-se pelo aumento das despesas, a necessidade de reutilizar materiais e com a preocupação ambiental. Consequentemente, vem dando uma ênfase maior a recuperação, reciclagem e reutilização de diversos resíduos (MARCHANT; BANAT, 2012).

A necessidade de preservação ambiental leva à reutilização de diversos resíduos industriais. Isto particularmente é válido para os alimentos e as indústrias de produção de alimentos cujos resíduos, efluentes e co-produtos podem ser reutilizados. Estas indústrias produzem grandes volumes de resíduos sólidos e líquidos, resultantes da produção, preparação e consumo dos alimentos e quando descartados geram poluição e representam uma grande perda de nutrientes, particularmente das indústrias de alimentos, vêm sendo utilizados na bioconversão e chamando mais atenção devido à possibilidade de aplicação na produção de bioadsorventes (MARCHANT; BANAT, 2012; MAKKAR et al., 2011; BANAT et al., 2010; SINGH et al., 2007).

Uma variedade de subprodutos, incluindo derivados de óleo vegetais, resíduos de amido, resíduos de destilaria de óleos e substâncias lácteas têm sido utilizados na produção de muitos metabólicos microbianos. A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 % a 30 % da matéria-prima representa o custo total de um produto biotecnológico (MUKHERJEE et al., 2006). Por outro lado, milhões de desperdícios em resíduos poluentes são jogados a cada ano por todo o mundo. O tratamento e a remoção destes resíduos também representam um alto custo para várias indústrias (PANDEY, et al., 2000).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes (MAKKAR et al., 2011; BANAT et al., 2010).

Muitos biossurfactantes têm sido produzidos de substratos agroindustriais, renováveis e de baixo custo. Óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais,

resíduos de destilaria de óleos, resíduos da indústria de laticínios (soro de leite), melaço de cana e glicerina têm sido citados na literatura (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

A seleção do substrato depende da escolha de um resíduo com um certo balanço de nutrientes para crescimento e produção. Os resíduos industriais com elevado valor de carboidratos ou lipídeos encontrados são muito atrativos como substratos para produção de biossurfactantes (MARCHANT; BANAT, 2012; MAKKAR; CAMEOTRA, 1999; MERCADE et al., 1994).

Barros et al. (2007) descreveram a importância da variedade de resíduos industriais como matéria-prima para diversos bioprocessos. Segundo os autores desse trabalho, a utilização de resíduos agroindustriais para produção de biossurfactantes é um dos passos para viabilização e implantação desses processos em escala industrial, sendo necessário um balanço de nutrientes para desenvolver condições adequadas no desenvolvimento e produção. Os efluentes do processamento de batata foram evidenciados como substitutos atrativos dos substratos convencionais, uma vez que são fontes de carboidratos na forma de amido e açúcar, de nitrogênio e de carbono, considerando que a composição do meio interfere na redução da tensão superficial.

Nitschke e Pastore (2006) utilizaram com sucesso resíduos industriais de fritura de batata na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*.

Anteriormente, Nitschke et al. (2004) selecionaram micro-organismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais. Utilizaram melaço, soro de leite e manipueira obtendo valores de tensão superficial em torno de 26 mN/m. Volbrecht et al. (1999) investigaram a produção de biossurfactantes usando óleo vegetal doméstico como substrato da bactéria *Tsukamurella spec* DSM 44370, conseguindo reduzir a tensão da água de 70 mN/m para 35 mN/m com CMC de 10 mg/L. Haba et al. (2000) compararam o uso de óleo de oliva e girassol para a produção de biopolímeros usando valores de tensão superficial até 40 mN/m como critério de seleção de micro-organismos potencialmente produtores. Rufino et al., (2007) utilizou um resíduo de refinaria na produção de biossurfactante por *Candida lipolytica* obtendo resultados satisfatórios em termos de tensão superficial.

Mukherjee et al. (2006) descreveram o uso de substratos de baixo custo como alternativa econômica e promissora para a produção de biossurfactantes.

Derivados de óleo vegetal, substâncias a base de amido, soro de leite, óleo de babaçu e girassol, melão e efluente de arroz foram utilizados com eficiência na produção de raminolípídeos e soforolípídeos por vários micro-organismos.

Diferentes elementos encontrados nos efluentes dos processos industriais também são fontes de nutrientes. Nitrogênio e ferro foram utilizados para aumentar o rendimento de biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 e *Ustilago maydis* (DUBEY et al., 2004).

Amezcu-Veja et al. (2006) descreveram a importância da relação entre diferentes elementos como C e N, C e P, C e Fe ou C e Mg na produção de biopolímeros e na otimização de seus processos de obtenção.

Recentemente, a borra oleosa do fundo de tanques da Petrobrás, contendo querosene, óleo diesel e petróleo, foi utilizado como matéria-prima de baixo custo para a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo contaminado (PIRÔLLO, 2006).

A Tabela 2 mostra um resumo de algumas matérias-primas de baixo custo e os respectivos micro-organismos utilizados na produção de biossurfactantes.

Tabela 2: Matérias-primas de baixo custo e respectivos micro-organismos utilizados na produção de biossurfactantes.

Matéria-prima de baixo custo ou resíduos	Tipo de biossurfactante	Espécie microbiana produtora	Rendimento máximo (g/L)
Óleo de babaçu	Glicolípídeo	<i>Candida lipolytica</i> IA 1055	---
Óleo de milho	Glicolípídeo	<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	400
Óleo de girassol e óleo de soja	Raminolípídeo Lípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	4,31 / 2,98
Óleo residual de fritura (óleos de oliva e girassol)	manosileritritol Raminolípídeo	<i>Candida</i> sp. SY16 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	95 2,7
Óleo residual de fritura (óleos de oliva e girassol)	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 NCIB 40044	2,7
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	11,72
Resíduo de refinaria de óleo de girassol	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	16
Resíduo de refinaria de óleo vegetal	Glicolípídeo	<i>Candida antactica</i> e/ou <i>Candida apicola</i>	10,5 / 13,4
Solo e resíduo de refinaria	Raminolípídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	0,92

de óleo vegetal			
Efluentes do	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i>	---
processamento de Batatas			
Manipueira	Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 e <i>Bacillus subtilis</i> LB5a	2,2 – 3,0

Fonte: MUKHERJEE et al., 2006.

1.3.8 Desenvolvimento de Bioprocessos para a Produção e Recuperação de Biossurfactantes

Um processo eficiente e econômico constitui a base de qualquer indústria biotecnológica com fins lucrativos; assim, o desenvolvimento de bioprocessos é o primeiro passo para a comercialização de todos os produtos biotecnológicos, inclusive os biossurfactantes. Qualquer tentativa de aumentar o rendimento de um biossurfactante exige a adição ótima de componentes do meio e a seleção das condições ótimas que conduzam à produtividade máxima ou ótima (MARCHANT; BANAT, 2012; MUKHERJEE et al., 2006).

De maneira semelhante, técnicas e métodos de processamento eficazes são necessários para a máxima recuperação do produto.

Vários elementos, componentes do meio e precursores são mencionados como capazes de afetar o processo de produção dos biossurfactantes e a quantidade e a qualidade finais. Segundo a literatura, elementos como o nitrogênio, o ferro e o manganês afetam o rendimento dos biossurfactantes. Da mesma maneira, as proporções entre diferentes elementos como C:N, C:P, C:Fe ou C:Mg afetam a produção de biossurfactantes e a sua otimização intensifica a produção (MAKKAR et al., 2011; BANAT et al., 2010; AMEZCUA-VEJA et al., 2007). A maximização da produtividade ou a minimização dos custos de produção exigem o uso de estratégias de otimização do processo, envolvendo múltiplos fatores.

Mesmo que se obtenha uma produção ótima utilizando-se meios e condições de cultivo adequados, o processo de produção ainda requer métodos eficazes e econômicos de recuperação dos produtos. Assim, um fator importante na determinação da viabilidade de um processo de produção em escala comercial é a disponibilidade de procedimentos de recuperação e “downstream” econômicos. No

caso de muitos produtos biotecnológicos, os custos do processamento correspondem a 60% dos custos totais de produção. Vários métodos convencionais para a recuperação de biossurfactantes como precipitação com ácidos, extração com solventes, cristalização, precipitação com sulfato de amônio e centrifugação têm sido amplamente mencionados na literatura (MUTHUSAMY et al., 2008).

Alguns métodos de recuperação não-convencionais foram utilizados nos últimos anos. Esses procedimentos tiram vantagem de algumas propriedades dos biossurfactantes – como a atividade superficial ou a capacidade de formar micelas – e são particularmente adequados à recuperação contínua em larga escala de biossurfactantes extracelulares do líquido metabólico. Alguns exemplos dessas estratégias de recuperação de biossurfactantes incluem fracionamento de espuma (DAVIS et al., 2001; NOAH et al., 2005), ultrafiltração (SEN, SWAMINATHAN et al., 2005), adsorção-dessorção em resinas de poliestireno e cromatografia de troca iônica (REILING et al., 1986). Uma das principais vantagens desses métodos é a capacidade de operar de modo contínuo na recuperação de biossurfactantes com um alto nível de pureza. Biossurfactantes com alto teor de pureza são exigidos em indústrias como a farmacêutica, alimentícia e cosmética, as quais irão exigir a aplicação dessas técnicas de recuperação.

Novas pesquisas são necessárias para aperfeiçoar as fases de processamento já existentes, tornando-as mais competitivas em termos de custos. Muitas vezes, uma só técnica de processamento não é suficiente para a recuperação e purificação do produto. A Tabela 3 descreve os procedimentos de recuperação dos biossurfactantes e suas vantagens.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos métodos de recuperação de biossurfactantes e suas vantagens relativas.

Processo de recuperação	Propriedade responsável pela seleção do método de separação	Instrumentação necessária	Vantagens
Precipitação ácida	Biossurfactantes se tornam insolúveis a baixos pH	Não requer equipamentos	Baixo custo; eficiente na recuperação do surfactante bruto
Extração com solventes orgânicos	Biossurfactantes são solúveis em solventes orgânicos devido à presença da cadeia hidrofóbica	Não requer equipamentos	Eficiente na recuperação do surfactante bruto e na purificação parcial; natureza reutilizável
Precipitação por sulfato de amônio	Exclusão da fase saturada em sal pelo biossurfactante polimérico rico em proteínas	Não requer equipamentos	Efetiva no isolamento de determinados tipos de biossurfact. Poliméricos
Centrifugação	Biossurfactantes insolúveis precipitam em função da força centrífuga	Necessidade de Centrífuga	Reutilizável; efetiva na recuperação do surfactante bruto
Fracionamento de espuma	Biossurfactantes, devido à atividade surfactante, formam e se particionam na espuma	Construção de biorreatores especiais que facilitem a recuperação da espuma durante a fermentação	Utilizado em processos contínuos de recuperação; alta pureza do produto
Ultrafiltração em membrana	Biossurf. formam micelas acima da CMC, as quais são retidas em membranas poliméricas	Unidades de ultrafiltração com membrana polimérica porosa	Rápido; recuperação em apenas uma etapa; alto grau de pureza
Adsorção em resinas de poliestireno	Biossurf. são adsorvidos em resinas poliméricas e podem ser desorvidos usando solvente orgânico	Resina de poliestireno empacotada em colunas de vidro	Rápido; recuperação em apenas uma etapa; alto grau de pureza; reutilizável
Adsorção em carbono ativo	Biossurf. são adsorvidos em carvão ativo e podem ser desorvidos usando solvente orgânico	Não requer equipamentos; pode ser adicionado ao meio de cultivo; também pode ser empregado em colunas de vidro	Pureza elevada do biossurfact.; baixo custo; reutilizável; recuperação em cultura contínua
Cromatografia de troca iônica	Biossurf. carregados se ligam a resinas trocadoras de íons e podem ser eluídos com um tampão específico	Resinas trocadoras de íons empregadas em colunas	Alta pureza, reutilização, rápida recuperação do produto

Extração por solvente (com MTBE)	Biossurf. são solúveis em solventes orgânicos devido à presença de cadeia hidrofóbica	Não requer equipamentos	Menos tóxico do que os solventes convencionais; baixo custo
---	---	-------------------------	---

Fonte: MUKHERJEE et al., 2006.

Nesses casos, uma estratégia de recuperação de múltiplas fases, utilizando uma seqüência de fases de concentração e purificação, é muito mais eficaz (REILING et al., 1986). Num processo de recuperação de múltiplas etapas dos biossurfactantes, será possível obter o produto a qualquer grau de pureza desejado. Biossurfactantes brutos ou impuros obtidos nas fases iniciais do processo de recuperação podem ser utilizados em aplicações ambientais e também na recuperação de petróleo e nas indústrias de tintas e têxtil e obtidas a custos mais baixos (MARCHANT; BANAT, 2012). Em alternativa, os biossurfactantes de elevado grau de pureza exigido pelas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética podem ser obtidos por meio de novos estágios de purificação. Este tipo de recuperação de fases múltiplas deverá ser útil nas indústrias que produzem biossurfactantes para uma vasta gama de aplicações (MUKHERJEE et al., 2006).

1.4 Métodos de Extração de Biossurfactantes

A análise química e estrutural de surfactantes microbianos pode ser realizada utilizando uma grande variedade de técnicas, desde simples ensaios colorimétricos à técnicas sofisticadas como espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN). Os métodos utilizados dependem grandemente da quantidade de informação desejada. Recomenda-se que um procedimento experimental tenha como base as seguintes etapas chave: (1) extracção de glicolípidos a partir do meio de cultura, (2) detecção, (3) purificação e separação do produto bruto (4) análise estrutural do produto através da utilização de CLAE, MS e RMN. Para uma identificação completa, entretanto, é necessário o uso combinado de alguns ou de todos esses recursos em conjunto para superar as dificuldades adicionais causadas pela presença, por exemplo, de vários tipos estruturais ou de isômeros da mesma molécula. Algumas das técnicas podem ser realizadas sem a necessidade de

equipamentos complexos, enquanto outras utilizam equipamentos refinados que requerem um técnico com conhecimento apurado para sua operação (SMYTH et al., 2010). Os diferentes métodos estão descritos a seguir.

1.4.1 Extração de biossurfactantes

O objetivo dessa técnica é obter um extracto bruto livre a partir do meio de cultura aquoso. Embora uma variedade de métodos esteja disponível, o mais comumente utilizado é de extração com solventes orgânicos como clorofórmio, metanol e acetato de etila, entre outros.

1.4.2 Detecção colorimétrica

Métodos colorimétricos podem ser usados para determinar a presença dos biossurfactantes em qualquer meio de cultura ou do extrato. A detecção pode ser realizada utilizando ensaios de detecção de porções de açúcar, tais como antrona (HODGE; HOFREITER, 1962) ou ensaio de orcinol sem a necessidade de extração. No entanto, interferências de produtos químicos e fontes de carbono podem resultar em resultados imprecisos e, portanto, só deve ser utilizado como um indicador aproximado de biossurfactante (SMYTH et al., 2010).

