



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - RENORBIO
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *BACILLUS CEREUS* UCP 1615
COM POTENCIAL PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS
INDUSTRIAIS

Recife – PE

2021

ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL

Produção de biossurfactante por *Bacillus cereus* UCP 1615 com potencial para aplicações biotecnológicas industriais

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Pernambuco da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Diniz Rufino

Recife – PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D968p

Durval, Italo José Batista

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Bacillus cereus* UCP 1615 COM POTENCIAL PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS INDUSTRIAIS / Italo José Batista Durval. - 2021.

150 f. : il.

Orientadora: Leonie Asfora Sarubbo.

Coorientadora: Raquel Diniz Rufino.

Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.

1. biorremediação. 2. toxicidade. 3. poluentes hidrofóbicos. 4. bioemulsificante. 5. nanopartículas. I. Sarubbo, Leonie Asfora, orient. II. Rufino, Raquel Diniz, coorient. III. Título

CDD 620.8

TERMO DE APROVAÇÃO

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO**

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL

**Produção de biossurfactante por *Bacillus cereus* UCP 1615 com potencial para
aplicações biotecnológicas industriais**

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em: 30 de julho de 2021.

Banca examinadora:

Orientadora:

Profa. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

Examinadores:

Prof. Dr. Valdemir Alexandre dos Santos
Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP)

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

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

Profa. Dra. Jenyffer Medeiros Campos
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Aos meus pais, por toda dedicação e esforço em prol da minha formação moral e intelectual.

As minhas avós, madrinha e padrinho pelo apoio em cada etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pela oportunidade de participar do Programa.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e à Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) por possibilitar o desenvolvimento desta tese.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudo para a realização desta pesquisa.

Ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), pelo suporte estrutural.

À minha orientadora, Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo, por sempre incentivar e mostrar o caminho, além de ser um exemplo de ser humano e profissional, serei eternamente grato por cada gesto e ensinamento.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Raquel Diniz Rufino, pelo suporte e por cada cobrança, sem perder o bom humor.

Aos companheiros de laboratório, por ajudarem a encontrar soluções para os desafios impostos pelas adversidades, principalmente durante a Pandemia de COVID-19, pela ajuda na execução dos experimentos do meu doutorado, além do suporte emocional em cada momento que achei que não conseguiria e pensei em desistir.

À minha família e aos meus amigos por acreditarem na minha capacidade, por incentivarem meus sonhos, pelo carinho sempre e o apoio incondicional.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão desta jornada.

“Isso também passa”

Chico Xavier

RESUMO

O presente estudo caracterizou e avaliou o biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615 em diversas aplicações industriais. A produção da biomolécula foi feita em meio de baixo custo composto por 2% de óleo de soja residual de fritura e 0,12% de peptona. A capacidade de redução da tensão interfacial e a concentração micelar crítica (CMC) foram definidas como 6 mN/m e 500 mg/L, respectivamente. A produção em larga escala foi feita em biorreatores de 1,2, 3,0 e 50,0 L, alcançando valores de tensão superficial de 28,7, 27,5 e 32,0 mN/m e rendimentos em torno de 4,3, 4,6 e 4,1 g/L, respectivamente. O biossurfactante foi classificado como um lipopetídeo aniônico a partir de análises para determinação da carga iônica, cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia gasosa (GC) e ressonância magnética nuclear (RMN). Testes de conservação a longo prazo com o aditivo sorbato de potássio (0,2%) demonstraram a estabilidade das propriedades tensoativas do biossurfactante, sugerindo sua aplicação em uma possível formulação comercial. Para avaliar a aplicação do biossurfactante em processos ambientais, o mesmo foi aplicado em ensaios contendo água do mar, solo e rochas contaminadas com derivado de petróleo e sua toxicidade também foi avaliada frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, ao peixe *Poecilia vivipara* e ao bivalve *Anomalocardia brasiliiana*, bem como frente às sementes de vegetais *Brassica oleracea* (repolho), *Solanum lycopersicum* (tomate) e *Cucumis anguria* (maxixe). O biossurfactante mostrou-se eficiente e biocompatível para biorremediação em água do mar, promovendo o crescimento da microbiota, e ainda apresentou índices de remoção de compostos hidrofóbicos em solo arenoso e rochas de 84 e 69%, respectivamente. A aplicação da biomolécula como bioemulsificante em alimentos também foi avaliada através da sua utilização na composição de um biscoito tipo cookie, tendo a citotoxicidade utilizando as linhagens celulares L929 e Vero e a atividade antioxidante determinados. Um biscoito com características típicas preservadas e com benefícios em relação ao padrão sem biossurfactante foi obtido. Os testes de citotoxicidade reforçaram a biocompatibilidade do biossurfactante, e o indicativo de atividade antioxidante corroborou com a contribuição do biossurfactante para preservação do biscoito. O biossurfactante também foi avaliado como estabilizante na síntese de nanopartículas de prata como agente antimicrobiano. Nanopartículas de tamanho em torno de 20 nm foram obtidas através do método verde de *Tollens*. As nanopartículas apresentaram atividade

fungicida diante de gêneros de fungos patogênicos humanos e vegetais. Os resultados obtidos demonstram que o biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP 1615 tem potencial de utilização em diversos setores econômicos, comprovando a versatilidade biotecnológica desta biomolécula e sua importância industrial.

Palavras-chave: biorremediação, toxicidade, poluentes hidrofóbicos, bioemulsionante, nanopartículas.

ABSTRACT

The present study characterized and evaluated the biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 in various industrial applications. The production of the biomolecule was carried out in a low-cost medium composed of 2% residual frying soybean oil and 0.12% peptone. The interfacial tension reducing capacity and the critical micelle concentration (CMC) were defined as 6 mN/m and 500 mg/L, respectively. Large-scale production was carried out in 1.2, 3.0 and 50 L bioreactors, reaching surface tension values of 28.7, 27.5 and 32 mN/m and yields around 4.3, 4.6 and 4.1 g/L, respectively. The biosurfactant was classified as an anionic lipopeptide from analyzes to determine ionic charge, thin layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC) and nuclear magnetic resonance (NMR). Long-term conservation tests with the additive potassium sorbate (0.2%) demonstrated the stability of the surface-active properties of the biosurfactant, suggesting its application in a possible commercial formulation. To evaluate the application of the biosurfactant in environmental processes, it was applied in tests containing seawater, soil and rocks contaminated with petroleum derivatives and its toxicity was also evaluated against marine organisms *Artemia salina* (microcrustacean), *Poecilia vivipara* (fish) and *Anomalocardia brasiliana* (bivalve) and to the seeds of vegetables *Brassica oleracea* (cabbage), *Solanum lycopersicum* (tomato) and *Cucumis anguria* (gherkin). The biosurfactant proved to be efficient and biocompatible for bioremediation tests in seawater, promoting the growth of the microbiota, and showed removal rates of hydrophobic compounds in sandy soil and rocks of 84 and 69%, respectively. The application of the biomolecule as a bioemulsifier in food was also evaluated through its use in the composition of a cookie type cookie, with cytotoxicity using the L929 and Vero cell lines and the antioxidant activity determined. A biscuit with preserved typical characteristics and benefits compared to the standard without biosurfactant was obtained. Cytotoxicity tests reinforced the biosurfactant's biocompatibility, and the antioxidant activity indicative corroborated with the biosurfactant's contribution to the biscuit preservation. The biosurfactant was also tested as a stabilizer in the synthesis of silver nanoparticles as an antimicrobial agent. Nanoparticles of size around 20 nm were obtained using the green Tollens method. The nanoparticles showed fungicidal activity against human and plant pathogenic fungal genera. The results obtained demonstrate that the biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP

1615 has potential for use in several economic sectors, proving the biotechnological versatility of this biomolecule and its industrial importance

Keywords: bioremediation, toxicity, hydrophobic pollutants, bioemulsifier, nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Monômero do surfactante	21
Figura 2. Surfactantes tendem a se associar em interfaces ou em micelas. (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica atacada a cadeia de hidrocarboneto; (b) camada micelar; (c) micela circular; e (d) representação de uma vesícula	22
Figura 3. Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC).	22
Figura 4. Aplicações dos biosurfactantes.	24
Figura 5. Estrutura química da surfactina.	27

Capítulo 1

Figure 1 Biosurfactant components detected by thin-layer chromatography (TLC). Samples were added (20 μ L) to TLC plates and developed with 7:3 (v/v) <i>n</i> -hexane:acetone solvent system. TLC plate was sprayed with anisaldehyde, followed by heating at 110 °C for 1 min.	79
Figure 2 Gas chromatographic profile of fatty acids of the biosurfactant produced by <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone.	79
Figure 3 ¹ H NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) of the isolated biosurfactant from <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone.	79
Figure 4 ¹³ C NMR spectrum (CDCl ₃ , 300 MHz) of the isolated biosurfactant from <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone.	79
Figure 5 Influence of biosurfactant from <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 grown in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone on growth of autochthonous (a) bacteria in seawater, (b) bacteria in seawater contaminated with motor oil, (c) fungi and yeasts in seawater and (d) fungi and yeasts in seawater contaminated with motor oil. (◆) Control (seawater); (■) seawater plus biosurfactant at half the Critical Micelle Concentration - CMC/2 (250 mg/L); (▲) seawater plus biosurfactant at the Critical Micelle Concentration - CMC (500 mg/L).	79

Capítulo 2

Figure 1. Removal of motor oil adsorbed to sand in packed glass columns (static assay) by the biosurfactant produced by <i>B. cereus</i> UCP 1615.....	91
Figure 2. Removal of motor oil adsorbed to sand in flasks (kinetic assay) by the biosurfactant produced by <i>B. cereus</i> UCP 1615 after stirring (24h).	92
Figure 3. Removal of motor oil adsorbed to rocks by the biosurfactant produced by <i>B. cereus</i> UCP 1615.....	93
Figure 4. Surface tensions of the biosurfactant produced by <i>B. cereus</i> UCP 1615 over 120 days of conservation with the addition of 0.2% potassium sorbate (a), fluent vaporization with the addition of 0.2% potassium sorbate (b) and fractionated tyndallization (c) at different pH (5, 7, 9), NaCl concentration (1, 3 and 5%) and temperature (40 and 50 °C). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from three independent experiments.....	94
Figure 5. Motor oil emulsification indexes of the biosurfactant produced by <i>B. cereus</i> UCP 1615 over 120 days of conservation with the addition of 0.2% potassium sorbate (a), fluent vaporization with the addition of 0.2% potassium sorbate (b) and fractionated tyndallization (c) at different pH (5, 7, 9), NaCl concentration (1, 3 and 5%) and temperature (40 and 50 °C). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from three independent experiments	94
Figure 6. Motor oil dispersion by the biosurfactant from <i>B. cereus</i> UCP 1615 over 120 days of conservation with the addition of 0.2% potassium sorbate (a), fluent vaporization with the addition of 0.2% potassium sorbate (b) and fractionated tyndallization (c) at different pH (5, 7, 9), NaCl concentration (1, 3 and 5%) and temperature (40 and 50 °C). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from three independent experiments	95

Capítulo 3

Figura 1. Biscoitos antes (1) e após a assar (2). (A): Formulação padrão; (B): Formulação A; (C): Formulação B; e (D): Formulação C.....	119
--	-----

Capítulo 4

Figura 1. Mudança na cor da solução após o processo de redução da solução do complexo de prata, mostrando a formação das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNPs).....	136
Figura 2. Espectro de UV-visível das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNPs), com 0 e 120 dias de formadas.	137
Figura 3. Figuras de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNP). Figura 3A: ampliação de 5kx; figura B: ampliação de 12kx..	138
Figura 4. Halo de inibição dos micélios dos fungos <i>Aspergillus niger</i> (A), <i>Cladosporium cladosporioides</i> (B) e <i>Penicillium fellutanum</i> (C) em meio BDA (Agar Batata Dextrose) com nanopartículas de prata sintetizadas com biossurfactante na concentração de 16,50 µg/L.....	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biossurfactantes com potencial de uso na indústria de alimentos.....	42
--	----

