



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RIVALDO BEZERRA DA ROCHA JÚNIOR

**Produção de Biossurfactante por *Candida tropicalis* para Aplicação na
Remoção de Metais Pesados**

RECIFE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLIGIA INDUSTRIAL

RIVALDO BEZERRA DA ROCHA JÚNIOR

**Produção de Biossurfactante por *Candida tropicalis* para Aplicação na
Remoção de Metais Pesados**

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Leonie
Asfora Sarubbo

RECIFE 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
programa de geração automática do SIB/UFPE

Rocha Júnior, Rivaldo Bezerra da.

Produção de Biossurfactante por *Candida tropicalis* para
Aplicação na Remoção de Metais Pesados / Rivaldo
Bezerra da Rocha Júnior. - Recife, 2016.
122 p.: il., tab.

Orientador(a): Leonie Asfora
Sarubbo Coorientador(a): Juliana
Moura de Luna

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia Industrial, 2016.
Inclui referências.

1. Educação. 2. Ecologia. 3. Meio Ambiente e
Biodiversidade. 4. Biotecnologia. 5. Microbiologia. 6.
Bioprocessos. I. Sarubbo, Leonie Asfora. (Orientação). II.
Luna, Juliana Moura de. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

RIVALDO BEZERRA DA ROCHA JÚNIOR

**Produção de Biossurfactante por *Candida tropicalis* para Aplicação na
Remoção de Metais Pesados**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^a. Dr^a Tânia Lúcia de Montenegro Stamford
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Jenyffer Medeiros Campos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico a minha família:
Meus pais Ana e Rivaldo,
Meus irmãos: Jonathan, Luiz, Fernando, Roberta e Fernanda
E aos meus avós, Maria e Ademar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, sempre, porque sem a permissão dele, nada teria acontecido. Pela força de seguir em frente diante dos obstáculos.

A minha orientadora, a Prof^a Dr^a Leonie Asfora Sarubbo, por acreditar no meu potencial sem nem me conhecer e estar sempre disposta com idéias inovadoras para contribuir com a realização deste trabalho.

A minha Coorientadora, a Dr^a Juliana Moura de Luna, por todo o apoio e disposição de me ajudar sempre que precisei.

Ao Coordenador do Mestrado em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, o Prof. Dr. Will de Barros Pita, assim como a CAPES pela concessão no ano final da execução da minha pesquisa.

À Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira Oliveira, pelo acesso aos laboratórios do Centro de Ciências e Tecnologia, onde os trabalhos experimentais foram desenvolvidos.

Aos meus colegas de laboratório, Adriana Adrielle Pinto, Pedro Pinto Ferreira Brasileiro, Bruno Galdino de Freitas, Fabíola Carolina de Almeida e Maria Aparecida Mendonça da Silva, que me ajudaram no dia a dia do laboratório.

Aos professores da graduação na UFPE que tive o prazer de conhecer e conviver em toda minha trajetória, pois foi com o apoio e orientação deles que cheguei até aqui.

Aos meus pais, pela imensa dedicação e por nunca medirem esforços para contribuir intensamente para a minha formação pessoal e profissional. Agradeço também por compartilharem comigo todos os momentos decisivos da minha carreira acadêmica e sempre estarem dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus irmãos, que assim como meus pais, sempre estiveram ao meu lado me dando apoio emocional e financeiro sempre que foi preciso.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a execução do meu trabalho.

“A mente que se abre a uma ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

O interesse industrial pelos surfactantes de origem microbiana tem se intensificado nos últimos tempos em função das características desses compostos como biodegradabilidade e toxicidade reduzida e da eficiência desses na remoção de metais pesados e compostos orgânicos hidrofóbicos em solos e águas. Assim, um biossurfactante foi produzido pela levedura *Candida tropicalis* em meio formulado com água destilada suplementada com 2,5% de melaço, 2,5% óleo de fritura e 4% de milhocina. Inicialmente, o biossurfactante foi produzido em escala de frascos e, em seguida, em biorreatores de 3 e 50L, a fim de simular condições industriais de produção. Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que em frascos obteve-se uma tensão superficial em torno de 30 mN/m e uma produção de 9,5 g/L, enquanto que no biorreator de 50 L a tensão superficial manteve-se estável, alcançando-se uma produção de 27 g/L de biossurfactante. Medidas de tensão e de emulsificação de óleo de motor foram realizadas em condições extremas de temperatura, pH e na presença de NaCl, demonstrando a estabilidade do biossurfactante. O biossurfactante isolado foi caracterizado como sendo uma molécula aniônica com capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 70 para 30 mN/m, com Concentração Micelar Crítica de 0,5%. O biossurfactante não apresentou efeito tóxico sobre sementes de vegetais nem sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Aplicações na remoção de metais pesados em areia contaminada, sob condições dinâmicas, demonstraram o potencial do biossurfactante bruto e isolado na remoção de Zn e Cu, com percentuais entre 30 e 80%, enquanto que a maior remoção de Pb foi de 15%. Testes em colunas empacotadas também confirmaram a capacidade do biossurfactante na remoção de Zn e Cu, entre 45 e 65%, embora o chumbo não tenha sido removido sob condições estáticas. A cinética de remoção demonstrou que 30 min são suficientes para a remoção dos metais, enquanto uma única lavagem da areia com o biossurfactante permite alcançar a maior eficiência de remoção. O biossurfactante também foi capaz de reduzir significativamente a condutividade elétrica de soluções contendo metais pesados. Uma breve análise econômica demonstrou o potencial desse agente como coadjuvante dos processos industriais de remediação de solos e efluentes poluídos por contaminantes inorgânicos.

Palavras-chave: Biossurfactante; *Candida tropicalis*; Resíduos Industriais; Contaminação Ambiental; Metais Pesados.

ABSTRACT

The industrial interest in microbial surfactants has been intensified in recent years due to the characteristics of these compounds as biodegradability and reduced toxicity and effectiveness in removing heavy metals and hydrophobic organic compounds in soil and water. Thus, a biosurfactant was produced by the yeast *Candida tropicalis* grown in distilled water supplemented with 2.5% molasses, 2.5% frying oil and 4% of corn steep liquor. firstly, the biosurfactant was produced in Erlenmeyers flasks and then in 3 and 50 L bioreactors to simulate industrial conditions of production. The results were satisfactory, since a surface tension of 30 mN/m and a production of 9.5 g/L was reached in flasks, while a production of 27 g/L of biosurfactant was reached in the 50 L bioreactor. Surface tension measurement and engine oil emulsification were performed under extreme conditions of temperature, pH and at the presence of NaCl, demonstrating the stability of biosurfactant. The isolated biosurfactant was characterized as an anionic molecule capable of reducing the surface tension of water from 70 to 30 mN/m at 0.5% of Concentration Critical Micelle. The biosurfactant showed no toxic effect on plant seeds or on the brine shrimp microcrustacean. Applications in removing heavy metals from contaminated sand under dynamic conditions demonstrate the potential of the crude and isolated biosurfactant in removal of Zn and Cu with percentages between 30 and 80%, while the best removal of Pb was 15%. Tests in packed columns also confirmed the ability of biosurfactant in removing Cu and Zn between 45 and 65%, although the lead has not been removed under static conditions. The removal kinetics demonstrated that 30 minutes was sufficient for the removal of metals while a single washing with the biosurfactant will achieve a higher removal efficiency. The biosurfactant was able to significantly reduce the electrical conductivity of solutions containing heavy metals. The results suggest the great potential of this agent for industrial remediation processes of soils and water polluted with inorganic contaminants. A brief economic analysis demonstrated the potential of this agent for application in the industrial remediation processes of soil and wastewater polluted by inorganic contaminants.

Keywords: biosurfactant; *Candida tropicalis*; industrial waste; environmental contamination; heavy metals.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1.1 BIOSSURFACTANTES.	21
3.1.2 Definição	20
3.1.3 Propriedades	22
3.1.4 Classificação	25
3.1.5 Micro-organismos produtores	28
3.1.6 Produção de Biossurfactantes a partir de resíduos industriais	30
3.1.7 Aplicações Ambientais	33
3.1.7.1 Aplicações na Biorremediação	34
3.1.7.2 Aplicação na recuperação avançada de petróleo	37
3.1.7.3 Lavagem de solos	40
3.1.7.4 Aplicação na limpeza de reservatórios de óleos	42
3.1.7.5 Aplicações na remoção de metais pesados	42
3.1.8 Utilização Industrial de Biossurfactante	64
4. MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1 Micro-organismo	66
4.2 Substrato	66
4.3 Areia	66
4.4 Meios de manutenção e crescimento do inóculo	67
4.5 Meios de produção do biossurfactante	67
4.6 Preparação do inóculo	67
4.7 Produção de biossurfactante em frascos	68
4.8 Scale up produção de biossurfactante	68

4.9 Determinação da tensão superficial e da (CMC)	68
4.10 Extração do biossurfactante	67
4.11 Avaliação da estabilidade da tensão superficial do biossurfactante	68
4.12 Avaliação da estabilidade da capacidade de emulsificação	68
4.13 Composição química do biossurfactante	70
4.14 Determinação da carga iônica do biossurfactante	70
4.15 Teste de fitotoxicidade	70
4.16 Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	71
4.17 Preparação da areia contaminada com metais pesados	71
4.18 Tratamento dinâmico da areia contaminada por metais pesados	72
4.19 Tratamento estático da areia contaminada por metais pesados	72
4.20 Cinética de remoção dos metais pesados pelo biossurfactante	73
4.21 Eficiência de remoção dos metais pesados	73
4.22 Remoção de metais pesados contidos em efluente	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Produção do biossurfactante em frascos e em biorreatores	74
5.2 Cinética de crescimento de <i>Candida tropicalis</i>	75
5.3 Estabilidade do biossurfactante relacionada à tensão superficial	76
5.4 Estabilidade do biossurfactante relacionada à emulsificação	79
5.5 Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante	80
5.6 Composição química preliminar do biossurfactante	82
5.7 Carga iônica do biossurfactante	82
5.8 Teste de Fitotoxicidade	82
5.9 Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	83
5.10. Tratamento dinâmico da areia contaminada por metais pesados	88
5.11 Tratamento estático da areia contaminada por metais pesados	89
5.12 Cinética de remoção dos metais pesados	90
5.13 Eficiência de remoção dos metais pesados	91
5.14 Remoção de metais pesados contidos em efluente sintético	92
5.15. Perspectivas de aplicação industrial do biossurfactante	92
6. CONCLUSÃO	96
7. REFERÊNCIAS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de micelas na CMC	21
Figura 2. Estrutura de um raminolipídeo	25
Figura 3. Estrutura de um soforolipídeo	26
Figura 4. Estrutura da surfactina	26
Figura 5. Estrutura do emulsan	27
Figura 6. Remoção de metais por biossurfactantes iônicos	55
Figura 7. Cinética de crescimento, de produção do biossurfactante, pH e tensão superficial	75
Figura 8. Concentração Micelar Crítica do biossurfactante	80
Figura 9. Remoção dos metais pesados pelo biossurfactante bruto de <i>C. tropicalis</i> em função do tempo	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais classes de biossurfactantes e respectivos micro-organismos produtores	28
Tabela 2	Resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes e seus micro-organismos produtores	32
Tabela 3	Química e especiação de alguns metais pesados	43
Tabela 4	Estabilidade da tensão superficial do biossurfactante de <i>C. tropicalis</i> cultivada em água destilada suplementada	77
Tabela 5	Estabilidade da emulsificação do óleo de motor	79
Tabela 6	Fitotoxicidade	82
Tabela 7	Remoção de metais pesados	84
Tabela 8	Remoção de metais pesados estático	89
Tabela 9	Eficiência de remoção	91
Tabela 10	Condutividade das soluções metálicas	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

UCP Universidade Católica de Pernambuco

MEOR Microbial Oil Recovery Enhancement

1. INTRODUÇÃO

Os poluentes inorgânicos presentes nos solos com maior potencial de risco ao homem são os metais pesados. Os metais pesados ocorrem naturalmente no ambiente e estão presentes em rochas, solos, plantas e animais (BARROS et al., 2007; CALVO et al., 2009; HAZRA et al., 2012).

Os metais ocorrem em diferentes formas como íons dissolvidos em água, vapor, ou sais minerais em rochas, areia e solo. Eles podem também estar ligados a moléculas orgânicas e inorgânicas ou atrelados por partículas no ar. Ambos os processos naturais e antropogênicos emitem metais para o ar e água (AGUIAR et al., 2002; JUWARKAR et al., 2007; SILVA et al., 2014).

Em um período de 300 anos a população mundial aumentou de 500 milhões para mais de 5.5 bilhões. Esse evento foi seguido de uma elevação nos níveis de poluição e subsequente destruição de muitos ecossistemas, dentre os quais se destacam os recursos hídricos como uma das fontes naturais mais atingidas pela poluição ambiental. Os rios e mares comumente recebem altas descargas de efluentes contendo elevadas concentrações de metais pesados, pesticidas e outras substâncias como nitrogênio, fósforo, compostos orgânicos e inorgânicos (HAZRA et al., 2012; DONG et al., 2009). Para reduzir diversos problemas causados pela presença de níveis elevados de metais pesados no suprimento de água, esforços têm sido feito para estabelecer constantemente a diminuição da concentração desses elementos nos efluentes industriais (CONAMA, 1986).

A contaminação dos solos por metais pesados surge como resultado das diversas atividades industriais, incluindo mineração, fundição de metais, produção de baterias automobilísticas, emissão de veículos e depósitos de resíduos industriais e a dispersão de cinzas provenientes dos processos de incineração (HONG et al., 2002; CHAKRABORTY; DAS, 2014). A presença de metais pesados nos solos provoca sérios problemas uma vez que os mesmos não podem ser biodegradados, levando à contaminação dos sistemas biológicos e do subsolo pelo processo de lixiviação. Nos Estados Unidos, por exemplo, o chumbo se encontra presente em 15% dos terrenos contaminados, seguido de cromo, cádmio e cobre, encontrados em cerca de 7-11% dos solos.

Com a finalidade de reduzir os custos associados ao tratamento de solos contaminados por metais pesados, diferentes tecnologias têm sido desenvolvidas e implantadas (PENG et al., 2008; SOUZA et al., 2014).

O Brasil, apesar de não possuir uma legislação adequada à realidade do país para os níveis máximos permitidos de metais pesados, registra altos índices de contaminação industrial desses poluentes. Nos últimos anos, a Companhia Mercantil e Industrial Ingá, indústria de zinco, situada a 85 km do Rio de Janeiro, desativada há quase 15 anos, transformou-se na maior área de contaminação de lixo tóxico no Brasil. Metais pesados como zinco, cádmio, mercúrio e chumbo continuam poluindo o solo, a água e atingem o mangue, afetando a vida da população. Isso ocorreu porque os diques construídos para conter a água contaminada não têm recebido manutenção há 5 anos, e dessa forma os terrenos próximos foram inundados, contaminando a vegetação do mangue. Atualmente a área foi arrematada pela Usiminas e passa por processo de descontaminação. Outro caso aconteceu em 1999 em Bauru, SP. A Indústria de Acumuladores Ajax, uma das maiores fábricas de baterias automotivas do país, contaminou com chumbo expelido pelas suas chaminés 113 crianças, sendo encontrados índices superiores a 10 miligramas/decilitro. A cidade de Paulínia, em SP também foi contaminada pela Shell Química do Brasil. Dos 166 moradores submetidos a exames, 53% apresentaram contaminação crônica e 56% das crianças revelaram altos índices de cobre, zinco, alumínio, cádmio, arsênico e manganês. Em adição observou-se também, a incidência de tumores hepáticos e de tireóide, alterações neurológicas, dermatoses, rinites alérgicas, disfunções gastrointestinais, pulmonares e hepáticas (TEIXEIRA, 2014).

Existem duas tecnologias normalmente aplicadas ao tratamento de solos contaminados por metais. A primeira consiste em imobilizar os metais pesados numa matriz sólida fortemente ligada ao solo, minimizando a migração. Esta tecnologia, contudo, não consiste numa solução definitiva para o problema, considerando a impossibilidade de reaproveitamento do solo e a necessidade de monitoramento em longo prazo. A Segunda tecnologia promove a mobilidade do metal e sua migração para a fase líquida por dessorção e solubilização (SINGH et al., 2007). Esta tecnologia pode ser considerada uma

solução permanente, permitindo ainda a reciclagem do solo remediado e consequentemente o reuso da terra. Normalmente, a lavagem do solo com ácidos e com agentes quelantes como o EDTA são as técnicas mais aplicadas. Contudo, a lavagem com ácidos leva a redução da fertilidade do solo e a alterações na composição química e física em virtude da dissolução de minerais (REED et al., 1996). A utilização de EDTA, por outro lado, é preocupante do ponto de vista salutar e de segurança, em função da sua degradação reduzida. A dificuldade de recuperação do metal pesado do complexo metal-EDTA também restringe o uso desta técnica (CHAKRABORTY; DAS, 2014).

Uma solução em potencial para a remediação de solos contaminados por metais e óleos consiste no uso de surfactantes, moléculas de natureza anfipática, as quais podem ser adicionadas em soluções, facilitando a solubilização, dispersão e dessorção dos contaminantes do solo, permitindo ainda sua reutilização (MUTHUSAMY et al., 2008; MARCHANT; BANAT, 2012). Vários surfactantes sintéticos têm sido avaliados em testes de descontaminação (ASÇI et al., 2008). Por outro lado, a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem motivado pesquisas para utilização de surfactantes de natureza microbiológica, os chamados biossurfactantes. Recentemente, a viabilidade dos biossurfactantes para a remoção de metais tem sido demonstrada (CORTIS; GHEZZEHEI, 2007; MULLIGAN et al., 2001). Vários trabalhos têm descrito o potencial de utilização de surfactantes biológicos, destacando-se os estudos com surfactina e raminolipídios, ambos de origem bacteriana (BARROS et al., 2007), e de alguns glicolipídeos originados de leveduras (DAHRAZMA; MULLIGAN, 2007; OCHOA-LOZA et al., 2007; COIMBRA et al., 2009; MENEZES et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; RUFINO et al., 2013). A natureza iônica desses agentes, bem como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades de superfície os tornam candidatos em potencial para a remoção de metais pesados contidos em solos e sedimentos.

O sucesso da produção industrial de biossurfactantes, entretanto, depende do desenvolvimento de processos de baixo custo, ou seja, da redução das etapas de purificação e da seleção de substratos pouco custosos, que

representam 60% e 10-30% do custo total do processo, respectivamente. A produção de biossurfactantes pode ainda ser intensificada pela variação das condições de cultivo como variações do pH, da temperatura, da aeração, da velocidade de agitação e da presença de substratos lipofílicos, entre outros (BANAT et al., 2010). Além da influência das condições de cultivo no processo de produção dos biossurfactantes, outras estratégias podem ser usadas no sentido de aumentar os rendimentos de produção, como o uso biorreatores, que constituem sistemas completamente fechados, permitem o controle das emissões e apresentam vantagens como o controle eficaz do processo, o maior controle das variáveis do processo (pH, temperatura, umidade, etc.), uma melhor incorporação de aditivos e a redução do tempo de processamento, fatores fundamentais em aplicações industriais (BANAT et al., 2010).

Portanto, considerando os graves problemas originados pela contaminação de metais pesados em solos e águas, a possibilidade de aplicação de biossurfactantes como tecnologia emergente na remediação de solos e os achados da literatura sobre o potencial de utilização de biossurfactantes de leveduras na remoção de metais pesados, o presente trabalho propôs a utilização de um biossurfactante produzido em meio de baixo custo na descontaminação de areia e efluente aquoso contendo metais pesados. Justifica-se, ainda, a apresentação de um insumo gerado com o desenvolvimento de novas tecnologias, possibilitando a aplicação de um produto biotecnológico efetivo, não só na descontaminação ambiental, mas também nos diversos segmentos industriais do país, com vantagens econômicas e sociais, que possibilitarão a melhoria da qualidade de vida e do bem-estar social.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e aplicar um biossurfactante na remoção de metais pesados em areia e efluente aquosos atendendo aos aspectos econômicos, sociais e de preservação ambiental.

2.2. Objetivos específicos

FASE I - produção do biossurfactante

- Produzir o biossurfactante em meio formulado com resíduos industriais em condições previamente estabelecidas.
- Determinar a cinética de crescimento do micro-organismo e de produção do biossurfactante.
- Isolar o biossurfactante produzido e determinar o rendimento de produção.
- Realizar o *scale-up* de produção do biossurfactante em biorreatores.

FASE II - Caracterização de biossurfactante

- Determinar a capacidade emulsificante e tensoativa do biossurfactante.
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante sob condições específicas de pH, temperatura e na presença de NaCl.
- Determinar a eficiência e a efetividade do biossurfactante através da determinação da tensão superficial e da Concentração Micelar Crítica.
- Determinar a composição química do biossurfactante.
- Determinar a carga iônica do biossurfactante.
- Determinar a toxicidade do biossurfactante.

FASE III - Aplicação do biossurfactante na remoção de metais pesados

- Investigar o potencial do biossurfactante na remoção de metais contidos em areia sob condições dinâmicas e estáticas.
- Determinar a cinética de remoção de metais pelo biossurfactante.
- Determinar a eficiência de remoção de metais em função do número de lavagens pelo biossurfactante.
- Investigar o potencial do biossurfactante na remoção de metais contidos em solução.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 BLOSSURFACTANTES

3.1.2 Definição

Os surfactantes constituem uma classe de compostos químicos utilizados em diversos setores industriais. Esses compostos são formados por estruturas moleculares contendo porções hidrofílicas e hidrofóbicas que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água) (MUTHUSAMI et al., 2008), promovendo a redução da tensão superficial e interfacial, conferindo a capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, solubilização e dispersão de fases (DELEU; PAQUOT, 2004; GAUTAM; TYAGI, 2006; NITSCHKE et al., 2007).

A utilização dos surfactantes se concentra nas indústrias de produtos de limpeza (sabões e detergentes), petróleo, cosméticos e produtos de higiene. A produção mundial de surfactantes excede três milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes para uso doméstico (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Alguns exemplos de surfactantes iônicos utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e sais de amônio quaternário (catiônico) (SINGH et al., 2007; BARROS et al., 2007; NITSCHKE et al., 2007).

Em função de sua natureza anfipática, os surfactantes podem ser adicionados em soluções, facilitando a solubilização, dispersão e dessorção dos contaminantes do solo, permitindo ainda sua reutilização (SILVA et al. 2014). Vários surfactantes sintéticos têm sido avaliados em testes de descontaminação (ASÇI et al., 2008). Por outro lado, a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem motivado pesquisas para utilização de surfactantes de natureza microbiológica, os chamados biossurfactantes ou biodetergentes.

3.1.3 Propriedades

A propriedade de maior importância para os agentes surfactantes é a tensão superficial, que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos (PACWA. -PŁOCINICZAK et al., 2011).