1.4.3 Detecção e/ou purificação por Cromatografia em Camada Delgada

A Cromatografia em camada fina (TLC) é um método simples que permite a detecção de glicolípidos e também pode fornecer informações sobre possíveis tipos estruturais de biossurfactantes presentes. A detecção por TLC deve ser realizada antes de procedimentos de purificação e também pode ser usada para determinar a pureza, após as etapas de purificação. Geralmente, um número de impurezas é geralmente co-extraída durante a extração, juntamente com vários tipos estruturais do biossurfactante alvo, que são produzidos em quantidades variáveis. Estes podem necessitar de avaliação por separação e remoção das impurezas (SMYTH et al., 2010).

1.4.4 Cromatografia em Coluna de Sílica Gel

A cromatografia em coluna é um método de custo relativamente reduzido, que pode ser usado para purificar biossurfactantes. Usando esta técnica, desde miligramas a quilo gramas de biossurfactantes podem ser obtidos livre de impurezas; a técnica também pode ser usada para separar os tipos estruturais de glicolípidos para posterior análise (SMYTH et al., 2010).

1.4.5 Análise de biossurfactantes

Uma vez que os biossurfactantes são isolados na forma pura, a análise é necessária para quantificar e/ou investigar características estruturais. Numerosas técnicas têm sido desenvolvidas atualmente para analisar biossurfactantes, quer na molécula intacta ou através do rompimento da estrutura em seus ácidos graxos e carboidratos. Entre estas técnicas, a espectrometria de massa oferece a maior quantidade de informações no que diz respeito à pureza e conformação estrutural (SMYTH et al., 2010).

1.4.5.1 Análise de lipídeos

Os biossurfactantes glicolipídicos variam muito em sua porção lipídica; portanto, a análise dos lipídeos fornece informação estrutural detalhada, que permite a identificação de estruturas glicolipídicas. O processo envolve a clivagem hidrolítica da ligação entre o hidrato de carbono e as porções lipídicas por hidrólise e subsequente derivatização das cadeias de ácido graxo resultantes para ésteres metílicos de ácidos graxos, que serão analisados por CG ou GC-MS (BRANDL et al., 1988).

1.4.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é um método que permite a separação de biossurfactantes e quando acoplado com detector de espalhamento de luz evaporativa (ELSD) ou

espectrometria de massa fornece informações valiosas necessárias para a identificação e quantificação dos biossurfactantes. A associação CLAE-UV (ultra violeta) pode também ser utilizada quando os compostos teste foram derivatizados para ésteres p-bromofenacil (MATA-SANDOVAL et al, 1999). Ambos CLAE-UV e CLAE-ELSD requerem comparação com tempos de retenção de padrões para permitir a identificação da estrutura, no entanto, a presença de isómeros não pode ser detectado por espectrometria de massas (SMYTH et al., 2010).

1.4.5.3 Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa representa um poderoso método para análise de biossurfactantes, proporcionando informação estrutural detalhada sobre a massa molecular dos compostos em estudo. Tandem MS (MS/MS) resulta na fragmentação das estruturas, permitindo assim a identificação de isómeros individuais, sem a necessidade de separação. Além disso, quando combinado com a CLAE, oferece o método mais sensível para identificação e quantificação de biossurfactantes. Uma desvantagem, no entanto, é que requer elevado nível de purificação, livre de os sais e lípidos não polares livres, que podem induzir supressão dos sinais de íons em condições de esclerose múltipla. Biossurfactantes podem ser analisados em todos os tipos de espectrômetros de massa, com ionização por electrospray (ESI-MS) com a matriz de ionização de dessorção a laser assistida (MALDI). Tal como acontece com todos os equipamentos, a técnica experimental irá variar muito, dependendo do fabricante do instrumento e do software (SMYTH et al., 2010).

1.4.5.4 Análise por MALDI

A MALDI consiste em uma técnica de espectrometria de massa por ionização leve que permite a identificação de compostos intactos. Basicamente, as amostras a serem analisadas são misturadas com uma matriz e secas sobre uma plataforma na qual um laser é disparado com vários graus de energia, formando assim íons gasosos que podem então ser observados em um analisador de tempo de voo (TOF) (SMYTH et al., 2010; PRICE et al., 2008).

1.4.5.5 Análise por Ressonância Magnética nuclear (RMN)

As metodologias previamente relatadas permitem quase que a identificação completa da estrutura molecular de um biossurfactante. Para alcançar uma determinação estrutural completa, a RMN é o método mais potente, capaz de identificar os grupos funcionais, bem como a posição das ligações dentro do hidrato de carbono e moléculas lipídicas. Utilizando uma série de experimentos de RMN, a localização exata de cada grupo funcional pode ser obtida. Informações sobre os isómeros estruturais também podem ser fixadas. Os biossurfactantes devem ser dissolvidos em clorofórmio deuterado e uma série de 1D (^1H e ^{13}C) e experimentos 2D (tais como COSY, ROSY, HMQC e HMBC) devem ser realizados por RMN (SMYTH et al., 2010).

1.4.5.6 Considerações sobre os processos de extração de biossurfactantes

O tempo necessário para executar os procedimentos de extração pode ser afetado por diversos fatores, tais como volume da amostra ou presença da produção de substratos residuais (óleos, em particular). Os métodos anteriormente descritos requerem, em média, os intervalos de tempo discriminados a seguir (SMYTH et al., 2010).

- 1- Extração - varia de acordo com a quantidade de material a ser extraído. Cerca de 100 ml poderia ser extraído e seco no espaço de 2 horas.
- 2- Ensaio colorimétrico e Cromatografia em Camada Delgada – dura cerca de 3 horas.
- 3- Purificação por Cromatografia em Coluna de Sílica Gel - depende da quantidade a ser purificada, mas pode variar de 1 dia a 2 semanas.
- 4- Análise lipídica – a derivatização combinada e análise por GC-MS necessita de 1 dia.
- 5- CLAE-ELSD – dura cerca de 1 hora por amostra.
- 6- ESI-MS - 10 minutos por amostra, incluindo as etapas de limpeza.

- 7- CLAE-MS - entre meia hora a uma e meia por amostra, dependendo do tempo de execução.
- 8- RMN - 1 hora por experiência ou, no máximo, 1 dia por amostra.

1.5 Economia na Produção de Biossurfactantes

Nos processos biotecnológicos a economia é sempre um fator importante, especialmente nos casos de produção de biossurfactantes. O sucesso da produção de biossurfactantes depende do desenvolvimento de processos de baixo custo e da utilização de substratos mais baratos, que representam de 10 a 30 % do custo total de produção. Os biossurfactantes têm que competir com os surfactantes petroquímicos considerando três aspectos: custo, funcionalidade e capacidade de produção junto à necessidade de aplicação pretendida (BANAT et al., 2010; COIMBRA et al., 2009; RUFINO et al., 2008; MUTHUSAMY, 2008; CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

O alto custo de produção de biossurfactantes pode ser absorvido, se usado em pouca quantidade, na produção de cosméticos, de medicamentos e de alimentos; por outro lado, para aplicações mais abrangentes, como a recuperação de óleos, a qual requer altos volumes de surfactantes, o alto custo de produção ainda dificulta a utilização destes biocompostos (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

Pattanath et al. (2008), sugerem quatro fatores para a redução dos custos dos biossurfactantes. Os micro-organismos (selecionados, adaptados ou criados para produção em larga escala), o processo (selecionado, adaptado ou criado para garantir baixo custo operacional), o meio de cultura (adaptado para baixo custo) e o processamento de produtos reciclados (mínimos ou gerenciados para venda mais do que para a queda).

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob

condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (DESAI; BANAT, 1997).

A produção de biossurfactantes a um baixo custo é dificultada quando se faz necessário uma refinação extensiva. Para o desenvolvimento de processos deve-se usar biossurfactantes capazes de serem recuperados por técnicas simples e baratas. O processo mais comum de recuperação dos biossurfactantes é a extração com solventes (clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butanol, acetato de etila, pentano, hexano e ácido acético, entre outros). Todavia, tem sido reportada técnicas de precipitação dos produtos como a precipitação por sulfato de amônia, centrifugação por cristalização, adsorção, fermentação fracionária, etc. Vários processos de recuperação de biossurfactantes estão demonstrados na Tabela 4 (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Tabela 4: Processos de recuperação de biossurfactantes.

Processo	Recuperação de biossurfactante
Precipitação do sulfato de amônia	Emulsan Biodispersan Bioemulsifier
Precipitação de acetona	Bioemulsificantes Glicolipídios
Precipitação de ácido	Surfactin Trealoselipídios
Extração de solvente	Sophorolipídios Liposan Celobiolipídios
Cristalização	Glicolipídios
Centrifugação	Glicolipídios Ranolipídios
Adsorção	Lipopeptídeos Glicolipídios
Fermentação Fracionada	Surfactin
Filtração de fluxo tangencial	Biossurfactante misto
Precipitação	Glicolipídios
Ultrafiltração	Glicolipídios

Fonte: MAKKAR; CAMEOTRA, 2002.

1.6 Referências Bibliográficas

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids : diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323-1336, 2010.

AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Microbial surfactants. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** , v. 15, p. 99-105, 2007.

AMARAL, P.F.F.; DA SILVA, J.M.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; COELHO, M.A.Z.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1894-1898, 2006.

AMEZCUA-VEJA, C. A. et al. Effect of culture conditions on fatty composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 237-240, 2007.

AMEZCUA-VEJA, C.; POGGI-VARALDO H. M.; ESPARZA-GARCIA, F.; RÍOS RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 237-240, 2006.

BANAT, I.M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARTINOTTI, M.G., FRACCHIA, L., SMYTH, T.J., MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 87, 2010, p. 427-444.

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

BANAT, I. M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, M. G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 01-14, 2007.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces A: **Physicochemical Engineering Aspects**. v. 152, p. 41-52, 1999.

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

BURGUER, M.M.; GLASER, L.; BURTON, R.M. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods in Enzymology**, v. 8, p. 441-445, 1966.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LOPÉZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 3634-3640, 2009.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.

CANET, R.; BIRNSTINGL, J. G.; MALCOLM, D. G.; LOPEZ-REAL, J. M.; BECK, A. J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresource Technology**, v.76, p. 113-117, 2002.

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

COIMBRA, C.D.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245-251, 2009.

CONNOLLY, H.E., RAHMAN, P.K.S.M., BANAT, I.M., LORD, R.A. Resource recovery and reduction of oily hazardous wastes via biosurfactant washing and bioremediation. In: **Trends in Bioremediation and Phytoremediation**. India: Ed. Grazyna Plaza, 2011, p. 43-57.

COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbial Science**, v. 3, n. 5, p. 145-149, 1986.

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

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 346-354, 2001.

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

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

DUBEY, K., JUWARKAR, A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 74-81, 2004.

FELSE, P. A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K. J.; GROSS, R. A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006.

FONTES, G. C.; BALA, G. A. Produção de biossurfactantes por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FRACCHIA, L., CAVALLO, M., GIOVANNA MARTINOTTI, M., BANAT, I.M. **Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – Present Status and Future Potentials**. Biomedical Science, Engineering and Technology, Dhanjoo N. Ghista Ed., 2012. p. 325-370.

FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., BANAT, I.M. (Bio)surfactant and bioremediation, successes and failures. In: **Trends in Bioremediation and Phytoremediation**. India: Editor G Plaza. Research Signpost, Kerala, 2011, p. 145-156.

FUKUOKA, T.; MORITA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T.; SAKAI, H.; KITAMOTO, D. Structural characterisation and surface-active properties of a new glycolipid biosurfactant, mono-acylated mannosylerythritol lipid, produced from glucose by *Pseudozyma antarctica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 801–810, 2007.

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

GONZINI, O.; PLAZA, A.; PALMA, D. I. L.; LOBO, M. C. Electrokinetic remediation of gasoil contaminated soil enhanced by rhamnolipids. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, p. 1239-1248, 2010.

GUERRA-SANTOS, L.H.; KÄPPELI, O.; FIECHLER, A. A dependence of *pseudomonas aeruginosa* continuous cultura biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Applied and Microbial Biotechnology**, v. 24, p. 443-448, 1986.

GUSMÃO, C. A. B.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP 1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal as hydrophobic contaminant. **World Journal Microbial Biotechnol**, v. 26, p. 1683-1692, 2010.

HABA, E; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 379-387, 2000.

HAMMAN, O. B.; de la RUBIA, T.; MARTINEZ, J. Decolorization of olive oil Mill wastewater by *Phanerochaete flavido-alba*. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 18, p. 2410-2415, 1999.

HODGE, J.E.; HOFREITER, B.T.; Determination of reducing sugars and carbohydrates. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, v. 1, p. 380–394, 1962.

HUE N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

HUE Z., CHEN J., LUN S., WANG X. Influence of biosurfactants produced by *Candida Antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, v. 34, p. 4143-4150, 2003.

KAKINUMA, A.; OACHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGINO, H.; ISANO, M.; TUMURA, O.; ARIMA, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, p. 669-1672, 1969.

KARANTH, N.G.R.; DEO, P.G.; VEENADING, N.K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science On Line**, v. 77, p. 116-126, 1999.

KIM, H. S. et al. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipids, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 40, p. 391-396, 2006.

LANG, S.; PHILP, J.C. Surface-active lipids in Rhodococci. **International Journal of General Molecular Microbiology**, v. 74, p. 59–70, 1998.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhaminose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 51p. 22-32, 1999.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. CAMPOS-TAKAKI, G.M. Produção de biossurfactante utilizando resíduos industriais como substratos de baixo custo. VI **Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental**, 2008.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 785-793, 2009.

MAKKAR R. S.; CAMEOTRA S. S. Biochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at thermophilic conditions. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 2, p. 371-376, 1999.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of uncoventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Micobiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., BANAT, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 1, 2011, p. 1-20.

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

MARCHANT, R., BANAT, I.M. **Biosurfactants**: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, 34, 2012, p. 1597-1605.

MARÇAL, M. do C.R. **Produção de biopolímeros por *Candida lipolytica* em meios suplementados por óleos vegetais (babaçu, côco e dendê)**. Recife, 1991. Dissertação (Mestrado em Nutrição): Universidade Federal de Pernambuco, 1991. 147f.

MARGESIN R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbon in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 650-663, 2002.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, J.; TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A**, v. 864, p. 211-220, 1999.

MAYER, R. M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agro industrial by products for biosurfactant production. **Journal of American Oil and Chemistry Society**. v. 71, p. 61-64, 1994..