Capítulo 1

Table. 1 Surface tension and yield of biosurfactant produced by <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone for 48 h under agitation of 250 rpm either in flasks or bioreactors. Results are expressed as means \pm standard deviations.....	78
---	----

Table. 2 Survival rates of the fish <i>Poecilia vivipara</i> submitted to different dilutions of crude or formulated biosurfactant produced by <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone after 96 h exposure. Results are expressed as means \pm standard deviations.....	78
--	----

Table. 3 Survival rates of bivalve <i>Anomalocardia brasiliiana</i> submitted to different dilutions of crude or formulated biosurfactant produced by <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone after 96 h exposure. Results are expressed as means \pm standard deviations	78
--	----

Capítulo 2

Table 1: Phytotoxicity evaluation of the biosurfactant from <i>B. cereus</i> 1615 against gherkin (<i>Cucumis anguria</i>), tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) and cabbage (<i>Brassica oleracea</i>) seeds.....	91
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Composição da formulação de massa de biscoito.....	112
--	-----

Tabela 2. Viabilidade celular das linhagens L929 e Vero após contato com diferentes concentrações de biossurfactante de <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615, em porcentagem. Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	114
--	-----

Tabela 3. Índice de capacidade antioxidante total (CAT) e de inibição oxidativa a partir da eliminação de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e radical ABTS [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] em diferentes concentrações do biossurfactante de <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615. Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	116
--	-----

Tabela 4. Índice de emulsificação (E_{24}) do biossurfactante de <i>B. cereus</i> UCP 1615 para diferentes óleos vegetais. Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	118
Tabela 5. Propriedades físicas dos biscoitos, depois de assar, da formulação padrão, formulação A (1 % de biossurfactante), formulação B (0.5% de biossurfactante) e formulação C (0.25% de biossurfactante). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	119
Tabela 6. Composição físico-química e valor energético dos biscoitos preparados com a formulação padrão, formulação A (1 % de biossurfactante), formulação B (0.5% de biossurfactante) e formulação C (0.25% de biossurfactante). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	120
Tabela 7. Análise do Perfil de Textura (TPA) da massa com 24 horas e 45 dias pós assada, para as formulações: padrão, A (1% de biossurfactante), B (0,5% de biossurfactante) e C (0.25% de biossurfactante). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	121

Capítulo 4

Tabela 1: Taxa de inibição (%) causada por nanopartículas de prata sintetizada com biossurfactante (BS- AgNPs) contra <i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Penicillium fellutanum</i> em meio BDA (Agar Batata Dextrose). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.....	140
--	-----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo Geral	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1. Surfactantes	21
3.2. Biossurfactantes.....	23
3.2.1. Biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero Bacillus.....	26
3.2.2. Matérias-primas utilizadas para produção de biossurfactantes	27
3.3. Aplicações de biossurfactantes na área ambiental	28
3.3.1. Contaminação por petróleo e derivados	28
3.3.2. Biorremediação.....	31
3.3.3. Remoção de compostos orgânicos do solo	33
3.3.4. Remoção de metais pesados	34
3.4. Aplicação de biossurfactante na indústria do petróleo	36
3.5. Aplicações do biossurfactante na área médica	37
3.5.1. Atividade antimicrobiana dos biossurfactantes	37
3.5.2. Agentes antiadesivos e inibidores de biofilmes.....	39
3.6. Aplicações do biossurfactante na área alimentar	41
3.6.1. Biossurfactantes como aditivos alimentares	41
3.6.2. Agentes emulsificantes	43
3.6.3. Agentes antimicrobianos e biofilmes em alimentos	44
3.6.4. Agentes Antioxidantes.....	45
3.7. Agentes estabilizantes de nanopartículas	45
3.8. Perspectivas industriais	48

REFERÊNCIAS	51
CAPÍTULO 1 - Artigo: Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills biorremediation	61
CAPÍTULO 2 - Artigo: Biosurfactant as an environmental remediation agent: toxicity, formulation and application in the removal of petroderivate in sand and rock walls.....	83
CAPÍTULO 3 - Artigo: Aplicação de um biossurfactante produzido por <i>Bacillus cereus</i> UCP 1615 a partir de óleo de fritura residual como emulsificante em uma formulação de biscoito	106
CAPÍTULO 4 -Artigo: Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando biossurfactante como estabilizante e seu potencial de aplicação como agente antifúngico	130
CONCLUSÕES GERAIS	144
ANEXO A – Dados do artigo publicado na Marine Pollution Bulletin.....	145
ANEXO B – Dados do artigo publicado na Biointerface Research in Applied Chemistry	146
ANEXO C – Produção científica (2017-2021)	145

1. INTRODUÇÃO

Os avanços da ciência impulsionam o progresso da humanidade; contudo, o rápido crescimento das indústrias leva à poluição ambiental, além de mudanças de hábitos que resultam em riscos à saúde humana. A biotecnologia surge como solução para o desenvolvimento industrial inclusivo e sustentável, fornecendo suporte ao desenvolvimento das indústrias de forma a garantir a sustentabilidade do setor e reduzir os impactos ambientais negativos que possam ocorrer (LOKKO et al., 2018).

Os surfactantes são compostos anfipáticos que tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade, promovendo a redução da tensão superficial e interfacial (FARIAS et al., 2021). Essa classe de compostos tem papel diverso e significativo em vários segmentos do mercado, incluindo a indústria de petróleo, sabão e detergente, redução da poluição ambiental e até na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos (KARLAPUDI et al., 2018). É principalmente por causa de sua extensa e diversificada aplicação que há uma preocupação crescente com os impactos ambientais gerados em função da dificuldade de degradação e biocompatibilidade reduzida.

A busca por alternativas sustentáveis resultou no interesse pelo estudo de agentes surfactantes de origem natural. Surgem então derivados de micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), os chamados "biossurfactantes", que são diversos em termos de estrutura e ganham atenção por causa de sua biodegradabilidade, biodisponibilidade, biocompatibilidade, alta seletividade, eficácia em ambientes extremos e estabilidade (JIMOH; LIN, 2019; SINGH; PATIL; RALE, 2019).

A produção de biossurfactantes em escala industrial, entretanto, requer a utilização de cepas bacterianas superprodutoras, processos de aumento de escala mais econômicos e a otimização das condições de cultivo e dos componentes do meio utilizando métodos estatísticos, juntamente com a utilização de matérias-primas de custo reduzido, que correspondem a 10 a 30% do custo total de produção (DEEPIKA et al., 2016; ROCHA E SILVA et al, 2019).

Os biossurfactantes são classificados em quatro grandes grupos: glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos e fosfolipídeos (NIKOLOVA; GUTIERREZ, 2021). Os biossurfactantes, do tipo lipopeptídico em especial, possuem propriedades que permitem a aplicação dessas biomoléculas não só como despoluentes, mas também como

emulsificantes em alimentos e estabilizantes na síntese química de nanopartículas, em função da capacidade espumante e como agentes estabilizadores, pois interagem de forma positiva na estabilização de partículas (NITSCHKE; SILVA, 2017; CAROLIN et al., 2021), além de terem demonstrado capacidade de interromper a formação de biofilmes, controlando a interação microbiana com interfaces e alterando a condição química e física dos ambientes de biofilmes em desenvolvimento (KIRAN et al., 2017; SATPUTE et al., 2019).

Essas propriedades apontam essas biomoléculas como uma nova geração de agentes de maior biocompatibilidade para diversas áreas industriais. Nesse sentido, o biosurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615 foi inicialmente caracterizado quanto às suas propriedades tensoativas e estruturais, sendo então produzido em biorreatores, avaliado quanto à toxicidade e aplicado como coadjuvante na área ambiental, como aditivo alimentar e estabilizador de nanomateriais, com vistas ao fornecimento de um produto de alto valor agregado para diferentes indústrias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir e caracterizar um biossurfactante e avaliar o seu potencial de aplicação em diversos setores indústrias.

2.2. Objetivos específicos

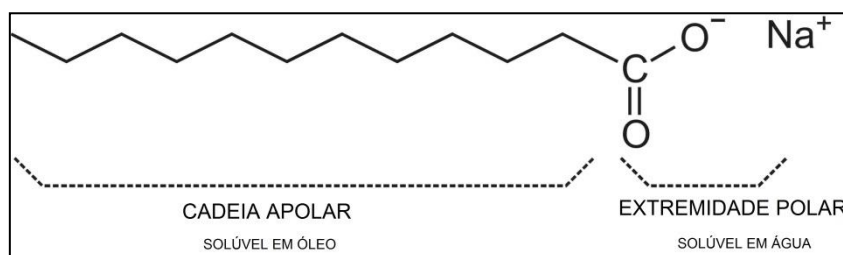
- Realizar o *scale-up* de produção do biossurfactante a partir de condições de cultivo previamente estabelecidas.
- Determinar as propriedades tensoativas e a carga iônica do biossurfactante.
- Caracterizar bioquimicamente o biossurfactante.
- Avaliar a toxicidade do biossurfactante frente a sementes vegetais e organismos marinhos em ambientes simulados.
- Avaliar métodos de conservação para o biossurfactante.
- Avaliar a conservação das propriedades tensoativas a longo prazo do biossurfactante formulado diante de condições específicas de pH, temperatura e salinidade.
- Avaliar a aplicação do biossurfactante como agente coadjuvante da biorremediação de contaminante hidrofóbico em ambiente marinho.
- Avaliar a aplicação do biossurfactante como agente removedor de contaminante hidrofóbico em ambiente terrestre e aquático.
- Avaliar a aplicação do biossurfactante como agente emulsificante em biscoitos tipo *cookie*.
- Avaliar a aplicação do biossurfactante como estabilizador de nanopartículas de prata.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Surfactantes

Os surfactantes são substâncias tensoativas compostas por moléculas orgânicas com caudas hidrofóbicas e cabeças hidrofílicas. Pela característica anfipática interagem, preferencialmente, na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, como interfaces óleo/água ou ar/água, fazendo com que eles sejam normalmente usados para separar os materiais oleosos de um determinado meio, fazendo dessa molécula componente essencial de sabões e detergentes (OGUNMOKUN; LIU; WALLACH, 2020; RUFINO et al., 2011a). Características como carga, polaridade e tamanho são utilizados para classificar os surfactantes (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). A porção apolar é frequentemente uma cadeia de hidrocarbonetos enquanto a porção polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfotérica (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Monômero do surfactante

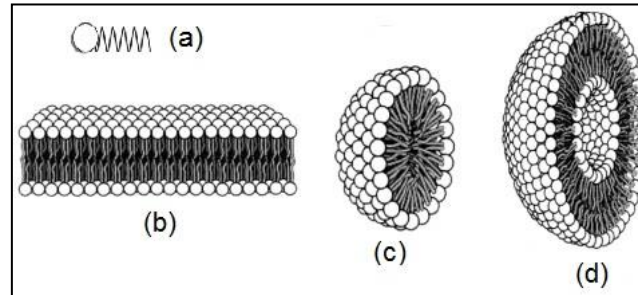


Fonte: Autor

Sua atividade superficial deriva de um equilíbrio entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas na molécula. Esse equilíbrio permite aos surfactantes reduzir a tensão superficial e interfacial nas interfaces entre sólidos, líquidos e gases, permitindo desse modo misturar ou dispersar prontamente como emulsões em água ou em outros líquidos, sendo possível que hidrocarbonetos solubilizem em água ou a água solubilize em hidrocarbonetos, através de microemulsões (RAUTELA; CAMEOTRA, 2014; SAŁEK; EUSTON, 2019).

A tensão superficial diminui a medida que 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 (Figura 2).