Define-se como superfície o limite entre um líquido e o ar e como interface o limite entre dois líquidos. Dessa forma, as tensões existentes entre as fases ar/água e óleo/água são conhecidas como tensão superficial e tensão interfacial, respectivamente (BANAT, 2010).

A tensão superficial é facilmente medida quantitativamente por um tensiômetro. Esta medição é a base da maior parte das avaliações iniciais para identificar a presença de um surfactante no meio. A tensão superficial ar/água para a água destilada é de aproximadamente 72 mN/m e a tensão interfacial para a água destilada contra n-hexadecano é de aproximadamente 40 mN/m. Tipicamente, surfactantes podem diminuir esses valores para cerca de 30-40 mN/m e 1 mN/m, respectivamente (MARCHANT; BANAT, 2012).

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. A concentração dessas micelas forma a Concentração Micelar Crítica (CMC) (Figura 1). Esta concentração corresponde à mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo. Quando a CMC é atingida, várias micelas são formadas (HAZRA et al., 2012).

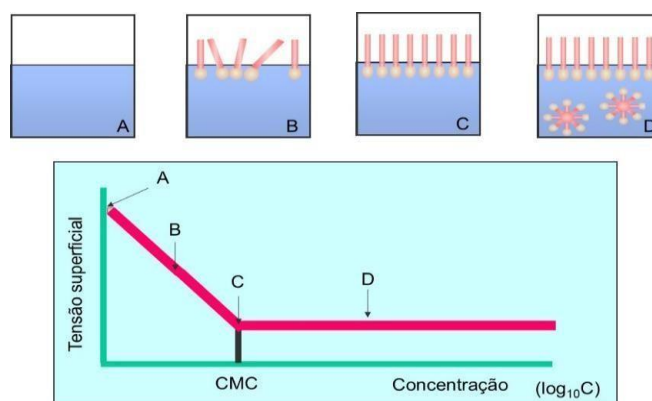


Figura 1. Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC)

Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa como gotículas microscópicas em outra fase líquida contínua. Dois tipos de emulsões podem ser formadas: água-em-óleo (a/o) (surfactante mais solúvel em óleo) e óleo-em-água (o/a) (surfactante mais solúvel em água).

A estabilidade de uma emulsão depende de muitos fatores, incluindo o tamanho das gotículas dispersas, que é favorecida através da redução da tensão interfacial. A presença de emulsificantes e de desemulsificantes estabiliza ou desestabiliza as emulsões, respectivamente (MAO et al., (2015).

A capacidade emulsificante é analisada pela habilidade do surfactante em gerar turbidez devido à suspensão de hidrocarbonetos, como n-hexadecano, em um sistema aquoso em análise, enquanto a capacidade de desemulsificação é geralmente avaliada pelo efeito do agente de-emulsificante sobre emulsões normais preparadas com agentes tensioativos sintéticos (PARKINSSON, 1985).

As propriedades físicas e químicas dos biossurfactantes descritas acima, 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 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 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 e
- biocompatibilidade e digestibilidade, o que garante a aplicação dessas biomoléculas nas 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 superprodutoras é rara e as conhecidas não são capazes de produzir altos rendimentos em surfactantes, além de necessitarem 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 e
- o aumento da produtividade é muitas vezes prejudicado pela formação de espuma, o que requer a utilização de meios diluídos.

3.1.4 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 (RON; ROSENBERG, 2001; MANEERAT, 2005; SILVA et al., 2014).

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 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):

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

Um exemplo de raminolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* está ilustrado na figura 2. Valores de tensão superficial de 29 mN/m são característicos destes componentes, que podem ser produzidos a partir de vários substratos incluindo alcanos (C11 e C12) piruvato, frutose, glicerol, óleo de oliva e glicose. A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, do pH, da composição dos nutrientes, substrato e da temperatura utilizada (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; CHRZANOWSKI et al., 2012).

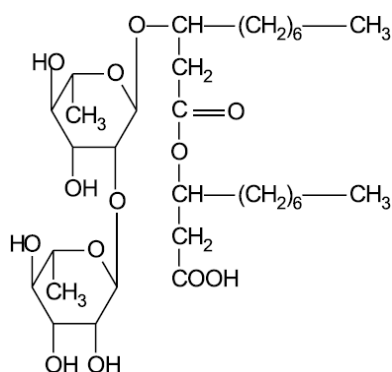


Figura 2. Estrutura de um raminolipídeo (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CHAKRABORTY; DAS, 2014)

A estrutura química de um sofrorolipídeo de *Candida bombicola* esta apresentada na figura 3. A tensão superficial desses biossurfactantes pode apresentar valores de 33 mN/m e reduções de 40 mN/m para 5 mN/m na tensão interfacial em n-hexadecano e água com 10 mg/L do sofrorolipídeos (KITAMOTO et al., 2009).

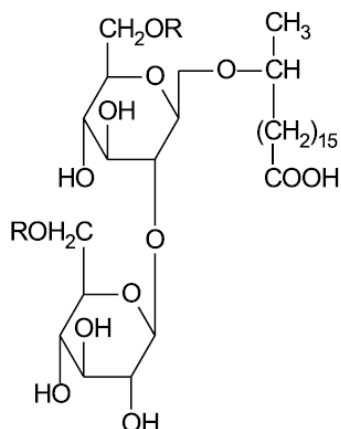


Figura 3. Estrutura de um sofrorolípdeo (NITSCHKE; PASTORE, 2002; CHAKRABORTY; DAS, 2014)

O lipopeptídeo surfactina de *Bacillus subtilis* contém sete aminoácidos ligados aos grupos carboxil e hidroxil do ácido com C14 (Figura 4). Concentrações de surfactina menores que 0,005% reduzem a tensão superficial para 27 mN/m. A solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, por outro lado, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (LU et al., 2007).

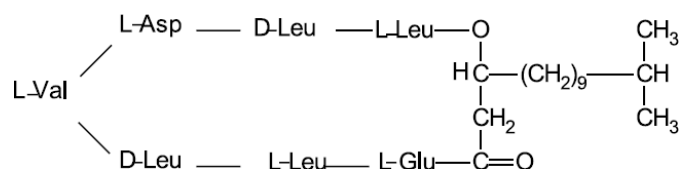


Figura 4. Estrutura da surfactina (NITSCHKE; PASTORE, 2002)

O emulsan, um polissacarídeo composto por ácidos graxos e proteínas está ilustrado na figura 5.

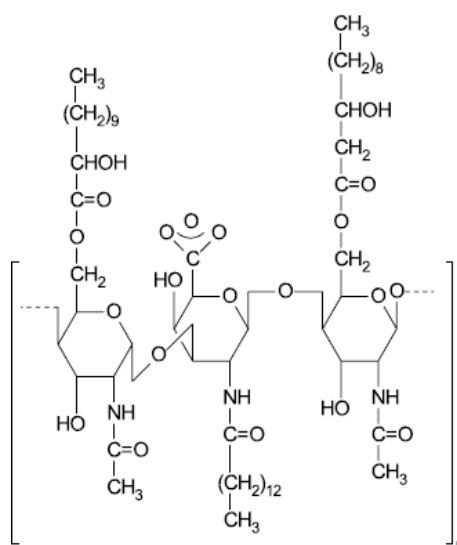


Figura 5. Estrutura do emulsan (NITSCHKE, PASTORE, 2002)

3.1.5 Micro-organismos Produtores

Uma grande variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos é capaz de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares (DELEU; PAQUOT, 2004), conforme descrito na Tabela 1.

As bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes.

Os raminolípeidos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* têm sido extensivamente estudados (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; CHRZANOWSKI et al., NITSCHKE et al., 2011; 2012; HENKEL et al., 2012). A composição e os rendimentos dependem do tipo do fermentador, do pH, da composição dos nutrientes, dos substratos e das temperaturas utilizadas (MULLIGAN, 2005).

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 (BARROS et al., 2007; LU et al., 2007). 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 (SARUBBO et al., 1999; 2001; 2006; 2007; RUFINO et al., 2007; 2008; GUSMÃO et al., 2010; LUNA et al., 2011a, b; 2013; SARUBBO; CAMPOS-TAKAKI, 2011).

Tabela 1. Principais classes de biossurfactantes respectivos micro-organismos produtores (SILVA et al., 2014)

Classe/tipo de Biossurfactante	Micro-organismos
Glicolipídeos	
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptideo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polymixyn	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácido graxo	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboiderato-lipídeos-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

Manana-lipídeo-proteína

*Candida tropicalis***Surfactantes particulados**

Vesículas

*Acinetobacter calcoaceticus***3.1.6 Produção de Biossurfactantes a Partir de Resíduos Industriais**

A maioria dos biossurfactantes conhecidos é produzida em substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, óleos e gorduras, embora muitos tenham sido obtidos a partir de substratos solúveis (SINGH et al., 2007; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). A disponibilidade e o tipo de matéria-prima podem contribuir consideravelmente para o custo de produção. Estima-se que 10 % a 30 % da matéria-prima represente o custo total de um produto biotecnológico (MUKHERJEE et al., 2006). Por outro lado, 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, MANEERAT, 2005; MARCHANT; BANAT, 2012;).

Nesse sentido, os resíduos industriais têm despertado grande interesse dos pesquisadores como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes. Muitos biossurfactantes têm sido produzidos a partir 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 (GALLERT; WINTER, 2002; TULEVA et al., 2002).

Os resíduos gerados a partir das refinarias de óleos vegetais e laticínios contêm grande quantidade de gorduras / gorduras e óleos que faz com que tais águas residuais não sejam facilmente degradadas. Os níveis elevados de gorduras e óleos em estes efluentes podem, ainda, causar poluição bruta de terra e água, devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (COD). Além disso, o elevado teor de gorduras e óleos frequentemente interfere com o procedimento normal de tratamento de águas residuais, resultando em aumento significativo do custo do processo e

do tempo. Assim, a remoção ou o pré-tratamento destas gorduras e óleos é necessário antes de se submeter o efluente às operações de tratamento biológico. Um grande número de métodos de pré-tratamento são utilizados para remover gorduras e óleos destas águas residuais. Esses tratamentos incluem separadores de placas inclinadas, sistemas de flotação por ar dissolvido e outros métodos de tratamento físico-químicos. No entanto, o custo destes métodos é considerado alto e a eficiência e remoção de gordura e óleo normalmente é baixa. Há poucos relatos disponíveis para degradação de gorduras e óleos por hidrólise alcalina/ácida/enzimática, e esses métodos ainda não são muito rentáveis. Métodos alternativos para lidar com o elevado conteúdo de gorduras e óleos em águas residuárias tais como a utilização de surfactantes visa facilitar a biodegradação de gorduras e óleos principalmente através do aumento da sua solubilidade. De fato, a utilização de surfactantes para facilitar a emulsificação e remoção de óleos de águas residuais tem sido explorada e usada com sucesso para o tratamento de lavagem de águas residuais (CAMMAROTA; FREIRE, 2006).

A seleção do substrato, entretanto, depende da escolha de um resíduo com um certo balanço de nutrientes para crescimento e produção. Os resíduos industriais com elevado valor de carboidratos ou lipídios encontrados são elementos necessários para o uso como substratos para produção de biossurfactantes (MERCADE et al., 1994; MAKKAR, CAMEOTRA, 1999; BARROS et al., 2007).

Nitschke e Pastore (2007) utilizaram com sucesso resíduos industriais de fritura de batata na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Anteriormente, Nitschke et al. (2004) havia selecionado microrganismos para a produção de biopolímeros utilizando resíduos agroindustriais como melaço, soro de leite e manipueira, obtendo valores de tensão superficial em torno de 27 mN/m. Rufino et al. (2008), Sobrinho et al. (2008), Luna et al. (2013) e Coimbra et al. (2009) utilizaram resíduos industriais na produção de biossurfactantes, 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 raminolipídeos e soforolipídeos por vários microrganismos (APARNA et al., 2012).

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, possibilita 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 os similares sintéticos (CANET et al., 2002; PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Outra condição essencial para o uso de biossurfactantes é que eles possam ser produzidos por micro-organismos não patogênicos. Os soforolipídeos (SLS) constituem um grupo de biossurfactante extracelulares produzido por várias espécies não patogênicas da levedura *Candida* (VAN BOGAERT et al., 2007). Em comparação com outros biossurfactantes, como, por exemplo, os raminolipídeos, que são produzidos por micro-organismos patogênicos, os SLS podem ser produzidos por espécies não patogênicas e também em quantidades muito maiores (VAN BOGAERT et al., 2007). Além disso, eles podem ser produzidos através da utilização de matérias-primas fermentativas de baixo custo tais como gordura animal (DESHPANDE; DANIELS, 1995), soro de queijo desproteínizado (DANIEL et al., 1998), melão de soja (SOLAIMAN et al., 2007), óleo residual de fritura (BATISTA et al., 2010), etc., pela levedura, a fim de reduzir o seu custo de produção. Os SLS e seus derivados também têm sido considerados promissores como tensioativos, emulsionantes e agentes antimicrobianos, (SOLAIMAN et al, 2007).

A Tabela 2 descreve alguns resíduos utilizados na produção de biossurfactantes.

Tabela 2. Resíduos industriais utilizados na produção de biossurfactantes e seus micro-organismos produtores (SILVA et al., 2014)

Resíduos industriais	Micro-organismos produtores	Referências
Óleo residual de canola e milhocina	<i>Pseudomonas cepacia</i> CCT6659	SILVA et al., (2013)
Glicerol	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCP0992	SILVA et al., (2010)
Suco de caju clarificado	<i>Bacillus subtilis</i> LAMI005	OLIVEIRA et al., (2013a)
Óleo residual e vinagre	<i>Bacillus pumilus</i>	OLIVEIRA et al., (2013b)
Resíduo de manipueira	<i>Bacillus subtilis</i> LB5a	BARROS et al., (2008)
Resíduo de refinaria de óleo de soja e milhocina	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	LUNA et al., (2011)
Resíduo de refinaria de óleo de soja e milhocina	<i>Candida sphaerica</i> UCP0995	SOBRINHO et al., (2008)
Gordura animal e milhocina	<i>Candida lipolytica</i> UCP0988	SANTOS et al., (2013)
Resíduo vegetal	<i>Candida glabrata</i> UCP1002	GUSMÃO et al., (2010)
Óleo de fritura de soja	<i>Candida tropicalis</i> UCP0996	BATISTA et al., (2010)
Melaço de cana	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SANTOS et al., (2010)

3.1.7 Aplicações Ambientais

Devido às diversas estruturas e propriedades, os biossurfactantes apresentam aplicação 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; MARCHANT; BANAT, 2012).

Até o presente momento, o maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde podem ser usados na limpeza de derramamento de óleos, na remoção de óleos de tanques de estocagem, na recuperação

avançada de petróleo e na biorremediação de solos e águas (GAUTAM; TYAGI, 2006; SINGH et al., 2007).

A contaminação ambiental causada pela atividade industrial, muitas vezes, se deve à liberação accidental ou deliberada de compostos orgânicos e/ou inorgânicos para o ambiente. Tais compostos representam problemas para a remediação, uma vez que se ligam facilmente a partículas de solo ou se espalham em meio aquoso. A aplicação de biossurfactantes na descontaminação de compostos orgânicos, tais como hidrocarbonetos, destina-se a aumentar a sua biodisponibilidade ou a mobilizar e remover os contaminantes por pseudossolubilização e emulsificação durante um tratamento de lavagem. A aplicação de biossurfactantes na recuperação de compostos inorgânicos, tais como metais pesados, por outro lado, envolve a ação quelante e remoção de tais íons durante a etapa de lavagem, a qual é facilitada pelas interações químicas entre os compostos anfífilos e os íons metálicos (BANAT et al., 2010; OLKOWSKA et al., 2012).

3.1.7.1 Aplicação 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 micronutrientes, características físico-químicas do histórico da poluição do contaminante ambiental e das partículas de solo ou outras às quais os organismos e contaminantes possam estar adsorvidos (MARGESIN; SCHINNER, 2001).

Os compostos anfipáticos são capazes de alterar as condições físico-químicas nas interfaces que afetam a distribuição das substâncias químicas entre as fases (TIEHM, 1994). Por exemplo, um solo contaminado por um hidrocarboneto contém pelo menos seis fases: bactérias, partículas de solo, água, ar, líquido imiscível e hidrocarboneto sólido. Os hidrocarbonetos podem ser particionados entre os diferentes estados: solubilizados na fase de água, ad/absorvidos a partículas do solo, sorvidos às superfícies celulares e

livres/insolúveis. Os biossurfactantes adicionados a este sistema podem interagir com ambas as partículas abióticas e as células bacterianas. Isto afeta os mecanismos de interação com os ambientes através da emulsificação dos contaminantes orgânicos.

As interações entre as micelas surfactantes e as células encontram-se entre as principais alterações que o componente bacteriano pode sofrer (VOLKERING et al., 1998). Estes fenômenos, de um lado, podem aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes solúveis, aumentando assim a velocidade de biodegradação, ou, por outro lado, podem resultar na inibição da biodegradação.

Apesar das inúmeras aplicações bem-sucedidas dos biossurfactantes, a literatura nesta área descreve resultados contrastantes. Por exemplo, os raminolipídios de *P. aeruginosa* podem estimular a degradação do n-hexadecano, mas não estimulam a degradação quando produzidos por *Rhodococcus*, mostrando a especificidade do micro-organismo. Em contraste, o biossurfactante de *R. erythropolis* 3C-9 aumentou significativamente a taxa de degradação de n-hexadecano. Portanto, o efeito da adição de biossurfactantes na biorremediação não é previsível, de modo que a eficácia de um dado surfactante precise ser avaliada experimentalmente (FRANZETTI et al., 2008). As interações entre as bactérias, os contaminantes e o biossurfactante podem ser interpretadas a partir de uma perspectiva funcional, considerando que o principal papel atribuído aos biossurfactantes seja seu envolvimento na captação de hidrocarbonetos (PERFUMO et al., 2010).

Surfactantes microbianos podem promover o crescimento microbiano em hidrocarbonetos, aumentando a área superficial entre o óleo e a água e, por meio de emulsificação, aumentando a pseudosolubilidade de hidrocarbonetos por meio de partições em micelas (VOLKERING et al., 1998).

Os biossurfactantes de elevada massa molar (bioemulsificantes) têm um grande potencial de estabilizar emulsões de hidrocarbonetos líquidos e água, aumentando a área superficial disponível para a biodegradação bacteriana. No entanto, eles têm sido raramente testados como estimuladores da biodegradação de hidrocarbonetos em sistemas de biorremediação, sendo os resultados descritos na literatura muito contrastantes (BARKAY et al., 1999;

FRANZETTI et al., 2009). Os biossurfactantes de baixa massa molar, acima da concentração micelar crítica (CMC), particionam uma fração significativa dos contaminantes hidrofóbicos nos núcleos micelares. Em alguns casos, isto resulta no aumento geral da biodisponibilidade dos contaminantes para os micro-organismos degradadores. Aplicações bem-sucedidas de raminolipídeo e surfactina em biorremediação foram avaliadas (MULLIGAN, 2009).

Pesquisas com consórcios microbianos e raminolipídeos demonstraram o potencial de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo (RAHMAN et al., 2006). A aplicação do raminolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 aumentou a biorremediação de gasolina adsorvida em solo (RAHAMN 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 organoclorados como DDT e ciclodienos (KARANTH et al., 1999).

Os modos específicos de absorção de hidrocarbonetos, no entanto, são não são totalmente compreendidos, como relatado nas seções anteriores. Recentemente, Cameotra e Singh (2009) elucidaram o mecanismo de absorção de n-hexadecano mediado por raminolipídeos de *P. aeruginosa*. Os raminolipídeos produziram uma emulsão com hexadecano, facilitando assim o contato entre o hidrocarboneto e as bactérias. Observou-se também que ocorreu absorção das gotículas dos hidrocarbonetos revestidos pelo biossurfactante, o que sugere a ocorrência de um mecanismo de pinocitose, e não um processo de captação bacteriana, como relatado anteriormente. Em contraste, sabe-se bem que a presença de um surfactante pode afetar prejudicialmente a biodegradação. Núcleos micelares podem reter contaminantes orgânicos, criando uma barreira entre os micro-organismos e as moléculas orgânicas, resultando na redução da disponibilidade do substrato.

Por exemplo, o Witconol SN70, um surfactante não iônico de álcool etoxilado, reduziu a taxa de biodegradação de hexadecano (COLORES et al., 2000).

Outro papel proposto para os biossurfactantes na captação de hidrocarbonetos é a regulação da ligação de células a superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas, alterando assim a hidrofobicidade de superfície celular (ROSENBERG et al., 1987; FRANZETTI et al., 2008). Este papel natural pode ser explorado através da adição de biossurfactantes para aumentar a hidrofobicidade de micro-organismos e facilitar o acesso das células aos substratos hidrofóbicos (SHREVE et al., 1995). Coimbra et al. (2009) descreveram estudos de hidrofobicidade com surfactantes de *Candida*. Chang et al. (2009) demonstraram o aumento da hidrofobicidade celular pelo acúmulo de diferentes ácidos graxos na superfície da célula durante o crescimento em hidrocarboneto com *R. erythropolis* NTU-1. A correlação entre a alteração da superfície da célula por saponinas e o grau de biodegradação de hidrocarbonetos foi relatada por Kaczorek et al. (2008).

3.1.7.2 Aplicação na Recuperação Avançada de Petróleo – MEOR

Os biossurfactantes também podem estar envolvidos na recuperação avançada de petróleo (MEOR - Microbial Oil Recovery Enhancement). Métodos de MEOR são usados para recuperar o óleo remanescente em reservatórios após os procedimentos de recuperação primária (mecânico) e secundária (físico) (SINGH et al., 2007; PACKWA-PŁOCINICZAK et al., 2011). A recuperação avançada de petróleo consiste em um importante processo terciário no qual os micro-organismos ou um dos seus metabólitos, incluindo biossurfactantes, biopolímeros, biomassa, ácidos, solventes, gases e enzimas, também são utilizados para aumentar a recuperação de petróleo a partir de depósitos esgotados. A aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo é um dos métodos mais promissores para recuperar uma parte substancial do óleo residual. O óleo remanescente fica muitas vezes localizado em regiões do reservatório que são de difícil acesso sendo o óleo aprisionado nos poros por pressão capilar. Os biossurfactantes reduzem a tensão interfacial entre o óleo / água e óleo/rocha. Isto reduz as forças capilares que impedem o

óleo de mover-se através dos poros da rocha. Os biossurfactantes podem também ligar-se fortemente com a interface óleo-água formando uma emulsão. Isso estabiliza o óleo dessorvido em água e permite a remoção de óleo, juntamente com a injeção de água (MARCHANT; BANAT, 2012). Bordoloi e Konwar (2008) investigaram a recuperação de petróleo bruto a partir de uma coluna de saturação sob condições de laboratório.