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M. N. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 822-832, 2001.

MONTEIRO, S. A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J. A.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.

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

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

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

MULLIGAN, C.N.; WANG, S.; Remediation of a heavy metal contaminated soil by a rhamnolipid foam. In: **Geoenvironmental engineering. Integrated management of groundwater and contaminated land**. London: Thomas Telford; p. 544-51, 2004.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T,K.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736-747, 2008

MÜLLER, M.M., KÜGLERA, J.H., HENKEL, M., GERLITZKI, M., HÖRMANN, B., PÖHNLEIN, M., SYLDATK, C., HAUSMANN, R., Rhamnolipids-Next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**. 162, 2012, p. 366-380.

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

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 1-2, 2004.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 336-341, 2006.

NOAH, K.S.; Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 465-473, 2005.

PACWA-PLOCINICZAK, M., PLAZA, G.A., PIOTROWSKA-SEGET, S., CAMEOTRA, S.S. Environmental Applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Science**. 12, 2011, p. 633-654.

PANDEY, A.; SOCCOL C. R.; MITCHEL D. A. New developments in solid-state fermentation: I – bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PATTANATH, K. M.; RAHMAN, K. S.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants – review. **Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 360-370, 2008.

PERFUMO, A., SMYTH, T.J.P., MERCHANT, R., BANAT, I.M. Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. In: **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Ed Timmis, K.N. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, p.1501-1512.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactante utilizando hidrocarbonetos**. Rio Claro, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2006.

PRICE, N.P.J.; RAY, K.J.; VERMILLION, K.; KUO, T-M. MALDI-TOF mass spectrometry of naturally occurring mixtures of monorhamnolipids and dirhamnolipids. **Carbohydrate Research**.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MERCHANT, R.; BANAT, I. M. ; Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials, **Biotechnology Progress**. v. 18, 2002, p. 1277-1281.

RAHMAN, K.S.M.; STREET, G.; LORD, R.; KANE, G.; RHAMAN, T.J.; MERCHANT, R.; BANAT, I.M. Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with biosurfactant. In: **Environmental Bioremediation Technologies**. Eds. SINGH, S.N.; TRIPATHI, R.D., Springer Publication, 2006, p. 391-408.

RAHMAN, P.K. S. M.; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants – review. **Biotechnology**, v. 7, p. 360-370, 2008.

REILING, H.E.E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. A pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, 1986, p. 985-989.

RODRIGUES L.; MOLDES A.; TEIXEIRA J.; OLIVEIRA R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bactéria. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, 2006, p. 135-142.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation, **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, 2002, p. 249-252.

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

ROSENBERG; E.; RON, E.Z. High- and low molacular mass antimicrobial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.

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, 2007, p. 729-734.

RUFINO, R.D., SARUBBO, L.A., BENICIO, B.N.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Experimental design for the production of tensio-active agent by *Candida lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, 2008, p. 907-914.

SAEKI, H.; SASAKI, KM.; KOMATSU, O.; MIURA, A.; MATSUDA, H. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 572-577.

SAPTURE, S. K. et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, 2010, p. 436-458.

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

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, 2006, p. 400-406.

SARUBBO, L.A., MARÇAL, M. C. R., CAMPOS-TAKAKI, G. M. Comparative study of bioemulsifiers production by *Candida lipolytica* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 40, 1997, p. 707-720.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial eor. **Process In Energy and Combustion Science**, v. 34, 2008, p. 714-724.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, 2005, p. 2953-2958.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v.3, 2008, p.123-133.

SHAH, V.; JURJERVIC, M.; BADIA, D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production. **Biotechnology Progress**, v. 23, 2007, p. 512-515.

SILVA, S. N. R. L. et al. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *pseudomonas aeruginosas* ucp 0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2010, p. 1-11.

SILVA, S. N. R. L., SANTOS, D. K. F., SILVA, A. F., FARIAS, C. B. B., LUNA, J. M., CAMPOS-TAKAKI, G. M., SARUBBO, L. A. Glicerina como substrato alternativo para produção de biossurfactantes In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Rio Claro, SP. **Holos Environment**, 2009.

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

SMYTH, T. J.; PERFUMO, P. A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: TIMMIS, K. N. (ed.),

Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, p. 3705-3723.

SOBRINHO, H.B.S., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SALGUEIRO, A.A., CAMPOSTAKAKI, G.M., LEITE, L.F.C. AND SARUBBO, L.A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, 2008, p. 912-917.

STANGUELLINI, M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants – their identify and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Disease**, v. 81, 1997, p. 4-12.

TORABIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S.A.; TEHRANI, H.A. Preparation and characterization of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae*. **Lebensm.-Wiss. u-Technology**, v. 29, 1996, p. 734-737.

VAN-HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, v.24, 2006, p.604-620.

VELIKONJA, J.; KOSARIC, N. Biosurfactant in food application. In: **Biosurfactants: production properties, applications**. Ed. KOSARIC, N., Marcel Dekker Inc., New York, 1993, p. 419-446.

VOLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surfaceactive di-, tri- and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *T. sukamurella* spec. **Fett/LIPID**. v. 101, 1999, p. 389-394.

ZINJARDE, S. S.; PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of basic Microbiology**, v. 42, n. 1, 2002, p. 67-73.

CAPÍTULO 2

Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil

Elias J. Silva^{a,c}, Nathália Maria P. Rocha e Silva^b Raquel D. Rufino^b, Juliana M. Luna^b, Ricardo O. Silva^c, Leonie A. Sarubbo^{b,*}

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

^b*Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brazil*

^c*Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil, CEP: 50670-901.*

* *Corresponding author. Tel.: +55 81 21194048; fax: +55 81 21194043.*

E-mail address: *leonie@unicap.br (L. Sarubbo)*

Abstract

The bacterium *Pseudomonas cepacia* CCT6659 cultivated with 2% soybean waste frying oil and 2% corn steep liquor as substrates produced a biosurfactant with potential application in the bioremediation of soils. The biosurfactant was classified as an anionic biomolecule composed of 75% lipids and 25% carbohydrates. Characterization by proton nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR) revealed the presence of carbonyl, olefinic and aliphatic groups, with typical spectra of lipids. Four sets of biodegradation experiments were carried out with soil contaminated by hydrophobic organic compounds amended with molasses in the presence of an indigenous consortium, as follows: Set 1 – soil + bacterial cells; Set 2 – soil + biosurfactant; Set 3 – soil + bacterial cells + biosurfactant; and Set 4 – soil without bacterial cells or biosurfactant (control). Significant oil biodegradation activity (83%) occurred in the first ten days of the experiments when the biosurfactant and bacterial cells were used together (Set 3), while maximum degradation of the organic compounds (above 95%) was found in Sets 1, 2 and 3 between 35 and 60 days. It is evident from the results that the biosurfactant alone and its producer species are both capable of promoting biodegradation to a large extent.

Keywords: biosurfactant, biodegradation, *Pseudomonas*, hydrophobic organic compounds, industrial residues.

1. Introduction

Environmental pollution caused by petroleum and its derivatives, such as diesel fuel, heavy oil, gasoline, fuel residues, mineral oil and engine oil, is an issue of the utmost importance regarding both economic development and ecological restoration. Considerable amounts of petroleum products contaminate groundwater and soil as a consequence of leaks and spills from petroleum refinery processes, oil transportation and storage tanks. While contamination is caused by accidents in some cases, it is often the result of negligent disposal [1].

Bioremediation is used for the degradation of hydrophobic organic compounds (HOCs) in contaminated soil and water due to its environmental and economic advantages over other physicochemical remediation methods, such as low temperature thermal desorption [2], incineration, photodegradation [3] and phytoremediation [4,5,6,7]. In this process, pollutants are mainly degraded by microorganisms or specific enzymes in solutions in which contaminants are available for microbial action [8,9,10]. However, the hydrophobicity and low degree of aqueous solubility of most HOCs often result in very slow, frequently unsatisfactory biodegradation. Therefore, overcoming the limited accessibility of these hydrophobic pollutants to microbes or enzymes is a pivotal issue in bioremediation processes [11].

To date, the main approach for enhancing the bioavailability of HOCs is the use of synthetic or natural surfactants [9,12,13,14,15], which promote the solubility of HOCs and improve the biodegradation process [11]. Biosurfactants are surface-active compounds produced by microorganisms and are characterized as organic molecules containing a hydrophobic portion and a hydrophilic portion, allowing these

substances to act at the interface of different compounds [16]. Biosurfactants are classified based on their chemical composition as glycolipids, lipopolysaccharides, oligosaccharides or lipopeptides and are produced by diverse bacterial genera [17,18].

The chemical and structural analysis of biosurfactants can be carried out using a broad range of techniques ranging from simple colorimetric assays to sophisticated mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. The method used greatly depends on the amount of information that is required. An experimental procedure should be based on the following key steps: 1) extraction of biosurfactant from the culture medium; 2) detection; 3) purification and separation of the crude product; and 4) structural analysis through the use of high-performance liquid chromatography, MS and/or NMR. Information from the analysis allows the optimization of production yields and the assembly of glycolipids with different structural characteristics. Therefore, the ability to drive production in a certain direction allows microbiologists to produce different types of glycolipids depending on the biological activity required, such as a reduction in surface tension [19].

Biosurfactants have received considerable attention in the field of environmental remediation processes. These substances influence such processes due to their efficacy as dispersion and remediation agents as well as their environmentally friendly characteristics, such as low toxicity and high biodegradability [20,21,22]. Despite these important advantages, biosurfactants have not yet been employed extensively in industry due to their relatively high production cost. One strategy for reducing this cost is the use of alternative substrates, such as agroindustrial wastes [23].

In the present study, soybean waste frying oil and corn steep liquor were used as cheap substrates for biosurfactant production. The biosurfactant produced from *Pseudomonas cepacia* was characterized and its HOC biodegradation potential was investigated in contaminated soil.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All chemicals were of reagent grade. Growth media were purchased from Difco Laboratories (USA). Soybean waste frying oil was obtained from a local restaurant in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil, stored according to the supplier's recommendations and used without any further processing. Corn steep liquor was obtained from "Corn Products do Brasil" in the municipality of Cabo de Santo Agostinho, state of Pernambuco, Brazil.

2.2. Soil

Soil contaminated with HOCs was used in the experiments. The soil was collected from old underground oil reservoirs located in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil. Soil samples (1 Kg) were homogenized and left to stand at room temperature for subsequent use.

2.3. *Bacterial strain and preparation of seed culture*

A strain of *P. cepacia* CCT669 was obtained from the culture collection of the André Tosello Research and Technology Foundation in the city of Campinas, state of São Paulo, Brazil. The cultures were maintained on nutrient agar slants at 4 °C. For pre-culture, the strain from a 24-h culture on nutrient agar was transferred to 50 ml of nutrient broth to prepare the seed culture. The cultivation conditions for the seed culture were 28 °C, 150 rpm and 10 to 14 h of incubation.

2.4. *Fermentation media*

The components of the production medium were dissolved in a mineral medium containing 0.2% NaNO₃, 0.05% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄.7H₂O, 0.01% KCl and 0.001% FeSO₄.7H₂O. The pH was adjusted to 7.0 by 1.0 M HCl. Two percent canola waste frying oil and 2% corn steep liquor were added. Two percent aliquots (v/v) of the cell suspension (0.7 optical density at 600 nm), corresponding to an inoculum of 10⁷ CFU/ml, were used to inoculate 500-ml Erlenmeyer beakers containing 100 ml of sterile production medium. Cultivation was carried out at 27 °C with agitation at 200 rpm for 120 h in a Marconi MA832 shaker (Marconi LTDA, Brazil). No pH adjustment was performed during cultivation. At the end of fermentation, samples were taken from the liquid culture to determine the surface tension.

2.5. *Determination of surface tension*

Changes in surface tension were determined in the cell-free broth obtained by centrifuging the cultures at 5000 x g for 20 min. Surface tension was determined using a Sigma 70 Tensiometer (KSV Instruments LTD - Finland) at room temperature. Tensiometers determine the surface tension with the aid of an optimally wettable ring suspended from a precision scale. With the ring method, the liquid is raised until contact with the surface is registered. The sample is then lowered again so that the film produced beneath the liquid is stretched for the determination of maximum force, which is used to calculate the surface tension. The instrument was calibrated against Mill-Q-4 ultrapure distilled water (Millipore, Illinois, USA). Prior to use, the platinum plate and all glassware were sequentially washed with chromic acid, deionised water and acetone and flamed with a Bunsen burner.

2.6. *Biosurfactant isolation*

The biosurfactant was extracted from the culture media after cell removal by centrifugation at 5000 x g for 30 min. The supernatant pH was adjusted to 2.0 with HCl 6.0 M and an equal volume of CHCl₃/CH₃OH (2:1) was added. The mixture was vigorously shaken for 15 min and allowed to set until phase separation. The organic phase was removed and the operation was repeated twice. The product was concentrated from the pooled organic phases using a rotary evaporator. The viscous yellowish product was dissolved in methanol and concentrated again by evaporation of the solvent at 45 °C [24]. The resulting residue was freeze dried. Partially purified

freeze-dried biosurfactant was used in the subsequent analyses and biodegradation experiments.

2.7. *Biosurfactant composition*

Protein concentration in the isolated biosurfactant was estimated using a total protein test kit (Labtest Diagnostica S.A., Brazil). Total carbohydrate content was estimated using the phenol-sulfuric acid method [25]. Lipid content was determined based on the method described by Manocha et al. [26]: 0.5 g of the isolated material was extracted with different proportions of chloroform:methanol (1:1 and 1:2, v/v). The organic extracts were then evaporated in a vacuum and the lipid content was determined by gravimetric estimation.

2.8. *Determination of ionic nature of biosurfactant*

The ionic charge of the biosurfactant was determined using the agar double diffusion method [27]. Two regularly spaced rows of wells were made in agar with a low degree of hardness (1% agar). The wells in one row were filled with the biosurfactant solution and the wells in the other row were filled a pure compound of known ionic charge. The anionic substance chosen was sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 mM and the cationic substance was barium chloride 50 mM. The appearance of precipitation lines between the wells, indicative of the ionic nature of the biosurfactant, was monitored over a 48-h period at room temperature.

2.9. Biosurfactant characterization using thin-layer chromatography

After isolation of the biosurfactant, a 0.1-g sample was dissolved in methanol and analyzed using thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates (G60; Merck, Germany). Chromatograms were developed with chloroform:methanol:acetic acid (65:15:2, v/v) and detection was performed as follows: 1) exposure to iodine vapor for lipid stains; 2) exposure to the Molish reagent for sugar detection; and 3) exposure to 1% ninhydrin solution for free amino groups. The reagents were sprayed and the plates were heated at 110 °C for 30 to 40 min until the appearance of the respective colors [28,29].