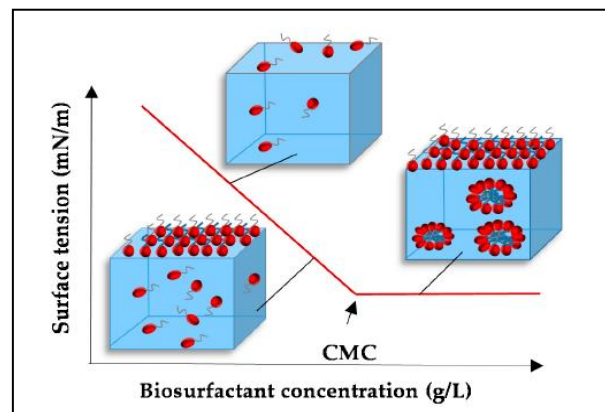
Figura 2. Surfactantes tendem a se associar em interfaces ou em micelas. (a) monômero surfactante, denotado por um círculo representando a cabeça hidrofílica atacada a cadeia de hidrocarboneto; (b) camada micelar; (c) micela circular; e (d) representação de uma vesícula



Fonte: Autor

A menor concentração de surfactante necessária para formar micelas é definida como Concentração Micelar Crítica (CMC). Quando essa condição é alcançada não há mais redução na tensão superficial e várias micelas são formadas (Figura 3) (ROCHA E SILVA et al., 2019).

Figura 3. Formação de micelas na Concentração Micelar Crítica (CMC).



Fonte: Santos et al. (2016)

A eficiência e a efetividade são características básicas essenciais que determinam um bom surfactante. A eficiência é medida através da CMC, enquanto a efetividade está relacionada com as tensões superficiais e interfaciais (BARROS et al., 2007). Tais propriedades possibilitam uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo detergentes, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade “molhante”, solubilização e dispersão de fases (SINGH; PATIL; RALE, 2019).

3.2. Biossurfactantes

A preocupação ambiental entre os consumidores, combinada a novas legislações de controle do meio ambiente exigiu a descoberta de uma alternativa igualmente eficiente, mas ambientalmente amigável, aos surfactantes sintéticos. Surgem então uma nova classe de surfactantes derivados, principalmente, de micro-organismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos), denominados "biossurfactantes", que são diversos em termos de estrutura e ganham atenção por causa de sua biodegradabilidade, biodisponibilidade, biocompatibilidade, alta seletividade, eficácia em ambientes extremos e longo tempo de armazenamento (JIMOH; LIN, 2019; SINGH; PATIL; RALE, 2019)

Biossurfactantes são principalmente produzidos por micro-organismos aeróbicos em meio aquoso com disponibilidade de fonte de carbono, tais como carboidratos, hidrocarbonetos, gorduras e óleos. Acredita-se que biossurfactantes são secretados para o meio de cultura para auxiliar no crescimento do micro-organismo através da facilitação da translocação de substratos insolúveis através das membranas celulares (CAMPOS et al., 2013), além de aumentar a área de contato de compostos insolúveis (tais como hidrocarbonetos), possibilitando o aumento da sua mobilidade, biodisponibilidade, e de biodegradação.

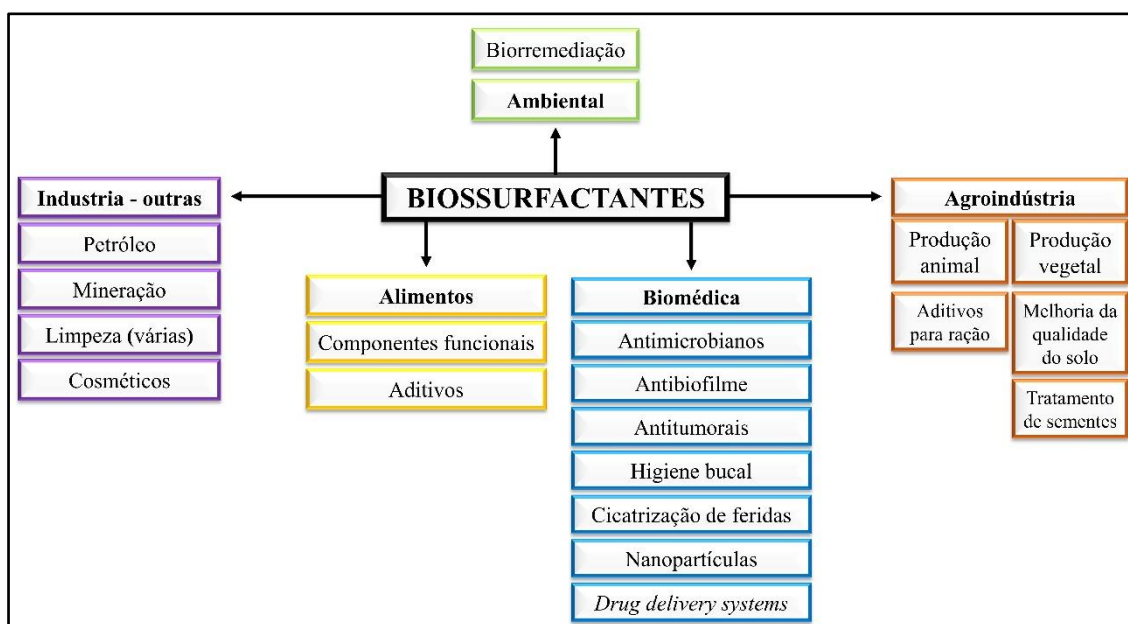
Os biossurfactantes são amplamente categorizados em cinco grupos principais: glicolipídeos (ex: ramolipídeos, soforolipídios, trealolipídios), lipopeptídeos (ex: surfactinas, liquenisinas, iturinas, fengicinas), fosfolipídios (ex: fosfatidiletanolamina), ácidos graxos, ácidos corinomuólicos) e biossurfactantes poliméricos (ex: emulsano, liposano) (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Essa biomolécula também pode ser dividida pelo peso molecular: moléculas de baixo peso molecular, que eficientemente diminuem a tensão superficial e interfacial, e polímeros de alto peso molecular, que são mais eficazes como agentes de estabilização da emulsão. As principais classes de surfactantes de baixo peso são glicolipídios, lipopeptídios, e fosfolipídios, enquanto os surfactantes de elevado peso incluem poliméricos e surfactantes particulados (GALABOVA et al., 2014).

A maioria dos biossurfactantes microbianos são aniônicos ou neutros e apenas alguns são catiônicos com grupos amina. A estrutura da porção hidrofóbica é caracterizada por uma cadeia alquila longa, enquanto a porção hidrofílica pode ser um grupo carboidrato, aminoácido, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou grupo

álcool. A massa molar dos biossurfactantes geralmente varia entre 500 e 1500 Da. (ROCHA E SILVA et al., 2019).

O fato de biossurfactantes serem caracterizados por uma grande diversidade estrutural e apresentar uma ampla gama de propriedades pode explicar porque este grupo de moléculas continua a despertar interesse científico (SARUBBO et al., 2015). As vantagens em relação aos surfactantes químicos, tais como biodegradabilidade, compatibilidade ambiental, baixa toxicidade e elevada seletividade devido à presença de grupos funcionais são importantes para uso na indústria da cosmética, farmacêutica e de alimentos, além da atividade em condições de temperaturas extremas, pH e salinidade (SANTOS et al., 2013; VECINO et al., 2015). A diversidade de aplicações de biossurfactantes pode ser observada na Figura 4.

Figura 4. Aplicações dos biossurfactantes.



Fonte: Adaptado de Jimoh e Lin (2019)

Inúmeros exemplos demonstram o potencial de aplicação de biossurfactantes em descontaminação ambiental, como foi estudado por Sobrinho et al. (2013a) que testou um biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* para a remoção de óleo de motor em testes realizados com água do mar, e este biossurfactante exibiu uma eficiência na dispersão do óleo de 75%, demonstrando o seu potencial para aplicação como coadjuvante em processos biotecnológicos de descontaminação ambiental. Já Mouafi et

al. (2016) observaram resultados satisfatórios de dispersão e emulsificação de óleo motor em água, utilizando o biotensioativo produzido por *Bacillus brevis*. O potencial de aplicação para contaminação de óleo em solo foi testado por Liu et al. (2014), que observaram o biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* BS-37, este apresentou uma taxa de remoção de 96% de óleo motor adsorvido em areia, o que demonstra um considerável potencial para uso em processos de biorremediação. Chaprão et al. (2018) utilizando o biossurfactante bruto de *B. methylotrophicus*, observou remoção de 63% do óleo das amostras de areia e 25% do solo arenoso.

O potencial de utilização de tensoativos biológicos como aditivo na área alimentícia é observado por estudos como o de Ribeiro et al. (2020) que utilizando um biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670 em substituição à gema de ovo em uma formulação de biscoito, observou que antes e depois de levado ao forno, não houve alteração nas propriedades em comparação com a formulação padrão. Silva et al. (2020) substituiu gordura vegetal, na produção de cupcake, por biossurfactante de *Candida bombicola* URM 3718, e os resultados indicaram este como promissor para aplicação como bioemulsificante pois além de manter as propriedades físico-químicas do produto, apresentou baixo teor antioxidante e sem potencial citotóxico.

A característica anfipática dos biossurfactantes permite a interação com a membrana plasmática, demonstrado em testes da atividade hemolítica (CARRILLO et al., 1996), em estudos para avaliar a aplicação deste bioativo como medicamento, como também aditivo em alimentos. Mohd Isa et al. (2020) utilizando a surfactina produzida por *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, observou atividade antibacteriana contra patógenos isolados de alimento: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*. Além do potencial antimicrobiano, Karlapudi et al. (2020), ainda notou a capacidade de diminuir a proliferação de biofilme e de células cancerígenas de um biossurfactante produzido por *Acinetobacter* M6.

A literatura destaca, entre as leveduras, o gênero *Candida* nos estudos de produção de biossurfactante, já entre as bactérias, as dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as grandes produtoras de acordo com Santos et al. (2016). O gênero *Pseudomonas* é conhecido por sua capacidade de produzir extensas quantidades de glicolipídeos, que são classificados como rhamnolipídeos, enquanto as bactérias do gênero *Bacillus* são grandes produtoras de lipopetídeos.

3.2.1. Biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*

As espécies do gênero *Bacillus* são cosmopolitas e morfologicamente diversificadas, algumas delas podem produzir diversos lipopeptídeos, sendo consideradas as maiores produtoras desta biomolécula (PENHA et al., 2020).

Lipopeptídeos apresentam atividades que tornam essas moléculas potencialmente úteis na indústria, na proteção ambiental e nos campos médicos e alimentícios. Pesquisas destacaram seu uso potencial de remoção de compostos hidrofóbicos, metais pesados, bioemulsificantes, agentes antibióticos, antifúngicos e antitumorais (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ; JANEK, 2017).

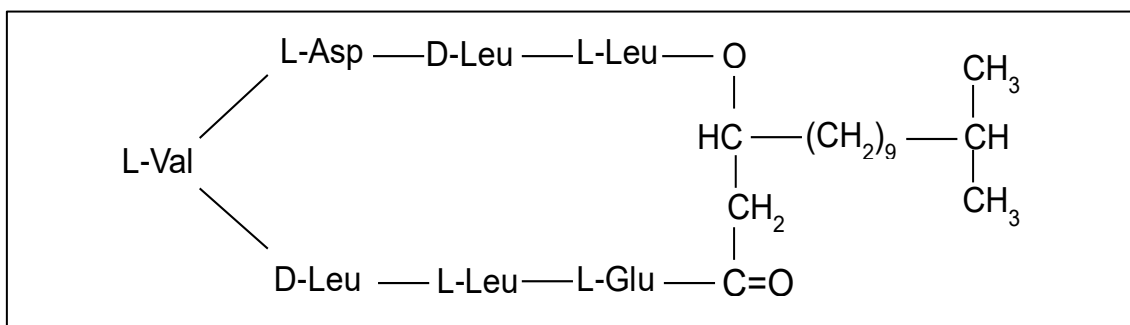
Lipopeptídeos são compostos por uma cauda hidrofóbica, que geralmente é um ácido graxo, ligado a uma cabeça hidrofílica entre 4 e 12 aminoácidos. A cabeça hidrofílica pode ser linear ou conter um anel de lactona, como é encontrado no LP cíclico. Podem ser divididos em três famílias principais: surfactinas, iturinas e fengicinas ou plispastatinas. As surfactinas e iturinas são compostas por heptapeptídeos cíclicos, que contêm ácido graxo β -hidroxi e ácido graxo β -amino, respectivamente. A surfactina, além da atividade antimicrobiana, mostra uma propriedade de superfície ativa. As iturinas são uma família de lipopeptídeos que apresentam notável atividade antifúngica, enquanto o decapeptídeo acíclico de fengycinis com um ácido graxo β -hidroxi na cadeia lateral. Esses lipopeptídeos diferem um do outro no comprimento e ramificação da cadeia lateral dos ácidos graxos, lixando as substituições de aminoácidos no anel peptídico (PEREZ et al., 2017).