Estudos laboratoriais sobre MEOR utilizam tipicamente colunas que contêm o substrato desejado, geralmente areia. Este substrato é utilizado para demonstrar a utilidade dos biossurfactantes na recuperação de óleo dos reservatórios. Para este efeito, uma coluna de vidro é embalada com areia seca; em seguida, a coluna é saturada com o petróleo bruto e uma solução aquosa de biossurfactante é vertida na coluna. O potencial de biossurfactantes em MEOR é estimado através da medição da quantidade de óleo liberado da coluna após a saída da solução aquosa de biossurfactante da coluna. O experimento deve ser realizado em temperatura ambiente e elevada, como 70-90 °C, para avaliar a influência da temperatura sobre a recuperação de óleo induzida pelo biossurfactante.

Os biossurfactantes utilizados na experiência de Bordoloi e Konwar (2008) foram produzidos por bactérias isoladas de *P. aeruginosa* (MTCC7815, MTCC7814, MTCC7812 e MTCC8165). Os biossurfactantes das estirpes MTCC7815, MTCC7812 e MTCC8165 recuperaram cerca de 49-54% de óleo bruto a partir da coluna empacotada à temperatura ambiente, 52-57% a 70 °C e 58-62% a 90 °C. Bai et al. (1997) investigaram o potencial do raminolípido aniônico isolado de *P. aeruginosa* adsorvido em solo em colunas empacotadas. O biossurfactante foi capaz de remover 84% de hexadecano adsorvido em areia de 20-30 mesh (0,6-0,85 mm), enquanto que 22% de remoção foram obtidos quando areia de 40-50 mesh (0,3-0,42 mm) foi utilizada. A capacidade de remoção do raminolípido foi comparada com a capacidade de remoção dos surfactantes sintéticos SDS (CMC de 2360 mg/l), também aniônico, e Tween 80 (mono oleato de sorbitana polioxietileno 20) (CMC de 13 mg/l), não iônico, utilizados em concentração de 500 mg/l, para areia de 40/50 mesh. O SDS (472 mg/l) e o Tween 80 (51 mg/l) removeram 0 e 6% do hexadecano, respectivamente. Por outro lado, a capacidade do surfactante sintético SDS em

remover diesel adsorvido em solo contido em coluna demonstrou que, enquanto a água, adicionada como controle, foi capaz de remover 24,7% do diesel, o SDS removeu 97% do combustível. Nesse trabalho foi observada a influência de fatores como a concentração de surfactante e o tempo de contato na cinética de remoção do poluente (KHALLADI et al., 2009). Concentrações elevadas (2,5 e 5,0 g/l) do biossurfactante isolado da *P. aeruginosa* 57SJ, que apresentou uma CMC de 400 mg/l, foram necessárias para remover 70% de pireno adsorvido em solo com tamanho de partículas de 2 mm (BORDAS et al., 2007). O líquido metabólico livre de células contendo os isolados de *P. aeruginosa* MTCC7815, MTCC7812 e MTCC8165 cultivados em 2% de glicerol removeram cerca de 49-54% do óleo bruto contido em colunas empacotadas (BORDOLOI; KONWAR, 2008).

Além das aplicações em MEOR, os biossurfactantes podem também ser explorados para outras aplicações na indústria do petróleo. As propriedades desemulsificantes de alguns biossurfactantes, por exemplo, podem ser utilizadas para quebrar emulsões que se formam em vários passos da extração e do processamento de petróleo, permitindo assim uma melhor recuperação do produto. A redução da tensão superficial provocada pelos surfactantes microbianos pode também ser usada para separar o óleo da parte inferior dos tanques (SINGH et al., 2007; PERFUMO et al., 2010).

Embora uma série de ensaios de campo de aplicações “in situ” de MEOR sejam relatados na literatura (SEN, 2008), não está completamente elucidado se os micro-organismos introduzidos podem ser realmente eficazes na recuperação de óleo ou se eles competem com bactérias autóctones. A incapacidade de se comparar os testes realizados com controles de poços submetidos a procedimentos de tratamento semelhantes, sem introdução de micro-organismos vivos ou de produtos dificulta traçar conclusões válidas. Wang et al. (2008), usando marcadores moleculares observaram mudanças na comunidade microbiana, em um reservatório de óleo durante um processo de MEOR, concluindo que tanto bactérias exógenas e autóctones parecem estimular o aumento da recuperação do petróleo.

3.1.7.3 Lavagem de solos

A aplicação de biossurfactantes para remover os contaminantes microbianos de solos é uma tecnologia menos conhecida do que a tecnologia de aplicação avançada de biossurfactantes na biorremediação, uma vez que a eficiência de remoção é impulsionada principalmente pelas propriedades físico-químicas dos biossurfactantes e não pelos seus efeitos sobre a atividade metabólica ou alterações das propriedades na superfície celular. No entanto, os mecanismos que afetam a mobilização ou a solubilização do hidrocarboneto em solos se assemelham aos envolvidos no aumento da biodisponibilidade para a biorremediação (FRANZETTI et al., 2009; MULLIGAN, 2009; BANAT et al., 2010).

Assim, os biossurfactantes podem aumentar a biorremediação de hidrocarbonetos através de dois mecanismos. O primeiro inclui o aumento da biodisponibilidade do substrato para os micro-organismos, enquanto o outro envolve a interação com a superfície da célula o que aumenta a hidrofobicidade da superfície de substratos hidrofóbicos permitindo mais facilmente sua associação com as células bacterianas (PRIETO et al., 2008). Ao reduzir a tensão superficial e interfacial, os biossurfactantes aumentam as áreas de superfície de compostos insolúveis que conduzem a uma maior mobilidade e biodisponibilidade de hidrocarbonetos. Em consequência, os biossurfactantes aumentam a biodegradação e a remoção de hidrocarbonetos.

A adição de biossurfactantes pode aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos por mobilização, solubilização ou emulsificação (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

A capacidade de solubilização depende da habilidade do surfactante em aumentar a solubilidade dos constituintes hidrofóbicos na fase aquosa. Um grande aumento desta capacidade é observado acima da CMC, a qual é atribuída à partição do hidrocarboneto no sítio hidrofóbico das micelas surfactantes. Neste processo, maiores concentrações em surfactantes são normalmente requeridas uma vez que a solubilidade dos constituintes dos hidrocarbonetos na solução surfactante dependerá totalmente da concentração do surfactante (BAI et al., 1997).

A mobilização ocorre em concentrações abaixo da CMC e pode ser dividida em deslocamento e dispersão. O deslocamento consiste na liberação de gotas de hidrocarbonetos do meio poroso devido à redução na tensão interfacial. Partindo de uma explicação teórica, os hidrocarbonetos serão removidos se a tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase oleosa for suficientemente reduzida a fim de superar as forças de capilaridade que causam a formação da saturação residual. A dispersão é o processo no qual o hidrocarboneto é disperso na fase aquosa como emulsões muito pequenas. As emulsões não são normalmente estáveis termodinamicamente. Contudo, elas podem permanecer estáveis por períodos significantes de tempo em função de restrições cinéticas. A dispersão está relacionada à tensão interfacial e à concentração do surfactante e difere do deslocamento uma vez que o processo de deslocamento está relacionado apenas à tensão interfacial entre as fases aquosa e hidrofóbica, sem formação de emulsões (BAI et al., 1997).

A eficiência de um surfactante na remoção de compostos hidrofóbicos depende também do pH e da força iônica da solução, que pode alterar a configuração dos agregados micelares e a sorção do surfactante ao solo. A sorção do surfactante ao solo limita, por sua vez, o transporte do hidrocarboneto pelo surfactante. Os raminolipídeos são considerados bons exemplos de surfactantes aniônicos uma vez que são menos retidos pelo solo do que outros surfactantes não iônicos ou neutros devido à carga negativa superficial dos solos (BORDAS et al., 2007).

Vários trabalhos descrevem o uso de biossurfactantes para a lavagem de solos. Sobrinho et al. (2008) demonstraram que o biossurfactante isolado de *C. sphaerica* foi capaz de remover 65 % do óleo de motor adsorvido em areia. O biossurfactante de *C. antarctica* demonstrou capacidade de remover cerca de 50 % de óleo adsorvido em areia (ADAMCZAC; BEDNARSKI, 2000), enquanto a solução do biossurfactante isolado de *C. glabrata* removeu cerca de 84 % do óleo de motor adsorvido (LUNA et al., 2009). O biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduos agroindustriais foi aplicado com sucesso na remoção de derivado de petróleo em solo da formação barreira (RUFINO et al., 2011). Resultados obtidos por Abu-Ruwaida et al. (1991) para o líquido metabólico livre de células contendo o

biossurfactante produzido por *Rhodococcus* demonstraram remoções de 86 % de óleo bruto residual adsorvido em areia. O biossurfactante de *P. aeruginosa* UCP0992 cultivada em glicerina removeu percentuais elevados de diesel adsorvido em amostras de areia (SILVA et al., 2010). Mulligan (2009) analisou a aplicação de biossurfactantes na lavagem de solos contaminados por hidrocarbonetos e metal. Franzetti et al. (2009) relataram uma remoção eficiente de petróleo bruto a partir de solo usando um bioemulsificante extracelular produzido por *Gordonia* sp.BS29.

3.1.7.4 Aplicação na limpeza de reservatórios de óleos

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 bruto, após quebra da emulsão (MULLIGAN; WANG, 2004; SINGH et al., 2007).

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 (MULLIGAN; WANG, 2004).

3.1.7.5 Aplicação na remoção de metais pesados

O termo coletivo “Metal pesado” se aplica ao grupo de metais e metalóides com densidades atômicas superiores a 4000 kg/m³, ou 5 vezes superiores a água e que são componentes naturais da crosta terrestre. Embora alguns deles atuem como micronutrientes essenciais para os seres vivos, em concentrações mais elevadas podem levar a intoxicação grave (HASHIM et al., 2011; MAO et al., 2015). As formas mais tóxicas destes metais, nas suas

espécies iônicas, são os estados de oxidação mais estáveis, como por exemplo, Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , As^{3+} os quais reagem com moléculas biológicas do corpo para formar compostos biotóxicos extremamente estáveis, que são de difícil dissociação (DURUIBE et al., 2007). No ambiente, os metais pesados são geralmente mais persistentes do que os contaminantes orgânicos, tais como os pesticidas ou os derivados de petróleo. Os metais pesados não são biodegradáveis; eles só podem ser transferidos de um estado químico para outro produto, alterando sua mobilidade e toxicidade. Eles podem se tornar móveis em solos, dependendo do pH, e de sua especiação. A química e a especiação de alguns metais pesados estão discriminadas na Tabela 3. De modo a determinar a especiação de metais em solos, extratores específicos são utilizados para solubilizar diferentes fases de metais. Através da extração sequencial com as soluções de forças cada vez maiores, a uma avaliação exata das diferentes frações pode ser obtida (TESSIER et al., 1979). Assim, uma fração pode ser lixiviada ao aquífero ou pode se tornar biodisponível para os organismos vivos (SANTONA et al., 2006).

Os metais ocorrem em diferentes formas: como íons dissolvidos em água, vapor, ou sais minerais em rochas, areia e solo. Eles podem também estar ligados a moléculas orgânicas e inorgânicas ou atrelados por partículas no ar. Ambos os processos naturais e antropogênicos emitem metais para o ar e água (AGUIAR et al., 2002; JUWARKAR et al., 2007).

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

O acúmulo mundial de metais pesados em solos europeus e americanos já atinge valores de 939.000 t de cobre, 783.000 t de chumbo, 1.372.000 t de zinco e 22.000 t de cádmio (HAZRA et al., 2012). Nos Estados Unidos, por

exemplo, o chumbo se encontra presente em 15% dos terrenos contaminados, seguido de cromo, cádmio e cobre, encontrados em cerca de 7-11% dos solos.

No Brasil, apesar de não possuir uma legislação adotada à realidade do país para os níveis máximos permitidos, registra altos índices de contaminação industrial desses poluentes.

Nos últimos anos, a Companhia Mercantil e Industrial Ingá, indústria de zinco, situada a 85 km do Rio de Janeiro, desativada há quase 15 anos, transformou-se na maior área de contaminação de lixo tóxico no Brasil. Metais pesados como zinco, cádmio, mercúrio e chumbo continuam poluindo o solo, a água e atingem o mangue, afetando a vida da população. Isso ocorreu porque os diques construídos para conter a água contaminada não têm recebido manutenção há 5 anos, e dessa forma os terrenos próximos foram inundados, contaminando a vegetação do mangue. Atualmente a área foi arrematada pela Usiminas e passa por processo de descontaminação. Outro caso aconteceu em 1999 em Bauru, SP. A Indústria de Acumuladores Ajax, uma das maiores fábricas de baterias automotivas do país, contaminou com chumbo expelido pelas suas chaminés 113 crianças, sendo encontrados índices superiores a 10 miligramas/decilitro. A cidade de Paulínia, em SP também foi contaminada pela Shell Química do Brasil. Dos 166 moradores submetidos a exames, 53% apresentaram contaminação crônica e 56% das crianças revelaram altos índices de cobre, zinco, alumínio, cádmio, arsênico e manganês. Em adição observou-se também, a incidência de tumores hepáticos e de tireóide, alterações neurológicas, dermatoses, rinites alérgicas, disfunções gastrointestinais, pulmonares e hepáticas (TEIXEIRA, 2014).

Tabela 3. Química e especiação de alguns metais pesados

Metal pesado	Especiação e química	Limites de concentração	Referências
	Pb ocorre nos estados de oxidação 0 e +2. O Pb (II) é a forma mais comum e reativa do chumbo. Compostos de reduzida solubilidade	Superfície de solo agrícola: 7-20 ppm. Níveis no solo: até 300	(BODEK et al., 1988; EVANKO; DZOMBAK, 1997;

Chumbo	formados por complexação com compostos inorgânicos (Cl^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}) e ligandos orgânicos (ácido húmico, EDTA, aminoácidos). Os processos primários que influenciam a fixação de Pb no solo incluem adsorção, troca iônica, precipitação e complexação com a matéria orgânica sorvida.	ppm. Nível máximo de contaminante na água potável segundo a USEPA: 0,015 ppm.	HAMMER; HAMMER, 2004; WHO, 2000)
Cromo	Cr ocorre nos estados de oxidação +6 e +3. O Cr(VI) é a forma dominante e tóxica do Cr nos aquíferos. A maioria das espécies de Cr (VI) incluem cromato CrO_4^{2-} e dicromato $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (especialmente Ba^{2+} , Pb^{2+} and Ag^+). O Cr (III) é a forma dominante de Cr em pH reduzidos (<4). Cr(VI) pode ser reduzido a Cr(III) pela matéria orgânica e íons S^{2-} e Fe^{2+} sob condições anaróbicas. A lixiviação de Cr(VI) aumenta com o aumento do pH do solo.	Concentração normal no subsolo: <0.001 ppm. Dose letal: 1-2 g. Nível máximo de contaminante na água potável segundo a USEPA: 0,1 ppm.	LENNTECH, 2004; SMITH et al., 1995
Zinco	Zn ocorre nos estados de oxidação 0 e +2. Forma complexos com ânions, aminoácidos e ácidos orgânicos. Em pH altos, o Zn está disponível. Zn hidrolisa em pH 7.0-7.5, formando $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Ele precipita rapidamente sob condições	Concentração natural de Zn nos solos: 30-150 ppm. Concentração nas plantas: 10-150 ppm. Toxicidade	(EVANKO; DZOMBAK, 1997; LENNTECH, 2004; SMITH et al., 1995)

	reduzida pode co-precipitar com hidróxidos de Fe ou manganês.	em plantas: 400 ppm. Limite na água pela WHO: 5 ppm.
Cádmio	Cd ocorre nos estados de oxidação 0 e +2. Hidróxidos ($\text{Cd}(\text{OH})_2$) e carbonatos (CdCO_3) predominam pH elevados, enquanto Cd^{2+} e espécies aquosas de sulfatos predominam em pH mais baixos (<8). Precipita na presença de fosfato, arsenato, cromato, sulfeto, etc. Mostra mobilidade na faixa de pH entre 4.5-5.5.	Concentração (MATTHEWS; DAVIS, 1984; SMITH et al., 1995) natural de Cd nos solos: >1 ppm. Concentração nas plantas: 0,005-0,02 ppm. Toxicidade em plantas: 5-30 ppm. Nível máximo de contaminante na água segundo a USEPA: 0,005 ppm
Arsênio	As ocorre nos estados de oxidação -3, 0, +3 e +5. In ambientes anaeróbios, o As(V) é dominante, usualmente na forma de arsenato (AsO_4^{3-}). Se comporta como quelato e pode coprecipitar com/ou se adsorver a hidróxidos de Fe sob condições ácidas. Sob condições reduzidas, o As(III) domina, existindo como	Nível máximo (BODEK et al., 1988; SMITH et al., 1995) de contaminante na água potável segundo a USEPA: 0,01 ppm. WHO: 0,01 ppm.

	arsênio (AsO_3) ³⁻ —o qual é solúvel em água e pode se adsorver/coprecipitar com sulfetos metálicos.		
Ferro	Fe ocorre nos estados de oxidação 0, +2, +3 e +6. Compostos organometálicos contêm estados de oxidação +1, 0, -1 e -2. Fe(IV) é um intermediário comum em muitas reações bioquímicas de oxidação. Muitos compostos de várias valências contêm ambos centros Fe(II) e Fe(III), como por exemplo, magnetita e azul da prússia.	Nível de ingestão máxima tolerável: Adultos: 45 mg/dia Crianças: 40mg/dia.	(HOLLEMAN et al., 1985)
Mercúrio	Hg ocorre nos estados de oxidação 0, +1 e +2. Pode ocorrer na forma alquilada (metil/etil mercúrio) dependendo da condutividade elétrica e do pH do sistema. Hg^{2+} e Hg_2^{2+} são mais estáveis sob condições oxidantes. A sorção em solos, sedimentos e materiais húmicos é dependente do pH e aumenta com o pH.	Concentração natural nos solos: >0,0002 ppm. Limite regulatório da USEPA na água potável: 0,002 ppm.	(BODEK et al., 1988; SMITH et al., 1995)
Cobre	Cu ocorre nos estados de oxidação 0, +1 e +2. O íon cúprico (Cu^{2+}) é a espécie mais tóxica de Cu, como por exemplo o $\text{Cu}(\text{OH})^+$ e o $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$. Em sistemas aeróbios alcalinos o CuCO_3 é a espécie solúvel	Concentração natural no solo: 2-100 ppm. Doses normais em plantas: 5-30	(DZOMBAK; MOREL, 1990; LAGREGA et al., 1994)

dominante.	Em ambientes	ppm.
anaeróbios, o CuS(s) irá se formar		Nível tóxico
na presença de enxofre. O Cu		em plantas:
forma complexos fortes com		30-100 ppm.
ácidos húmicos.		Nível máximo
		de
		contaminante
		na água
		segundo a
		USEPA:
		1,3 ppm.

Tecnologias de tratamento de metais pesados

Ao longo das últimas décadas, muitas tecnologias de remediação foram aplicadas para tratar solos e lençóis freáticos contaminados em todo o mundo (HASHIM et al., 2011). Muitos documentos sobre essas tecnologias para remediação de poluentes orgânicos e inorgânicos estão disponíveis (USEPA, 1997; MULLIGAN et al., 2001; KHAN et al, 2004; DIELS et al, 2005; SCULLION, 2006). Muitos trabalhos de Revisão sobre a remoção de metais pesados de águas residuais também estão publicados (FU; WANG, 2011). Além do relatório da USEPA (1997), nenhum documento revendo as tecnologias de remediação de metais pesados em águas subterrâneas foi disponibilizado nos últimos tempos. As tecnologias em aplicação, em algumas condições operacionais, possuem alguma limitação em virtude da qual podem não funcionar tão eficazmente em outras condições (HASHIM et al., 2011).

As águas subterrâneas são inteiramente relacionadas com o solo através do qual elas fluem. No passado, algumas tecnologias foram aplicadas para remover apenas os produtos petrolíferos, enquanto outras foram destinadas à remoção dos metais pesados. Com o passar dos anos, essa barreira foi sendo ultrapassada à medida que pesquisadores de todo o mundo têm combinando várias tecnologias para atingir os resultados desejados. As

tecnologias de remoção de metais pesados estão classificadas em três categorias: Tecnologias Químicas, Tecnologias Biológicas / Bioquímica / Biossortivas e Tecnologias Físico-Químicas. Em alguns casos, estas tecnologias se sobrepõem como consequência da nova face da ciência e da tecnologia no mundo moderno, onde estudos interdisciplinares estão ganhando terreno sobre o campo de estudos compartimentados (HASHIM et al., 2011).

Tecnologias químicas de tratamento

Os contaminantes da água subterrâneas são muitas vezes dispersos em plumas sobre grandes áreas, bem abaixo da superfície, tornando as tecnologias convencionais de remediação de difícil aplicação. Nesses casos, as tecnologias de tratamento químico podem ser a melhor escolha. Os produtos químicos são utilizados para diminuir a toxicidade ou a mobilidade dos contaminantes metálicos, convertendo-os estados inativos. A oxidação e a redução de reações de neutralização podem ser utilizadas para este fim (EVANKO; DZOMBAK, 1997).

A redução é o método mais utilizado (YIN; ALLEN, 1999). Estas tecnologias são aplicadas principalmente para o controle de grandes plumas de contaminantes espalhados por uma grande área no fundo dos aquíferos. Redutores tais como o ditionito (composto aniônico de enxofre, com a fórmula química $[S_2O_4]^{2-}$) e sulfeto de hidrogênio gasoso podem ser injetados na zona contaminada, mas o pH alcalino e a alta permeabilidade do solo são pré-requisitos. O fornecimento de gás torna-se difícil e pode ser usado nitrogênio como gás vetor. Intermediários tóxicos são formados durante o processo de redução e estes não podem ser adequadamente manipulados.

O ferro coloidal (Fe zero e Fe II) é outro redutor muito aclamado por seu fácil manuseio. Ele pode ser injetado no fundo do aquífero, mas sofre corrosão rápida e também produz subprodutos tóxicos. Alguns sais ferrosos são utilizados principalmente para a redução de cromato, mas este processo é adequado apenas para as regiões de subsuperfície, não para os aquíferos. A lavagem química fornece um método muito eficaz e direto de lidar com o problema de contaminação por metais pesados. Essa tecnologia promove a

mobilidade do metal e sua migração para a fase líquida por dessorção e solubilização. Esta tecnologia pode ser considerada uma solução permanente, permitindo ainda a reciclagem do solo remediado e consequentemente o reuso da terra (HASHIM et al., 2011). Normalmente, a lavagem do solo com ácidos e com agentes quelantes como o EDTA são as técnicas mais aplicadas. Contudo, a lavagem com ácidos leva a redução da fertilidade do solo e a alterações na composição química e física em virtude da dissolução de minerais (REED et al., 1996).