2.10. Biosurfactant characterization using Nuclear Magnetic Resonance

All NMR experiments were performed with a VNMR400 spectrometer (Varian, Palo Alto, USA) operating at 400.0 and 100.0 MHz for the ^1H and ^{13}C nucleus, respectively. The biosurfactant was dissolved in CD_3OD . The residual signal of the solvent (^1H 3.31 ppm) and the signal of the methyl group (^{13}C 49.0 ppm) were used as reference for the chemical shift to ^1H and ^{13}C NMR spectra, respectively. To assess microbial action, the organic phase of the samples was extracted with CDCl_3 and the residual signal of the solvent (^1H 7.26 ppm) was used as reference. Spectra were determined with a PFG 5 mm probe, pulse of RF equivalent at 45°, an acquisition time of 3.2 s, delay of 1.0 s and 64 repetitions.

2.11. Evaluation of oil-degrading ability in contaminated soil

Samples of contaminated soil (10 g) were added to 100 mL of drinking water and the mixture was enriched with 1 mL of molasses. This mixture constituted the indigenous consortium. Then, 2% of the isolated biosurfactant and/or 1% of its microbial-producing species (previously cultivated in nutrient broth) were added and the medium was placed in a rotary shaker at 150 rpm and 28 °C for 60 days (Table 1). The experiments were performed in triplicate using 125-ml Erlenmeyer beakers. Samples of 5 mL were removed after 5, 10, 35, 45 and 60 days for HOC analysis by NMR.

Please insert Table 1

2.12. Analysis of hydrophobic organic compounds

The degradation of HOCs was determined by ^1H NMR spectroscopy. Soil samples of 3.0 mL were extracted with 700 μL of chloroform-d. The organic phase was transferred to the NMR tube and 1.12×10^{-5} mol of benzene (1.0 μL , 99%, $d = 0.88 \text{ g.mL}^{-1}$) was used as internal standard to estimate the variation in integration area under the signal between ^1H 0.0 and 2.8 ppm in the spectra. The percentage of degradation was estimated from the relationship between the integration area in the control and each sample collected, according with the following equation:

$$\% \text{ of degradation} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{set}}) \times 100}{A_{\text{control}}}$$

in which A_{control} and A_{set} are the relative areas under the signal in the control and set spectra. The area under the benzene signal ($\delta_{\text{H}} 7.4$ ppm) was maintained constant and equal to 100.

3. Results and Discussion

3.1. Biosurfactant characterization

The production of the biosurfactant from *P. cepacia* CCT6659 cultivated in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil as the carbon source and 2.0% corn steep liquor as the nitrogen source has been described. This biosurfactant is able to reduce the surface tension of the medium from 70 mN/m to 27.57 mN/m and showed application potential in the oil industry as a complement to remediation processes involving contaminated soil and water [30].

After fermentation for five days, the biosurfactant was isolated, the surface tension was verified and the biomolecule was subjected to characterization. The crude extract from *P. cepacia* appeared as a viscous, sticky, oily, brown residue. The biosurfactant was soluble in organic solvents, such as chloroform, methanol, hexane, ethylether and ethyl acetate. Agar double diffusion tests revealed precipitation lines between the biosurfactant produced by *P. cepacia* and the cationic compound used as reference (barium chloride), whereas no lines were formed between the biosurfactant and the anionic compound (SDS). Under the experimental conditions of the present study, this very simple test confirmed the anionic nature of the

biosurfactant. Biosurfactants produced from other species of the genus *Pseudomonas* have also been described as anionic using the same method [24, 27].

The biosurfactant extracted from the cell-free broth was analyzed using TLC and visualized with specific reagents. A spot was produced with a retention factor (Rf) of 0.9, which demonstrated positive reactions for sugars with Molish reagents and for lipids with iodine vapors, but negative reactions for amino groups with ninhydrin (Fig. 1). The presence of both glycosyl units and lipid moieties on the same spot suggests that the sample was a glycolipid. These results are similar to the profiles described for a biosurfactant from *P. aeruginosa* grown in glycerol, for which the Rf for rhamnolipids was 0.85 [24].

The chemical composition analyses of the biosurfactant produced by *P. cepacia* revealed the presence of 75% lipids and 25% carbohydrates, suggesting once again the glycolipid nature of the compound, as demonstrated by TLC. A minor fraction of protein was found in the samples, likely resulting from remaining culture media co-precipitated with the biosurfactant during the extraction process. According to the literature, most surfactants produced by species of *Pseudomonas* are glycolipids in nature [24,31,32].

Please insert Figure 1

Biosurfactants are generally macromolecules and it is not easy to determine their chemical structure, especially when these compounds are produced from industrial waste. However, the determination of the structural formula of these compounds is fundamental to increasing the production yield and designing of novel compounds with specific structural features.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is a powerful tool for structural elucidation, which is obtained in 1D and 2D experiments. In organic chemistry, the main tools for structural elucidation are ^1H and ^{13}C NMR spectra associated with 2D experiments, such as ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC and NOESY [33]. Other techniques also are used, such as mass spectrometry (MS), especially MALDI-TOF, and infrared spectroscopy [34,35]. However, NMR and MS are the more powerful. In the present study, NMR was used to identify the class of the biosurfactant produced and investigate the biodegradation of petroleum-derived compounds. Fig. 2 shows the ^{13}C NMR spectrum (Attached Proton Transfer – APT) of samples containing the biosurfactant.

Please insert Figure 2

The APT spectrum shows the signals as a function of the phase or the number of hydrogen nuclei bonded to carbon. CH_3 and CH nuclei have a positive phase, while CH_2 and C nuclei have a negative phase. Figure 1 shows three different regions: a) between 10.0 and 40.0 ppm, attributed to aliphatic groups; b) between 120.0 and 140.0 ppm, attributed to olefinic groups; and c) a signal at 177.5 ppm, attributed to the carbonyl group. Two signals with a positive phase were found in the aliphatic region and were therefore attributed to methyl groups. Moreover, a set of signals with a negative phase were attributed to methylene groups. All signals in the olefinic region had a positive phase and were attributed to CH groups.

Fig. 3 shows the ^1H NMR spectrum of the biosurfactant from *P. cepacia*, demonstrating two well-defined regions. The signals between 0.8 and 4.0 ppm and those between 5.0 and 6.0 ppm were attributed to aliphatic and olefinic groups,

respectively. The signals at 3.3 and 5.0 ppm were attributed to the residual signal of the solvent (methanol) and water.

Please insert Figure 3

^1H and ^{13}C NMR of the biosurfactant are typical spectra of lipids [36]. Therefore, the biosurfactant studied is mainly made up of lipids. This conclusion was corroborated by the TLC assays, which indicated that the biosurfactant was 75% lipids.

Microbial glycolipids consist of four major groups: rhamnolipids, sophorolipids, trehalose lipids and mannosylerythritol lipids. Extensive research has been carried out on rhamnolipids and sophorolipids. Most biosurfactants produced by *P. aeruginosa* strains are glycolipids [19]. However, a detailed structural analysis of the biosurfactant produced by the *P. cepacia* strain is needed to confirm its glycolipid nature. An MS analysis of the biosurfactant produced by *Lactobacillus delbrueckii* confirmed lipid and glycolipid moieties [23]. NMR analysis has also demonstrated that the novel isolate *Pseudozyma* sp. NII 08165 produced a glycolipid biosurfactant, which was a combination of all the three mannosylerythritol lipid isomers along with some unknown glycolipids [37].

3.2. Degradation of hydrophobic organic compounds

The oil in the soil was characterized as a complex mixture of aliphatic compounds. In the present study, only fractions of alkanes were determined. The initial sample characterization revealed approximately 100% aliphatic compounds.

According to Toledo et al. [38], the relative proportions of these fractions vary from oil to oil and the susceptibility of a specific oil to microbial degradation can be predicted from this composition. According to Mohamed et al. [39], the biodegradability of petroleum compounds follows a decreasing preferential order: n-alkanes > branched-chain alkanes > branched chain alkenes > monoaromatic > cycloalkanes > polyaromatic > asphaltenes. Fractions containing n-alkanes are usually more susceptible to biodegradation, whereas saturated fractions containing branched alkanes are less vulnerable to microbial attack [38].

One of the main factors affecting the biodegradation efficiency of complex oil compounds is the low availability of contaminants for microbial attack. Increasing substrate solubilization through the use of a biosurfactant is a way to enhance bioavailability and metabolism of contaminants. In the treatment of areas contaminated with complex compounds, which are difficult to degrade, it is both economically and environmentally advantageous to use indigenous microorganisms that exhibit degradation capacity together with a biosurfactant [40, 41]. Biosurfactants affect the biodegradation process by increasing the solubility and dispersion of the compound in one of two ways: increasing the surface area of the hydrophobic water-insoluble substrate or increasing the bioavailability of hydrophobic water-insoluble substances [42].

As the rate of natural attenuation is generally slow, measures are often adopted to speed up the removal of pollutants. The most widely used mechanism in bioremediation is the stimulation of indigenous microorganisms through the addition of carbon substrates and nutrients [43]. According to Teng et al. [44], indigenous soil microorganisms have some capacity to degrade hydrocarbons, but effectiveness is

limited and long periods of time are required. Thus, either carbon sources are added as cometabolic substrates or soil enzymatic activity is accelerated to enhance the bioremediation of soil contaminated with hydrocarbons. Su et al. [1] found that the biodegradation of motor oil by *P. aeruginosa* SU-1 was accelerated from 55.9% to 64.4% by adding yeast extract. In the present study, molasses was added to increase the rate of degradation of the HOCs in the soil. A laboratory-scale experiment of the biosurfactant-enhanced degradation of HOCs in the soil samples was conducted. Figure 4 displays the effects of the addition of the biosurfactant from *P. cepacia* alone and with cells of the bacterium in the biodegradation process.

Please insert Figure 4

After five and ten days of cultivation, the experiment performed in the presence of the biosurfactant and its producing species together (Set 3) was much more efficient than the experiments conducted in the presence of the biosurfactant alone (Set 2) or the bacterium cells alone (Set 1). However, the spectra obtained after 35, 45 and 60 days of cultivation indicated similar performance among the three conditions, demonstrating the efficiency of both the biosurfactant and its producing species in degrading high percentages of the HOCs adsorbed to the soil samples. These findings demonstrate the advantages of applying either the biosurfactant or *P. cepacia* cells to enhance the degradation rate of aliphatic compounds from petroleum derivatives.

Crude oil biodegradation experiments with a biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 grown in a medium containing 3% glucose resulted in

56% and 90% degradation on 9th and 27th days, respectively [45]. Cerqueira et al. [46] analyzed the biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons from petrochemical oily sludge in a liquid medium by a bacterial consortium and five pure bacterial cultures. The bacterial consortium demonstrated excellent degradation capacity, reducing 90.7% of the aliphatic fraction and 51.8% of the aromatic fraction of the oily sludge.

A biosurfactant from *Lactobacillus delbrueckii* cultured with peanut oil cake as the carbon source was tested in biodegradation experiments with crude oil. In agreement with the present findings, significant oil degradation occurred when the biosurfactant and bacterial cells were used together. The biosurfactant alone was also capable of promoting biodegradation to a large extent without added fertilizers [23].

3. Conclusions

The biosurfactant produced by *P. cepacia* in the presence of industrial wastes demonstrated potential for use in bioremediation processes. The findings demonstrate that this biosurfactant can be synthesized from low cost substrates, such as frying oil and corn steep liquor, for use in environmental applications. The addition of both the biosurfactant and bacterial cells of *P. cepacia* favored the biodegradation of hydrophobic organic compounds. As the insolubility of hydrocarbons decreases the efficiency and rate of degradation, this limitation can be overcome by either the addition of a surface active compound (surfactant) to the growth medium, thereby making hydrocarbons more water soluble and available for

cells to degrade, or by the addition of degrading microorganisms, such as *P. cepacia*. Biosurfactants also stimulate the catabolism of hydrocarbons through a co-metabolism process, as these organic compounds readily degradable by microorganisms. All these approaches can make the bioremediation process an economically and environmentally viable mitigation technology.

Acknowledgements

This study received funding from the Brazilian fostering agencies Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE), Thermoelectric of Pernambuco (TERMOPE), National Agency of Electric Energy (ANEEL), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES). The authors are grateful to the laboratories of the Center for Sciences and Technology of the *Universidade Católica de Pernambuco* and the Analytical Center of the *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil.

References

- [1] W-T. Su, B-S. Wu, W-J. Chen, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 42 (2011) 689.
- [2] P. R. D. Percin, J. Hazard. Mater. 40 (1995) 203.
- [3] W. Chu, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 421.
- [4] A. Lunney, B. Zeeb, K. Reimer, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 6147.
- [5] K.Y. Cheng, J.W.C. Wong, Chemosphere. 62 (2006) 1907.
- [6] J. Wong, M. Fang, Z. Zhao, B. Xing, J. Environ. Qual. 33 (2004) 2015.
- [7] J. White, R. Peters, J. Kelsey, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 2922.
- [8] H. Harms, T. Bosma, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18 (1997) 97.
- [9] H. Zhu, M.D. Aitken, Environ. Sci. Technol. 44 (2010) 7260.
- [10] Z. Zhao, A. Selvam, J.W.C. Wong, J. Hazard. Mater. 190 (2011) 345.
- [11] G. Zheng, A. S. Jonathan, W.C. Wong, Bioresource Technology. 126 (2012) 397.
- [12] G. Walters, M. Aitken, Water Environ. Res. 73 (2001) 15.
- [13] H.S. Kim, W.J. Weber, Environ. Sci. Technol. 37(2003) 3574.
- [14] R. Kommalapati, K. Valsaraj, W. Constant, D. Roy, Water Res. 31 (1997) 2161.
- [15] C. N. Mulligan, Environ. Pollut. 133 (2005) 183.
- [16] V.S. Cerqueira, J.A.V. Costa, Química Nova 32 (2009) 394.
- [17] A. Franzetti, E. Tamburini, I.M Banat, In: R. Sen (Ed.), Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 672, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010, p. 121.
- [18] I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M.G. Martinotti, L. Fracchia, T.J. Smyth, R. Marchant, Appl. Microbiol. Biotechnol. 87 (2010) 427.