A capacidade de síntese surfactina é amplamente distribuída não só entre *B. subtilis*, mas também entre *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens*. A produção da biomolécula, por esses micro-organismos, ocorre principalmente durante a fase estacionária, quando os nutrientes no meio de cultura são limitados (VEDARAMAN; VENKATESH, 2011).

A surfactina tem sido demonstrada como um dos biossurfactantes mais eficazes, com maior eficiência em biorremediação e no melhoramento de recuperação microbiana de óleo “*in situ*”, apresentando resultados mais promissores do que os raminolipídeos e, portanto, pode ter potencial para o desenvolvimento bioindustrial em grande escala (MARCHANT et al., 2014; MOYA RAMÍREZ et al., 2015). Em termos estruturais, a surfactina (Figura 5) consiste em um heptapeptídeo ligado a um ácido graxo β -hidróxi,

que contenha um número de 13 a 15 carbonos, características observadas por Faria et al. (2011) na biomolécula produzida por *B. subtilis* LSFM-05 e numa surfactina comercial.

Figura 5. Estrutura química da surfactina.



Fonte: Autor

A surfactina foi descrita por Arima et al. (1968) como um lipopeptídeo aniônico de massa molecular igual a 1050 ± 100 Da. apresentando-se na forma de cristais em agulha de coloração branca, com ponto de fusão entre $137-140^\circ\text{C}$. Com solubilidade em água alcalinizada, acetona, metanol, etanol, benzeno, clorofórmio e ácido acético glacial; insolúvel em água e ácidos minerais; e fracamente solúvel em tetracloreto de carbono, éter de petróleo, hexano e ciclohexano. Estável em pH de 7-9 a 120°C por 30 minutos, apresenta reação positiva para biureto e negativa para ninhidrina, sendo precipitada em soluções alcalinas com 50% de saturação com sulfato de amônio ou metais divalentes.

3.2.2. Matérias-primas utilizadas para produção de biosurfactantes

A produção de biosurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipófilos, as variações no pH, temperatura, arejamento e velocidade de agitação ou quando o crescimento celular é mantida sob condições de stress, tal como uma baixa concentração de nitrogênio (SANTOS et al., 2016). Bhardwaj et al. (2013) também citam fatores físico-químicos (pH, temperatura e tempo de incubação) e as fontes de carbono e de nitrogênio como importantes influenciadores para a produção de biosurfactante.

A necessidade de encontrar destino adequado para resíduos industriais, nocivos ou não, torna-se uma solução para a produção de biosurfactantes, uma vez que muitos destes podem ser usados como matérias-primas de baixo custo, superando os custos

dispendiosos da produção (JIMOH; LIN, 2019). Os produtos residuais selecionados devem possuir o equilíbrio adequado de nutrientes para permitir o crescimento microbiano e consequente produção de biossurfactante, destacando aqueles resíduos industriais com um elevado teor de hidrocarbonetos ou lipídeos, como os ideais para uso como substrato (SANTOS et al., 2016). Indústria de alimentos, por exemplo, possui resíduos de produtos entre eles resíduos de amido, melação, gordura animal e óleos que são ricos em compostos utilizados pelo metabolismo microbiano (BANAT et al., 2014; JIMOH; LIN, 2019).

Geetha et al. (2018) e Santos et al. (2016) destacam uma série de resíduos de produtos observados na literatura e utilizados na produção de biossurfactante, tais como óleos vegetais, efluentes oleosos, efluentes ricos em amido, gordura animal, gordura vegetal, óleo vegetal de cozinha residual, borra, melação, resíduos da indústria de laticínios (soro), milhocina, águas residuais da produção de farinha de mandioca, resíduos da destilaria de óleos, e glicerol.

Dentre esses resíduos destaca-se o óleo de fritura como grande fonte de carbono para a produção de biossurfactante, resíduo de fácil obtenção e baixo custo. Ramírez et al. (2015) utilizou óleo de oliva residual como fonte de carbono para produzir ramniolipídeo e surfactina a partir de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, respectivamente, e verificou o potencial desta fonte para produção de biossurfactantes. Usando óleo de soja como substrato, Li et al. (2016) produziu um biossurfactante lipopeptídico a partir do *Bacillus pseudomycooides* BS6 que proporcionou uma redução de tensão da água para $30,2\text{mNm}^{-1}$ e uma taxa de emulsificação para óleos vegetais e hidrocarbonetos que variou de 62,8 - 94,2%.

3.3. Aplicações de biossurfactantes na área ambiental

3.3.1. Contaminação por petróleo e derivados

A liberação de petróleo e derivados, para o meio ambiente é uma das principais causas da poluição global e tornou-se um foco de grande preocupação, tanto em países industrializados como em desenvolvimento, uma vez que esses hidrocarbonetos e derivados estão presentes em diversos setores, e causam danos em solos, águas subterrâneas, e ar (SILVA et al., 2014).

A possibilidade de vazamento de contaminantes está presente em toda cadeia produtiva do petróleo: acidentes durante o transporte de combustível por navios e

caminhões; vazamento de tanques de armazenamento subterrâneo que estão sujeitos à corrosão, como postos de gasolina; operações de extração de petróleo e de transformação e lançamento inadequado de resíduos gerados pelas indústrias que utilizam derivados de petróleo na produção de plásticos, solventes, produtos farmacêuticos e cosméticos (ŁAWNICZAK; MARECIK; CHRZANOWSKI, 2013).

A principal fonte de hidrocarbonetos nos oceanos vem de operações de rotina como a lavagem do navio, o vazamento de óleo natural no fundo do mar e os acidentes durante a exploração e o transporte de petróleo, esse merece destaque pelo fato de que metade da produção do mundo (cerca de três bilhões de toneladas / ano) é transportado por navios (SOUZA; VESSONI-PENNA; DE SOUZA OLIVEIRA, 2014).

A mídia tem, constantemente, relatado o vazamento de milhares de toneladas de petróleo que contaminam a água do mar. Um dos maiores derrames de petróleo no mundo ocorreu no Golfo do México, em 2010, em consequência da explosão de uma plataforma petrolífera próxima da costa dos estados de Louisiana e Mississippi (EUA). Após o naufrágio da plataforma, os dutos abertos na área de perfuração (profundidade de 1,5 kms) continuaram despejando petróleo no mar por um período de três meses antes de finalmente ser tampado. Relatórios oficiais indicam a libertação de mil barris de petróleo por dia, com um total estimado de quatro a cinco milhões de barris de óleo derramado, tornando este o maior desastre ambiental da história dos Estados Unidos (PEZESHKI; DELAUNE, 2015). No Brasil, um dos derramamentos de maior impacto ocorreu em novembro de 2011, sobre a plataforma de petróleo Sedco 706, operada pela Chevron Brasil na Baía de Campos (Rio de Janeiro, Brasil). Um total de 5.943 litros vazam, que abrangendo uma área de 163 km² (SOUZA; VESSONI-PENNA; DE SOUZA OLIVEIRA, 2014).

Recentemente, no segundo semestre de 2019, um óleo bruto denso começou a aparecer em grande quantidade nas praias do nordeste brasileiro (SOARES et al., 2020). O óleo atingiu mais de 980 praias (> 3000 km) da costa brasileira, incluindo pontos da costa amazônica, tornando esse desastre o mais extenso e grave já registrado na história da bacia do Atlântico Sul e em regiões costeiras tropicais em todo o mundo. Além dos impactos ambientais que colocaram em risco 27 espécies ameaçadas de extinção, o desastre também afetou atividades econômicas, como pesca artesanal e turismo que empregavam uma população de aproximadamente 870 mil pessoas (MAGRIS; GIARRIZZO, 2020).

Devido à ampla produção e uso de produtos petrolíferos (hidrocarbonetos e seus derivados em particular), o ambiente marinho, solo e águas subterrâneas foram seriamente contaminados por esses produtos químicos em todo o mundo, causando danos significativos para os organismos autóctones, e potencial prejuízo a saúde humana por ser absorvido pela pele e rapidamente se espalhar pelo organismo (BACHMANN; JOHNSON; EDYVEAN, 2014; LIN et al., 2014; LIU et al., 2018).

O petróleo é um hidrocarboneto hidrófobo com efeitos negativos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas celulares em organismos vivos, oferecendo considerável risco de contaminação em ambos os ecossistemas, marinhos e terrestres (SOBRINHO et al., 2013b). Quando em contato com a água, o petróleo se espalha formando uma fina camada sobre a superfície, alterando a troca de gases entre o ar e a água, a passagem de luz solar, impedindo assim o processo de respiração e fotossíntese, impactando, por exemplo, as comunidades de fitoplâncton, causando um colapso na cadeia alimentar (SILVA et al., 2014).

Nas últimas décadas, segundo Tehrani et al. (2016), o aumento do nível de contaminantes do tipo “poluente orgânico de persistência” (POP) em meio aquático causa preocupação ambiental devido ao seu amplo uso e toxicidade. Os hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH’s) e os poli-hidrocarbonetos aromáticos (PAH’s) em águas marinhas e costeiras foram classificados como grupos POP pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) (TAVAKOLY SANY et al., 2014).

Outro tipo de contaminação muito prejudicial ao meio ambiente e a saúde pública, motivo de preocupação para a sociedade contemporânea, é a por metais pesados. A contaminação do solo por metais pesados é resultante de diferentes atividades industriais, como a mineração, a produção de baterias para veículos, resíduos industriais e a dispersão de lavagem de processos de incineração. Além de hidrocarbonetos oleosos e metais pesados, a utilização exhaustiva de substâncias pesticidas, herbicidas, contaminantes do ar (monóxido de carbono, ozônio, chuva ácida, material particulado), compostos orgânicos voláteis, compostos nitroaromáticos e entre outros, estão na lista de poluentes que podem ser nocivos, causadores de danos extensos, como lesões corrosivas, toxicidade e doenças em geral.

O destino dos poluentes é geralmente o solo, lagos, rios e mar levando à bioacumulação e efeitos de biomagnificação ao longo do tempo, o que leva a efeitos

deletérios e perigosos à vida aquática e terrestre. As substâncias que penetram no ambiente do solo e da água podem afetar indiretamente os seres humanos, por absorção em diferentes vegetais, frutas, peixes e outros produtos alimentares humanos (JIMOH; LIN, 2019).

Segundo Ivihina et al. (2015), existem quatro categorias principais de tecnologias de limpeza disponíveis para a remediação de derramamentos de petróleo em ambiente marinho: tratamento químico (dispersantes, disjuntores de emulsão); queima in situ; recuperação mecânica (barreiras de contenção “booms”, escumadeiras, separadores de óleo e água, adsorventes; e biorremediação. Entre estas categorias aquela que oferece melhor retorno para o ambiente é a biorremediação, com destaque para os biossurfactantes, este melhora a dispersão dos contaminantes na fase aquosa e aumentar a biodisponibilidade do substrato hidrofóbico para micro-organismos, com a remoção subsequente de tais poluentes por biodegradação, com a vantagem de ter baixa toxicidade e ser biocompatível.