A utilização de EDTA (ácido etileno diamino tetracético), por outro lado, é preocupante do ponto de vista salutar, em virtude de sua natureza cancerígena e de segurança, em função da sua degradação reduzida, além de ser um produto dispendioso, embora possa ser regenerado e reutilizado. A dificuldade de recuperação do metal pesado do complexo metal-EDTA também restringe o uso desta técnica. O tratamento *ex-situ* do solo contaminado é um assunto complexo, de difícil manuseio. O processo de lavagem que emerge gera, assim, um outro perigo e sua aplicação é de fato uma questão complexa.

Tecnologias físico-químicas de tratamento

As técnicas físico-químicas dependem de processos físicos ou de atividades como construção de barreiras, adsorção física ou absorção, transferência de massa ou processos bioquímicos. Na maioria das vezes, dois ou mais processos são usados em conjunto para lidar com o problema de contaminação. As barreiras reativas permeáveis (BRP) apresentam a solução mais prática dentre as técnicas de remediação das águas subterrâneas.

A USEPA (1989) definiu as BRP como a criação de barreira física a jusante da pluma de contaminação que têm como objetivo "filtrar" os contaminantes que atravessam a mesma e promovem o tratamento por meio de reações químicas e/ou biológicas, ou seja, essa tecnologia consiste em imobilizar os metais pesados numa matriz sólida fortemente ligada ao solo, minimizando a migração. No entanto, elas são propensas a problemas sérios como entupimento e redução da permeabilidade, o que leva ao desvio do fluxo de águas subterrâneas. O esgotamento de reatividade de barreiras também

dificulta a sua atividade e recarga, havendo necessidade de substituição ou reposição, o que se torna um desafio nesta tecnologia, sendo necessário seu constante monitoramento a fim de garantir o desempenho satisfatório. Essa tecnologia depende principalmente dos processos de sorção, de precipitação e dos processos de redução e biológicos.

O processo de sorção nas barreiras é conseguido através da utilização do ferro absorventes à base, carvões ativados, materiais de zeólitos (minerais porosos, especialmente aluminossilicatos hidratados que possuem uma estrutura *aberta* que pode acomodar uma grande variedade de íons positivos, como o Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , entre outros) bem como bioabsorventes. No entanto, com a mudança no ambiente do solo, por exemplo pH e potencial redox, os metais pesados sorvidos podem mais uma vez ganhar mobilidade. Adsorventes de carvão ativado possuindo grupos tensoativos podem absorver uma grande variedade de metais pesados, podem ser regenerados e também podem ser acoplados com micro-organismos para imobilização reforçada do metal.

Os zeólitos apresentam elevada taxa de frações moleculares, dependendo do teor de mineral e da mineralogia. Sorbentes como o Ferro são extremamente populares para prender o arsênico da água subterrânea e da atividade depende do conteúdo de oxigênio da água e condição aeróbia ou anaeróbia do aquífero. A precipitação química em barreiras reativas envolve a utilização de vários agentes químicos como o ferro metálico, agentes complexantes alcalinos e magnésia cáustica para prender os metais pesados móveis, convertendo-os quimicamente a seu estado insolúvel.

O Fe coloidal (zero), como agente precipitante, pode imobilizar um grande número de metais pesados, como por exemplo Cr, Ni, Pb, Mn, Se, Co, Cu, Cd, Zn, Ca, Mg, V, Sr e Al, que co-precipitam com ele. No entanto, estas precipitações resultam na corrosão de ferro metálico e no entupimento da barreira que finalmente perde a sua permeabilidade. Magnésia e agentes cáusticos alcalinos complexantes, tais como o calcário aumentam o pH da corrente contaminada, como, por exemplo, pluma água subterrânea e drenagem ácida de mina, precipitando assim os metais pesados. Às vezes, a compostagem também pode ser usada para suportar o crescimento micro-

organismos redutores de metal. As barreiras biológicas abrigam os micro-organismos capazes de precipitar os metais pesados.

A liberação de nutrientes ao longo da barreira é uma dificuldade enfrentada por essa técnica. Mecanismos de redução biológica de sulfatos e desnitrificação ajudam na remoção de Cr, Se, Al, Fe, Fe, Ni, Zn, Al, Mn, Cu, L, A e V. Mais uma vez, as BRP contendo Ferro coloidal podem ser melhoradas fornecendo micro-organismos, nutrientes e substratos para remover, Sr, Pb, Cd, Zn, Ni e pelo processo redução biológica dos sulfatos. Os mecanismos de adsorção, absorção e de filtração fornecem o maior escopo de aplicação prática, bem como opções de pesquisa para a remoção de metais pesados de águas subterrâneas. Carvão ativado, técnicas de filtração por membranas, surfactantes, subprodutos industriais e resíduos (madeira de bordo cinza), diferentes materiais ferrosos (Ferro coloidal, Fe_3O_4 , FeCl_3) e minerais têm sido pesquisados e aplicados ao longo dos anos para a remoção de metais pesados da água, do solo e em outras matrizes. Estes podem ser usados de forma semelhante em BRP ou zonas reativas para tratar águas subterrâneas também.

Tratamentos eletrocinéticos às vezes demonstram alta eficiência de remoção de metais pesados de águas subterrâneas, dependendo dos fatores, tais como o teor de água, pH, condutividade iônica, textura, porosidade e taxa de fluxo das águas subterrâneas. Este processo de tratamento pode ser combinado com outros processos, como as BRP, filtração por membranas, lavagem com surfactante e bioaumento, para atingir as metas de remediação com sucesso. Algumas outras técnicas de remediação do solo, como por exemplo solidificação e a separação magnética nunca são aplicados a águas freáticas, mas podem ser pesquisados para utilização juntamente com algumas outras tecnologias (HASHIM et al., 2011).

Tecnologias biológicas, bioquímicas e biossortivas de tratamento

A atividade biológica natural não tem a capacidade de remover metais pesados a partir de camadas mais profundas do solo ou dos lençóis freáticos. No entanto, os processos biológicos, tais como a fitorremediação e a utilização

de micro-organismos (biorremediação) podem ser utilizados para fins de reparação de longa duração em conjugação com qualquer outra reparação mais intensa (HASHIM et al., 2011). Os micro-organismos podem influenciar metais de várias maneiras. Algumas formas de metais podem ser transformadas por processos redox ou por alquilação. Os metais também podem ser acumulados por micro-organismos por ingestão metabólica independente (passiva) ou por absorção dependente do metabolismo (ativa).

Os micro-organismos podem influenciar indiretamente a mobilidade do metal afetando o pH ou pela produção ou liberação de substâncias que alterem a mobilidade dos metais (BRIUNS et al., 2000; LEDIN et al., 2000). Organismos geneticamente manipuladas podem ser utilizados para o papel mais ativo neste processo. A Biorrestauração aprimorada é uma área altamente pesquisada. A imobilização de radionuclídeos, como U, Tc e Ra por micro-organismos de espécies *Geobacter* é método muito novo. Biobarreiras podem ser usadas para remediar tais radionuclídeos das águas subterrâneas.

O processo de bioprecipitação *in situ* imobiliza os metais pesados como precipitados de sulfetos através do processo de redução biológica de sulfatos, mas a estabilidade dos sulfetos sob alteração do pH e condições redox continua a ser uma questão discutível. O processo de redução dos sulfatos envolve uma ampla escolha de doadores de elétrons para aumentar as atividades das bactérias redutoras de sulfato e pode ser aplicado em uma barreira reativa ou num biorreator anaeróbio *ex-situ*, o que é bastante difícil. Drenagens ácidas de mina podem ser eficazmente tratados pelo processo de redução biológica de sulfatos. A remoção de arsênio *in-situ* por micro-organismos e óxidos ferrosos tem provado ser uma tecnologia muito eficaz e sustentável na prática. É um processo de longo prazo e há muito efeito duradouro sobre o aquífero. Nenhum desperdício é gerado e praticamente nenhum produto químico é necessário para criar uma zona de oxigenação no aquífero.

O processo mantém um bom equilíbrio de coprecipitação entre As(V) e Fe(III). A biossorção é uma solução muito prática para remediação de metais pesados e é um campo muito pesquisado, trazendo os metais para fora do solo ou do aquífero matriz. No entanto, sua aplicação no campo para remoção de

metais pesados é ainda limitada. A absorção do metal por vários organismos é principalmente um processo natural mais lento que pode ser usado em campo para as medidas de reparação de longa duração. Isto pode ser aplicado em reatores de leito fluidizado também. No entanto, os metais imobilizados podem ser lixiviados de volta à solução sob influência do pH ácido. Resíduos agrícolas e materiais celulósicos têm um enorme potencial para serem usados para bioabsorção de metais pesados através de processo de troca iônica, complexação e interações eletrostáticas. Pré-tratamentos simples envolvendo agentes químicos podem ser necessários para aumentar o poder de sorção e a estabilidade. Baixo custo, ausência de toxicidade, alta taxa de adsorção e fácil disponibilidade tornam esta opção de investigação científica mais lucrativa e intensa neste campo (HASHIM et al., 2011).

Remoção de metais pesados por biossurfactantes

Uma solução alternativa em potencial para a remediação de solos contaminados por metais consiste no uso de biossurfactantes. Os biossurfactantes possuem vantagens inquestionáveis uma vez que os micro-organismos capazes de produzir compostos surfactantes não precisam ter capacidade de sobrevivência no solo contaminado pelo metal pesado, embora o uso de biossurfactantes requera adição contínua de novas porções destes compostos (PACKWA-PLOCINIKZAC et al., 2011). Os biossurfactantes facilitam a solubilização, dispersão e dessorção dos contaminantes do solo, permitindo ainda sua reutilização (HASHIM et al., 2011).

Dois métodos estão envolvidos na remediação de solo contaminado com metais. A primeira técnica é utilizada *ex-situ* – o solo contaminado é escavado, colocado na coluna de vidro e lavado com solução de biotensioativo. Por sua vez, o segundo método consiste na lavagem do solo *in situ* e envolve a utilização de tubos de drenagem e trincheiras para a introdução e coleta de solução de biossurfactante no solo (HERMAN et al. 1995; HASHIM et al., 2011).

Curiosamente, os biossurfactantes podem ser usados para a remoção de metal a partir do solo. Biossurfactantes podem ser aplicados a uma pequena

parte do solo contaminado em que o solo é colocado em um enorme misturador de cimento, sendo o complexo biossurfactante-metal liberado para fora, o solo depositado de volta, e o complexo biossurfactante-metal tratado para precipitar o biossurfactante, deixando para trás o metal. A ligação formada entre o metal carregado positivamente e o tensoativo carregado negativamente é tão forte que a água de lavagem através do solo remove o complexo de metal do tensoativo a partir da matriz do solo.

Mecanismos de remoção de metais pesados por biossurfactantes

O uso de biossurfactantes apresenta vantagens inquestionáveis, uma vez que as estirpes bacterianas capazes de produzir compostos tensoativos não necessitam apresentar capacidade de sobrevivência em solos contaminados com metais pesados. No entanto, o uso de biossurfactantes isoladamente requer a adição contínua de novas porções destes compostos (PACKWA-PLOCINIKZAC et al., 2011).

A utilidade de biossurfactantes para a biorremediação de metais pesados do solo contaminado é baseado principalmente em sua capacidade de formar complexos com metais. Os biossurfactantes aniônicos criam complexos com metais formados por ligações iônicas. Essas ligações são mais fortes do que as ligações do metal com os complexos de solo e o complexo metal-biossurfactantes é desorvido a partir da matriz do solo para a solução do solo, devido à redução da tensão interfacial. Os biossurfactantes catiônicos podem substituir os mesmos íons carregados pela competição por algumas, mas não todas as superfícies carregadas negativamente (troca iônica). Os íons metálicos também podem ser removidos da superfície do solo pelas micelas biossurfactantes (SINGH; CAMEOTRA, 2004; JUWARKAR et al., 2007; ASÇI et al., 2008; PACWA-PLOCINIKZAC et al., 2011).

De forma mais detalhada, considera-se que a remoção de metais por biossurfactantes iônicos ocorre na seguinte sequência: (1) sorção do biossurfactante à superfície do solo e complexação com o metal, (2) destaque do metal do solo para a solução e (3) associação com as micelas do biossurfactante. Neste caso, os metais pesados ficam presos nas micelas

através de interações eletrostáticas, podendo ser facilmente recuperados por técnicas de separação por membranas (MULLIGAN, 2009), conforme ilustrado na Figura 6.

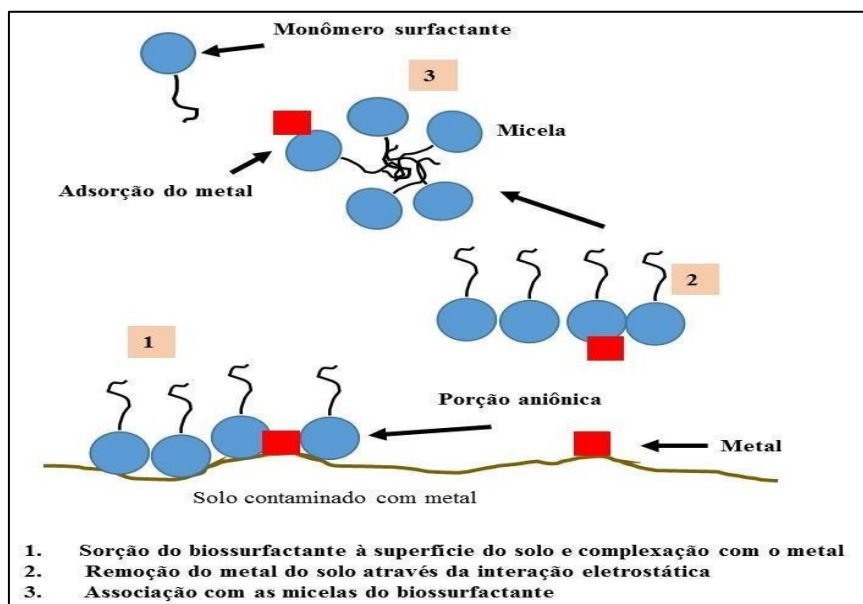


Figura 6. Remoção de metais por biossurfactantes iônicos

Vários surfactantes sintéticos têm sido avaliados em testes de descontaminação (ELLIS et al., 1985; NASH et al., 1987; ASÇI et al., 2008). Por outro lado, a necessidade de substituição de compostos sintéticos por similares naturais tem levado a pesquisas para utilização de biossurfactantes (MULLIGAN, 2009). Alguns biossurfactantes utilizados na biorremediação de solos contaminados têm sido propostos para utilização na remoção de metal nos últimos anos (PACWA-PLOCINIKZAC et al., 2011). Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de utilização desses agentes biológicos, destacando-se os estudos com surfactina e raminolipídios, de origem bacteriana, e de alguns soforolípídeos originados de leveduras (HERMAN et al., 1995; MULLIGAN et al., 1999; NEILSON et al., 2003; DAHRAZMA; MULLIGAN, 2007; OCHOA-LOZA et al., 2007). A natureza iônica desses agentes, bem como a biodegradabilidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades superficiais os tornam candidatos em potencial para a remoção de metais pesados contidos em solos e sedimentos.

Pesquisas realizadas ao longo das últimas décadas com aplicação de biossurfactantes na remoção de metais pesados estão descritas a seguir.

Um lipopolissacarídeo (LPS) constituído por uma porção polissacarídica hidrofílica e por fosfolipídios hidrofóbicos foi investigado como biossurfactante para a extração de metais pesados. A pesquisa de Langley e Beveridge (1999) mostrou que o LPS aumentou a hidrofilicidade das paredes celulares exteriores, facilitando a absorção de cátions metálicos pelas bactérias.

Juwarkar et al. (2007) investigaram a remoção de cádmio e chumbo por um biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* BS2. Experimentos em colunas foram realizados para determinar a remoção de Cd e Pb por raminolipídeos. A remoção de cádmio foi maior do que a de Pb. Mais de 92% de Cd e 88% de Pb foram removidos pelo raminolipídeo (0,1%) dentro de 36 h. O raminolipídeo também foi capaz de diminuir a toxicidade e permitir a atividade microbiana (*Azotobacter* e *Rhizobium*) evitando a degradação do solo.

Li et al. (2002) investigaram como a sorção de um surfactante catiônico sobre a argila pode retardar a migração de cromato. Observou-se que o agente tensoativo catiônico com um grupo hidrofóbico longo aumentou significativamente a retenção do cromato em solos. Esta observação indicou que os agentes tensoativos catiônicos podem ser ancorados na superfície através de atração hidrofóbica entre a argila os seus grupos longos, e fixa ainda mais o Cr carregado negativamente (VI) (por exemplo, dicromato, encontrado a um pH abaixo de 5, e cromato, encontrado em um pH superior a 6), através da atração eletrostática entre o Cr (VI) e os grupos de cabeça com carga positiva. Este efeito de fixação é obviamente prejudicial para a mobilidade de Cr (VI), e impede a subsequente remoção do Cr (VI).

Compostos tensoativos produzidos por *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. foram utilizados para flotação e separação de calcita e eschelita. A recuperação foi de 95% para CaWO_4 e 30% para CaCO_3 , ressaltando que reagentes químicos convencionais foram incapazes de separar estes dois minerais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Wang e Mulligan (2004) avaliaram a viabilidade do uso de espuma de raminolipídeo para remover Cd e Ni de um solo arenoso. Relataram que a

utilização de espuma teve um efeito significativo sobre a mobilidade do biotensoativo que flui num meio poroso. A aplicação de espuma raminolípídeo aumentou a eficiência e permitiu a remoção de 73,2% e 68,1% de Cd (II) e Ni, respectivamente, enquanto a solução do raminolípídeo removeu apenas 61,7% e 51% de Cd e Ni, respectivamente. O sistema utilizado para a experiência foi apresentado esquematicamente por Wang e Mulligan (2004). A taxa de remoção de metais pesados a partir do solo depende fortemente da sua composição química. O constituinte predominante da fração de areia e lodo em muitos solos é o quartzo.

Outro método eficaz para a recuperação de solos contaminados por metais pesados é a tecnologia da espuma biossurfactante. Mulligan e Wang (2006) usaram um raminolípídeo para estudar sua capacidade de remoção de metal, tanto na forma líquida quanto na forma de espuma. Raminolípídeos com tensões superficiais de 29mN/m foram encontrados como sendo adequados para lavagem dos solos e remoção de metais pesados (Jeneil biosurfactant LLC Co., 2001). Os metais foram removidos por formação de complexos com os agentes tensoativos do solo, devido à redução da tensão interfacial e, portanto, a associação com as micelas do surfactante. As melhores taxas de remoção, 73,2% de Cd e 68,1% de Ni, foram obtidos através do ajuste do valor do pH da solução inicial a 10. Um aumento de 11% e 15% na remoção de Cd e Ni foi observado pela espuma de uma solução de raminolípídeo na mesma concentração.

Kim e Vipulanandan (2006) avaliaram a remoção de chumbo de água e de solo contaminado (caulinita). O biotensoativo foi produzido a partir de óleo vegetal. Mais de 75% do chumbo pôde ser removido a partir de 100 mg/L de água contaminada com 10 vezes a CMC.

A sorção dos biossurfactantes pode reduzir o seu potencial para a remoção de contaminantes a partir de vários componentes do solo (OCHOA-LOZA et al., 2007). Por conseguinte, foram realizados testes de sorção de um raminolípídeo. A sorção reduziu a eficiência de remoção do raminolípídeo, sendo dependente da concentração do surfactante.

Asci et al. (2007) avaliaram o potencial para a remoção de Cd (II) a partir de caulinita. Vários modelos de sorção foram avaliados para Cd (II). Os efeitos

de dessorção de pH, concentração de raminolipídeo e de Cd (II) sorvido foram determinados. O pH 6,8 foi considerado ótimo e uma concentração de 80 mM do raminolipídeo permitiu 71,9% de remoção de Cd (II). Asci et al., (2008a, b) examinaram a remoção de zinco a partir de feldspato (um componente do solo) por um biossurfactante raminolipídico. Uma significativa sorção de zinco foi mostrada para o feldspato. Um pH ótimo de 6,8 foi obtido para a remoção em função da formação de micelas nessas condições. Tensões interfaciais são baixas nesta faixa, facilitando o contato metal biossurfactante e a subsequente sorção do metal. Uma concentração de 25 mM foi ótima para a remoção de 2,2 mM de zinco. A remoção foi de 98,8%.

O uso de biossurfactantes (raminolipídeos, saponina e lipídios manosil eritritol (MEL) para remover metais pesados do solo a partir de um canteiro de obras no Canadá e um sedimento do lago do Japão foi avaliada (MULLIGAN et al., 2007). O solo continha 890 mg / kg de zinco, 260 mg / kg de cobre, 170 mg / kg de níquel e 230 mg / kg hidrocarbonetos totais de petróleo. O sedimento continha 4440 mg / kg de zinco, 94 mg / kg de cobre e 474 mg / kg de chumbo. Após cinco lavagens do solo com saponina (30 g/L), foram obtidos os níveis mais elevados de remoção de zinco (88%, pH 3) e remoção de níquel (76%, pH 5). A remoção de cobre (46%) foi máxima com 2% raminolipídeos (pH 6,5). Lavagens múltiplas do solo com 4% MEL (pH 5,6) proporcionou os níveis mais baixos de remoção (17% do zinco e níquel e 36% de cobre). A partir do sedimento, o maior nível de remoção de zinco (33%) e de chumbo (24%) foram obtidos com 30 g/L. A remoção de cobre (46%) foi máxima com 2% raminolipídeos (pH 6,5). A extração sequencial mostrou que a fração óxido de zinco e de cobre e a fração orgânica foram substancialmente reduzidas pelos biossurfactantes. A viabilidade de reduzir o conteúdo de zinco, cobre, chumbo e níquel de solos e sedimentos contaminados com os biossurfactantes aniônicos testado foi assim demonstrada.

Dahrazma e Mulligan (2007) avaliaram o desempenho de um raminolipídeo em uma configuração de fluxo contínuo para a remoção de metais pesados (cobre, zinco, níquel e) a partir dos sedimentos retirados do canal de Lachine, no Canadá. A solução do raminolipídeo foi bombeada através da amostra dentro de uma coluna de sedimentos a um fluxo constante.

A concentração do raminolípídeo, o tempo e a taxa de fluxo foram investigados. A remoção dos metais pesados a partir dos sedimentos foi de até 37% de Cu, 13% de Zn, e 27% de Ni quando o raminolípídeo foi aplicado. A adição de NaOH a 1% para 0,5% raminolípídeo reforçou a remoção do cobre por até 4 vezes em comparação com apenas 0,5% de raminolípídeo. Muitos metais existem principalmente na fração orgânica ambiente e a adição de OH⁻ nos sedimentos solubiliza esta fração, e assim, mais metais estão disponíveis para a remoção de um biotensoativo raminolípídico. Esta informação foi valiosa para a criação de um protocolo de remediação para a lavagem de sedimentos.