- [19] T.J.P. Smyth, A. Perfumo, R. Marchant, I.M. Banat, In: K.N. Timmis (Ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, p. 3705.
- [20] C. Sivapathasekaran, S. Mukherjee, A. Ray, A. Gupta, R. Sen, Bioresour. Technol. 101 (2010) 2884.
- [21] S.G. Kiran, T.A. Thomas, J. Selvin, B. Sabarathnam, A.P. Lipton, Bioresour. Technol. 101 (2010) 2389.
- [22] S.K. Satpute, I.M. Banat, P.K. Dhakephalkar, A.G. Banpurkar, B.A. Chopade, Biotechnol. Adv. 28 (2010) 436.
- [23] R. Thavasi, S. Jayalakshmi, I. M. Banat, Biores. Technol. 102 (2011) 3366.
- [24] S.N.R.L. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, Colloids Surf. B: Biointerf. 79 (2010) 174.
- [25] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Anal. Chem. 28 (1956) 350.
- [26] M.S. Manocha, G. San-Blas, S. Centeno, J. Gen. Microbiol. 117 (1980) 147.
- [27] T. Meylheuc, C. J. Van Oss, M. N. Bellon-fontaine, J. Appl. Microbiol. 91 (2001) 822.
- [28] M. Deshpande, L. Daniels, Biores. Technol. 54(1995) 143.
- [29] A.S. Santos, A.P.W. Sampaio, G.S. Vasquez, L.M.S. Anna, N. Pereira Jr, D.M.G Freire, Appl. Biochem. Biotechnol. 98 (2002) 1025.
- [30] N. M. P. Rocha e Silva, R. D. Rufino, J. M. Luna, V. A. Santos, L. A. Sarubbo, Biocatal. Agric. Biotechnol. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005> .
- [31] E. Haba, M.J. Espuny, M. Busquets, A. Manresa, J. Appl. Microbiol. 88 (2000) 379.

- [32] A. S. Monteiro, G. L. Sasaki, L. M. de Souza, J. A. Meira, J. M. de Araújo, D. A. Mitchell, L.P. Ramosa, N Krieger. *Chemi. Phys. Lip.* 147 (2007) 1.
- [33] R. O. Silva, R. A. W. Neves Filho, R. Azevedo, R. M.; Srivastava, H. Gallardo, *Struct. Chem.* 21 (2010b) 485.
- [34] M. Hashimoto, F. Kirikae, T. Dohi, S. Adachi, S. Kusumoto, Y. Suda, T. Fujita, H. Naoki, T. Kirikae, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 3715.
- [35] M. Rao, G. Muralikrishna, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2457.
- [36] E. Falch, T. R. Storseth, M. Aursand, *Chem. Phys. Lipids.* 147 (2007) 46.
- [37] K.V. Sajna, R.K. Sukumaran, H. Jayamurthy, K.K. Reddy, S. Kanjilal, R.B.N. Prasad, A. Pandey, *Biochem. Eng. J.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.014>
- [38] F.L. Toledo, C. Calvo, B. Rodelas, J. González-Lopez, *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (2006) 244.
- [39] M.E. Mohamed, M. Al-Dousary, R.Y Hamzah, G. Fuchs, *Int. Biodeter. Biodegr.* 58 (2006) 213.
- [40] A. M. Abalos, J. Vinas, M.A. Sabate. M.A.M. Solanas, *Biodegr.* 15 (2004) 249.
- [41] S.S. Cameotra, P. Singh, *Int. Biodeter. Biodegr.* 62(2008) 274.
- [42] Desai, I.M. Banat, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 47.
- [43] R. Margesin, F. Schinner, *Extremophiles.* 5 (2001) 73.
- [44] Y. Teng, Y. Lou, M. Sun, Z. Liu, Z. Li, P. Christie, *Biores. Technol.* 101 (2010) 3437.
- [45] V. V. Jadhav, A. Yadav, S.Y. Shouche, S. Aphale, A. Moghe, S. Pillai, A. Arora, R. K. Bhadekar. *Desalination.* 318 (2013) 64.

[46] V. S. Cerqueira, E. B. Hollenbach, F. Maboni, M. H. Vainstein, F. A.O. Camargo, M. do C. R. Peralba, F. M. Bento. *Biores. Technol.* 102 (2011) 11003–11010.

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Biosurfactant components detected by thin layer chromatography; the samples were applied in 20 μl volumes in TLC plates and developed with a $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_3\text{COOH}$ (65:15:2, v/v) solvent system

Fig. 2. ^{13}C NMR spectrum (APT, CD_3OD , 100 MHz) of the biosurfactant from *P. cepacia* CCT6659 grown in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil and 2.0% corn steep liquor

Fig. 3. ^1H NMR spectrum (CD_3OD , 300 MHz) of biosurfactant from *P.cepacia* CCT6659 grown in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil and 2.0% corn steep liquor

Fig. 4. Percentage of HOCs degradation from ^1H NMR spectra data. Set 1 – soil + *P. cepacia* cells; Set 2 –soil + *P. cepacia* biosurfactant; Set 3 – soil + *P. cepacia* cells + *P. cepacia* biosurfactant. SD of 0.50

Table 1

Formulated mixtures for HOCs biodegradation experiments in soil

Experiment	Composition
Set 1	Contaminated soil + <i>P. cepacia</i> cells
Set 2	Contaminated soil + <i>P. cepacia</i> biosurfactant
Set 3	Contaminated soil + <i>P. cepacia</i> biosurfactant + <i>P. cepacia</i> cells
Set 4	Contaminated soil (control)

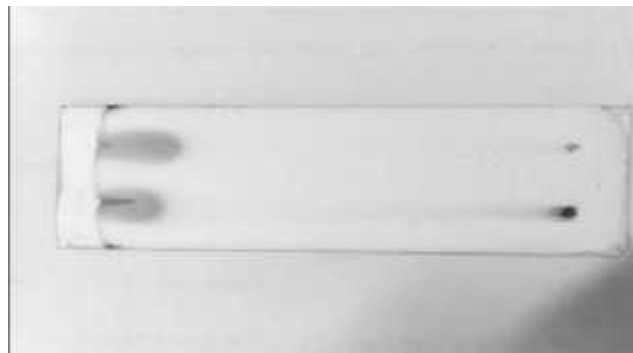


Figure 1

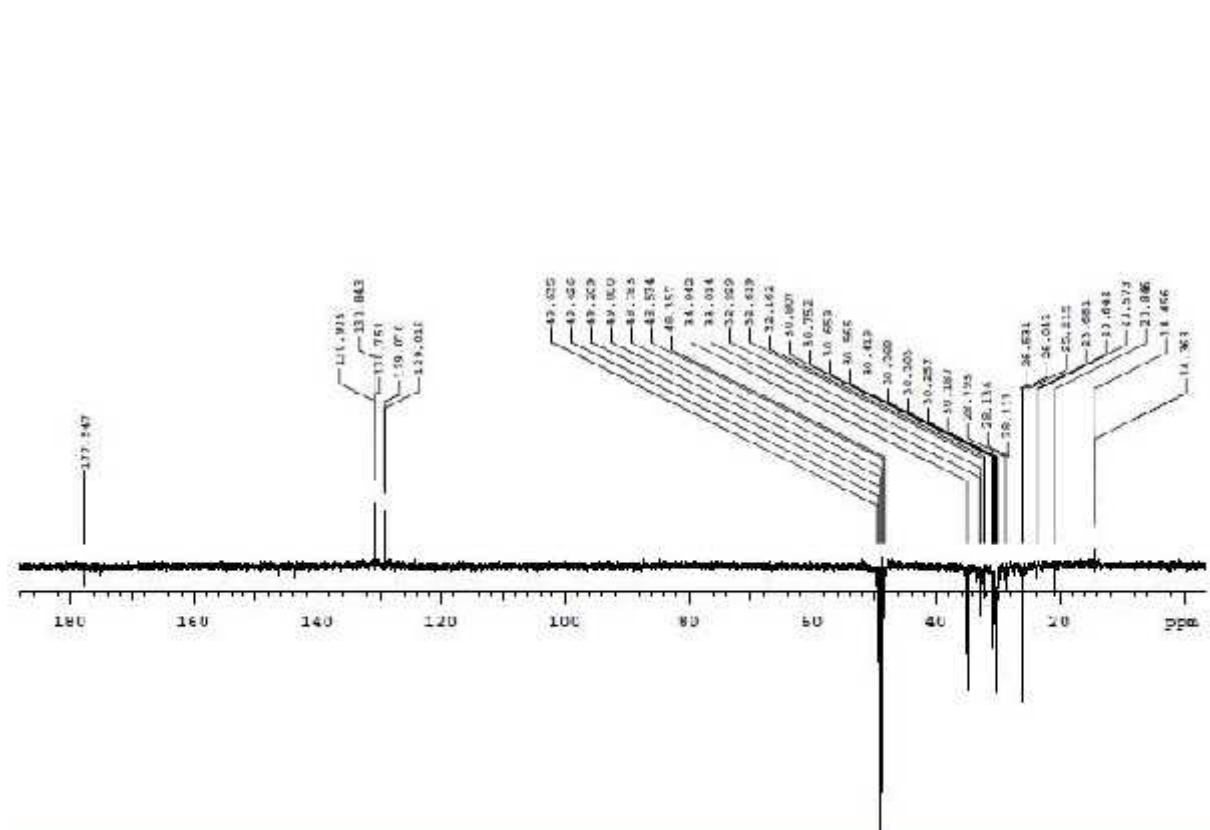


Figure 2

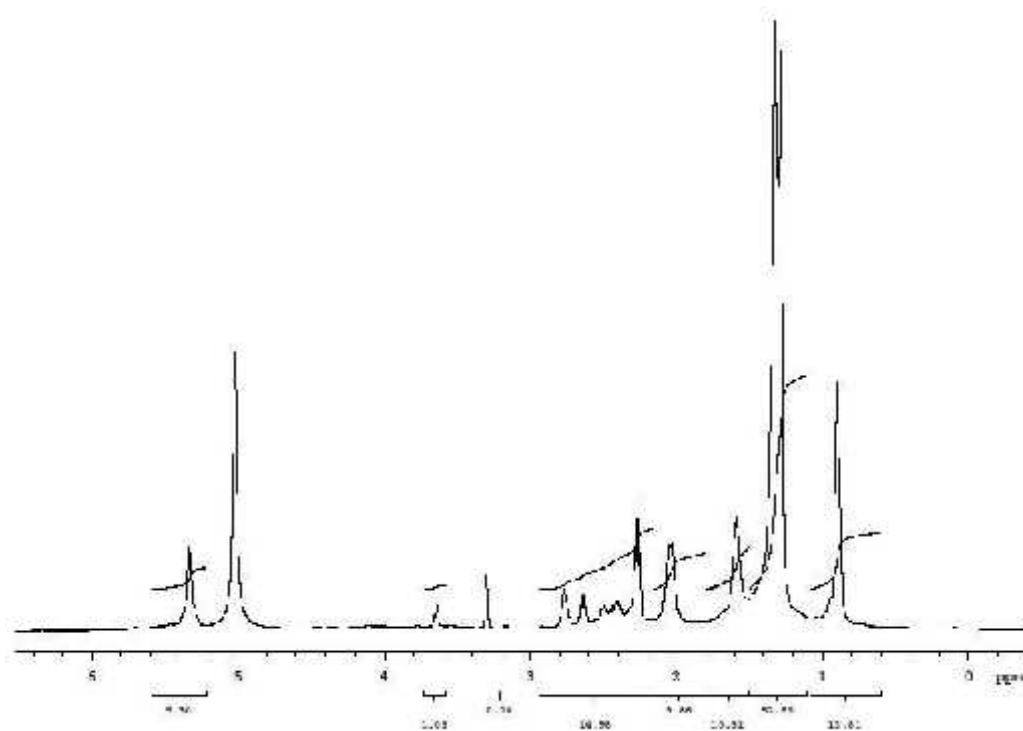


Figure 3

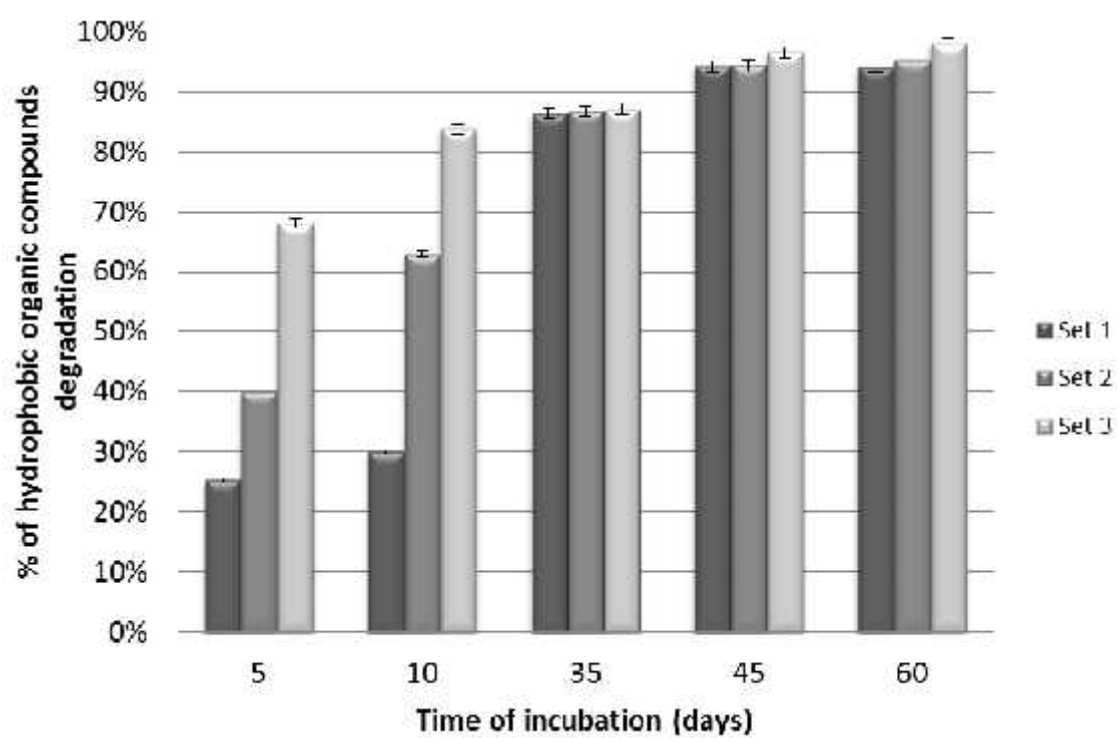


Figure 4

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados permitem as seguintes conclusões:

- A *Pseudomonas cepacia* CCT6659 apresenta grande potencial como microrganismo produtor de compostos com atividades surfactante a partir do uso de resíduos industriais como substratos.
- Os resultados de caracterização obtidos a partir da Cromatografia em Camada Delgada e da Ressonância Magnética Nuclear como técnicas de identificação comprovam a eficiência do uso concomitante de uma técnica mais simples e outra de refinada na identificação de biomoléculas surfactantes.
- A caracterização do biossurfactante sugere uma estrutura glicolipídica, a exemplo das estruturas dos surfactantes produzidos por outras espécies de *Pseudomonas*.
- O biossurfactante produzido pela *P. cepacia* apresenta potencial como coadjuvante dos processos de remediação de solos contaminados com compostos orgânicos hidrofóbicos.
- O biossurfactante produzido pela *P. cepacia* não apresenta efeito inibidor sobre os microrganismos autóctones nas condições estudadas nesse trabalho.
- A bactéria *P. cepacia* apresenta potencial de aplicação como micro-organismo degradador de compostos orgânicos hidrofóbicos adsorvidos em solos.
- O uso concomitante do biossurfactante e de seu micro-organismo produtor apresenta-se como uma alternativa para reduzir o tempo de degradação de compostos orgânicos hidrofóbicos adsorvidos em solos.