3.3.2. Biorremediação

A biorremediação envolve a capacidade de degradação natural, a partir dos processos metabólicos de plantas e micro-organismos tanto para a conversão parcial de contaminantes em compostos menos tóxicos ou a conversão completa de tais substâncias em dióxido de carbono e água (DA SILVA et al., 2020).

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

Surfactantes podem auxiliar nos processos de biorremediação, uma vez que são capazes de aumentar a mobilidade dos hidrocarbonetos, bem como a biodisponibilidade. (HAFTKA; HAMMER; HERMENS, 2015). Em 1989, o petroleiro Exxon Valdez derramou 41.000 mil litros de petróleo no Golfo do Alasca, e o uso de surfactantes químicos desempenhou um papel importante na limpeza, dando origem ao desenvolvimento desta tecnologia, dando razões para acreditar na eficácia da aplicação

deste método de tratamento em derrames de petróleo futuras sob as circunstâncias adequadas (MORRIS; LOUGHLIN, 1994).

Com o passar dos anos, os estudos com surfactantes biológicos (biossurfactantes) cresceram e estes tornaram-se alternativa aos químicos devido a sua diversidade de aplicações e às suas propriedades versáteis específicas, toxicidade diminuta e aceitabilidade biológica. Eles são usados como aditivos para a produção de produtos químicos orgânicos, derivados de petróleo e petroquímicos (KARLAPUDI et al., 2018).

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

Jadhav et al. (2013) observou que a adição de biossurfactante produzido por *Oceanobacillus* sp. ao meio rico em células bacterianas aumentou a biodegradação de óleo bruto para até 90%, enquanto o teste usando apenas células bacterianas como agentes de degradação obtiveram êxito de até 63% apenas.

A biorremediação é uma das tecnologias indicadas, pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, para o tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, a via biológica é a mais estudada (SANTOS et al., 2016). Para auxiliar nesse processo, os biossurfactantes, mais uma vez, se mostram úteis uma vez que podem possibilitar o aumento da disponibilidade do substrato hidrofóbico, sendo alternativa a processos químicos e mecânicos utilizados na recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos: incineração, dessorção térmica, a solidificação/estabilização e extração de vapores do solo (IVSHINA et al., 2015).

Além da bioremediação, os surfactantes (ou agentes umectantes) podem ajudar repelência à água do solo que é gerada pela matéria orgânica do solo. A repelência tem um efeito substancial na hidrologia da água no solo: dificulta a infiltração, levando a escoamento superficial melhorado e erosão do solo, e causa fluxo preferencial no perfil do solo além daquele da heterogeneidade natural do solo. Ao reduzir a tensão superficial

do líquido em que são dissolvidos, eles reduzem simultaneamente a repelência à água no solo, aumentando a força motriz da absorção de água por superfícies hidrofóbicas. Os surfactantes tornam o solo molhável à medida que a cauda hidrofóbica do agente umectante se liga quimicamente ao revestimento hidrofóbico na partícula do solo, enquanto a cabeça hidrofílica atrai moléculas de água, permitindo que elas passem para o solo e aumentando a infiltração (OGUNMOKUN; LIU; WALLACH, 2020).

Sarubbo et al. (2015) destaca os biotensoativos, para tratamento de metais pesados, como alternativa às técnicas tradicionais (imobilização em matriz sólida, migração para fase líquida por dessorção e a solubilização e limpeza com ácidos e agentes quelantes), devido à natureza iônica dessas biomoléculas, bem como a sua biodegradabilidade, baixo grau de toxicidade e as propriedades superficiais excepcionais, tornam os biossurfactantes potenciais candidatos para a remoção de metais pesados de solos e sedimentos.

3.3.3. Remoção de compostos orgânicos do solo

A aplicação de biossurfactantes para a remoção de contaminantes do solo é menos conhecido do que o uso em biorremediação em água, uma vez que a eficiência de remoção é impulsionada principalmente pelas propriedades físico-químicas da biossurfactante em vez de os efeitos sobre a atividade metabólica ou alterações nas propriedades de superfície da célula. No entanto, os mecanismos que afetam a mobilização e a solubilização de hidrocarbonetos no solo são semelhantes aos envolvidos no aumento de biodisponibilidade para a biorremediação (FRANZETTI et al., 2009; DA SILVA et al., 2020).

Pacwa-Płociniczak et al. (2011) afirma que biossurfactantes promovem a remoção de hidrocarbonetos através da biodegradação, solubilização, mobilização ou emulsificação. Um considerável aumento da capacidade de solubilização de hidrocarbonetos deste ocorre acima da CMC, devido à partição do hidrocarboneto na porção hidrofóbica das micelas, sendo necessárias muitas vezes maiores concentrações de biossurfactantes. Já a mobilização ocorre em concentrações baixas da CMC e é dividido em deslocação e dispersão. Deslocação consiste na libertação de gotículas de hidrocarbonetos do meio poroso devido à redução na tensão interfacial (entre a fase aquosa e a oleosa), que possibilita a diminuição das forças de capilaridade que causam a formação de saturação residual. Dispersão está relacionada com a tensão interfacial e

concentração de surfactante e difere da deslocação, que está relacionada apenas com a tensão interfacial entre as fases aquosa e hidrofóbicos, sem formação de emulsão minúsculas (GUIYUN; BRUSSEAU; MILLER, 1997).

A eficácia de um agente tensoativo na remoção de compostos hidrofóbicos também depende do pH e da força iônica da solução, o que pode alterar a disposição das micelas de agregados e de sorção do agente tensoativo para o solo, o que, por sua vez, limita o transporte de o hidrocarboneto pelo surfactante. Diferentes biossurfactantes já foram testados para a remoção dos produtos derivados do petróleo do solo e da água contaminada. Entre os diversos tensoativos utilizados em processos de descontaminação biotecnológicas está a surfactina, com remoções superiores a 85% com a biomoléculas produzidas por *Bacillus licheniformis* (KAVITHA; MANDAL; GNANAMANI, 2014) e 88% por *Bacillus subtilis* (FERNANDES et al., 2016). Outros tensoativos produzidos por espécies de *Bacillus* (CHAPRÃO et al., 2018; GUDIÑA et al., 2013; RABODONIRINA et al., 2019), *Pseudomonas* (RABODONIRINA et al., 2019; RAMADASS et al., 2018) e *Candida* (CHAPRÃO et al., 2015; MINUCELLI et al., 2017; SOBRINHO et al., 2013a), também têm sido utilizados com sucesso na recuperação de solos.

3.3.4. Remoção de metais pesados

A contaminação por metais pesados é nociva para os seres vivos e para o meio ambiente devido à sua persistência na natureza, baixa biodisponibilidade, natureza cancerígena, mutagênica e teratogênica (LAL et al., 2018).

Os íons metálicos pesados estão naturalmente presentes no solo, por exemplo, contudo atividades humanas como a mineração, fabricação de tintas, baterias, aplicação de pesticidas contendo metais, galvanoplastia, curtumes, tubulação metálica, munições e lodo de esgoto (doméstico e industrial) e destinação de resíduos industriais aumenta a concentração de metal no ambiente (DAS et al., 2017; LAL et al., 2018).

Os metais pesados são propensos a se acumularem nos sedimentos, por não serem degradáveis. Contudo, eles podem re-suspender ou dissolver-se facilmente pelas águas superficiais, especialmente quando houver mudanças nas condições ambientais (potencial redox, pH, etc.), tornando-se biodisponíveis podendo entrar na cadeia alimentar e se concentrar em organismos (CHEN et al., 2017). Pela crescente e riscos a saúde, várias técnicas como mecânica, física e métodos químicos, juntamente com a fitorremediação de metais têm sido amplamente estudados (DAS et al., 2017).

Atualmente, os principais tratamentos para sedimentos contaminados por metais pesados incluem solidificação / estabilização que visa reduzir a mobilidade de metais pesados pela adição de um agente que solidifica e imobiliza os metais para que seja removido através da lavagem (CHEN et al., 2017). Usman et al. (2016) afirma que objetivo da utilização de surfactantes como agente para remoção de compostos orgânicos e metais é semelhante, contudo pelo fato de metais pesados não são biodegradáveis; só podem ser transformados de um estado químico para outro, como resultado, alterando seu estado de mobilidade e toxicidade. Além disso, os compostos orgânicos são formados principalmente por moléculas neutras, enquanto os metais são mais frequentemente encontrados como espécies catiônicas.

Devido a um caráter aniônico, os biossurfactantes podem formar complexos com o metal carregado positivamente. Isso oferece a oportunidade de usar biossurfactantes como agentes sequestradores de metais, permitindo, portanto, dessorção de metais do solo e da água contaminada (MNIF; GHRIBI, 2015). A remoção dos metais pelo biossurfactantes iônicos é pensado para ocorrer na seguinte ordem: adsorção do biossurfactante à superfície do solo e a complexação com o metal; separação do metal a partir do solo para a solução; e associação com micelas. Os metais pesados são aprisionados dentro das micelas através de interações eletrostáticas e pode ser facilmente recuperada através de métodos de separação de precipitação ou de membrana (SANTOS et al., 2016). Além da natureza iônica, os biossurfactantes apresentam vantagem pela sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e excelentes propriedades superficiais. Estudos demonstram o potencial da surfactina, ramnolipídeos e soforolipídeos na remoção de metais pesados (AYANGBENRO; BABALOLA, 2018)

Biossurfactantes aniônicos criar complexos não-iônicos com metais através de ligações iônicas, sendo estas mais fortes do que aquelas entre o metal e o solo. O complexo de metal-biossurfactante é separado do solo, devido à redução da tensão interfacial. Já os biossurfactantes catiônicos pode substituir íons metálicos igualmente carregados através de troca iônica (concorrência para superfícies carregadas negativamente). Micelas de surfactantes podem também ser utilizadas para remover íons metálicos da superfície do solo (SARUBBO et al., 2015).

Lal et al. (2018) afirma que a exploração da tecnologia de interação planta-metal-micróbio, explorando os mecanismos por trás da planta e dos micróbios rizosféricos, pode ser útil na remediação de solos contaminados por metais pesados. A partir disto fez um

estudo o uso de biossurfactante e rizobactérias produtoras de exopolissacarídeos como uma ferramenta biológica avançada para remoção completa de metais tóxicos do solo. Wang et al. (2014) em experimentos com um mutante de *B. subtilis* observou a redução de até 96% da presença de metais pesados (cádmio, cromo, cobre, chumbo e níquel) nas plantas expostas aos metais, quando associadas a uma bioestimulados dos micro-organismo do solo.

Tang et al. (2017) observou a eficiência de remoção significativamente mais altas (Cu, Zn, Cr, Pb, Ni e Mn foram de $70,6 \pm 3,41\%$, $82,2 \pm 5,21\%$, $89,0 \pm 3,34\%$, $60,0 \pm 4,67\%$, $88,4 \pm 4,43\%$ e $70,0 \pm 3,51\%$, respectivamente) pelo uso simultâneo de GLDA, agente complexante biodegradável, e biossurfactante ramnolípido em ação sinérgica no processo eletrocinético na descontaminação de metais pesados do lodo. Luna et al. (2016) obteve taxas de remoção de 95, 90 e 79% para Fe, Zn e Pb, respectivamente, além de observar o efeito da mudança do pH no aumento da remoção e a manutenção da eficiência após reciclo do biossurfactante de *Candida sphaerica*.

3.4. Aplicação de biossurfactante na indústria do petróleo

A indústria petrolífera, busca melhorias e aprimoramentos de tecnologias para garantir resultados mais econômicos e eficazes. Essas tecnologias incluíam recuperação aprimorada de óleo (*Enhanced oil recovery* - EOR), desenvolvida para melhorar economicamente os rendimentos de extração e recuperação de óleo (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018).

Os métodos tradicionais de recuperação de óleo estão inseridos nos processos conhecidos como EOR, que incluem, por exemplo, o uso de calor, compostos químicos tais como surfactantes, e a injeção de gás miscível. Contudo, os custos químicos elevados impediram o uso generalizado de surfactantes para recuperação avançada de petróleo (YOUSSEF et al., 2013).