O tamanho e a morfologia das micelas de um raminolípídeo foram avaliadas por Dahrazma et al. (2008). Verificou-se que o pH tem um efeito significativo sobre a morfologia. A pH elevado, grandes agregados e micelas na ordem de 17 Å foram encontrados. Em condições ácidas, no entanto, vesículas de diâmetro de 500-600 Å foram formadas. Por conseguinte, não deveria haver nenhum efeito de filtragem em relação à lavagem do solo através de poros à medida em que eles são tipicamente da ordem de 200 nm. A complexação das micelas com metais, assim, não demonstrou qualquer efeito significativo sobre o tamanho das micelas.

Uma nova abordagem para a estabilização de metal por biossurfactantes foi descrita por Massara et al., (2007). O Cromo hexavalente Cr (VI) é um poluente ambiental tratado através de sua redução ao Cr trivalente (III). Este último pode ser re-oxidado para a forma tóxica, Cr (VI), sob condições específicas. Foi realizado um estudo sobre a remoção de Cr (III) para eliminar o perigo imposto pela sua presença em solo. Estudou-se o efeito da adição de biossurfactantes com carga negativa (raminolípídeos) em caulinita contaminada com cromo. Os resultados mostraram que os raminolípídeos possuem a capacidade de extrair 25% da forma estável, de crómio, Cr (III), a partir da caulinita, sob condições ótimas. A remoção de cromo hexavalente também foi melhorada em comparação com a água por um fator de 2, utilizando uma solução de raminolípídeos. Os resultados do processo de extração sequencial demonstraram que os raminolípídeos removem o Cr (III) principalmente a partir das porções da caulinita de carbonato, óxido e hidróxido. Os raminolípídeos apresentaram também capacidade de reduzir 100% de Cr (VI) a Cr (III) ao

longo de um período de 24 dias. Este estudo indicou que os raminolipídios poderiam ser benéficos para a remoção ou conversão de Cr (VI) a Cr (III) a longo prazo. Como continuação deste trabalho para avaliar a viabilidade da utilização dos raminolipídeos para a remoção e redução do cromo hexavalente do solo e da água contaminada, experimentos foram realizados por Ara e Mulligan (2008).

A concentração inicial de cromo, a concentração de raminolipídeo, o pH e a temperatura foram avaliados e verificou-se que estes parâmetros afetaram a eficiência de redução. O raminolipídeo pôde reduzir 100% de Cr inicial (VI) em água em condições ótimas (pH 6, 2% de concentração de raminolipídeo, 25 °C), se a concentração é baixa (10 ppm). Para concentrações iniciais mais altas (400 ppm), levou 24 h para reduzir Cr 24,4% em um dia). No caso de solo, o raminolipídeo só foi capaz de remover a parte solúvel do cromo presente. A extração aumentou com um aumento na concentração inicial em solo, mas diminuiu ligeiramente com o aumento da temperatura acima de 30 °C. A tendência de redução do cromo extraído é o mesmo que em meio aquoso. Um estudo de extração seqüencial foi utilizado no solo antes e após a lavagem para determinar a partir de qual fração o raminolipídeo removeu o cromo.

As frações permutáveis e carbonato representaram 24% e 10% de cromo total, respectivamente. A óxidos e hidróxidos a parte retida 44% de crômio presente no solo. Por outro lado, 10% e 12% do cromo foi associada com as frações orgânicas e residuais. Raminolipídeo pode remover a maioria das porções trocável (96%) e carbonato (90%) e algum da porção óxido e hidróxido (22%), mas não é possível remover o cromo das outras frações. Esta informação é importante na concepção das condições apropriadas para a lavagem do solo.

O potencial dos biossurfactantes na mobilização e na descontaminação de solos contaminados com metais pesados foi confirmada por Juwarkar et al. (2008), que utilizaram o di-raminolipídeo biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* BS2 para a mobilização de metais a partir de um solo contaminado por vários metais pesados. Para estudar a viabilidade dos di-raminolipídeos para remover o cromo, chumbo, cádmio e cobre a partir do solo, um estudo em coluna foi conduzido. A coluna de vidro foi lavada com solução a

0,1% do raminolípídeo. Os resultados indicaram que o di-raminolípídeo removeu seletivamente os metais pesados a partir do solo da ordem de $Cd = Cr > Pb = Cu > Ni$.

Um biossurfactante à base de plantas, a saponina, foi avaliado por Song et al. (2008) para a remoção dos contaminantes misturados fenantreno e cádmio a partir do solo. O fenantreno foi removido por solubilização, enquanto o cádmio foi complexado pelos grupos carboxilas da saponina. As taxas de remoção foram 87,7% e 76,2% para fenantreno e cádmio, respectivamente, demonstrando a possibilidade de remoção combinada pelo tensoativo. Outros estudos foram realizados com a saponina por Chen et al. (2008), que mediram a capacidade da saponina em remover cobre e níquel em solo. Verificou-se que 2000 mg/L de saponina removeu 83% do cobre e 85% de níquel. Yuan et al. (2008) testaram a remoção de metais pesados com uma saponina derivada de chá. Foi utilizada a tecnologia de flotação. O biossurfactante funcionou tanto como coletor quanto como agente espumante. Os íons complexados se adsorveram sobre a superfície da bolha de ar. O chumbo (90%) foi preferencialmente removido, seguido de cobre (81%) e cádmio (71%). O aumento da força iônica diminuiu ligeiramente a eficiência de remoção. A complexação via grupos carboxilatos com os íons metálicos bivalentes foi observada.

Das et al. (2009) investigaram a possibilidade de utilizar o biotensoativo produzido por uma bactéria marinha para a remoção de metais pesados a partir de soluções. Os pesquisadores mostraram que a remoção de cádmio a partir de solução aquosa também ocorreu em concentrações menores do que a de CMC, embora uma concentração de cinco vezes a CMC resultou na remoção quase completa de 100 ppm de íons metálicos. A remoção de metais pesados a partir dos sedimentos foi reforçada pela utilização de uma solução contendo biotensoativo e compostos inorgânicos. Anteriormente, o papel positivo do biossurfactante marinho na remediação de hidrocarbonetos poliaromáticos foi relatado (DAS et al., 2008), porém, não houve informações sobre o papel deste biossurfactantes na remediação de metais pesados.

Wen et al. (2009) estudaram a degradação de um raminolípido em solos contaminados por Cd (II) e Zn (II), sugerindo que o raminolípido pode permanecer por tempo suficiente no solo para aumentar a fito-extração metal.

Biossurfactantes também foram utilizados para avaliar o seu potencial na mobilização arsênio dos rejeitos de minas (WANG; MULLIGAN, 2009 a, b). Os resultados experimentais mostraram que a introdução de um raminolípido reforçou a mobilização dos rejeitos da mina de forma significativa. A mobilização aumentou com a concentração de biotensoativo e tornou-se relativamente estável quando a concentração do raminolípido foi superior a 100 mg /L. Foi relatado por Doong et al. (1998) que a remoção de metais pesados aumentou linearmente com o aumento da concentração de surfactante abaixo da CMC e manteve-se relativamente constante acima da CMC. A CMC de o biotensoativo utilizado por Wang e Mulligan (2009) foi de cerca de 30 mg /L. A alta concentração do raminolípido necessária neste experimento pode ter sido devido à sorção do biossurfactante aos rejeitos de minas e à diluição e ligações às partículas do rejeito. O biossurfactante pode aumentar a mobilização de As pela redução da tensão interfacial entre As e os rejeitos de minas, por formação de complexos aquosos ou micelas, melhorando a molhabilidade dos rejeitos de minas. Os resultados deste estudo indicaram que biossurfactantes tem potencial para serem utilizados na remediação de rejeitos de minas contaminados por As e podem ser também eficazmente utilizados para remover as a partir de solos. Além da mobilização, os biossurfatantes podem estar envolvidos em outros processos relacionados com a recuperação de metais pesados. Eles são usados, por exemplo, no aprisionamento de cromo trivalente em micelas, promovendo tolerância bacteriana e resistência a altas concentrações de Cr (III).

Asci et al. (2010) também descreveram experiências com raminolípidos para a extração de Cd (II) e Zn (II) a partir de quartzo. Quando 0,31 mMol/kg de Cd (II) em quartzo foi tratado com 25 mM de raminolípido, 91,6% do Cd sorvido (II) foi recuperado. No caso de Zn (II), aproximadamente 87,2% foi extraído usando 25 mM de concentração de raminolípido. Em média, 66,5% de Zn (II) e 30,3% de Cd (II) foram liberados com cargas altas ou saturação de

íons metálicos em quartzo. Isto indicou que uma parcela relativamente grande dos íons metálicos foi irreversivelmente retida pelo quartzo.

Gnanamani et al. (2010) estudaram a biorremediação de cromo (VI) por um isolado de *Bacillus* sp. MTCC 5514 produtor de biossurfactante. A remediação promovida por esta estirpe passou por dois processos: redução de Cr (VI) a Cr (III) pela cromoreductase extracelular e aprisionamento de Cr (III) pelos biossurfactantes. O primeiro processo transforma o estado tóxico de cromo em estado menos tóxico e o segundo processo evita a exposição das células bacterianas ao cromo (III). Ambas as reações mantêm as células bacterianas ativas o tempo todo e fornecem tolerância e resistência para altas concentrações de cromo trivalente e hexavalente.

Slizovskiy et al. (2011) estudaram a remediação de solos contaminados por metais pesados reforçada por um surfactante catiônico (DPC), não iônico A (mmonyxKP surfactante) e por um biossurfactante iônico (JBR-425). Verificou-se que o JBR-425 teve o melhor efeito de eluição para Zn (39%), Cu (56%), Pb (68%), e Cd (43%).

Biossurfactantes produzidos por espécies de *Candida* também têm sido aplicados com sucesso na flotação de metais pesados, sendo capazes de remover mais de 90% dos cátions em colunas e em processos de Flotação por Ar Dissolvido (MENEZES et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012).

3.1.8 Utilização Industrial de Biossurfactantes

Muitas das potenciais aplicações dos biossurfactantes, bem como uma expansão dos poucos já firmados no mercado dependem da possibilidade de um processo de produção econômico. Muito trabalho ainda será necessário para a otimização de processos a nível biológico e de engenharia. Os custos típicos dos biossurfactantes variam de cerca de U.S 10 \$/mg para surfactina pura (98% de pureza), utilizada em pesquisas médicas, a U.S. 24 \$/kg para fórmulas de emulsão propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo. 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 (BOGNOLO, 1999).

Embora se admita que o aperfeiçoamento da tecnologia de produção dos biossurfactantes já tenha possibilitado um aumento de 10–20 vezes da sua produtividade, é provável que novos e significativos progressos (ainda que de uma ordem de magnitude inferior) sejam necessários para tornar essa tecnologia comercialmente viável (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Os parâmetros que podem ser variados na tentativa de otimizar a produção de biossurfactantes incluem:

- a) Seleção de matérias-primas de baixo custo, possibilitando o equilíbrio adequado de C, N, P e outros oligoelementos para maximização do rendimento e o desenvolvimento de cepas de micro-organismos capazes de metabolizar qualquer subproduto residual.
- b) Bioprocessamento, que pode ser otimizado por meio das condições operacionais do reator e da reciclagem do meio utilizado.
- c) Isolamento/recuperação do produto: a maioria das tecnologias inicialmente propostas envolvia formas mais elaboradas de purificação e isolamento. A possibilidade de desenvolvimento *in-situ* ou a utilização de líquidos metabólicos, ou seja, do biossurfactante bruto, pode, sem dúvida, conduzir a uma redução substancial de custos (BOGNOLO, 1999).

O sucesso da comercialização de um produto biotecnológico depende, em grande parte, da economia de seu bioprocessamento. Atualmente, os preços dos surfactantes microbianos não são competitivos com os preços dos agentes tensioativos químicos devido aos elevados custos de produção e aos rendimentos reduzidos em produto isolado. A fim de tornar a produção de biossurfactantes comercialmente viável será importante otimizar os processos de produção a níveis biológico e de engenharia. Os avanços das pesquisas envolvendo o processo de produção de biosurfactantes já permitiram um aumento de 10 a 20 vezes na produtividade, apesar da necessidade de estudos mais aprofundados. O uso de substratos de baixo custo e o estabelecimento do crescimento microbiano em condições ideais de produção, juntamente com novos métodos de purificação e com a utilização de cepas microbianas hiperprodutoras pode tornar a produção de biossurfactantes

economicamente viável. Embora um grande número de micro-organismos produtores de biossurfactantes seja relatado na literatura, as pesquisas relacionadas com o aumento de produção têm se concentrado na maioria das vezes a poucos gêneros de micro-organismos, tais como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Candida* (SILVA et al., 2014). Como relatado nesta revisão, os biossurfactantes são grandes candidatos para substituir os surfactantes sintéticos especialmente nas indústrias de óleos, sendo o investimento nas estratégias para aperfeiçoar o bioprocessamento dessas biomoléculas o caminho para a produção de biossurfactantes em larga escala.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

A *Candida tropicalis* UCP 0996, depositada no Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, foi utilizada como micro-organismo produtor do biossurfactante. A levedura foi mantida em meio YMA (Yeast Mold Ágar). Repiques foram mensalmente realizados para manter a viabilidade celular.

4.2 Substratos

Um resíduo da fabricação de produtos à base de milho, milhocina, gentilmente cedida pela Corn Products S.A., Cabo de Santo Agostinho-PE, melaço, resíduo da fabricação da cana-de-açúcar, gentilmente cedido pela Usina São José, localizada no Município de Igarassu, PE, e óleo de fritura de soja (residual), obtido junto a um restaurante local em Recife-PE, foram utilizados como substratos para a produção do biossurfactante.

4.3 Areia

Amostras de areia padrão NBR 7214 (ABNT, 1982) foram utilizadas nos experimentos. A areia possui um tamanho de partícula da ordem de 0,15-

0,30 mm, 0,2% de água, densidade específica de 2,620 g/cm³ e um conteúdo de matéria orgânica de 100 ppm.

4.4 Meios de manutenção e crescimento do inóculo

A manutenção da levedura foi realizada utilizando-se o meio Yeast Mold Ágar (YMA), com a seguinte composição: extrato de levedura (0,3%), D-glicose (1%), peptona (0,5%), ágar (2%) Água destilada q.s.p (100mL). Os componentes foram solubilizados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Quando excluído o ágar, constituiu o meio de crescimento, Yeast Mold Broth (YMB).

4.5 Meio de produção do biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada em água destilada suplementada com 2,5% de óleo de fritura, 2,5% de melaço e 4% de milhocina. Após o preparo do meio, o pH foi ajustado para 5,5 sendo o mesmo autoclavado a 121°C por 20 minutos.

FASE I - PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

4.6 Preparação do inóculo

O inóculo foi padronizado transferindo-se as culturas para um tubo contendo o meio YMA, a fim de se obter uma cultura jovem. Em seguida, a amostra foi transferida para frascos contendo 50 mL do meio YMB e incubados sob agitação de 200 rpm a 27 °C durante 24 horas. Após este período, foram realizadas diluições até se obter a concentração final de células desejadas (10⁶ células/mL).

4.7 Produção do biossurfactante em frascos

As fermentações para produção do biossurfactante foram realizadas em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de capacidade contendo 100 mL do meio de produção e incubados com a suspensão celular de 10^6 células/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital de 200 rpm, durante 144 horas, à temperatura de 28°C em mesa agitadora (MA-832, MARCONI LTDA, Brasil).

4.8 Scale-up de produção do biossurfactante

A fermentação para produção do biossurfactante foi realizada em biorreator de 3L contendo 1,5L (TEC-BIO-FLEX, TECNAL LTDA, Brasil) e em biorreator de 50L contendo 20L de meio de produção (REATOR 502/50L UNI, MARCONI LTDA, Brasil), nas mesmas condições da mesa agitadora (shaker orbital), ou seja, com uma suspensão celular de 10^6 células/mL, durante 144 horas à temperatura de 28°C.

4.9 Determinação da tensão superficial e da concentração micelar crítica (CMC)

A tensão superficial no líquido metabólico livre de células contendo os biossurfactante após 144 horas de cultivo e a CMC do biossurfactante isolado foram medidas em um tensiômetro (Sigma 700, KSV Instruments LTD, Finland) utilizando-se o anel de NUOY. A tensão superficial foi medida através da imersão do anel de platina no líquido metabólico e registrando-se a força requerida para puxá-lo através da interface ar-líquido, enquanto a CMC foi determinada partindo-se de uma solução de concentração conhecida do biossurfactante isolado.

4.10 Extração do biossurfactante

O isolamento do biossurfactante foi realizado a partir do líquido metabólico livre de células. Em seguida, o mesmo volume de clorofórmio/metanol (2:1 vol/vol) foi adicionado, sendo a mistura vigorosamente agitada por 15 minutos e deixada em repouso para separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação repetida por mais duas vezes. O produto obtido foi concentrado a partir das fases orgânicas coletadas usando rota-evaporador, dissolvido em metanol e novamente concentrado por evaporação do solvente a 45°C, sendo posteriormente pesado (SILVA et al., 2010).

FASE II - CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

4.11 Avaliação da estabilidade da tensão superficial do biossurfactante (efeitos do pH, da temperatura e da adição de NaCl)

Os efeitos de diferentes temperaturas (0, 5, 28, 70, 100 e 120°C), pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12) e concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10%) na atividade do biossurfactante foram avaliados no líquido metabólico livre de células para determinação da tensão superficial. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.12 Avaliação da estabilidade da capacidade de emulsificação do biossurfactante (efeitos do pH, da temperatura e da adição de NaCl)

O índice de emulsificação foi determinado de acordo com Cooper e Goldenberg (1987), onde 1 ml do substrato oleoso (óleo de motor) foi adicionado a 1 ml do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação, em tubos graduados e agitados em vórtex durante 2 minutos. A estabilidade da emulsão foi determinada após 24 horas, e o índice de emulsificação (E) foi calculado pela razão entre a altura da emulsão e a altura total, sendo o valor então multiplicado por 100. O índice de emulsificação

também foi determinado em diferentes temperaturas (0, 5, 28, 70, 100 e 120°C), pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12) e concentrações de NaCl (2, 4, 6, 8 e 10%).

4.13 Composição química do biossurfactante

A concentração de proteína do biossurfactante isolado foi determinada através do Kit Labtest. Os carboidratos foram determinados pelo método ácido fenol-sulfúrico, usando D-glicose como padrão (HANSON et al., 1981) e os lipídios quantificados de acordo com Manocha et al. (1980).

4.14 Determinação da carga iônica do biossurfactante

A carga iônica do biossurfactante foi determinada pela técnica de difusão dupla em Agar modificada (SILVA et al., 2010). A substância aniônica selecionada foi o dodecil sulfato de sódio (SDS), na concentração de 0,02 M, enquanto a substância catiônica foi o cloreto de bário, na concentração de 0,05 M. O surgimento de linhas de precipitação entre os poços, indicativas do caráter iônico do biossurfactante, foi monitorado durante 48 horas à temperatura ambiente.

4.15 Teste de fitotoxicidade

A fitotoxicidade do biossurfactante foi avaliada em ensaio estático através da germinação da semente e do crescimento da raiz de repolho (*Brassica oleracea*), de acordo com (TIQUIA et al., 1996). Soluções teste do biossurfactante isolado foram preparadas em água destilada em diferentes concentrações (1/2xCMC e na CMC). A toxicidade foi determinada em placas de Petri estéreis (10 cm) contendo discos de papel de filtro Whatman N°1. As sementes foram previamente tratadas com NaClO, sendo 10 sementes simetricamente adicionadas por placa, que foram inoculadas com 5 mL da solução teste a 28°C, tendo a água destilada utilizada como controle. No decorrer de cinco dias de incubação no escuro, a germinação das sementes, o

crescimento da raiz (≥ 5 mm) e o índice de germinação (IG) foram calculados de acordo com as fórmulas abaixo:

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

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

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

4.16 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

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

FASE III - APLICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE NA REMOÇÃO DE METAIS PESADOS

4.17 Preparação da areia contaminada com metais pesados

A areia padrão foi artificialmente contaminada em laboratório com uma solução de metais ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 + \text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{Zn}(\text{NO}_3)_2$). Os sais foram dissolvidos separadamente em água deionizada a fim de atingir a concentração de 1000 mg/L, sendo em seguida adicionados em conjunto à areia, sem ajustes de pH. A areia foi deixada em contato com a solução durante 3 dias em shaker (200 rpm a 25°C) e posteriormente centrifugada a 5000 rpm por 10 min para remover os metais não adsorvidos presentes na solução. O sobrenadante foi descartado e a areia contaminada seca em estufa a 50°C por 24 h (JUWARKAR et al., 2007).

4.18 Tratamento dinâmico da areia contaminada por metais pesados com o biossurfactante

O processo de lavagem da areia foi realizado em função da concentração da solução do biossurfactante isolado em diferentes concentrações (1/2 CMC, CMC e 2xCMC) e do biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células). Para seleção da melhor concentração de biossurfactante para remoção dos metais pesados, 5g de solo foram colocados em frascos de Erlenmeyer com 125 ml de capacidade sendo adicionados 50mL da solução do biossurfactante nas diferentes concentrações descritas acima. A amostra de areia foi paralelamente tratada com H_2O destilada com a finalidade de se determinar a remoção dos metais por mistura física (controle). Soluções de NaOH a 1% e HCl a 0,7%, bem como combinações de soluções do biossurfactante bruto e isolado com 0,7% de HCl e com 1% de NaOH também foram utilizadas. As amostras foram agitadas durante 24 horas a 150 rpm e então centrifugadas a 5000 g por 15 min. A concentração dos metais foi

determinada por espectrofotometria de absorção atômica. A porcentagem de remoção de metais foi determinada com base no conteúdo inicial de metal na areia e os resultados foram apresentados como % de remoção do metal.

4.19 Tratamento estático da areia da areia contaminada por metais pesados com o biossurfactante

A areia contaminada com metais foi colocada em colunas de vidro (57 cm de altura e 3,0 cm de diâmetro) e mantidas à temperatura ambiente. A areia foi compactada durante o preenchimento nas colunas e molhada a partir do topo a fim de ajustar a mistura do solo a um nível de 20%.

O processo de lavagem da areia foi realizado com 200 mL de solução do biossurfactante isolado em diferentes concentrações (1/2 CMC, CMC e 2xCMC) e do biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células). A amostra de areia foi paralelamente tratada com o mesmo volume de H₂O destilada com a finalidade de se determinar a remoção dos metais por mistura física (controle). Após a lavagem das colunas, as amostras de areia foram submetidas à quantificação dos metais pesados por espectrofotometria de absorção atômica.