ANEXOS

Characterization of biosurfactant produced from industrial wastes by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 and application in biodegradation of hydrophobic compounds in soil

Elias J. Silva^{a,c}, Nathália Maria P. Rocha e Silva^b, Raquel D. Rufino^b, Juliana M. Luna^b, Ricardo O. Silva^c, Leonie A. Sarubbo^b

SUPPLEMENTARY DATA

The figures 1S-5S present ¹H NMR spectra of samples of the experiments as function of time of incubation.

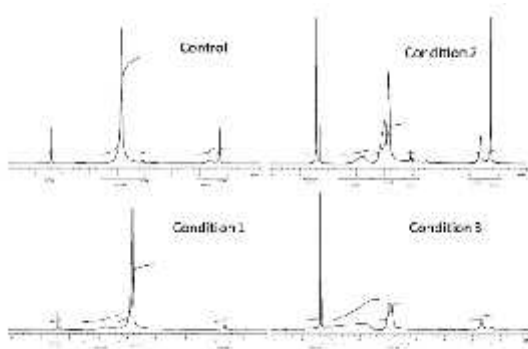


Figure 1S – ¹H NMR spectra (CDCl₃, 400 MHz) of sets 1-4 after five days of incubation

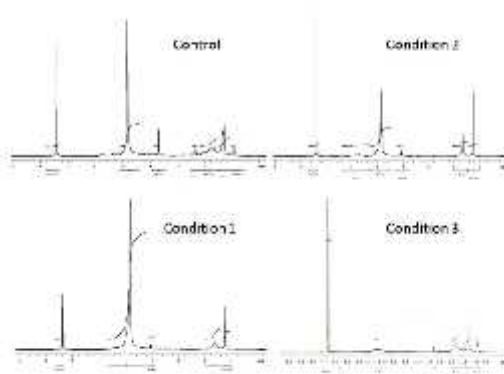


Figure 2S – ¹H NMR spectra (CDCl₃, 400 MHz) of sets 1-4 after ten days of incubation

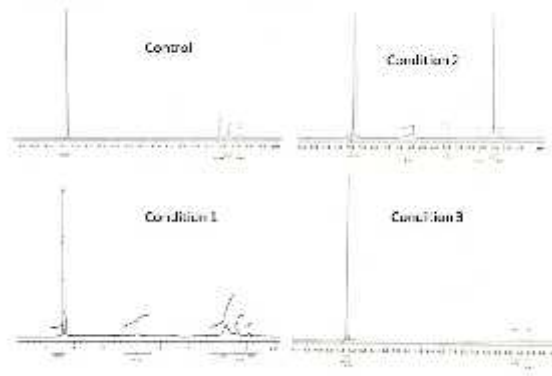


Figure 3S – ^1H NMR spectra (CDCl_3 , 400 MHz) of sets 1-4 after thirty five days of incubation

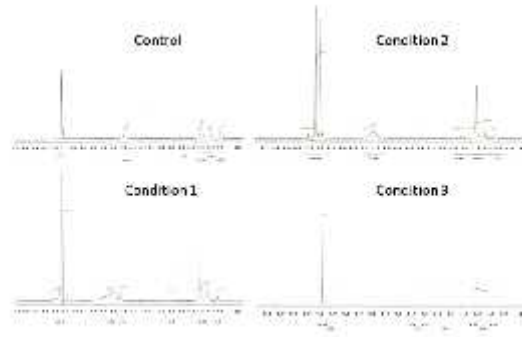


Figure 4S – ^1H NMR spectra (CDCl_3 , 400 MHz) of sets 1-4 after forty five days of incubation

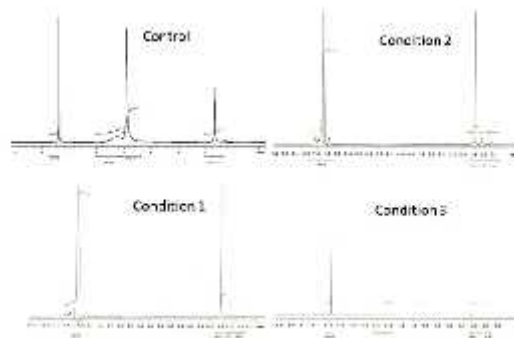


Figure 5S – ^1H NMR spectra (CDCl_3 , 400 MHz) of sets 1-4 after sixty days of incubation

Colloids and Surfaces B:

Biointerfaces



Introduction

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces is an international journal devoted to fundamental and applied research on colloid and interfacial phenomena in relation to systems of biological origin, having particular relevance to the medical, pharmaceutical, biotechnological, food and cosmetic fields. The objective of the journal is to cover all aspects of biointerfaces. Therefore contributions from both biological and physical scientists are strongly encouraged.

Examples of targeted topics are:

- Surface properties of materials of both synthetic and biological origin in relation to biological interactions.
- Adsorption of surfactants, proteins and other biopolymers, bacteria and mammalian cells.
- Cell-cell interactions and membrane fusion.
- Diffusion and transport in membranes and vesicles.
- Biopolymer and cell immobilization.
- Biofouling of surfaces.
- Biosurfactants and biopolymers: synthesis, surface activity, aggregation, solubilization, phase behaviour.
- Colloidal drug carriers, including nanoparticles, nanocapsules, liposomes, microspheres, microcapsules: drug diffusion, drug release kinetics, interactions of drugs and carrier materials.

Papers on the use of experimental methods such as X-ray diffraction, ellipsometry; scanning probe microscopes (STM, AFM), electron microscopy, light scattering techniques, XPS, FTIR, NMR, and other methods for the study of rapid reactions (temperature jump, stopped flow, time-resolved fluorescence) and their application to biological problems of an interfacial nature will also be included.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces publishes regular research papers, reviews, short communications and invited perspective articles, called *BioInterface Perspectives*. The *BioInterface Perspectives* provide researchers the opportunity to review their own work, as well as provide insight into the work of others that inspired and influenced the author. As a guideline, reviews should have a length of approximately 3500 words (about 3 - 4 printed pages).



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and

<http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>;

EC Directive 86/609/EEC for animal experiments

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm;

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals

<http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>.

This must be stated at an appropriate point in the article

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also

⇒ <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see ⇒ <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting

services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

For submitting your manuscript to Colloids and Surfaces B: Biointerfaces please go to our Elsevier Editorial System (EES) Website at: <http://ees.elsevier.com/colsub/>.

Referees

Upon submission, the author is obliged to suggest 5 reviewers who are not an Editor or an Editorial Board member. To the Editors' discretion manuscripts may be immediately rejected without review, when such manuscript falls outside the scope of the journal, or when the English language is not of appropriate level.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not

use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or

uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be no longer than 250 words

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

The use of nomenclature and symbols adopted by IUPAC is recommended (Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry, Blackwell Scientific, Oxford, 1988).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text)

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference Style

1. All references made to publications in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the information given in the text is exactly the same as that given in the reference list.

References to the literature should be made according to the numerical system described below.

2. In the text refer to the subject or to the author's name (without initial), followed by the reference number in square brackets.

3. If reference is made in the text to publications written by more than two authors, the name of the first author should be used, followed by "et al.". Note that in the reference list the names of authors and co-authors should be given in full.

4. References should be arranged in the order in which they appear in the text.

5. Use the following system for arranging the references:

(i) For journals N. Levy, N. Garti and S. Margdassi, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 97 (1995) 91

(ii) For monographs B.E. Conway, *Ionic Hydration in Chemistry and Biophysics*, Elsevier, Amsterdam, 1981.

(iii) For edited books R.D. Thomas, in E. Buncl and J.R. Jones (Eds.), *Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1991, Chapter

7.

For conference proceedings, symposia etc. A.G. Marshall, in P.G. Kistemaker and N.M.M. Nibbering (Eds.), *Advances in Mass Spectrometry*, Proc. 12th International Mass

Spectrometry Conference, Amsterdam, 26-30 August 1991, Elsevier, Amsterdam, 1992, p. 37.6.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the Chemical Abstract Service (Bibliographic Guide for Editors and Authors, The American Chemical Society, Washington, DC, 1974). If the correct abbreviation is not known, the title should be given in full.

7. Reference to a personal communication should be followed by the year, e.g. A.N. Other, personal communication, 1989. **Journal abbreviations source** Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations:

⇒ <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): ⇒ <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ⇒ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at ⇒ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.]

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. **Ensure that the following items are present:**

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at

<http://epsupport.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes.

Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from

⇒ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

⇒ <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

<https://webmail.unicap.br/h/printmessage?id=20036&tz=America/Argen...>

Zimbra

leonie@unicap.br

Qua, 16 de janeiro de 2014 13:20

Submission Confirmation for: COLSUB-D-13-01985R1

De : Colloids and Surfaces B

<esubmissionsupport@elsevier.com>

Remetente : ees colsub 0 25d6f4 ae5fe91c

<ees.colsub.0.25d6f4.ae5fe91c@eesmail.elsevier.com>

Assunto : Confirmation of Submission

Para : leonie@unicap.br, leonie@terra.com.br

Ms. Ref. No.: COLSUB-D-13-01985R1

Title: Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Dear Sarubbo,

Your revised manuscript has been received for reconsideration for publication in Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.

You may check the status of your manuscript by logging onto the Elsevier Editorial System of the journal as an Author. at

JOURNAL_URL%

Your username is: leonie@unicap.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/COLSUB/automail_query.asp

For further assistance, please visit our customer support site at

<http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Yours sincerely,

Elsevier Editorial System

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces



Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil



Elias J. Silva^{a,c}, Nathália Maria P. Rocha e Silva^{b,c}, Raquel D. Rufino^{b,c}, Juliana M. Luna^{b,c}, Ricardo O. Silva^d, Leonie A. Sarubbo^{b,c,*}

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

^b Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900 Recife, PE, Brazil

^c Centro de Gestão de Tecnologia e Inovação (CGTI), Rua da Praia, n.11, São José, CEP: 50000-000, Recife, PE, Brazil

^d Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235—Cidade Universitária, CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2013

Received in revised form 6 February 2014

Accepted 7 February 2014

Available online 17 February 2014

Keywords:

Biosurfactant

Biodegradation

Pseudomonas

Hydrophobic organic compounds

Industrial residues

ABSTRACT

The bacterium *Pseudomonas cepacia* CCT6659 cultivated with 2% soybean waste frying oil and 2% corn steep liquor as substrates produced a biosurfactant with potential application in the bioremediation of soils. The biosurfactant was classified as an anionic biomolecule composed of 75% lipids and 25% carbohydrates. Characterization by proton nuclear magnetic resonance (¹H and ¹³C NMR) revealed the presence of carbonyl, olefinic and aliphatic groups, with typical spectra of lipids. Four sets of biodegradation experiments were carried out with soil contaminated by hydrophobic organic compounds amended with molasses in the presence of an indigenous consortium, as follows: Set 1—soil + bacterial cells; Set 2—soil + biosurfactant; Set 3—soil + bacterial cells + biosurfactant; and Set 4—soil without bacterial cells or biosurfactant (control). Significant oil biodegradation activity (83%) occurred in the first 10 days of the experiments when the biosurfactant and bacterial cells were used together (Set 3), while maximum degradation of the organic compounds (above 95%) was found in Sets 1–3 between 35 and 60 days. It is evident from the results that the biosurfactant alone and its producer species are both capable of promoting biodegradation to a large extent.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Environmental pollution caused by petroleum and its derivatives, such as diesel fuel, heavy oil, gasoline, fuel residues, mineral oil and engine oil, is an issue of the utmost importance regarding both economic development and ecological restoration. Considerable amounts of petroleum products contaminate groundwater and soil as a consequence of leaks and spills from petroleum refinery processes, oil transportation and storage tanks. While contamination is caused by accidents in some cases, it is often the result of negligent disposal [1].

* Corresponding author's at: Universidade Católica de Pernambuco, Centro de Ciências e Tecnologia, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900 Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 21194084; fax: +55 81 21194000.

E-mail addresses: leonie@unicap.br, leonie@terra.com.br (L.A. Sarubbo).

Bioremediation is used for the degradation of hydrophobic organic compounds (HOCs) in contaminated soil and water due to its environmental and economic advantages over other physico-chemical remediation methods, such as low temperature thermal desorption [2], incineration, photodegradation [3] and phytoremediation [4–7]. In this process, pollutants are mainly degraded by microorganisms or specific enzymes in solutions in which contaminants are available for microbial action [8–10]. However, the hydrophobicity and low degree of aqueous solubility of most HOCs often result in very slow, frequently unsatisfactory biodegradation. Therefore, overcoming the limited accessibility of these hydrophobic pollutants to microbes or enzymes is a pivotal issue in bioremediation processes [11].

To date, the main approach for enhancing the bioavailability of HOCs is the use of synthetic or natural surfactants [9,12–15], which promote the solubility of HOCs and improve the biodegradation process [11]. Biosurfactants are surface-active compounds produced by microorganisms and are characterized as organic

molecules containing a hydrophobic portion and a hydrophilic portion, allowing these substances to act at the interface of different compounds [16]. Biosurfactants are classified based on their chemical composition as glycolipids, lipopolysaccharides, oligosaccharides or lipopeptides and are produced by diverse bacterial genera [17,18].

The chemical and structural analysis of biosurfactants can be carried out using a broad range of techniques ranging from simple colorimetric assays to sophisticated mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. The method used greatly depends on the amount of information that is required. An experimental procedure should be based on the following key steps: (1) extraction of biosurfactant from the culture medium; (2) detection; (3) purification and separation of the crude product; and (4) structural analysis through the use of high-performance liquid chromatography, MS and/or NMR. Information from the analysis allows the optimization of production yields and the assembly of glycolipids with different structural characteristics. Therefore, the ability to drive production in a certain direction allows microbiologists to produce different types of glycolipids depending on the biological activity required, such as a reduction in surface tension [19].

Biosurfactants have received considerable attention in the field of environmental remediation processes. These substances influence such processes due to their efficacy as dispersion and remediation agents as well as their environmentally friendly characteristics, such as low toxicity and high biodegradability [20–22]. Despite these important advantages, biosurfactants have not yet been employed extensively in industry due to their relatively high production cost. One strategy for reducing this cost is the use of alternative substrates, such as agroindustrial wastes [23].