Pereira et al. (2013), afirmam que a substituição de tensoativos sintéticos convencionais por biocompostos parece ser uma abordagem boa e eficiente; no entanto, ainda depende da estratégia adotada, e é nisso que se baseia a recuperação avançada de petróleo por via microbiana (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) (PACWA- PŁOCINICZAK et al., 2011). Silva et al (2014) descrevem a recuperação avançada de

petróleo como 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. Alvarez et al. (2015), fizeram simulações de MEOR com biossurfactante produzido por *B. amyloliquefaciens* e obteve recuperação de hidrocarbonetos de petróleo superior a 90%, enquanto que Khondee et al. (2015) obtiveram 100% de recuperação de óleo, usando a técnica de fracionamento por espuma, usando do biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. GY19.

A atuação dos biossurfactantes na redução da tensão interfacial entre óleo / água e óleo / rochas nos poros das rochas dos reservatórios de petróleo, leva a uma redução nas forças de capilaridade que impedem o óleo de mover-se através dos poros das rochas. Biossurfactantes também pode formar uma emulsão na interface óleo-água, o que estabiliza o óleo dissolvido em água e permite a remoção de óleo, juntamente com a água de injeção (MAO et al., 2015; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011)

A aplicação de biossurfactantes na recuperação avançada de petróleo é um dos métodos mais promissores para recuperar uma parte substancial do óleo residual, que fica muitas vezes localizado em regiões do reservatório que são de difícil acesso sendo o óleo aprisionado nos poros por pressão capilar, por atuarem na redução da tensão superficial do óleo residual ao diminuir as forças capilares que impedem a circulação desse óleo através dos poros da rocha. Através de processos de recuperação de petróleo, avalia-se que esses poços de petróleo produzem apenas um terço a metade do petróleo originalmente presentes nos locais. Gudiña et al. (2013) demonstraram a eficiência da recuperação de óleo residual em reservatórios maduros, períodos longos de exploração, e teve resultados que mostram um aumento de recuperação de 6-25% para o óleo de aquecimento, 16-24% de parafina viscosa, 13-18% para o óleo árabe leve e 15-17% para o petróleo bruto pesado.

3.5. Aplicações do biossurfactante na área médica

3.5.1. Atividade antimicrobiana dos biossurfactantes

As atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral dos biossurfactantes os tornam potencialmente aplicados no combate à muitas doenças e podem ser utilizados como agentes terapêuticos (YULIANI et al., 2018). Mecanismos de ação de compostos antimicrobianos incluem inibição da síntese de proteínas, parede celular ou ácido

nucleico, ruptura de membranas bacterianas e, em alguns casos, interferência na via metabólica (FARIQ; SAEED, 2016).

A classe mais comumente relatada de biosurfactantes com atividade antimicrobiana são os lipopeptídeos devido as propriedades bioativas versáteis, podendo atuar como antibióticos, antivirais, antitumorais, imunomoduladores e inibidores de enzimas (FARIQ; SAEED, 2016; LOISEAU et al., 2015).

A atividade antimicrobiana dos biosurfactantes lipopeptídicos se deve à capacidade desses se auto-associarem e formar agregados micelares dentro da membrana lipídica. Devido a estas propriedades, os lipopeptídeos normalmente causam ruptura da membrana, aumento da permeabilidade da membrana, liberação de metabólitos e lise celular. Além disso, alterações na estrutura da membrana e destruição de conformações protéicas alteram as funções vitais da membrana, incluindo a geração e o transporte de energia (FRACCHIA et al., 2015).

Loiseu et al. (2015) verificam que uma cepa de *Bacillus subtilis* exibe uma atividade antagônica contra *Legionella pneumophila*, o agente causador da doença dos legionários, um tipo de pneumonia rara, como também exibe uma atividade fraca em relação à ameba *Acanthamoeba castellanii*, conhecida por ser o reservatório natural de *L. pneumophila*.

Fracchia et al. (2014) citam alguns lipopeptídeos que atingiram um status de antibiótico comercial, como as equinocandinas, a micafungina, a anidulafungina e a daptomicina. Robbel e Marahiel (2010) descrevem a daptomicina, um lipopeptídeo cíclico ramificado isolado de culturas de *S. roseosporus* e produzido pela Cubist Pharmaceuticals sob o nome Cubicin®, aprovado em 2003 para o tratamento de infecções cutâneas causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e outros patógenos gram-positivos, e em 2006 pela bacteremia e endocardite causada por *S. aureus*.

A literatura apresenta outros tipos de biosurfactante com potencial antimicrobiano. Luna et al. (2011) e Rufino et al. (2011b) observaram a atividade antimicrobiana de dois biosurfactantes derivados, respectivamente, de *Candida sphaerica* UCP0995 e *Candida lipolytica* UCP 0988, contra estirpes gram-positivas como *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. agalactiae*, *S. epidermidis*, *S. Oralis* e contra *C. albicans*. Mani et al. (2016) identificaram atividade de um glicolipídico de *Staphylococcus saprophyticus* contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P.*

aeruginosa, *Vibrio cholerae*, *B.subtilis*, *Salmonella paratyphi* e *S. aureus*, e os fungos *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Biossurfactantes brutos isolados de *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus plantarum* demonstraram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* CMCC26003 (YAN et al., 2019).

A versatilidade da atividade antimicrobiana de biossurfactantes, especialmente os lipopeptídicos, extrapola para além de patógenos humanos, podendo ser uso agroindustrial no controle de pragas, por exemplo, como relata por Nanjundan et al. (2019) em estudo bem sucedido com surfactina de *Bacillus amyloliquefaciens* contra uma variedade de patógenos fúngicos, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*.

Apesar do elevado número de publicações que descrevem a atividade antimicrobiana dos biossurfactantes e das patentes relacionadas com a sua utilização, as aplicações reais nas indústrias farmacêuticas, biomédicas e de higiene permanecem limitadas (FRACCHIA et al., 2015).

3.5.2. Agentes antiadesivos e inibidores de biofilmes

Biofilmes são comunidades complexas e sésseis de micro-organismos encontrados ligados à uma superfície ou incorporado firmemente em uma matriz extracelular formando agregados celulares. A matriz do biofilme que envolve as bactérias os torna tolerantes a condições adversas e resistentes a tratamentos antibacterianos (ROY et al., 2018).

Pay e Boles (2016) descrevem a formação de biofilme, dividindo em pelo menos 3 etapas, em qualquer superfície: O primeiro estágio envolve a ligação das células a uma superfície seguida pela instalação das células para formar micro colônias e finalmente a diferenciação do biofilme em uma estrutura madura. Após o desenvolvimento completo do biofilme, sua quebra ou dispersão ocorre através de processos mecânicos e químicos (PAYNE; BOLES, 2016).

Pelo fato de a adesão microbiana ser o primeiro estágio da formação do biofilme, este é o melhor momento para a ação de compostos antiadesivos e antibiofilmes. A capacidade do biossurfactante de alterar as superfícies nas quais entram em contato, faz dele um promissor agente antiadesivo e antibiofilme, além de sua maior biocompatibilidade. Pesquisadores nesta área relataram a eficácia da ação dos biossurfactantes ao observarem a dispersão de biofilme de bactérias patogênicas, a

diminuição da viabilidade celular bacteriana e a redução nas propriedades de adesão bacteriana, segundo Naughton et al. (2019).

Sugere-se que os biosurfactantes reduzem as interações hidrofóbicas que diminuem a hidrofobicidade da superfície que acaba por impedir a adesão microbiana a superfícies e, posteriormente, interfere no desenvolvimento de biofilmes (MNIF; GHRIBI, 2015). A maneira de orientação dos biosurfactantes em seu filme formado sobre determinados sólidos é decisiva para o equilíbrio das propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas do sólido coberto pelo filme de biosurfactante (ZDZIENNICKA; JAŃCZUK, 2018).

A formação do filme de biosurfactante na superfície sólida depende dos componentes e parâmetros de sua tensão superficial, bem como da tensão superficial do surfactante ou biosurfactante. Zdziennicka e Jańczuk (2018) afirmam que o ramnolípido e a surfactina são utilizados para proteção de dispositivos e implantes cirúrgicos, pelo fato de exibirem propriedades anti-adesivas e inibirem a formação de biofilme.

Abdelli et al. (2019) utilizando surfactina de *Bacillus safensis* apresentou uma interessante atividade antiadesiva que excedeu 80% contra a cepa *Staphylococcus epidermidis* S61 formadora de biofilme. Um lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* AC7 combinado com a molécula farnesol foi capaz de neutralizar biofilmes de *Candida albicans* no elastômero de silicone em condições fisiológicas simuladas (CERESA et al., 2018).

Utilizando soforolípido de *Candida bombicola* ATCC 22214, Ceresa et al. (2020) observaram redução significativa na capacidade de *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* de formar biofilmes e aderir às superfícies em 90 a 95% de silicone utilizado em equipamentos médicos. Satpute et al. (2019) utilizando o biosurfactante glicolipoproteico produzido por *Lactobacillus acidophilus* observaram atividades antibiofilme e antiadesiva contra micro-organismos produtores de biofilme em implantes médicos baseados em PDMS (poly dimethyl siloxane), considerando um potencial agente antiadesivo em várias superfícies de dispositivos biomédicos.

3.6. Aplicações do biossurfactante na área alimentar

3.6.1. Biossurfactantes como aditivos alimentares

As mudanças no estilo de vida nas últimas décadas transformaram os hábitos alimentares, com a crescente incorporação de aditivos aos produtos alimentares (ONAOLAPO; ONAOLAPO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2018), aditivos alimentares são substâncias adicionadas para manter ou melhorar a segurança, frescura, sabor, textura e / ou aparência dos alimentos.

Os surfactantes quimicamente sintetizados são utilizados em inúmeras formulações alimentares. Biossurfactantes também têm sido utilizados para esse fim, como a lecitina e algumas proteínas utilizadas em molhos para salada e cobertura de bolos. No entanto, os surfactantes quimicamente sintetizados são tóxicos e, portanto, os biossurfactantes ganharam terreno devido à sua natureza biodegradável e baixa toxicidade, tornando esses compostos naturais mais atraentes como novos aditivos funcionais para uso na indústria de alimentos (SHARMA, 2016).

Existe uma demanda crescente por parte dos consumidores pela substituição de produtos sintéticos mais nocivos por produtos naturais menos nocivos que desempenham as mesmas funções. Nesse contexto, os biossurfactantes emergem como uma solução biocompatível que pode ser utilizada como emulsificante, antimicrobiano, antibiofilme e antioxidante (Tabela 1) com aplicações na formulação de produtos alimentícios (RANASALVA; SUNIL; POOVARASAN, 2014).

Tabela 1. Biossurfactantes com potencial de uso na indústria de alimentos

Micro-organismo	Biossurfactante	Função	Alvo	Referência
<i>Bacillus sp.</i> MTCC 5877	Glicolipídeo	Antiadesiva Antimicrobiana	<i>E. coli</i>	Anjum et al. (2016)
<i>Candida utilis</i>	Complexo de carboidratos, lipídios e proteínas	Emulsificante	-	Campos et al. (2019)
<i>A. piechaudii</i> CC-ESB2	-	Emulsificante, Antioxidante	-	Chen et al. (2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC-10145	Raminolipídeo	Antimicrobiana	<i>S. lutea</i> , <i>M. luteus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>C. albicans</i>	El-Sheshtawy e Doheim (2014)
<i>Candida albicans</i> SC5314	Soforolipídeo	Emulsificante, Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MTCC 424), <i>Escherichia coli</i> (MTCC 723), <i>Bacillus subtilis</i> (MTCC 441), e <i>Staphylococcus aureus</i> (MTCC 9886).	Gaur et al. (2019)
<i>Candida glabrata</i> CBS138	Soforolipídeo	Emulsificante, Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MTCC 424), <i>Escherichia coli</i> (MTCC 723), <i>Bacillus subtilis</i> (MTCC 441), e <i>Staphylococcus aureus</i> (MTCC 9886).	Gaur et al. (2019)
<i>Bacillus licheniformis</i> VS-16	Fosfo-lipopeptídeo	Antibiofilme	<i>E. coli</i>	Giri et al. (2017)
<i>Bacillus ssp.</i>	Surfactina	Antimicrobiano	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Mohd Isa et al. (2020)

Os biossurfactantes podem ser utilizados em produtos de panificação e sorvetes durante o cozimento de gorduras e óleos e para o controle da consistência, prolongando a vida útil do produto e solubilizando os óleos aromáticos. Vijayakumar e Saravanan (2015), por exemplo, observaram que o uso de ramnolipídeos melhorou a estabilidade da massa, bem como o volume, a textura e a conservação de produtos de panificação.