4.20 Cinética de remoção dos metais pesados pelo biossurfactante

Amostras de 5,0 g de areia foram adicionadas a 50 mL da solução do biossurfactante bruto e agitadas a 150 rpm durante 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 horas e então centrifugadas a 5000 g por 15 min. Após a lavagem, as amostras de areia foram submetidas à quantificação dos metais pesados por espectrofotometria de absorção atômica.

4.21 Eficiência de remoção dos metais pesados em função do número de lavagens com o biossurfactante

A eficiência de remoção dos metais pesados em função do número de lavagens foi determinada pela lavagem da mesma amostra de areia

contaminada com cinco soluções do biossurfactante bruto. Uma amostra de 5,0 g de areia foi adicionada a 50 mL do biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células) e agitadas a 150 rpm durante 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi removido por centrifugação e a areia novamente submetida à lavagem com uma nova solução do biossurfactante bruto, e assim sucessivamente, até completar o total de cinco lavagens. Os metais foram quantificados após centrifugação por espectrofotometria de absorção atômica.

4.22 Remoção de metais pesados contidos em efluente sintético pelo biossurfactante

A capacidade de remoção de metais pesados em água pelo biossurfactante foi determinada em um fluente sintético contendo Cu, Zn e Pb. Soluções do biossurfactante isolado 1/2CMC (0,25%), na CMC (0,5%) e 2xCMC (1,0%) foram adicionadas a soluções do efluente sintético preparado com água destilada e nitrato de chumbo, nitrato de zinco e nitrato de cobre, separadamente, na concentração de 1000 mg/L. Posteriormente, o precipitado metal-biossurfactante foi removido por centrifugação a 5.000 g por 15 min e a condutividade da solução medida. O condutivímetro foi calibrado com água deionizada antes de medir cada amostra (DAS et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção do biossurfactante em frascos e em biorreatores

A utilização de resíduos industriais surge como alternativa para obtenção de produtos de baixo custo, reduzindo em cerca de 30% os custos envolvidos nos processos biotecnológicos. (SARUBBO et al., 2015). Nesse sentido, o biossurfactante de *C. tropicalis* foi obtido a partir do cultivo da levedura em 2,5% óleo de fritura de canola, 2,5% de melaço de cana e 4% de milhoцина.

Considerando a utilização de óleos vegetais de padrão alimentar, óleos vegetais residuais de fritura ou resíduos industriais oleosos, usados isoladamente ou combinados com substratos solúveis, resultados promissores

têm sido obtidos na última década para a produção de biossurfactantes por espécies de *Candida* (SARUBBO et al., 2001; 2006; 2007). É importante considerar, entretanto, que os substratos atuam de maneira específica para cada microrganismo testado, como descrito por Haba et al. (2000), que observou que o óleo de oliva residual não foi apropriado para o crescimento celular, embora a tensão superficial do meio tenha sido reduzida nos cultivos com *Candida* sp. 39A2 (35 mN/m), *C. albicans* (39 mN/m), *C. rugosa* IFO0750 (39 mN/m) e *C. tropicalis* CECT 1357 (35 mN/m).

Dentre as demais estratégias que podem ser usadas no sentido de aumentar os rendimentos de produção dos biossurfactantes, o uso biorreatores se destaca, uma vez que esses equipamentos constituem sistemas completamente fechados, permitem o controle das emissões e apresentam vantagens como controle eficaz do processo, o maior controle das variáveis do processo (pH, temperatura, umidade, etc.), uma melhor incorporação de aditivos e a redução do tempo de processamento, fatores fundamentais em aplicações industriais (BANAT, 2010).

Nesse sentido, visando a aplicação industrial do biossurfactante, um estudo comparativo foi realizado entre a produção do biossurfactante em biorreator e em shaker.

Os resultados obtidos foram satisfatórios, uma vez que na fermentação em frascos obteve-se uma tensão superficial em torno de 30 mN/m e uma produção de 9,5 g/L, enquanto que no biorreator de 3 L a tensão superficial foi de 31 mN/m, com 20,0 g/L de biossurfactante e em Biorreator de 50 L alcançou-se uma produção de 27 g/L. Esses resultados reforçam a capacidade de produção por *Candida tropicalis* e sua eficiência no aumento da produtividade em diferentes volumes de produção, quando comparados a outras estirpes.

Marti et al. (2014) descreveram a produção de surfactina a partir de estirpes geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* em meio mineral contendo 2% de glicose em frascos e biorreator de 5L. Ao contrário dos resultados obtidos nesse trabalho, a produção em frascos da surfactina atingiu 6,2 g/L em biossurfactante, enquanto a produção em biorreator não ultrapassou 0,006 g/L.

5.2 Cinética de crescimento de *Candida tropicalis* e de produção do biossurfactante

A Figura 7 mostra a cinética de crescimento do micro-organismo e de produção do biossurfactante de *C. tropicalis* cultivada em água destilada suplementada com 2,5% de resíduo de melaço de cana, 2,5% de óleo de fritura e 4% de milhocina.

A cinética de crescimento do micro-organismo demonstrou um perfil diáuxico entre 12 e 36 horas de fermentação. O início da fase exponencial de crescimento foi observado com 4hs de cultivo. A maior produção de biossurfactante (9,5 g/L) ocorreu na fase estacionária de crescimento após 144 horas, enquanto a tensão superficial do meio foi reduzida para 30 mN/m. Com relação ao pH do meio houve uma redução, atingindo valores em torno de 4,0 com 48 horas de cultivo e em seguida houve um aumento no pH para 5,6 permanecendo inalterado até o fim do cultivo.

A maioria dos surfactantes bacterianos é capaz de reduzir a tensão superficial para valores em torno de 27–28 mN/m. Embora os biossurfactantes originados a partir de leveduras descritos nas últimas décadas tenham demonstrado capacidade de redução da tensão superficial para valores em torno de 35 mN/m (GAUTAM; TYAGI, 2006; KITAMOTO et al., 2002), pesquisas mais recentes têm demonstrado o potencial das leveduras em reduzir tensões a valores abaixo de 30 mN/m, tornando-os competitivos aos similares obtidos por bactérias (GUSMÃO et al., 2010; SOBRINHO et al., 2008; COIMBRA et al. 2009; LUNA et al., 2011; 2013; RUFINO et al., 2007; 2008; SANTOS et al., 2013), a exemplo do biossurfactante produzido nas condições estabelecidas nesse trabalho.

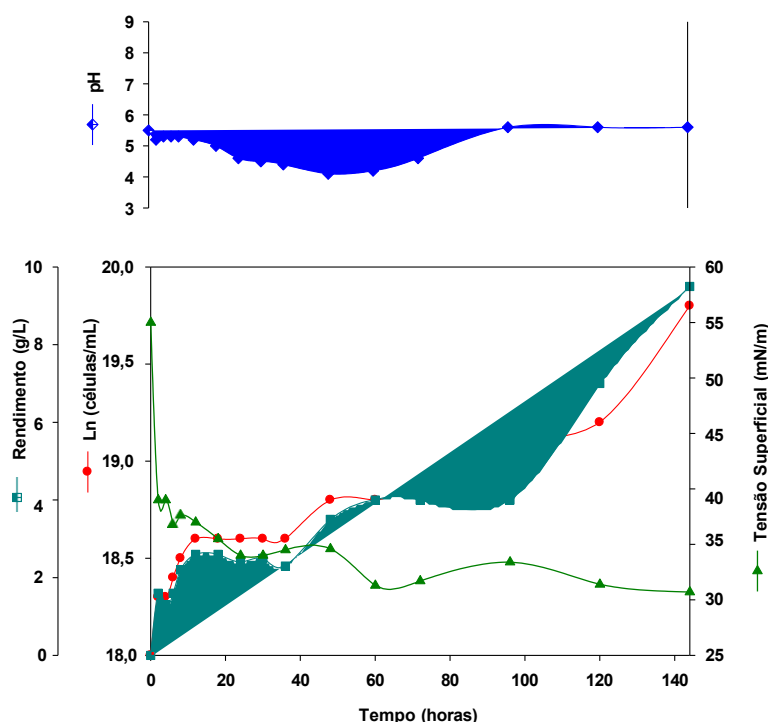


Figura 7. Cinética de crescimento, de produção do biossurfactante, pH e tensão superficial de *C. tropicalis* cultivada em água destilada suplementada com 2,5% de melaço de cana, 2,5% de óleo de fritura e 4% de milhocina.

5.3 Estabilidade do biossurfactante relacionada à tensão superficial

A redução da tensão superficial ou interfacial é considerada o principal parâmetro para detecção de um composto tensoativo em um determinado meio (DELEU; PAQUOT, 2004).

Fatores ambientais como pH, temperatura e NaCl também influenciam a atividade e a estabilidade de um biossurfactante. Consequentemente torna-se de fundamental importância o estudo da influência desses parâmetros ao se considerar a possibilidade de aplicações específicas para esses compostos (MUTHUSAMY et al., 2008).

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada no líquido metabólico livre de células após 144 horas de cultivo quanto a diferentes valores de pH, temperatura e na presença de NaCl em função da tensão superficial da biomolécula (Tabela 4).

Os testes realizados no líquido metabólico livre de células, com relação à variação do pH demonstraram que o biossurfactante obtido apresentou estabilidade da tensão superficial ao longo da faixa ácida e alcalina (Figura 9), destacando-se a tensão extremamente reduzida (24,7 mN/m) no pH 8. De acordo com Kim et al. (2000), as tensões superficiais do biossurfactante de *Nocardia sp.* L-417 foram mantidas em todos os valores de pH testados (de 2 a 12), indicando que a variação do pH também não teve efeito significativo sobre a tensão superficial. França et al. (2015), observaram que em todos os pHs testados (6 a 10), a tensão superficial manteve-se praticamente constante e inferior a 40 mN/m. Liu et al. (2015), observaram que a surfactina apresentou uma tensão superficial estável apenas em concentrações alcalinas.

Com relação à influência da temperatura sobre a tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante (Figura 10), observou-se uma discreta tendência de redução da tensão superficial com o aumento da temperatura.

França et al. (2015) observaram a estabilidade da tensão superficial após a exposição do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* a temperaturas variando de 5 a 75°C. Makkar e Cameotra (2002) observaram a estabilidade da tensão superficial após a exposição do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* a temperatura de 100°C.

Liu et al. (2015) observaram que quando a temperatura foi variada entre 30°C e 120°C, a tensão superficial da surfactina apresentou pouca variação, mantendo-se constante em torno 28-30 mN/m.

A influência da salinidade foi avaliada em função da possibilidade de uso do biossurfactante produzido em ambientes marinhos. Considerando que a maior salinidade encontrada nos mares é de 3% (<http://en.wikipedia.org/wiki/seawater>), o biossurfactante de *C. tropicalis* foi capaz de manter a capacidade de reduzir a tensão superficial na presença de até 10% de sal.

Tabela 4. Estabilidade da tensão superficial do biossurfactante de *C. tropicalis* cultivada em água destilada suplementada em 2,5% de melaço, 2,5% óleo de fritura e 4% de milhocina como substratos frente a variações de pH, temperatura e à adição de NaCl

pH	Tensão superficial (mN/m)
2	29,2±0,22
4	29,0±0,17
6	28,0±0,26
8	25,2±0,18
10	28,1±0,17
12	28,2±0,20
Temperatura (°C)	
0	28,3±0,24
5	27,2±0,12
28	27,3±0,25
70	27,0±0,42
100	26,6±0,50
120	26,2±0,13
NaCl (%)	
2,0	26,6±0,10
4,0	26,9±0,15
6,0	26,6±0,35
8,0	27,0±0,41
10,0	26,8±0,38

O biossurfactante bruto de *Pseudozyma* sp. NII 08.165 cultivada em óleo de soja foi considerado estável a 60 e 80°C de incubação sem qualquer perda de tensão superficial. O biossurfactante bruto também permaneceu estável ao longo do intervalo de pH 8,0-12,0 (SAJNA et al., 2013).

5.4 Estabilidade do biossurfactante relacionada à atividade de emulsificação

Os resultados da atividade de emulsificação demonstraram uma elevada afinidade do biossurfactante bruto (líquido metabólico livre de células) com o óleo de motor, o qual, independentemente das condições ambientais testadas, ou seja, variações de temperatura e pH, foi bem emulsificado (Tabela 5). Para as emulsões com óleo de motor em presença de NaCl, por outro lado, o biossurfactante de *C. tropicalis* manteve sua capacidade de emulsificação até 2%, percentual compatível com a concentração salina encontrada na água do mar, havendo um decréscimo na emulsificação ocasionado pelo aumento do percentual de NaCl acima de 4%. Em se tratando da estabilidade de emulsificação frente aos parâmetros de temperatura e pH foi verificado que os percentuais de estabilidade mantiveram-se constantes acima de 92% validando assim a sua capacidade emulsificante diante dessas condições. Al-Wahaibi et al. (2014) obtiveram dados percentuais de emulsificação de hidrocarbonetos de cadeia longa ($\geq 50\%$), indicando a possibilidade de aplicação do biossurfactante de *Bacillus subtilis* produzido em glicose ou melaço na indústria de petróleo. Ibrahim et al., (2013) observaram altos índice de emulsificação de querosene pelos líquidos metabólicos livre de células dos cultivos de *Serratia marcescens*, com 87% de atividade, seguida de *Bacillus firmus* com 62%, *Bacillus lentus* e *Sphingomonas paucimobilis* com 53 e 57%, respectivamente, enquanto *Bacillus licheniformis* e *Micrococcus kristinae* apresentaram índices de 49 e 39%, respectivamente. Todas as bactérias foram cultivadas em meio mineral contendo óleo bruto. O biossurfactante de *Serratia marcescens* apresentou estabilidade de suas emulsões numa ampla faixa de temperatura 50-100°C, com um pequeno aumento da atividade a 50°C. A atividade de emulsificação também foi mantida na faixa de pH de 2 a 12, com

maior atividade no pH 4 (84%). A presença de NaCl também afetou a capacidade emulsificante, embora a melhor atividade tenha sido obtida na presença de 8% do sal, com 60% de atividade emulsificante (IBRAHIM et al., 2013). A formação de emulsões estáveis do biossurfactante de *Klebsiella* sp. cultivada em amido foi observada com xileno, tolueno, tetracloreto de carbono, diclorometano e óleo vegetal de algodão (JAIN et al., 2013).

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

NaCl (%)	Emulsificação do óleo de motor (%)	Temperatura (°C)	Emulsificação do óleo de motor (%)	pH	Emulsificação do óleo de motor (%)
0	92±1,4	0	92±1,5	2	92±1,1
2	94±1,3	5	92±1,1	4	85±1,1
4	30±1,8	28	92±1,8	6	93±1,7
6	10±1,2	70	92±2,0	8	93±1,2
8	10±1,4	100	92±1,2	10	93±1,5
10	10±1,1	120	92±1,3	12	93±1,2

5.5 Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante

Outra importante propriedade dos biossurfactantes potentes é a habilidade de atuarem na formação de micelas que são moléculas anfipáticas agregadas (SILVA et al., 2014). A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação das micelas. A Concentração Micelar Crítica (CMC) é a mínima concentração de biossurfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo.

O biossurfactante de *C. tropicallis* exibiu excelente capacidade de redução da tensão superficial, uma vez que a tensão superficial da água foi reduzida de 70 mN/m para 28 mN/m com o aumento da concentração do biossurfactante até 0,5% (Figura 8). A partir desse ponto, o aumento da concentração da solução do biossurfactante não provocou maiores reduções na tensão superficial da água, indicando que a CMC havia sido atingida nessa concentração. O biossurfactante de *C. tropicallis* demonstrou maior capacidade de reduzir a tensão do que os surfactantes de *C. lipolytica* (32 mN/m) (RUFINO et al., 2007), de *C. glabrata* (31 mN/m) (SARUBBO et al., 2006), de *C. antarctica* (35 mN/m) (ADAMCZAC, BEDNARSKI, 2000) e de *Yarrowia lipolytica* (50 mN/m) (GALLERT; WINTER, 2002). O biossurfactante produzido nas condições estudadas nesse trabalho também demonstrou uma CMC muito inferior do que a CMC de outros surfactantes de leveduras descritos na literatura, considerando os valores de 2,5 % encontrados para os biossurfactantes de *C. lipolytica* (SARUBBO et al., 2007) e *C. glabrata* (LUNA et al., 2007) e valores de 1 % para o biossurfactante de *C. lipolytica* cultivada em resíduo de refinaria (RUFINO et al., 2007) e valores de 0,08 % para *C. sphaerica* (SOBRINHO et al., 2008).

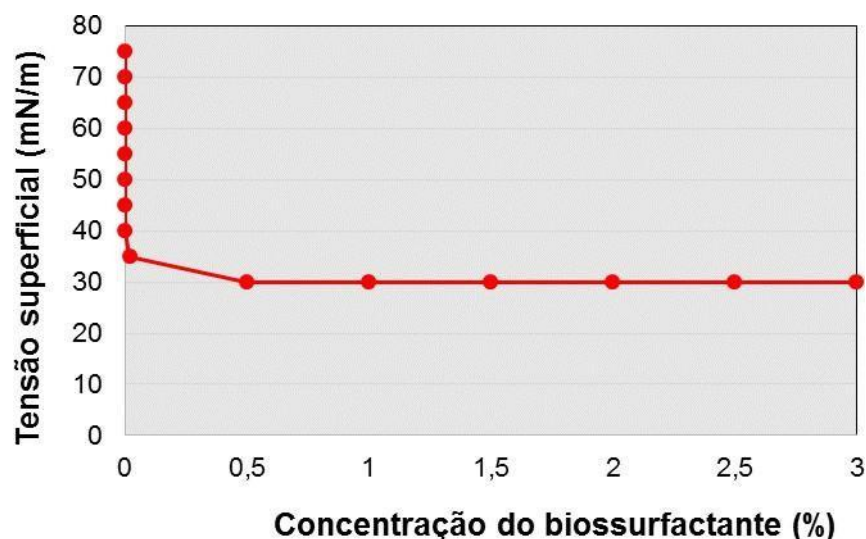


Figura 8. Concentração Micelar Crítica do biossurfactante produzido por *C. tropicallis* cultivada em água destilada suplementada em 2,5% de melaço, 2,5% óleo de fritura e 4% de milhocina como substratos frente a variações de temperatura.

5.6 Composição química preliminar do biossurfactante

A análise preliminar do biossurfactante isolado a partir do cultivo de *C. tropicalis* em 2,5% de melaço, 2,5% óleo de fritura e 4% de milhocina como substratos indicou a presença de 67,2% de lipídios, 36,6% de proteínas e 36 % de carboidratos. Liposan, um emulsificante produzido por *C. lipolytica* é composto por 93% de carboidratos e 7% de proteínas (CIRIGLIANO; CARMAN 1985). Outros polímeros emulsificantes contendo proteínas, carboidratos e lipídios também foram produzidos por *C. lipolytica* quando cultivada em óleo vegetal de babaçu e glicose como fontes de carbono (SARUBBO et al., 1999). Gusmão et al. (2010) observaram que o biossurfactante produzido por *Candida glabrata* utilizando resíduo industrial apresentou 34% de proteínas, 18% de lipídeos e 48% de carboidratos.

5.7 Carga iônica do biossurfactante

Os testes de difusão dupla em ágar revelaram o surgimento de linhas de precipitação entre o biossurfactante produzido pela *C. tropicalis* e o composto iônico selecionado (cloreto de bário) demonstrando, nas condições experimentais estudadas, o caráter aniônico do biossurfactante através da utilização de um teste bastante simples. Outros biossurfactantes produzidos por espécies de *Candida* também apresentaram caráter aniônico quando submetidos ao mesmo teste (SOBRINHO et al., 2008; LUNA et al., 2014).

5.8 Teste de Fitotoxicidade

O índice de germinação (IG), que combina as medidas da germinação relativa das sementes e o crescimento relativo das raízes foi utilizado para avaliar a toxicidade do biossurfactante produzido por *C. tropicalis* frente a semente *Brassica oleracea* var. *Captata* L. (Coração de Boi). Considerando que um IG de 80% tem sido utilizado como indicador do desaparecimento da fitotoxicidade (TIQUIA et al., 1996), os resultados obtidos indicaram que as

soluções testadas não apresentaram efeito inibitório sobre a germinação das sementes e sobre o alongamento das raízes, uma vez que as soluções do biossurfactante isolado nas concentrações de 0,25% (1/2CMC) e 0,5%(CMC) forneceram valores de índice de germinação de 66 e 56% (Tabela 6). Foi possível visualizar, também, o crescimento de raízes secundárias e o surgimento de folhas para todas as soluções testadas.

Tabela 6. Fitotoxicidade do biossurfactante isolado de *C. tropicalis* frente a sementes de *Brassica oleracea*

Concentração do biossurfactante	Germinação (%)	Crescimento (%)	Índice de Germinação (%)
1/2CMC (0,25%)	104	64	66
CMC (0,50%)	104	54	56

5.9 Teste de toxicidade com *Artemia salina*

A *Artemia salina* é um organismo padrão comumente usado em ecotoxicologia devido a sua simplicidade de manutenção em laboratório e ao seu ciclo de vida reduzido (MEYER et al., 1982).

Os testes com a *Artemia salina* demonstraram que o biossurfactante produzido por *C. tropicallis* não apresentou toxicidade para as concentrações testadas (0,25% ou 2500 mg/L e 0,5% ou 5000 mg/L). Por outro lado, Wang et al. (2005) demonstraram o potencial algicida dos raminolipídeos de *P. aeruginosa* contra espécies da nociva alga bloom (*Heterosigma akashiwo*) acima de 0,4 mg/L. Os testes de toxicidade aguda do surfactante JE1058BS produzido pela bactéria *Gordonia* sp., para duas espécies de larvas marinhas, *Mysidopsis bahia* (camarão) e *Menidia beryllina* (peixe), também demonstraram a baixa toxicidade desse biossurfactante (SAEKI et al., 2009). França et al. (2015) observaram que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, apresentou baixa taxa de mortalidade, inferior a 20%, quando utilizado nas concentrações de 12, 5, 25 e 50 mg/L. De acordo com Meyer et al. (1982) as substâncias que apresentam uma DL 50 acima de 500 mg/L são consideradas

como atóxicas.

A DL50 da surfactina foi de 2,5 mg/L, indicando a toxicidade desse biossurfactante (MARTI et al. 2014).

5.10. Tratamento dinâmico da areia contaminada por metais pesados com o biossurfactante

Os avanços das tecnologias de lavagem de solos aumentaram o interesse das pesquisas por novos agentes de lavagem, como os biossurfactantes aniônicos, os quais, além de apresentarem capacidade de se ligar aos metais, não fornecem riscos ao meio ambiente por suas características de biodegradabilidade e toxicidade reduzida (MAITY et al., 2013).