In the present study, soybean waste frying oil and corn steep liquor were used as cheap substrates for biosurfactant production. The biosurfactant produced from *Pseudomonas cepacia* was characterized and its HOC biodegradation potential was investigated in contaminated soil.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals were of reagent grade. Growth media were purchased from Difco Laboratories (USA). Soybean waste frying oil was obtained from a local restaurant in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil, stored according to the supplier's recommendations and used without any further processing. Corn steep liquor was obtained from "Corn Products do Brasil" in the municipality of Cabo de Santo Agostinho, state of Pernambuco, Brazil.

2.2. Soil

Soil contaminated with HOCs was used in the experiments. The soil was collected from old underground oil reservoirs located in the city of Recife, state of Pernambuco, Brazil. Soil samples (1 kg) were homogenized and left to stand at room temperature for subsequent use.

2.3. Bacterial strain and preparation of seed culture

A strain of *P. cepacia* CCT669 was obtained from the culture collection of the André Tosello Research and Technology Foundation in the city of Campinas, state of São Paulo, Brazil. The cultures were maintained on nutrient agar slants at 4 °C. For pre-culture, the strain from a 24-h culture on nutrient agar was transferred to 50 mL of nutrient broth to prepare the seed culture. The cultivation

conditions for the seed culture were 28 °C, 150 rpm and 10 to 14 h of incubation.

2.4. Fermentation media

The components of the production medium were dissolved in a mineral medium containing 0.2% NaNO₃, 0.05% KH₂PO₄, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.01% KCl and 0.001% FeSO₄·7H₂O. The pH was adjusted to 7.0 by 1.0 M HCl. Two percent canola waste frying oil and 2% corn steep liquor were added. Two percent aliquots (v/v) of the cell suspension (0.7 optical density at 600 nm), corresponding to an inoculum of 10⁷ CFU/mL, were used to inoculate 500-mL Erlenmeyer beakers containing 100 mL of sterile production medium. Cultivation was carried out at 27 °C with agitation at 200 rpm for 120 h in a Marconi MA832 shaker (Marconi LTDA, Brazil). No pH adjustment was performed during cultivation. At the end of fermentation, samples were taken from the liquid culture to determine the surface tension.

2.5. Determination of surface tension

Changes in surface tension were determined in the cell-free broth obtained by centrifuging the cultures at 5000 × g for 20 min. Surface tension was determined using a Sigma 70 Tensiometer (KSV Instruments Ltd—Finland) at room temperature. Tensiometers determine the surface tension with the aid of an optimally wettable ring suspended from a precision scale. With the ring method, the liquid is raised until contact with the surface is registered. The sample is then lowered again so that the film produced beneath the liquid is stretched for the determination of maximum force, which is used to calculate the surface tension. The instrument was calibrated against Mill-Q-4 ultrapure distilled water (Millipore, Illinois, USA). Prior to use, the platinum plate and all glassware were sequentially washed with chromic acid, deionised water and acetone and flamed with a Bunsen burner.

2.6. Biosurfactant isolation

The biosurfactant was extracted from the culture media after cell removal by centrifugation at 5000 × g for 30 min. The supernatant pH was adjusted to 2.0 with HCl 6.0 M and an equal volume of CHCl₃/CH₃OH (2:1) was added. The mixture was vigorously shaken for 15 min and allowed to set until phase separation. The organic phase was removed and the operation was repeated twice. The product was concentrated from the pooled organic phases using a rotary evaporator. The viscous yellowish product was dissolved in methanol and concentrated again by evaporation of the solvent at 45 °C [24]. The resulting residue was freeze dried. Partially purified freeze-dried biosurfactant was used in the subsequent analyses and biodegradation experiments.

2.7. Biosurfactant composition

Protein concentration in the isolated biosurfactant was estimated using a total protein test kit (Labtest Diagnostica S.A., Brazil). Total carbohydrate content was estimated using the phenol-sulfuric acid method [25]. Lipid content was determined based on the method described by Manocha et al. [26]: 0.5 g of the isolated material was extracted with different proportions of chloroform:methanol (1:1 and 1:2, v/v). The organic extracts were then evaporated in a vacuum and the lipid content was determined by gravimetric estimation.

Table 1
Formulated mixtures for HOC biodegradation experiments in soil.

Experiment	Composition
Set 1	Contaminated soil + <i>P. cepacia</i> cells
Set 2	Contaminated soil + <i>P. cepacia</i> biosurfactant
Set 3	Contaminated soil + <i>P. cepacia</i> biosurfactant + <i>P. cepacia</i> cells
Set 4	Contaminated soil (control)

2.8. Determination of ionic nature of biosurfactant

The ionic charge of the biosurfactant was determined using the agar double diffusion method [27]. Two regularly spaced rows of wells were made in agar with a low degree of hardness (1% agar). The wells in one row were filled with the biosurfactant solution and the wells in the other row were filled a pure compound of known ionic charge. The anionic substance chosen was sodium dodecyl sulphate (SDS) 20 mM and the cationic substance was barium chloride 50 mM. The appearance of precipitation lines between the wells, indicative of the ionic nature of the biosurfactant, was monitored over a 48-h period at room temperature.

2.9. Biosurfactant characterization using thin-layer chromatography

After isolation of the biosurfactant, a 0.1-g sample was dissolved in methanol and analyzed using thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates (G60; Merck, Germany). Chromatograms were developed with chloroform:methanol:acetic acid (65:15:2, v/v) and detection was performed as follows: (1) exposure to iodine vapor for lipid stains; (2) exposure to the Molish reagent for sugar detection; and (3) exposure to 1% ninhydrin solution for free amino groups. The reagents were sprayed and the plates were heated at 110 °C for 30 to 40 min until the appearance of the respective colors [28,29].

2.10. Biosurfactant characterization using nuclear magnetic resonance

All NMR experiments were performed with a VNMR5400 spectrometer (Varian, Palo Alto, USA) operating at 400.0 and 100.0 MHz for the ¹H and ¹³C nucleus, respectively. The biosurfactant was dissolved in CD₃OD. The residual signal of the solvent (δ_{H} 3.31 ppm) and the signal of the methyl group (δ_{C} 49.0 ppm) were used as reference for the chemical shift to ¹H and ¹³C NMR spectra, respectively. To assess microbial action, the organic phase of the samples was extracted with CDCl₃ and the residual signal of the solvent (δ_{H} 7.26 ppm) was used as reference. Spectra were determined with a PFG 5 mm probe, pulse of RF equivalent at 45°, an acquisition time of 3.2 s, delay of 1.0 s and 64 repetitions.

2.11. Evaluation of oil-degrading ability in contaminated soil

Samples of contaminated soil (10 g) were added to 100 mL of drinking water and the mixture was enriched with 1 mL of molasses. This mixture constituted the indigenous consortium. Then, 2% of the isolated biosurfactant and/or 1% of its microbial-producing species (previously cultivated in nutrient broth) were added and the medium was placed in a rotary shaker at 150 rpm and 28 °C for 60 days (Table 1). The experiments were performed in triplicate using 125-mL Erlenmeyer beakers. Samples of 5 mL were removed after 5, 10, 35, 45 and 60 days for HOC analysis by NMR.

2.12. Analysis of hydrophobic organic compounds

The degradation of HOCs was determined by ¹H NMR spectroscopy. Soil samples of 3.0 mL were extracted with 700 μ L of chloroform-d. The organic phase was transferred to the NMR tube and 1.12×10^{-5} mol of benzene (1.0 μ L, 99%, $d = 0.88$ g/mL) was used as internal standard to estimate the variation in integration area under the signal between δ_{H} 0.0 and 2.8 ppm in the spectra. The percentage of degradation was estimated from the relationship between the integration area in the control and each sample collected, according with the following equation:

$$\% \text{ of degradation} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{set}}) \times 100}{A_{\text{control}}}$$

in which A_{control} and A_{set} are the relative areas under the signal in the control and set spectra. The area under the benzene signal (δ_{H} 7.4 ppm) was maintained constant and equal to 100.

3. Results and discussion

3.1. Biosurfactant characterization

The production of the biosurfactant from *P. cepacia* CCT6659 cultivated in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil as the carbon source and 2.0% corn steep liquor as the nitrogen source has been described. This biosurfactant is able to reduce the surface tension of the medium from 70 to 27.57 mN/m and showed application potential in the oil industry as a complement to remediation processes involving contaminated soil and water [30].

After fermentation for five days, the biosurfactant was isolated, the surface tension was verified and the biomolecule was subjected to characterization. The crude extract from *P. cepacia* appeared as a viscous, sticky, oily, brown residue. The biosurfactant was soluble in organic solvents, such as chloroform, methanol, hexane, ethylether and ethyl acetate. Agar double diffusion tests revealed precipitation lines between the biosurfactant produced by *P. cepacia* and the cationic compound used as reference (barium chloride), whereas no lines were formed between the biosurfactant and the anionic compound (SDS). Under the experimental conditions of the present study, this very simple test confirmed the anionic nature of the biosurfactant. Biosurfactants produced from other species of the genus *Pseudomonas* have also been described as anionic using the same method [24,27].

The biosurfactant extracted from the cell-free broth was analyzed using TLC and visualized with specific reagents. A spot was produced with a retention factor (Rf) of 0.9, which demonstrated positive reactions for sugars with Molish reagents and for lipids with iodine vapors, but negative reactions for amino groups with ninhydrin (Fig. 1). The presence of both glycosyl units and lipid moieties on the same spot suggests that the sample was a glycolipid. These results are similar to the profiles described for a biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* grown in glycerol, for which the Rf for rhamnolipids was 0.85 [24].

The chemical composition analyses of the biosurfactant produced by *P. cepacia* revealed the presence of 75% lipids and 25% carbohydrates, suggesting once again the glycolipid nature of the compound, as demonstrated by TLC. A minor fraction of protein was found in the samples, likely resulting from remaining culture media co-precipitated with the biosurfactant during the extraction process. According to the literature, most surfactants produced by species of *Pseudomonas* are glycolipids in nature [24,31,32].

Biosurfactants are generally macromolecules and it is not easy to determine their chemical structure, especially when these compounds are produced from industrial wastes. However, the determination of the structural formula of these compounds is

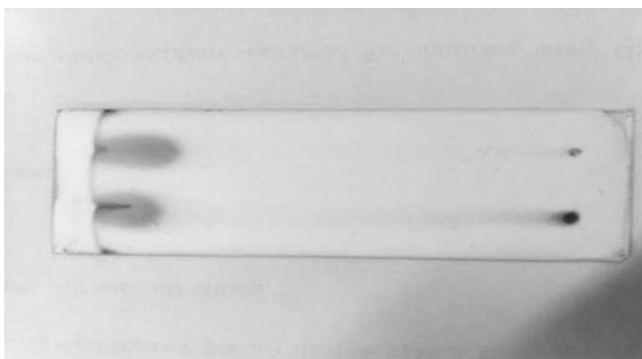


Fig. 1. Biosurfactant components detected by thin layer chromatography. Samples were added at volumes of 20 μ L to TLC plates and developed with a CHCl_3 :MeOH:H₃COOH (65:15:2, v/v) solvent system.

fundamental to increasing the production yield and designing of novel compounds with specific structural features.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is a powerful tool for structural elucidation, which is obtained in 1D and 2D experiments. In organic chemistry, the main tools for structural elucidation are ^1H and ^{13}C NMR spectra associated with 2D experiments, such as ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C CHMBC and NOESY [33]. Other techniques also are used, such as mass spectrometry (MS), especially MALDI-TOF, and infrared spectroscopy [34,35]. However, NMR and MS are the more powerful. In the present study, NMR was used to identify the class of the biosurfactant produced and investigate the biodegradation of petroleum-derived compounds. Fig. 2 shows the ^{13}C NMR spectrum (Attached Proton Transfer—APT) of samples containing the biosurfactant.

The APT spectrum shows the signals as a function of the phase or the number of hydrogen nuclei bonded to carbon. CH_3 and CH nuclei have a positive phase, while CH_2 and C nuclei have a negative phase. Fig. 1 shows three different regions: (a) δ between 10.0 and 40.0 ppm, attributed to aliphatic groups; (b) δ between 120.0 and 140.0 ppm, attributed to olefinic groups; and (c) a signal at δ 177.5 ppm, attributed to the carbonyl group. Two signals with a positive phase were found in the aliphatic region and were therefore attributed to methyl groups. Moreover, a set of signals with a negative phase were attributed to methylene groups. All signals in the olefinic region had a positive phase and were attributed to CH groups.

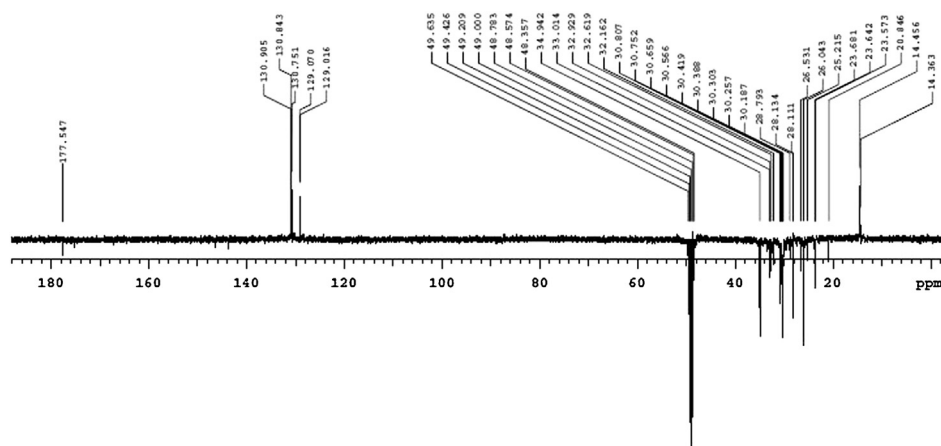


Fig. 2. ^{13}C NMR spectrum (APT, CD_3OD , 100 MHz) of the biosurfactant from *P. cepacia* CCT6659 grown in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil and 2.0% corn steep liquor.

Fig. 3 shows the ^1H NMR spectrum of the biosurfactant from *P. cepacia*, demonstrating two well-defined regions. The signals between δ 0.8 and 4.0 ppm and those between δ 5.0 and 6.0 ppm were attributed to aliphatic and olefinic groups, respectively. The signals at δ 3.3 and 5.0 ppm were attributed to the residual signal of the solvent (methanol) and water.

^1H and ^{13}C NMR of the biosurfactant are typical spectra of lipids [36]. Therefore, the biosurfactant studied is mainly made up of lipids. This conclusion was corroborated by the TLC assays, which indicated that the biosurfactant was 75% lipids.