3.6.2. Agentes emulsificantes

Nos alimentos, o emulsificante atua promovendo a estabilidade da emulsão formada. A redução da tensão superficial na interface óleo-água é o ponto-chave e resulta no controle de gotículas desenvolvidas, bem como na estabilização de sistemas aerados (RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020). Como resultado, os emulsificantes funcionam melhorando a consistência e a textura dos alimentos formulados, promovendo também a solubilização de aromas. Outra função é o aumento da vida útil. Portanto, os emulsificantes são essenciais para a indústria de alimentos, na qual são frequentemente usadas espumas e emulsões de óleo de água (PATINO et al., 2008; RADHAKRISHNAN et al., 2011; SATPUTE, 2018).

A produção de emulsificantes a partir de culturas microbianas é uma alternativa aos aditivos existentes, possibilitando a aquisição de produtos mais resistentes que atendem aos requisitos das modernas tecnologias de processamento de alimentos (NITSCHKE; SILVA, 2017). Há relatos de uso de biossurfactantes como emulsificantes no processamento de matérias-primas com aplicações em produtos de panificação (afetando as características reológicas da massa) e carnes processadas (emulsificação de gordura)(SHARMA, 2016).

Os biossurfactantes podem ser usados como emulsificantes para controlar o agrupamento de glóbulos de gordura, estabilizar sistemas aerados e melhorar a consistência dos produtos gordurosos. Estudos relatam o uso de ramnolipídios para melhorar as propriedades da manteiga, croissants e doces congelados (MUTHUSAMY et al. 2008). Utilizou-se um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* em molhos para salada (CAMPOS et al., 2015; CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2014) e um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* na formulação de biscoitos (ZOUARI et al., 2016).

Barros et al. (2007) cita micro-organismos produtores robustos de bioemulsificadores como *Candida utilis*, *Candida valida*, *Hansenula anomala*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Rhodotorula graminis*, *Klebsiella* sp e *Acinetobacter*

calcoaceticus e a alga *Porphyridium cruentum*, com estabilidade superior aos emulsificadores comerciais.

3.6.3. Agentes antimicrobianos e biofilmes em alimentos

Os biossurfactantes têm sido utilizados com sucesso para inibir ou retardar o desenvolvimento de micro-organismos comuns em produtos alimentares. O mecanismo de ação depende das características físico-químicas do composto bioativo. Alguns dos mecanismos descritos incluem uma alteração na permeabilidade, desestabilização e ruptura da membrana celular ou a destruição das conformações proteicas, com a alteração das funções vitais, incluindo a geração e o transporte de energia (FRACCHIA et al., 2015).

Anjun et al. (2016) realizaram testes com resultados efetivos utilizando um biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. para inibir o crescimento de *E. coli*. Yuliani et al. (2018) investigaram um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* C19 e encontraram atividade contra cinco patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica typhi* e *Listeria monocytogenes*). Anteriormente, alguns patógenos relacionados a alimentos, como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* diminuíram sua proliferação quando ramnolipídeos derivados de *Pseudomonas aeruginosa* foram adicionados à cultura (COSTA et al., 2010). Freitas Ferreira et al. (2019) utilizando ramnolipídeo comercial relatou a atividade antimicrobiana contra patógenos Gram-positivos de alimentos (*B. cereus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*), dependendo do pH.

Na indústria de alimentos, os biofilmes bacterianos são uma fonte potencial de contaminação, transmissão de doenças e deterioração de produtos alimentícios. Assim, reduzir a formação de biofilme na superfície dos alimentos é de extrema importância para o fornecimento de produtos de qualidade aos consumidores (CAMPOS et al., 2013). Os métodos para a prevenção ou erradicação do biofilme abrangem processos físicos, químicos ou biológicos, bem como o desenvolvimento de novos materiais de embalagem modificados (E SILVA et al., 2017). Devido à sua considerável atividade superficial, os biossurfactantes são eficazes para evitar a formação de biofilme (SHARMA, 2016).

Um biossurfactante isolado da bactéria *Lactobacillus paracasei* exibiu atividade antibiofilme contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae*, todos patógenos alimentares bem conhecidos

(GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010). Um biossurfactante derivado de *Bacillus licheniformis* reduziu a formação do biofilme de *E. coli* em 54% (GIRI et al., 2017). Biossurfactante produzido por *Nocardiopsis* sp. MSA13 interrompeu significativamente a formação de biofilme por *Vibrio alginolyticus* (KIRAN et al., 2014). Um glicolípido produzido por *Brevibacterium casei* inibiu significativamente a produção de biofilme por *Vibrio* spp., *E. coli* e *Pseudomonas* spp. (KIRAN; SABARATHNAM; SELVIN, 2010).

3.6.4. Agentes Antioxidantes

Os antioxidantes são uma classe de aditivo alimentar usado para evitar a oxidação lipídica, aumentando assim a vida útil dos produtos alimentícios (CÖMERT; GÖKMEN, 2018). A geração de compostos tóxicos e o desenvolvimento de ranço e sabores indesejáveis são os efeitos negativos da peroxidação lipídica, levando a uma redução na qualidade e segurança do produto (NITSCHKE; SILVA, 2017).

Os biossurfactantes têm atividade antioxidante significativa e, portanto, têm o potencial de cumprir esse objetivo (SHARMA, 2016). Biossurfactantes isolados de cepas de *Lactobacillus casei* demonstraram atividade satisfatória em relação ao sequestro de radicais livres de DPPH, com maior efeito alcançado quando a concentração do biossurfactante foi aumentada (MERGHNI et al., 2017).

Yalçın e Çavuşoğlu (2010) sugerem que um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* RWI poderia ser usado como um antioxidante alternativo natural. Os autores avaliaram sua atividade antioxidante com base em seu poder redox, no sequestro de DPPH e na quelatação de íons de ferro, concluindo que o biocomposto possui boa capacidade antioxidante para a eliminação de radicais livres.

3.7. Agentes estabilizantes de nanopartículas

A nanotecnologia estende a interdisciplinaridade das ciências para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, da ordem de 1 a 100 nanômetros (KHAN; SAEED; KHAN, 2019). Partículas deste tamanho, conhecidas como nanopartículas, apresentam uma grande área superficial e, frequentemente, exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. O aproveitamento dessas propriedades em aplicações

tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (RAI; DURAN, 2011; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

A nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que permitam melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente. A utilização de nanomateriais catalíticos aumenta a eficiência e a seletividade de processos industriais com um aproveitamento mais eficiente de matérias primas, consumo menor de energia e diminuição da produção de resíduos indesejáveis (RAI; DURAN, 2011).

Ouro, prata e cobre têm sido os metais mais utilizados na síntese de nanopartículas estáveis. Adicionalmente, as nanopartículas possuem absorção ressonante, *plasmon*, superficiais na região do UV-visível. A banda de *plasmon* superficial surge em função da existência de elétrons livres na banda de condução devido ao pequeno tamanho da partícula (PRYSHCHEPA; POMASTOWSKI; BUSZEWSKI, 2020). O deslocamento da banda é dependente do tamanho da partícula, do ambiente químico ao redor, das espécies adsorvidas na superfície e da constante dielétrica. As características dessas partículas metálicas são definidas através da análise da alteração na absorbância ou no comprimento de onda, o que fornece a medida do tamanho da partícula e sua forma. Ainda, esses nanomateriais inertes, funcionais e biocompatíveis, possuem potencial de aplicação no diagnóstico e na terapia do câncer (LEE; JUN, 2019). A liberação das drogas anticâncer tem sido realizada utilizando-se nanomateriais. Com o uso de nanocristais magnéticos e fluorescentes, a detecção e o monitoramento de tumores têm sido demonstrados (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Várias técnicas químicas e físicas vêm sendo desenvolvidas para sintetizar nanopartículas, tais como redução química, técnicas eletroquímicas, redução fotoquímica, micelas reversas lamelares, técnicas com aerosol e a técnica por vaporização eletrostática (XIE; YE; LIU, 2006). Estudos têm demonstrado que o tamanho, a morfologia, a estabilidade e as propriedades (químicas e físicas) das nanopartículas são fortemente influenciadas pelas condições experimentais, pela cinética de interação dos íons metálicos com os agentes redutores e os processos de adsorção dos agentes estabilizantes (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

A prata coloidal é de interesse particular devido às suas propriedades distintas como alta condutividade, sendo usadas na fabricação de elementos usados em eletrônicos impressos, estabilidade química, atividade antibacteriana, atividade catalítica e capacidade para construção de detectores extremamente sensíveis e seletivos em função

da existência do *plasmon* superficial, substrato para espectroscopia *raman* de aumento de superfície (SHIRAIISHI; TOSHIMA, 2000; GARCIA, 2011).

A redução química é o método mais largamente aplicado na preparação de nanopartículas de prata em dispersões coloidais em água ou solventes orgânicos estáveis. Os redutores comumente utilizados são o borohidreto, o citrato, o ascorbato e o hidrogênio elementar. A redução de íons prata (Ag^+) em solução aquosa geralmente fornece prata coloidal com diâmetro de partícula de vários nanômetros. Inicialmente, a redução de vários complexos com íons Ag^+ leva à formação de átomos de prata (Ag^0), a qual é seguida da aglomeração dentro de aglomerado. Esses aglomerados levam, então, à formação das partículas de prata coloidais (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

A síntese de nanopartículas por redução química é sempre acompanhada da presença de estabilizadores que previnam a indesejável aglomeração dos coloides, como polímeros (goma arábica ou amido) e surfactantes. O tamanho da partícula, a distribuição do tamanho (polidispersão), assim como a estabilidade do sistema pode ser modificada também pela adição do agente estabilizante. A influência dos surfactantes está intimamente ligada à não apenas à concentração do mesmo no meio, mas também à sua natureza – com a presença ou ausência de carga em suas estruturas, isto é, se eles são aniônicos, catiônicos ou neutros. Embora se tem descrito que a adição de surfactantes neutros tenha conduzido à estabilidade duradoura, a adição de surfactante iônicos em sistemas contendo nanopartículas de prata permita não só a estabilidade, devido ao aumento do potencial eletrostático que é gerado pela adsorção de tensoativos na superfície da nanopartícula, como também a alteração, no sentido de melhorar, a distribuição do tamanho dos partículas. Os surfactantes iônicos também são usados como modificadores do tamanho de partícula; a presença desses agentes também pode levar a alterações na morfologia das nanopartículas (SOUKUPOVÁ et al., 2008).

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

Eswari, Dhagat e Mishra (2018) listam cinco abordagens de síntese verde de nanopartículas de prata: (1) No método do polissacarídeo, a água e o polissacarídeo atuam como agentes estabilizadores e / ou redutores. (2) No método de Tollens, os sacarídeos reduzem os íons de prata na presença de amônia. Isso produz nanopartículas de prata de diferentes tamanhos e formas. (3) A irradiação de sais de prata e surfactante com feixes de laser leva à formação de nanopartículas de prata de vários tamanhos e formas de distribuição. (4) Doses e taxas de dose de radiação também controlam a morfologia das nanopartículas formadas. (5) No método biológico, os extratos microbianos e vegetais são usados como agentes redutores ou estabilizadores. As biomoléculas presentes no extrato, aminoácidos, polissacarídeos, vitaminas, enzimas e proteínas, atuam como agentes redutores.