Os possíveis mecanismos para a extração de metais pesados por biossurfactantes incluem troca iônica, precipitação-dissolução e associação ao contra-íon. Considera-se que os metais são removidos através da formação de complexos com o surfactante, na superfície do solo, sendo destacados do solo pela redução da tensão interfacial e se associando, conseqüentemente, às micelas surfactantes. Os surfactantes aniônicos fornecem resultados satisfatórios uma vez que os cátions metálicos têm afinidade pelos surfactantes negativamente carregados, sendo também possível que o biossurfactante permita uma maior remoção em função de sua capacidade de redução da tensão interfacial (DOONG et al., 1998).

Segundo a literatura, é importante que os biossurfactantes usados no tratamento de solos tenham uma interação mínima com o solo. Em outras palavras, é desejável que a maioria dos biossurfactantes permaneça na fase aquosa. Entretanto, as grandes concentrações de biossurfactante normalmente requeridas para a remoção efetiva de metais pesados em solo se devem à sorção desses ao solo. Logicamente, o comportamento adsorptivo de um biossurfactante irá depender de suas características moleculares, como por exemplo, carga e hidrofobicidade, bem como das características do solo (ASÇI et al., 2008; CALVO et al., 2009).

Nesse sentido, o biossurfactante aniônico de baixo custo produzido a partir do cultivo de *C. tropicalis* em resíduos industriais foi testado na remoção dos metais pesados contidos em amostras de areia padrão. A areia padrão, cujo teor de matéria orgânica é da ordem de 100 ppm, foi utilizada no sentido de minimizar a interação do biossurfactante com o solo e maximizar as interações metal-biossurfactante.

Soluções do biossurfactante isolado em diferentes concentrações, de 1/2CMC (0,25%), na CMC (0,5%) e 2xCMC, foram testadas para avaliar a remoção dos metais sem e com a formação das micelas, estruturas eficientes na mobilização de metais pesados, através do tratamento do solo. A remoção dos metais pelo líquido metabólico livre de células, ou seja, pelo biossurfactante bruto, também foi avaliada. A possibilidade de aumentar os percentuais de remoção dos metais foi testada pela combinação do surfactante com os aditivos NaOH e HCl, enquanto a água destilada foi usada como controle. Os aditivos também foram usados isoladamente.

Os resultados do tratamento da areia com as diferentes soluções do biossurfactante estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Remoção dos metais pesados cobre, chumbo e zinco contidos em areia padrão NBR 7214 pelos tratamentos utilizados em ensaio dinâmico

Tratamentos	Remoção (%)		
	Cu	Pb	Zn
Água destilada (controle)	17±1,5	11±1,0	15±1,3
Solução de NaOH a 1%	11±2,0	15±0,9	20±1,1
Solução de HCl a 0,7%	70±1,2	84±2,1	70±1,4
Líquido metabólico livre de células	60±1,9	10±1,7	55±1,8
Líquido metabólico livre de células + HCl a 0,7%	67±1,8	55±2,0	82±0,9
Líquido metabólico livre de células + NaOH a 1%	62±1,5	18±1,4	25±1,8
Líquido metabólico livre de células + NaOH a 1% + HCl a 0,7%	68±1,3	28±1,6	25±1,7
Solução do biossurfactante a 0,25% (1/2CMC)	35±1,9	4±1,4	40±1,5

Solução do biossurfactante a 0,25% (1/2CMC) + 0,7% HCl	93±2,0	92±0,8	82±0,9
Solução do biossurfactante a 0,25% (1/2CMC) + 1% NaOH	28±2,1	13±1,5	35±1,3
Solução do biossurfactante a 0,25% (1/2CMC) + 0,7% HCl + 1% NaOH	28±0,7	15±1,0	32±0,9
Solução do biossurfactante a 0,5% (CMC)	40±1,1	5±1,6	55±1,2
Solução do biossurfactante a 0,5% (CMC) + 0,7% HCl	80±0,9	94±2,1	68±1,0
Solução do biossurfactante a 0,5% (CMC) + 1% NaOH	25±2,0	13±0,8	32±0,9
Solução do biossurfactante a 0,5% (CMC) + 0,7% HCl + 1% NaOH	35±2,0	20±1,9	33±1,0
Solução aquosa do biossurfactante a 1% (2xCMC)	70±0,5	15±1,3	80±1,1
Solução do biossurfactante a 1% (2xCMC) + 0,7% HCl	75±1,5	75±1,7	85±1,7
Solução do biossurfactante a 1% (2xCMC) + 1% NaOH	44±1,1	22±2,0	45±1,3
Solução do biossurfactante a 1% (2xCMC) + 0,7% HCl + 1% NaOH	42±1,7	16±2,0	34±1,2

Os resultados demonstraram que não houve uma afinidade específica do biossurfactante por um dos três metais (Cu, Pb e Zn) nas condições desse trabalho, embora o biossurfactante testado isoladamente tenha sido mais eficiente na remoção de Zn e Cu, que variou entre 35 e 80% enquanto o maior percentual de remoção do Pb tenha sido de 15%. O tratamento físico realizado com água destilada como controle removeu entre 11 e 17% dos metais presentes na areia. De acordo com Ochoa-Loza et al. (2007), a afinidade de um surfactante varia entre os diferentes metais. Os trabalhos descritos na literatura, de um modo geral, apresentam resultados contraditórios, mostrando que a remoção de metais pesados irá depender do

tipo do biossurfactante, da sua concentração, da sua interação com os aditivos (ácidos e bases) e, logicamente, das características do solo.

O líquido metabólico livre de células de *C. tropicalis* foi capaz de remover 60, 55 e 10% de Cu, Zn e Pb da areia, respectivamente, indicando que o biossurfactante bruto pode ser utilizado no tratamento de solos contaminados com metais pesados, o que representa uma redução dos custos de produção da ordem de 60%, considerando que este é o percentual descrito na literatura para as etapas de purificação dos surfactantes obtidos por via fermentativa (DAHRAZMA; MULLIGAN, 2007).

A solução do aditivo HCl a 0,7% (pH 2,0) removeu quantidades expressivas dos metais, enquanto o NaOH a 1% (pH 12) não foi eficiente como o ácido. É importante ressaltar que o tratamento com ácidos ou bases reduz a fertilidade e provoque alterações na composição química dos solos.

Comparando-se as três concentrações de surfactante testado isoladamente, observou-se que o aumento da concentração favoreceu a remoção dos metais. Remoções de 80, 70 e 15% foram obtidas para Zn, Cu e Pb, respectivamente, quando se utilizou a solução do surfactante a 1% (2xCMC).

Doong et al. (1998) observaram que a remoção de metais pesados aumentou linearmente com o aumento da concentração de surfactante abaixo da CMC e manteve-se relativamente constante acima da CMC. As concentrações mais efetivas para a remoção de metais irá depender dos tipos de surfactante, dos metais e de solo. A alta concentração necessária em alguns experimentos está relacionada, na maioria das vezes, à sorção do biossurfactante aos componentes do solo e ligações às partículas do solo (WANG; MULLIGAN, 2009).

Com relação à utilização dos aditivos HCl e NaOH com as soluções do biossurfactante bruto e isolado, observou-se que a presença da base não foi favorável à remoção dos metais, com poucas exceções, enquanto a presença do ácido potencializou a remoção dos três metais testados. Quando se adicionaram ambos ácido e base às soluções do biossurfactante, por sua vez, houve uma melhora nos percentuais de remoção dos metais em comparação ao tratamento com soluções do biossurfactante e da base em

conjunto, mas muito inferior à adição da solução do ácido e do biossurfactante juntamente, demonstrando a ação positiva do HCl na remoção dos metais e o efeito negativo da base. Segundo Hong et al. (2002), o Na^+ pode competir com os metais pesados pelo biossurfactante, formando um complexo Na-surfactante. É possível que o Na^+ do NaOH tenha competido com os metais pelo biossurfactante, reduzindo, com isso, a remoção do metal pela base quando comparada com a utilização do ácido. Por outro lado, França et al. (2015) obtiveram maiores remoções de Cu, Cr e Zn quando NaOH foi adicionado à solução do biossurfactante de *B. subtilis*. A possível explicação seria o aumento da solubilidade do biossurfactante na presença do NaOH,

A possibilidade do uso de biossurfactantes na remoção de metais pesados tem sido demonstrada em alguns trabalhos realizados a nível laboratorial. Mulligan et al. (2001b) demonstraram a aplicabilidade de biossurfactantes na remoção de metais pesados contidos em solos. Inicialmente, o soforolípídeo de *Torulopsis bombicola* cultivada em glicose e óleo de soja, com uma CMC de 0,8g/L (0,08%) e capacidade de reduzir tensão superficial para 34 mN/m foi testado. A solução do soforolípídeo a 4% não removeu o Zn contido no solo, removendo apenas 3% do Cu. A adição de 1% de NaOH foi benéfica em associação a 4% do soforolípídeo, aumentando a remoção para 7 e 36% de Zn e Cu, respectivamente. A remoção mais significativa de Cu e Zn ocorreu com o uso de 0,7% de HCl e 4% do soforolípídeo, atingindo uma remoção de 16 e 37% de Zn e Cu, respectivamente. Já o raminolípídeo de *Pseudomonas aeruginosa* produzido em meio mineral contendo 4% de glicose, com uma CMC de 0,003% e tensão superficial de 26 mN/m, possibilitou a remoção de 20 e 35% de zinco e cobre, respectivamente, para uma elevada concentração, de 12%, uma vez que a solução do raminolípídeo a 2% removeu apenas 5 e 10 de zinco e cobre, respectivamente. A adição de 1% de NaOH à solução do surfactante a 2%, por outro lado, aumentou significativamente a remoção do cobre (de 10 para 28%), mas diminuiu a remoção do zinco (de 5 para 3%).

Mulligan et al. (1999) demonstraram o aumento da remoção de Zn quando a surfactina a 2% foi usada em combinação com a base, enquanto a remoção de Cu não foi afetada pela presença do NaOH. Já a associação da

base com 0,5% do raminolípídeo favoreceu a remoção de ambos os metais para 65 e 18%, quando comparado com a base sozinha. Por outro lado, 100% de remoção de cobre e zinco foram obtidas com ou sem a adição de 4% do soforolípídeo a 0,7% de HCl. A redução da concentração de ácido (0,3%) permitiu concluir que a presença do surfactante aumentou a remoção de ambos os metais em comparação com o ácido sozinho, de 38% para 60% de zinco e de cerca de 6% para 25% de cobre. Já a remoção de cobre diminuiu quando o ácido foi adicionado ao surfactante, comparado com o surfactante sozinho, que removeu 38% do metal.

Daharazma e Mulligan (2007) observaram que os percentuais de remoção dos metais pesados em solo aumentaram linearmente com o aumento da concentração do raminolípídeo testado. A utilização de 5% do raminolípídeo removeu 37% de Cu, 7,5% de Zn e 33,2% de Ni. Assim como os resultados aqui descritos, para os quais a adição do biossurfactante bruto e isolado nas três concentrações potencializou a remoção dos metais pela base e pelo ácido, a adição da solução de 0,5% do raminolípídeo ao NaOH aumentou a remoção de cobre para 28,3% e do Ni para 11,5%, sendo essas remoções 9, 4 e 6 vezes maiores para o Cu, Zn e Ni, respectivamente, quando comparadas com as remoções pela base isoladamente (NaOH a 1%).

A saponina, que apresenta uma CMC de 0,1% e tensão superficial de 36 mN/m, foi testada entre 0,1 e 10%, sendo a remoção dos metais pesados contidos no solo proporcional à sua concentração, embora a solução a 3% tenha sido selecionada para estudos posteriores, uma vez que concentrações maiores apenas aumentaram o percentual de remoção em pequenas proporções (HONG et al., 2002).

5.11 Tratamento estático da areia contaminada por metais pesados com o biossurfactante

Considerando a possibilidade do tratamento de solos *in situ*, o biossurfactante de *C. tropicalis* foi testado em colunas empacotadas contendo areia padrão. Os resultados obtidos, embora inferiores aos observados nos ensaios dinâmicos, foram satisfatórios para Zn e Cu (Tabela 8). É importante

salientar o potencial de utilização do biossurfactante sob condições estáticas, uma vez que na ausência de agitação, a interação do biossurfactante com os metais só é favorecida pela ação da gravidade.

Tabela 8. Remoção dos metais pesados Cobre, chumbo e zinco contidos em areia padrão NBR 7214 pelos tratamentos utilizados em ensaio estático

<i>Tratamentos</i>	Remoção (%)		
	Cu	Pb	Zn
Água destilada (controle)	9±2,0	0,1±0,5	8±1,5
Líquido metabólico livre de células	45±1,9	2,0±1,3	46±1,4
Solução do biossurfactante a 0,25% (1/2CMC)	20±1,4	0,5±1,1	32±1,1
Solução do biossurfactante a 0,5% (CMC)	25±2,1	0,65±1,7	40±1,6
Solução do biossurfactante a 1% (2XCMC)	65±0,9	4,05±1,2	65±2,0

5.12 Cinética de remoção dos metais pesados

A cinética de remoção dos metais pesados foi estudada ao longo de 24 horas com a finalidade de reduzir o tempo de ação do biossurfactante e, consequentemente, os custos finais de aplicação da biomolécula.

Na Figura 9, a concentração residual dos metais pesados na areia foi registrada em função do tempo.

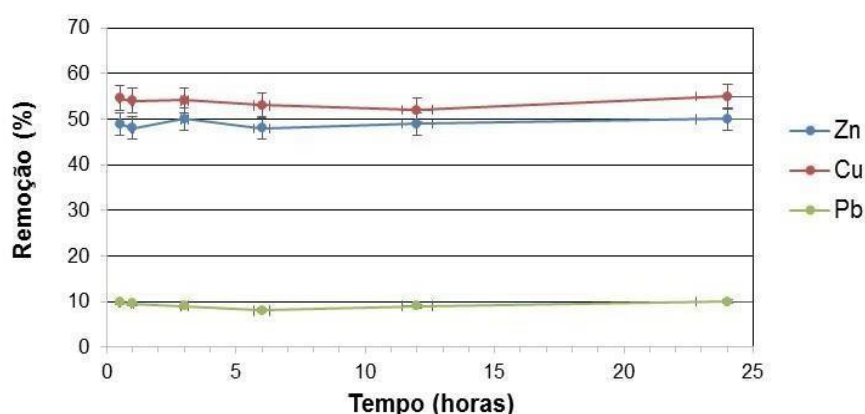


Figura 9. Remoção dos metais pesados pelo biossurfactante bruto de *C. tropicalis* em função do tempo

O experimento cinético indicou que um equilíbrio foi alcançado nos primeiros 30 min para a máxima recuperação dos três metais testados. Hong et al. (2002) obtiveram máxima remoção dos metais pesados Zn, Cd, Cu e Pb após 6 horas em um experimento semelhante ao conduzido nesse trabalho.

5.13 Eficiência de remoção dos metais pesados em função do número de lavagens com o biossurfactante

A literatura descreve a necessidade de múltiplas lavagens com agentes biossurfactantes para garantir a remoção efetiva de metais pesados em função da forte interação destes e dos próprios surfactantes com os constituintes do solo (SARUBBO et al., 2015).

Nesse sentido, um experimento de múltiplas lavagens com o biossurfactante de *C. tropicalis* foi conduzido na areia contaminada com os metais pesados.

A tabela 9, mostra os resultados obtidos na remoção dos metais pesados contidos na areia após cinco lavagens com soluções do biossurfactante bruto. Observou-se que uma única lavagem com o líquido metabólico livre de células foi suficiente para remover praticamente a quase totalidade de cobre e chumbo, enquanto uma segunda lavagem com uma nova solução do biossurfactante aumentou o percentual de remoção em cerca de 9%.

O soforolipídeo de *Torulopsis bombicola* cultivada em glicose e óleo de soja foi aplicado com adição de HCl removeu 16 e 37% de Zn e Cu, respectivamente. Esse percentual aumentou após a realização de cinco lavagens, atingindo 100 e 50% de remoção de Zn e Cu, respectivamente (MULLIGAN et al., 2001b). Dois agentes ambientalmente compatíveis, ou seja, um raminolipídeo (0,5%), com CMC de 0,005% (0,05g/L) e a CMCD (carboximetilciclodextrina) (5,3%) foram testados para a remoção de metais adsorvidos em dois tipos de solo. Após dez lavagens consecutivas, o raminolipídeo foi capaz de remover cerca de 15% do Pb contido nos solos testados, enquanto a CMCD removeu entre 5 e 13,4% do metal (NEILSON et al., 2003). Percentuais de remoção de Pb em torno de 10% foram obtidos

nesse trabalho para o biossurfactante de *C. tropicalis*. Embora esses percentuais sejam comparáveis aos obtidos no trabalho de Neilson et al. (2003), é importante ressaltar a eficiência do biossurfactante de *C. tropicalis* frente ao raminolípido testado.

Tabela 9. Eficiência de remoção dos metais pesados contidos em areia em função do número de lavagens com soluções do biossurfactante bruto de *C. tropicalis*

Lavagens com soluções do biossurfactante bruto	Remoção (%)		
	Zn	Cu	Pb
1ª lavagem	51±1,1	56±1,2	10±1,5
2ª lavagem	9,4±0,5	3,9±0,7	0,99±1,0
3ª lavagem	1,2±0,3	0,6±0,2	0,46±0,3
4ª lavagem	0,27±0,1	0,2±0,1	0,36±0,1
5ª lavagem	0,17±0,1	0,2±0,2	0,25±0,3
Total	62,04	59,9	12,06

5.14 Remoção de metais pesados contidos em efluente sintético pelo biossurfactante

Medidas de condutividade são utilizadas rotineiramente em muitas aplicações industriais e ambientais como uma forma rápida, eficiente e de baixo custo de medição do caráter iônico de uma solução (SARUBBO et al. 2015).

A condutividade da solução do biossurfactante na metade da CMC (1/2CMC) foi de 400 $\mu\text{S}/\text{cm}$. A condutividade da solução do biossurfactante aumentou com o aumento na concentração, alcançando 900 e 1600 $\mu\text{S}/\text{cm}$, na CMC e no dobro da CMC (2XCMC), respectivamente. O aumento da condutividade com o aumento da concentração da solução do biossurfactante se deve à natureza aniônica do agente tensoativo. Por outro lado, a condutividade das soluções contendo os metais pesados zinco (Zn), cobre (Cu)

e chumbo (Pb) foi acentuadamente reduzida quando o biossurfactante foi adicionado às soluções de metal na concentração de 1/2CMC devido à precipitação dos metais carregados positivamente depois de serem capturados pelo biossurfactante, reduzindo a quantidade de íons metálicos disponíveis na solução de metal e consequentemente os valores de condutividade da referida solução (Tabela 10).

Tabela 10. Condutividade das soluções metálicas antes e após lavagem com soluções do biossurfactante isolado de *C. tropicalis*

Metais pesados	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) das soluções metálicas	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) após tratamento com soluções do biossurfactante		
		1/2xCMC	CMC	2xCMC
Zn	2202 $\pm$ 150	2,73 $\pm$ 0,4	3,56 $\pm$ 0,2	3,97 $\pm$ 0,5
Cu	2870 $\pm$ 400	3,12 $\pm$ 0,5	3,49 $\pm$ 0,6	4,53 $\pm$ 0,6
Pb	1335 $\pm$ 300	1,62 $\pm$ 0,3	1,98 $\pm$ 0,4	2,61 $\pm$ 0,5

Os resultados obtidos também demonstraram a grande eficiência do biossurfactante na menor concentração testada (1/2CMC), uma vez que observou-se o aumento gradativo da condutividade das soluções dos três metais após a adição das soluções do biossurfactante em concentrações superiores (CMC e 2xCMC), mostrando que os valores de condutividade voltaram a aumentar em virtude da carga iônica do próprio biossurfactante.

5.15. Perspectivas de aplicação industrial do biossurfactante

As tecnologias físico-químicas (ventilação, lavagem, extração por solventes, solidificação) e térmicas (incineração, dessorção e vitrificação) de remediação de solos existentes parecem ser economicamente inviáveis devido ao elevado custo (US \$ 750 bilhões), além da elevada estimativa de custo dos projetos de escavação de solos na Europa (US \$ 270-460/ ton de solo) e nos Estados Unidos (US \$ 324-552/m³ de solo). Comparativamente, o custo da

biorremediação está em torno de US \$ 75 bilhões (US\$ 14 bilhões/ano) ou 5-170 £/ton de solo (HAZRA et al., 2012).

Nesse sentido, a aplicação de biossurfactantes na biorremediação “*in situ*” (no local) tem despertado grande interesse comercial. Hoje, biossurfactantes glicolipídicos do tipo raminolipídeos (porção lipídica ligada ao açúcar raminose) estão disponíveis comercialmente na “Jeneil Biosurfactant Inc.” (EUA), na “Ecover” (França) e na “Raminolipídeos Participações Inc.” (EUA), enquanto biossurfactantes glicolipídicos do tipo soforolipídeos (porção lipídica ligada ao açúcar soforose) são atualmente oferecidos como Sophoron TM na “Saraya” (Japão) e na “Soliance” (França). O preço atual de produção de soforolipídeos equivale a 2-5 €/kg, enquanto os raminolipídeos custam US \$ 5-20/kg, ou seja, para vendas de 20 m³, custam US \$ 20/kg e quando produzidos em escala de 100 m³ custam US \$ 5 /kg, contra os etoxilados ou alquil poliglicosídeos, que custam US \$ 1-3/kg. (HAZRA et al., 2012).

Diante do exposto, é possível fazer algumas considerações para o biossurfactante bruto obtido nesse trabalho, a saber:

- a) Sabendo que os substratos usados na produção de biossurfactantes correspondem a 20-30% dos custos e que as etapas de purificação representam 60% do processo, o biossurfcante de *C. tropicalis*, além de ser produzido com resíduos industriais, é eficiente na forma bruta, ou seja, eliminando-se as etapas de purificação pode-se sugerir uma redução nos custos da ordem de 70%, o que significaria um preço final entre 0,6-1,5 €/kg, tomando como base o custo do soforolipídeo, biossurfactante também produzido por uma levedura.
- b) Dentre as técnicas físico-químicas de remediação, a lavagem, que consiste na extração de contaminantes do solo por dissolução, suspensão em soluções aquosas ou através da reação química com o líquido que passa através das camadas de solo contaminadas, tem o menor custo (US \$ 170/ton solo) (EPA, 2001) de aplicação, comparável até mesmo com biorremedição, e pode ser atrelado o uso do biossurfactante, com significativas vantagens ao processo.

Na lavagem, o fluido é aplicado por meio de pulverizadores colocados na superfície, sendo os contaminantes arrastados pela água, a qual é

posteriormente bombeada até a superfície, recorrendo-se a poços de extração, e sujeita a tratamento.