Microbial glycolipids consist of four major groups: rhamnolipids, sophorolipids, trehalose lipids and mannosylerythritol lipids. Extensive research has been carried out on rhamnolipids and sophorolipids. Most biosurfactants produced by *P. aeruginosa* strains are glycolipids [19]. However, a detailed structural analysis of the biosurfactant produced by the *P. cepacia* strain is needed to confirm its glycolipid nature. An MS analysis of the biosurfactant produced by *Lactobacillus delbrueckii* confirmed lipid and glycolipid moieties [23]. NMR analysis has also demonstrated that the novel isolate *Pseudozyma* sp. NII 08165 produced a glycolipid biosurfactant, which was a combination of all the three mannosylerythritol lipid isomers along with some unknown glycolipids [37].

3.2. Degradation of hydrophobic organic compounds

The oil in the soil was characterized as a complex mixture of aliphatic compounds. In the present study, only fractions of alkanes were determined. The initial sample characterization revealed approximately 100% aliphatic compounds. According to Toledo et al. [38], the relative proportions of these fractions vary from oil to oil and the susceptibility of a specific oil to microbial degradation can be predicted from this composition. According to Mohamed et al. [39], the biodegradability of petroleum compounds follows a decreasing preferential order: *n*-alkanes > branched-chain alkanes > branched chain alkenes > monoaromatic > cycloalkanes > polyaromatic > asphaltenes. Fractions containing *n*-alkanes are usually more susceptible to biodegradation, whereas saturated fractions containing branched alkanes are less vulnerable to microbial attack [38].

One of the main factors affecting the biodegradation efficiency of complex oil compounds is the low availability of contaminants for microbial attack. Increasing substrate solubilization through the use of a biosurfactant is a way to enhance bioavailability and metabolism of contaminants. In the treatment of areas contaminated with complex compounds, which are difficult to

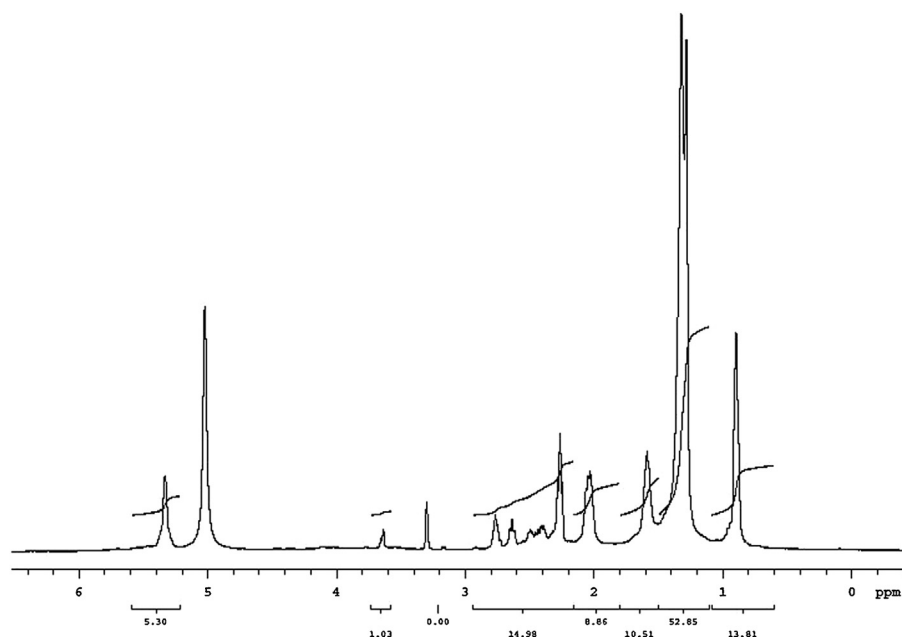


Fig. 3. ^1H NMR spectrum (CD_3OD , 300 MHz) of biosurfactant from *P. cepacia* CCT6659 grown in mineral medium supplemented with 2.0% soybean waste frying oil and 2.0% corn steep liquor.

degrade, it is both economically and environmentally advantageous to use indigenous microorganisms that exhibit degradation capacity together with a biosurfactant [40,41]. Biosurfactants affect the biodegradation process by increasing the solubility and dispersion of the compound in one of two ways: increasing the surface area of the hydrophobic water-insoluble substrate or increasing the bioavailability of hydrophobic water-insoluble substances [42].

As the rate of natural attenuation is generally slow, measures are often adopted to speed up the removal of pollutants. The most widely used mechanism in bioremediation is the stimulation of indigenous microorganisms through the addition of carbon substrates and nutrients [43]. According to Teng et al. [44], indigenous soil microorganisms have some capacity to degrade hydrocarbons, but effectiveness is limited and long periods of time are required. Thus, either carbon sources are added as cometabolic substrates or soil enzymatic activity is accelerated to enhance the bioremediation of soil contaminated with hydrocarbons. Su et al. [1] found that the biodegradation of motor oil by *P. aeruginosa* SU-1 was accelerated from 55.9% to 64.4% by adding yeast extract. In the present study, molasses was added to increase the rate of degradation of the HOCs in the soil. A laboratory-scale experiment of the biosurfactant-enhanced degradation of HOCs in the soil samples was conducted. Fig. 4 displays the effects of the addition of the biosurfactant from *P. cepacia* alone and with cells of the bacterium in the biodegradation process.

After five and ten days of cultivation, the experiment performed in the presence of the biosurfactant and its producing species together (Set 3) was much more efficient than the experiments conducted in the presence of the biosurfactant alone (Set 2) or the bacterium cells alone (Set 1). However, the spectra obtained after 35, 45 and 60 days of cultivation indicated similar performance among the three conditions, demonstrating the efficiency of both the biosurfactant and its producing species in degrading high percentages of the HOCs adsorbed to the soil samples. These findings demonstrate the advantages of applying either the biosurfactant or *P. cepacia* cells to enhance the degradation rate of aliphatic compounds from petroleum derivatives.

Crude oil biodegradation experiments with a biosurfactant from *Oceanobacillus* sp. BRI 10 grown in a medium containing 3% glucose resulted in 56% and 90% degradation on 9th and 27th days, respectively [45]. Cerqueira et al. [46] analyzed the biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons from petrochemical oily sludge in a liquid medium by a bacterial consortium and five pure bacterial cultures. The bacterial consortium demonstrated excellent degradation capacity, reducing 90.7% of the aliphatic fraction and 51.8% of the aromatic fraction of the oily sludge.

A biosurfactant from *L. delbrueckii* cultured with peanut oil cake as the carbon source was tested in biodegradation experiments with crude oil. In agreement with the present findings, significant oil degradation occurred when the biosurfactant and bacterial cells were used together. The biosurfactant alone was also capable of promoting biodegradation to a large extent without added fertilizers [23].

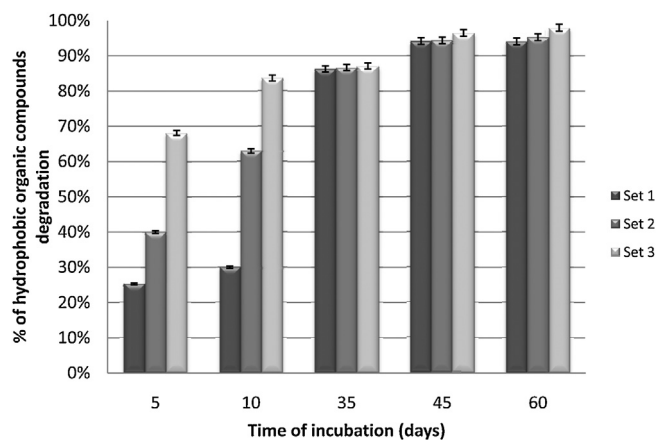


Fig. 4. Percentage of HOC degradation in ^1H NMR spectra data. Set 1—soil + *P. cepacia* cells; Set 2—soil + *P. cepacia* biosurfactant; Set 3—soil + *P. cepacia* cells + *P. cepacia* biosurfactant. Error bars represent SD, $n = 3$.

4. Conclusions

The biosurfactant produced by *P. cepacia* in the presence of industrial wastes demonstrated potential for use in bioremediation processes. The findings demonstrate that this biosurfactant can be synthesized from low cost substrates, such as frying oil and corn steep liquor, for use in environmental applications. The addition of both the biosurfactant and bacterial cells of *P. cepacia* favored the biodegradation of hydrophobic organic compounds. As the insolubility of hydrocarbons decreases the efficiency and rate of degradation, this limitation can be overcome by either the addition of a surface active compound (surfactant) to the growth medium, thereby making hydrocarbons more water soluble and available for cells to degrade, or by the addition of degrading microorganisms, such as *P. cepacia*. Biosurfactants also stimulate the catabolism of hydrocarbons through a co-metabolism process, as these organic compounds readily degradable by microorganisms. All these approaches can make the bioremediation process an economically and environmentally viable mitigation technology.

Acknowledgments

This study received funding from the Brazilian fostering agencies Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE), Thermoelectric of Pernambuco (TERMOPE), National Agency of Electric Energy (ANEEL), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES). The authors are grateful to the laboratories of the Center for Sciences and Technology of the *Universidade Católica de Pernambuco* and the Analytical Center of the *Universidade Federal de Pernambuco*, Brazil.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.012>.

References

- [1] W.-T. Su, B.-S. Wu, W.-J. Chen, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 42 (2011) 689.
- [2] P.R.D. Percin, *J. Hazard. Mater.* 40 (1995) 203.
- [3] W. Chu, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 421.
- [4] A. Lunney, B. Zeeb, K. Reimer, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 6147.
- [5] K.Y. Cheng, J.W.C. Wong, *Chemosphere* 62 (2006) 1907.
- [6] J. Wong, M. Fang, Z. Zhao, B. Xing, *J. Environ. Qual.* 33 (2004) 2015.
- [7] J. White, R. Peters, J. Kelsey, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 2922.
- [8] H. Harms, T. Bosma, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18 (1997) 97.
- [9] H. Zhu, M.D. Aitken, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 7260.
- [10] Z. Zhao, A. Selvam, J.W.C. Wong, *J. Hazard. Mater.* 190 (2011) 345.
- [11] G. Zheng, A.S. Jonathan, W.C. Wong, *Bioresour. Technol.* 126 (2012) 397.
- [12] G. Walters, M. Aitken, *Water Environ. Res.* 73 (2001) 15.
- [13] H.S. Kim, W.J. Weber, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3574.
- [14] R. Kommalapati, K. Valsaraj, W. Constant, D. Roy, *Water Res.* 31 (1997) 2161.
- [15] C.N. Mulligan, *Environ. Pollut.* 133 (2005) 183.
- [16] V.S. Cerqueira, J.A.V. Costa, *Quím. Nova* 32 (2009) 394.
- [17] A. Franzetti, E. Tamburini, I.M. Banat, in: R. Sen (Ed.), *Biosurfactants: Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, p. 121.
- [18] I.M. Banat, A. Franzetti, I. Gandolfi, G. Bestetti, M.G. Martinotti, L. Fracchia, T.J. Smyth, R. Marchant, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010) 427.
- [19] T.J.P. Smyth, A. Perfumo, R. Marchant, I.M. Banat, in: K.N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, p. 3705.
- [20] C. Sivapathasekaran, S. Mukherjee, A. Ray, A. Gupta, R. Sen, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2884.
- [21] S.G. Kiran, T.A. Thomas, J. Selvin, B. Sabarathnam, A.P. Lipton, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 2389.
- [22] S.K. Satpute, I.M. Banat, P.K. Dhakephalkar, A.G. Banpurkar, B.A. Chopade, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 436.
- [23] R. Thavasi, S. Jayalakshmi, I.M. Banat, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 3366.
- [24] S.N.R.L. Silva, C.B.B. Farias, R.D. Rufino, J.M. Luna, L.A. Sarubbo, *Colloids Surf., B* 79 (2010) 174.
- [25] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350.
- [26] M.S. Manocha, G. San-Blas, S. Centeno, *J. Gen. Microbiol.* 117 (1980) 147.
- [27] T. Meylheuc, C.J. Van Oss, M.N. Bellon-fontaine, *J. Appl. Microbiol.* 91 (2001) 822.
- [28] M. Deshpande, L. Daniels, *Bioresour. Technol.* 54 (1995) 143.
- [29] A.S. Santos, A.P.W. Sampaio, G.S. Vasquez, L.M.S. Anna, N. Pereira Jr., D.M.G. Freire, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98 (2002) 1025.
- [30] N.M.P. Rocha e Silva, R.D. Rufino, J.M. Luna, V.A. Santos, L.A. Sarubbo, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005i>
- [31] E. Haba, M.J. Espuny, M. Busquets, A. Manresa, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 379.
- [32] A.S. Monteiro, G.L. Sasaki, L.M. de Souza, J.A. Meira, J.M. de Araújo, D.A. Mitchell, L.P. Ramos, N. Krieger, *Chem. Phys. Lipids* 147 (2007) 1.
- [33] R.O. Silva, R.A.W. Neves Filho, R. Azevedo, R.M. Srivastava, H. Gallardo, *Struct. Chem.* 21 (2010) 485.
- [34] M. Hashimoto, F. Kirikae, T. Dohi, S. Adachi, S. Kusumoto, Y. Suda, T. Fujita, H. Naoki, T. Kirikae, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 3715.
- [35] M. Rao, G. Muralikrishna, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2457.
- [36] E. Falch, T.R. Storseth, M. Aursand, *Chem. Phys. Lipids* 147 (2007) 46.
- [37] K.V. Sajna, R.K. Sukumaran, H. Jayamurthy, K.K. Reddy, S. Kanjilal, R.B.N. Prasad, A. Pandey, *Biochem. Eng. J.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.014>
- [38] F.L. Toledo, C. Calvo, B. Rodelas, J. González-Lopez, *Syst. Appl. Microbiol.* 29 (2006) 244.
- [39] M.E. Mohamed, M. Al-Dousary, R.Y. Hamzah, G. Fuchs, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58 (2006) 213.
- [40] A.M. Abalos, J. Vinas, M.A. Sabate, M.A.M. Solanas, *Biodegradation* 15 (2004) 249.
- [41] S.S. Cameotra, P. Singh, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62 (2008) 274.
- [42] J.D. Desai, I.M. Banat, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 47.
- [43] R. Margesin, F. Schinner, *Extremophiles* 5 (2001) 73.
- [44] Y. Teng, Y. Lou, M. Sun, Z. Liu, Z. Li, P. Christie, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3437.
- [45] V.V. Jadhav, A. Yadav, S.Y. Shouche, S. Aphale, A. Moghe, S. Pillai, A. Arora, R.K. Bhadekar, *Desalination* 318 (2013) 64.
- [46] V.S. Cerqueira, E.B. Hollenbach, F. Maboni, M.H. Vainstein, F.A.O. Camargo, M. do C.R. Peralba, F.M. Bento, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 11003–11010.