Considerando que o custo da lavagem está associado com a capacidade de remoção e os limites máximos de poluente que poderá ser retornado ao solo, conforme a legislação vigente, e ainda que torna-se necessária a retrolavagem do solo nos casos onde os limites aceitáveis não são alcançados nas primeiras tentativas, o biodetergente irá reduzir o custo de processo de lavagem, considerando que o biossurfactante já contém em sua formulação a água necessária para o arraste dos metais contidos no solo. Por outro lado, também não será necessário o tratamento da água contaminada nem a utilização desta água, uma vez que ao final do processo de lavagem, a solução do biossurfactante poderá ser reutilizada, após a precipitação dos metais pesados como hidróxidos, enquanto os metais poderão ser reaproveitados para outros fins (indústrias automotivas de baterias, pintura, na galvanização, etc.).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem as seguintes colocações:

- Resíduos industriais podem ser usados como matérias-primas para a geração de produtos biotecnológicos de alto valor agregado.
- A levedura *C. Tropicalis* UCP0995 apresenta potencial como produtora de um agente surfactante efetivo em termos de atividade tensoativa e emulsificante.
- O *scale-up* foi favorável à produção do biossurfactante, demonstrando perspectivas de aplicação em escala industrial.
- O biossurfactante demonstrou estabilidade frente a condições extremas de temperatura, de pH na presença de NaCl.
- O biossurfactante é atóxico frente a sementes vegetais e ao indicador marinho *Artemia salina*.
- O biossurfactante bruto apresenta potencial de remoção de metais pesados adsorvidos em solos.
- Os biossurfactantes bruto e isolado foram eficientes na remoção de Zn e Cu sob condições dinâmicas e estáticas.
- O biossurfactante bruto apresenta rápida ação na captura dos metais pesados, demonstrando perspectivas de aplicação industrial.
- O biossurfactante bruto é eficiente na remoção dos metais pesados em pequenas quantidades nas condições estudadas nessa pesquisa.
- O biossurfactante apresenta capacidade de complexar cátions metálicos em soluções aquosas, sugerindo o potencial desse agente como coadjuvante dos processos de remediação de efluentes poluídos por metais pesados.

7. REFERÊNCIAS

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

ABU-RUWAIDA, A. S.; BANAT, I. M.; HADITIRTO, S.; SALEM, A.; KADRI, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization and evaluation. **Acta Biotechnologica**, v. 11, p. 315-324. 1991.

ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of surfactants produced by *Candida Antarctica*, **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 313-316, 2000.

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

ALBUQUERQUE C. F.; LUNA-FINKLER C. L.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; MENEZES, C. T. B.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Evaluation of biosurfactants for removal of heavy metal ions from aqueous effluent using flotation techniques. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, p.1–6. 2012.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-333, 2014.

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

ARA, I.; MULLIGAN, C. N. Conversion of Cr (VI) in water and soil using rhamnolipid. **61st Canadian Geotechnical Conference**, Edmonton, AB; Sept. 20–24, 2008.

ASCI, Y.; NURBAS, M.; ACIKEL, Y. S. Removal of zinc ions from a soil component Na-feldspar by a rhamnolipid biosurfactant. **Desalination**, v. 233, p. 361–365, 2008a.

ASCI, Y.; NURBAS, M.; ACIKEL, Y. S. Sorption of Cd (II) onto kaolin as a soil component and desorption of Cd (II) from kaolin using rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Hazardous Materials** v. 139, p. 50–6, 2007.

ASÇI, Y.; NURBAS, M.; SAG AÇIKEL, Y. Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metal ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Environmental Management**, v. 91, p. 724-731, 2010.

ASÇI, Y.; NURBAS, M.; AÇIKEL, Y. A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 663-673, 2008b.

BAI, G.; BRUSSEAU M. L.; MILLER R. M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 25, p. 157-170, 1997.

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

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

BARKAY, T.; NAVON-VENEZIA, S.; RON E. Z.; ROSENBERG, E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2697–2702, 1999.

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

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciencia e Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, p. 979–985, 2008.

BATISTA, R. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SOUZA, J. E. G.; SARUBBO, L. A. Effect, of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. **Water and Environmental Research**, v. 82, p. 418–25, 2010.

BODEK, I.; LYMAN, W. J.; REEHL, W. F.; ROSENBLATT, D. H. **Environmental Inorganic Chemistry: Properties, Processes and Estimation Methods**. Pergamon Press, Elmsford, NY, 1988.

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

BORDAS, F.; LAFRANCE, P.; VILLEMUR, R. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 69-76, 2007.

BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. **Colloids and Surfaces B**, v. 63, p. 73-82, 2008.

BRIUNS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 198–207, 2000.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; I. UAD, I.; GONZÁLEZ-LOPEZ, 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.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial and Cell Factory**, v. 8, p. 16-21, 2009.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technology**, v. 97, 2195-2210, 2006.

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.

CHAKRABORTY, J.; DAS, S. Biosurfactant-based bioremediation of toxic metals. In: **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. Elsevier, pp. 167-201, 2014.

CHANG, W. N.; LIU, C. W.; LIU, H. S. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. **Process Biochemistry**, v. 44, p.955–962, 2009.

CHEN, W-J.; HSIAO, L-C.; CHEN, K. K-Y. Metal desorption from copper(II)/nickel(II) - spiked kaolin as a soil component using plant-derived saponic biosurfactant. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 488–98, 2008.

CHRZANOWSKI, L.; ŁAWNICZAK, L.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 401–419, 2012.

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 and relation with the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245-251, 2009.

COLORES, G. M.; MACUR, R. E.; WARD, D. M.; INSKEEP, W. P. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p.2959–2964, 2000.

CONAMA, Conselho de Política Ambiental. Deliberação Normativa nº 20, **Diário Oficial da União**, p. 11356-11357, 30 de julho de 1986.

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

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.

DAHRAZMA, B.; MULLIGAN, C. N.; NIEH, M. P. Effects of additives on the structure of rhamnolipid (biosurfactant): a small-angle neutron scattering

(SANS) study. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, p. 590–593, 2008.

DAHRAZMA, B.; MULLIGAN, C. N. Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. **Chemosphere**, v. 69, p. 705–711, 2007.

DANIEL, H. J.; REUSS, M.; SYLDACTK, C. Production of a sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapessed oil in a two-stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and a *Cryptococcus curvatur* ATCC 20509. **Biotechnology Letters**, v. 20, p.1153-1156, 1998.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Biosurfactant of marine origin exhibiting heavy metal remediation properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4887–4890, 2009.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, p. 1229–1234, 2008.

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

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

DIELS, L.; GEETS, J., DEJONGHE, W., ROY, S. V.; VANBROEKHOVEN, K.; SZEWCZYK, A.; MALINA, G. Heavy metal immobilization in groundwater by in situ bioprecipitation: comments and questions about carbon source use,

efficiency and sustainability of the process, **9th International Mine Water Congress**, 2005.

DONG, D.; ZHAO, X.; HUA, X.; LIU, J.; GAO, M. Investigation of the potential mobility of Pb, Cd and Cr(VI) from moderately contaminated farm Land soil to groundwater in Northeast, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, p. 1261-1268, 2009.

DOONG, R. A.; WU, Y. W.; LEI, W. G. Surfactant enhanced remediation of cadmium contaminated soils. **Water Science and Technology**, v. 37, p. 65–71, 1998.

DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2, p. 112-118, 2007.

DZOMBAK, D. A.; MOREL, F. M. M. Surface Complexation Modeling, Hydrous Ferric Oxide. **Wiley-Interscience**, New York, NY, 1990.

ELLIS, W. D.; PAYNE, J. R.; MCNABB, G. D. Treatment of contaminated soils with aqueous surfactants. **U.S. EPA 600/2-85/129**, 1985.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. A Citizen's Guide to Bioremediation, Soil Waste and Emergency Response, EPA 542-F-01-001, 2001b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/>>. Acesso em: 20 set, 2014.

EVANKO, C. R.; DZOMBAK, D. A. Remediation of metals-contaminated soils and groundwater, technology evaluation report, TE-97-01. **Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center**, Pittsburg, PA, 1997.

FRANÇA, I. W.L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Production of a biosurfactant

by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>, 2015.

FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; TAMBURINI, E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 6, p. 238–248, 2008.

FRANZETTI, A.; CAREDDA, P.; RUGGERI, C.; LA COLLA, P.; TAMBURINI, E.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Potential applications of surface-active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v. 75, p.810–807, 2009.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 407-418, 2011.

GALLERT, C.; WINTER, J. Solid and liquid residues as raw materials for biotechnology. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 483-496, 2002.

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

GNANAMANI, A.; KAVITHA, V.; RADHAKRISHNAN, N.; RAJAKUMAR, G. S.; SEKARAN, G.; MANDAL, A. B. Microbial products (biosurfactant and extracellular chromate reductase) of marine microorganism are the potential agents reduce the oxidative stress induced by toxic heavy metals. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 334–339, 2010.

GUSMÃO, B.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, 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, 2002.

HAMMER, M. J.; HAMMER, M. J. J. **Water Quality, Water and Waste Water Technology**, fifth ed. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 139-159, 2004.

HANSON, R. S.; PHILLIPS, J. A.; GHERHARDT, P. **Manual of Methods for General Bacteriology**. American Society for Microbiology, Washington, DC. 328-364, 1981.

HASHIM, M. A.; MUKHOPADHYAY, S.; SAHU, J. N.; SENGUPTA, B. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 2355 -2388, 2011.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. biosurfactant-assisted bioaugmentation in bioremediation. In: **Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment**.Eds.: SATYANARAYANA, T.; JOHRI B. N.; PRAKASH, A. Springer, New York, pp. 631-664, 2012.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v.47, p. 1207–1219, 2012.

HERMAN, D. C.; ARTIOLA, J. F.; MILLER, R. M. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p.2280–2285, 1995.

HOLLEMAN, A. F.; WIBERG, E.; WIBERG, N. **Iron**. in German. Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 1985.

HONG, K. J.; TOKUNAGA, S.; KAJIUCHI, T. Evolution of remediation process with plant-derived biosurfactant for recovery of heavy metals from contaminated soils. **Chemosphere**, p. 381-384, 2002.

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.

IBRAHIM, M. L.; IJAH, U. J. J.; MANGA, S. B.; BILBIS, L. S.; UMAR. S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81 p. 28-34, 2003.

JAIN, R. M.; MODY, K.; JOSHI, N.; MISHRA, A.; JHA, B. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.108, p. 199– 204, 2013.

JENEIL Biosurfactant Co. LLC, 2001. Material Safety Data Sheet for JBR425. [http:// www.biosurfactant.com/downloads/jbr425msds.pdf](http://www.biosurfactant.com/downloads/jbr425msds.pdf).

JUWARKAR, A. A.; NAIR, A.; DUBEY, K. V.; SINGH, S.; DEVOTTA, S. Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. **Chemosphere**, v. 68, p. 1996-2002, 2007.

JUWARKAR, A. A.; DUBEY, K. V.; NAIR, A.; SINGH, S. K. Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant—a novel approach. **Indian Journal of Microbiology**, v.48, p. 142–146, 2008.

KACZOREK, E.; CHRZANOWSKI, L.; PIJANOWSKA, A.; OLUANOWSKI, A. Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipids and saponins. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4285–4291, 2008.

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.

KHALLADI, R.; BENHABILESA, O.; BENTAHARA, F.; MOULAI-MOSTEFAB, N. Surfactant remediation of diesel fuel polluted soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 1179–1184, 2009.

KHAN, F. I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **Journal of Environmental Management**, v. 71, p. 95-122, 2004.

KIM, J.; VIPULANANDAN, C. Removal of lead from contaminated water and clay soil using a biosurfactant. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, p.; 777–786, 2006.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S., O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.

KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.14, p. 315–328, 2009.

KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 187-201, 2002.

LAGREGA, M. D.; BUCKINGHAM, P. L.; EVANS, J. C. **Hazardous Waste Management**. McGraw Hill, New York, 1994.

LANGLEY, S.; BEVERIDGE, T. J. Effect of O-side chain-lipopolysaccharidechemistry on metal binding, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.489–498, 1999.

LEDIN, M. Accumulation of metals by microorganisms—processes and importance for soil systems. **Earth Science**, v. 51, p. 1-31,2000.

LENNTECH. **Water Treatment**. Lenntech, Rotterdamseweg, Netherlands (Lenntech Water Treatment and Air Purification), 2004.

LI, Z.; ALESSI, D.; ZHANG, P.; BOWMAN, R. Organo-illite as a low permeabilitysorbent to retard migration of anionic contaminants, **Journal of Environmental Engineering**, v. 128, p. 583–587, 2002.

LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v.93, p. 31–37, 2015.

LU, J. R.; ZHAO, X. B.; YASEEN, M. Biomimetic amphiphiles: biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, p. 60-67, 2007.

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.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; ALBUQUERQUE., C. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Economic optimized medium for tension-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 2463-2476, 2011a.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202– 209, 2013.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; RODRIGUES, L. R. M.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant Lunasan produced by *Candidasphaerica* UCP0995. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1527–1534, 2011b.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.12.014>

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 unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

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

MANOCHA, M. S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasilienses*: possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v. 117, p. 147-154, 1980.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W.; YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435, 2015.

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

MARGESIN R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbon in extreme environments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 650-663, 2001.

MARTI, M. E.; COLONNA, W. J.; PATRAC, P.; ZHANG, H.; GREENE, C.; REZNIK, G.; PYNMF, M.; JARRELL, K.; NYMAN, J. A.; SOMASUNDARAN, P.; GLATZ, C. E.; LAMSAL, B. P. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 31– 39, 2014.

MASSARA, H.; MULLIGAN, C. N.; HADJINICOLAOU, J. Effect of rhamnolipids on chromium contaminated soil. **Soil and Sediment Contaminant International Journal** v. 16, p. 1–14, 2007.

MATTHEWS, P. J.; DAVIS, R. D. Control of metal application rates from sewage sludge utilization in agriculture. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 14, p. 199-250, 1984.

MENEZES, C. T. B.; BARROS, E. C.; RUFINO, R. D.; LUNA, L. A.; SARUBBO, L. A. Replacing synthetic with microbial surfactants as collectors in the treatment of aqueous effluent produced by acid mine drainage, using the

dissolved air flotation technique. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, p. 540-546, 2011.

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

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGH-LIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents, **Planta Medica**, v. 45, p. 31–34, 1982.

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

MULLIGAN, C. N.; OGHENEKEVWE, C.; FUKUE, M.; SHIMIZU, Y. Biosurfactant enhanced remediation of a mixed contaminated soil and metal contaminated sediment. **7th Geoenvironmental Engineering Seminar**, Japan–Korea–France; May 19–24, 2007.

MULLIGAN, C. N.; WANG, S. Remediation of a heavy metal contaminated soil by a rhamnolipid foam. **Engineering Geology**, v.85, p. 75–81, 2006.

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. Evironmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metalcontaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering Geology**, v. 60, p. 193-207, 2001.

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; pp. 544-511, 2004.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 3812–3820, 1999.

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

NASH, J.; TRAVER, R. P.; DOWNEY, D. C. Surfactant enhanced in situ soil washing. **US.EPA HWERL**. Edilsin. New Jersey. 1987.

NEILSON, J. W.; ARTIOLA, J. F.; MAIER, R. M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 899–908, 2003.

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.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 621–630, 2011.

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.

OCHOA-LOZA F. J.; NOORDMAN W. H.; JANNSEN D. B.; BRUSSEAU M. L.; MAIER R. M. Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhaminolipid biosurfactant sorption by soil. **Chemosphere**, v. 66, p. 1634-1642, 2007.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANC, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIROA, M. E. A.; MELO, V. M. M.; ALVES, L. R. B. G. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34–43, 2013b.

OLIVEIRA, J. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 155–160, 2013a.

OLKOWSKA, E.; POLKOWSKA, Z.; NAMIÉŚNIK, J. Analytical procedures for the determination of surfactants in environmental samples. **Talanta**, v. 88, p. 1–13, 2012.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 633-654, 2011.

PANDEY, A.; SOCCOL, C R; MITCHELL, D A. New developments in solid-state fermentantion: bioprocess and production. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1153-1169, 2000.

PARKINSON, M. Bio-Surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 3, p. 65-83, 1985.

PERFUMO, A.; RANCICH, I.; BANAT, I. M. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. **Advances in experimental and Medical Biology**, v.672, p. 135–145, 2010.

PENG, J. F.; SONG, Y. H.; YUAN, P.; CUI, X. Y.; QIU, G. L. The remediation of heavy metals contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 633-640, 2008.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

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

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

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

REED, B. E.; CARRIERE, P. C.; MOORE, R. J. Flushing of a Pb (II) contaminated soil using HCL, EDTA and Ca Cl₂. **Journal of Environment**, v. 122, p.48-50, 1996.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; LEGMANN, R.; RON, E. Z. Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 323–326, 1987.

RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; MARINHO, P.H.C.; FARIAS, C. B. B.; FERREIRA, S. R. M.; SARUBBO, L. A. Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v.109, p.117 - 122, 2013.

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

RUFINO, R. D.; RODRIGUES, G. I. B.; CAMPOS-TAKAKI, M. G.; SARUBBO, L. A.; FERREIRA, S. R. M. Application of a yeast biosurfactant in the removal of heavy metals and hydrophobic contaminant in a soil used as slurry barrier. **Applied and Environmental Soil Science**, p. 1-7, 2011.

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, p. 729-734, 2007.

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, p. 572-577, 2009.

SAJNA, K. V.; SUKUMARAN, R. K.; JAYAMURTHY, H.; REDDY, K. K.; KANJILAL, S.; PRASAD, R. B. N.; PANDEY, A. Studies on biosurfactants from

Pseudozyma sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 85– 92, 2013.

SANTONA, L.; CASTALDI, P.; MELIS, P. Evaluation of the interaction mechanisms between red muds and heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 324-329, 2006.

SANTOS, C. A.; BEZERRA, M. S.; PEREIRA, H. S.; SANTOS, E. S.; MACEDO, G. R. Production and recovery of rhamnolipids using sugar cane molasses as carbon source. **Journal of Chemical Engineering**, v. 4, p., 27-33, 2010.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science & Engineering**, v. 105, p. 43–50, 2013.

SARUBBO, L.A.; ROCHA JUNIOR, R.B.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SANTOS, V.A.; BANAT, I.M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p. 707-723, 2015.

SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. *Candida* biosurfactant - enhanced removal hydrophobic organic pollutants. In Ed. Alexander C. Mason: **Bioremediation: Biotechnology, Engineering and Environmental Management**. New York: Nova Science Publishers, Inc., v.1. p. 745-758, 2011.

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, p. 68-73, 2007.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida*

glabrata UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 400-406, 2006.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. C.; NEVES, M. L. C.; PORTO, A.L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 45, p. 1-4, 1999.

SARUBBO, L. A.; MARÇAL, M. do C.; NEVES, M. L. C.; SILVA, M. da P. C.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.95, p. 59-67, 2001.

SCULLION, J. Remediating polluted soils. **Naturwissenschaften**, v. 93, p. 51-65, 2006.

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

SHREVE, G. S.; INGUVA, S.; GUNNAN, S. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Biology and Biotechnology**, v. 4, p. 331–337, 1995.

SILVA, R. L.; FARIAS, C.B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174-183, 2010.

SILVA, R. C. F. S.; ALMEIDA D. G.; LUNA, J. M., RUFINO, R. D., SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 12523-12542, 2014.

SILVA, R. C. F. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; FARIAS, C. B. B.; FILHO, H. J. B.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Enhancement of biosurfactant production from *Pseudomonas cepacia* CCT6659 through optimisation of nutritional parameters using response surface methodology. **Tenside Suractants and. Detergents**, v. 50, p. 137–142, 2013.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174–183, 2010.

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

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 319, p. 291–297, 2004.

SLIZOVSKIY, I. B.; KELSEY, J. W.; HATZINGER, P. B. Surfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils: efficacy and toxicological consequences to earthworms. **Environmental and Toxicology Chemistry**, v. 30, p. 112–123, 2011.

SMITH, L. A.; MEANS, J.L.; CHEN, A.; ALLEMAN, B.; CHAPMAN, C. C.; TIXIER, J. S.; BRAUNING, S. E. J.; GAVASKAR, A. R.; ROYER, M. D. **Remedial Options for Metals contaminated Sites**. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1995.

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

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; ZERKOWSKI, J. A.; FOGLIA, T. A. Simplified soy molasses-based medium for reduced-cost production of sophorolipids by *Candida bombicola*. **Biotechnology Letters**, v. 1341-1347, 29, p. 2007.

SONG, S. S.; ZHU, L. Z.; ZHOU, W. J. Simultaneous removal of phenanthrene and cadmium from contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant. **Environmental Pollution**, v. 156 p. 1368–1370, 2008.

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

TEIXEIRA, R. M. Vivaterra sociedade de defesa, pesquisa e educação ambiental [online]. Disponível em: <http://www.vivaterra.org.br/vivaterra_metais_pesados.htm> Acesso em: 25 set. 2014.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, v. 51, p. 844-851, 1979.

TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 258–263, 1994.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environmental Pollution**, v.93, p. 249-256, 1996.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by a new pseudomonas putida strain. **Z Naturforsch**, v. 57, p. 356-360, 2002.

USEPA. Evaluation of Groundwater Extraction Remedies. EPA Office of Emergency and Remedial Responses, Washington, DC, 1989.

USEPA. Recent Developments for in Situ Treatment of Metal Contaminated Soils, 68-W5-0055, 1997.

VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 821–833, 2011.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, v. 8, p. 401–417, 1998.

WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*, **Harmful Algae**, v.4, p. 433-443, 2005.

WANG, J.; MA, T.; ZHAO, L.; LV, J.; LI, G.; ZHANG, H.; ZHAO, B.; LIANG, F.; LIU, R. Monitoring exogenous and indigenous bacteria by PCRDGGE technology during the process of microbial enhanced oil recovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 619–628, 2008.

WANG, S.; MULLIGAN, C. N. Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant. **Applied Geochemistry**, v. 24, p. 928–935, 2009a.

WANG, S.; MULLIGAN, C. N. Rhamnolipid biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 296–301, 2009b.

WANG, S.; MULLIGAN, C. N. Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil. **Water Air and Soil Pollution**, v. 157, p. 315–330, 2004.

WEN, J.; STACEY, S. P; MCLAUGHLIN, M. J.; KIRBY, J. K. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p.2214–2221, 2009.

WHO. Hazardous Chemicals in Human and Environmental Health: a Resource Book for School, College and University Students, in: Organisation, W.H. (Ed.), Geneva, 2000.

YIN, Y., ALLEN, H. E. In-situ Chemical Treatment. Technology Evaluation Report, 1999.

YUAN, X. Z.; MENG, Y. T.; ZWNG, G. M.; FANG, Y. Y.; SHI, J. G. Evaluation of tea-derived biosurfactant on removing heavy metal ions from dilute wastewater by ion flotation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 317, p. 256–61, 2008.