A maioria dos surfactantes usados é derivada de petróleo, ou seja, é tóxica e não biodegradável. Neste sentido, os biossurfactantes, como estabilizadores “verdes”, surgem como excelentes candidatos para a aplicação na síntese de nanopartículas. O uso de biossurfactantes para síntese e estabilização de nanopartículas vem ganhando importância desde a última década (FARIAS et al., 2014; KUMAR et al., 2010; PRIYADARSHINI et al., 2016; RANE et al., 2017).

3.8. Perspectivas industriais

A importância comercial dos surfactantes torna-se evidente a partir da tendência do mercado em aumentar a produção desses compostos em decorrência da diversidade de utilizações industriais. As aplicações industriais são classificadas de acordo com seus usos: 54% como detergentes, 13% nas indústrias têxteis, de couro e de papel, 10% em processos químicos, outros 10% nas indústrias farmacêutica e de cosméticos, 3% na indústria de alimentos, 2% na agricultura e os 2% restantes em outras aplicações (ALMEIDA et al., 2016)

A maioria destes agentes tensoativos é obtida por processos químicos da petroquímica e recursos oleoquímicos. No entanto, o foco na sustentabilidade e na nova legislação ambiental tem levado à busca de surfactantes naturais como alternativas aos produtos existentes, tornando boas as perspectivas de crescimento para o mercado de biossurfactantes (FARIAS et al., 2021).

Em 2012, o mercado global de surfactantes gerou uma receita de 27 bilhões de dólares (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014). A produção total de surfactantes

em 2012 foi de aproximadamente 12 milhões de toneladas, destas, apenas 3,5 milhões de toneladas das quais foram biossurfactantes (SILVA et al., 2014), contudo espera-se que deve chegar a 4,6 toneladas até 2020, crescendo a uma CAGR (Taxa Composta Anual de Crescimento) de 4,3% entre 2014 e 2020 (GRAND VIEW RESEARCH, 2015). A geração de receita do mercado de biossurfactante ultrapassou US\$ 1,8 bilhão em 2016 e deve chegar a US\$ 2,6 bilhões em 2023 (540 toneladas até 2024).

Singh et al. (2019) afirmam que a Europa está emergindo e espera-se que continue a crescer como o maior mercado (cerca de 53%) seguido pelos Estados Unidos, principalmente devido a diretrizes regulatórias mais rigorosas na região. No entanto, o aumento da conscientização e da infraestrutura nos países asiáticos os torna um consumidor crescente de biossurfactantes. Entre os biossurfactantes, os soforolipídeos tiveram a maior participação de mercado global com a indústria de detergentes, líder no setor de aplicação de produtos.

A BASF Cognis (Alemanha) e Ecover (Bélgica) emergiram como os dois principais fabricantes de surfactantes a se aventurar no mercado de biossurfactantes. Outros produtores no mercado são MG Intobio, Urumqui Unite, Saraya, Sun Products Corporation, Akzo Nobel, Croda International PLC, Evonik Industries (Alemanha), Mitsubishi Chemical Corporation e Jeneil Biosurfactant (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2018).

Os valores de mercado dos biossurfactantes variam de cerca de US\$ 10/mg para surfactina pura (98% de pureza), utilizada em pesquisas médicas, a US\$ 24/kg para fórmulas de *emulsan* propostas no início da década de 1980 para limpeza de tanques e/ou recuperação avançada de petróleo. Outros biossurfactantes como os soforolipídeos tem custo de produção de 2 a 5 €/kg, ramnolipídeos custam US\$ 20/kg, para produzir num volume de 20 m³, mas apenas US\$ 5/kg, quando produzidos numa escala de 100 m³, colocando-o para mais perto de sintéticos como etoxilato ou do alquil-poliglicósido (US\$ 1-3/kg) (SANTOS et al., 2016).

Apesar da grande demanda do mercado, a produção de um biossurfactante não é tão competitiva quanto suas contrapartes sintéticas. Para um produto biotecnológico tornar-se competitivo e viável para produção em larga escala, é necessário focar principalmente na otimização do seu bioprocessamento para torná-lo competitivo com os métodos tradicionais. Portanto, a economia do processo de produção de biossurfactante assume importância para sustentar o mercado desses compostos no atual cenário

ambientalmente frágil e no desenvolvimento sustentável a longo prazo (SINGH; PATIL; RALE, 2019).

A literatura cita exemplos que demonstram que com o aperfeiçoamento da tecnologia de produção dos biossurfactantes é possível um aumento de sua produtividade, como o demonstrado por He et al. (2017), que desenvolveram um processo de fermentação sequencial em batelada alimentada (*fed batch*) com operação de preenchimento e extração para melhorar a produção de ramnolipídio por *Pseudomonas aeruginosa* e atingiu uma produção de mais de 150 g / L, observando um aumento de 163% e 102% em relação aos processos tradicionais de batelada (*batch*) e batelada alimentada (*fed batch*), respectivamente. Usando de manteiga de leite e resíduos farinha de transformação de aves como substratos de baixo custo, Zouari et al. (2015) obteve um aumento de seis vezes no rendimento de produção em relação aos processos otimizados descritos com o meio original de *Bacillus subtilis* SPB1, além disso, o resultado corrobora com o desenho estatístico experimental feito antes da produção.

Indústrias estão investindo em biossurfactantes devido a suas características e propriedades potenciais e prospectivas. Com o uso de mutantes e micro-organismos hiperativos com alta capacidade de produção e substratos renováveis baratos como matéria-prima, processos de purificação simples e de baixo custo, e por fim, investimentos financeiros, a produção de biossurfactantes pode ser aprimorada (JIMOH; LIN, 2019; SANTOS et al., 2016). Independentemente das diferentes composições e aplicações que os biossurfactantes mostraram, a síntese em larga escala industrial desses compostos deve ser o principal foco nos dias de hoje.

REFERÊNCIAS

- ABDELGHANY, T. M. et al. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. **BioNanoScience**, v. 8, n. 1, p. 5–16, 2018.
- ABDELLI, F. et al. Antibacterial, anti-adherent and cytotoxic activities of surfactin(s) from a lipolytic strain *Bacillus safensis* F4. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p. 287–300, 2019.
- ALMEIDA, D. G. et al. Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–14, 2016.
- ALVAREZ, V. M. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, n. SEPTEMBER, p. 14–21, 2015.
- ANJUM, F. et al. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 262–269, 2016.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 488–494, maio 1968.
- AYANGBENRO, A.; BABALOLA, O. Metal(loid) Bioremediation: Strategies Employed by Microbial Polymers. **Sustainability**, v. 10, n. 9, p. 3028, 26 ago. 2018.
- BACHMANN, R. T.; JOHNSON, A. C.; EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, p. 225–237, jan. 2014.
- BANAT, I. M. et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. DEC, p. 1–18, 12 dez. 2014.
- BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, abr. 2007.
- BEZZA, F. A.; TICHAPONDWA, S. M.; CHIRWA, E. M. N. Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 393, n. October 2019, p. 122319, 2020.
- BHARDWAJ, G. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 04, n. 06, p. 1–6, 2013.
- BINIARZ, P.; ŁUKASZEWICZ, M.; JANEK, T. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 393–410, 2017.
- CAMPOS, J. M. et al. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 5, p. 1097–1108, set. 2013.
- CAMPOS, J. M. et al. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. v. 2, p. 1164–1170, 2015.
- CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and

application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p. 313–324, 2019.

CAMPOS, M. J.; STAMFORD, L. T. M.; SARUBBO, L. A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. n. February, 2014.

CAROLIN C, F.; KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, p. 124827, 2021.

CARRILLO, P. G. et al. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 82–84, 1996.

CERESA, C. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by lipopeptide AC7 coated medical-grade silicone in combination with farnesol. **AIMS Bioengineering**, v. 5, n. 3, p. 192–208, 2018.

CERESA, C. et al. The effect of sophorolipids against microbial biofilms on medical-grade silicone. **Journal of Biotechnology**, v. 309, n. September 2019, p. 34–43, 2020.

CHAPRÃO, M. J. et al. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 471–479, 2015.

CHAPRÃO, M. J. et al. Production of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* UCP1616 for use in the bioremediation of oil-contaminated environments. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 10, p. 1310–1322, 2018.

CHEN, C.; LIN, T.; SHIEH, Y. Emulsification and antioxidation of biosurfactant extracts from Chinese medicinal herbs fermentation in vitro. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 4, p. 387–395, out. 2015.

CHEN, W. et al. Heavy metal (Cu, Cd, Pb, Cr) washing from river sediment using biosurfactant rhamnolipid. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16344–16350, 25 jul. 2017.

CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. **Food Research International**, v. 105, n. November 2017, p. 76–93, 2018.

COSTA, S. G. V. A. O. et al. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511–1516, set. 2010.

DAS, A. J. et al. Bacterial biosurfactants can be an ecofriendly and advanced technology for remediation of heavy metals and co-contaminated soil. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 6, p. 1343–1354, 3 jun. 2017.

DA SILVA, I. G. S. et al. Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. **Energies**, v. 13, n. 18, 2020.

DE FARIA, A. F. et al. Production and structural characterization of surfactin (C 14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951–1957, 2011.

DE FREITAS FERREIRA, J.; VIEIRA, E. A.; NITSCHKE, M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. **Food Research International**, v. 116, p.

737–744, 2019.

DEEPIKA, K. V. et al. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 38–47, 2016.

E SILVA, S. S. et al. Disruption of *Staphylococcus aureus* biofilms using rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7864–7873, 2017.

EL-SHESHTAWY, H. S.; DOHEIM, M. M. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2014.

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

FARIAS, C. B. B. et al. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28–39, 2021.

FARIAS, C. B. B. et al. Production of green surfactants: Market prospects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 28–39, 2021.

FARIAS, C. B. B. et al. Synthesis of silver nanoparticles using a biosurfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 122–125, 2014.

FARIQ, A.; SAEED, A. Production and Biomedical Applications of Probiotic Biosurfactants. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 489–495, 2016.

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

FRACCHIA, L. et al. Industrial Applications of Biosurfactants. In: **Biosurfactants**. [s.l.] CRC Press, 2014. p. 245–268.

FRACCHIA, L. et al. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. **AIMS Bioengineering**, v. 2, n. 3, p. 144–162, 2015.

FRANZETTI, A. et al. Chemosphere Potential applications of surface active compounds by *Gordonia sp.* strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v. 75, n. 6, p. 801–807, 2009.

GALABOVA, D. et al. **Role of Microbial Surface-Active Compounds in Environmental Protection**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014.

GARCIA, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 28, 2011.

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

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. December 2017, p. 23–32, 2018.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 66–72, 2014.

GIRI, S. S. et al. Role of *Bacillus licheniformis* VS16-Derived Biosurfactant in Mediating Immune Responses in Carp Rohu and its Application to the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–13, 28 mar. 2017.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Biosurfactants Market Size By Product (Sphorolipids, Rhamnolipids, Alkyl Polyglucosides [APG], Methyl Ethyl Sulfonates [MES], Sucrose Esters, Sorbitan Esters, Lipopeptides), By Application (Household Detergents, Personal Care, Industrial Cleaners, Food P.** Disponível em: <<https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report>>. Acesso em: 28 abr. 2020.

GRAND VIEW RESEARCH. **Biosurfactants Market Share Insights.** Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry>>. Acesso em: 28 maio. 2020.

GUDIÑA, E. J. et al. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. **Journal of Hazardous Materials**, v. 261, p. 106–113, 2013.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 298–304, 2010.

GUIYUN, B.; BRUSSEAU, M. L.; MILLER, R. M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 25, n. 1–2, p. 157–170, 1997.

HAFTKA, J. J. H.; HAMMER, J.; HERMENS, J. L. M. Mechanisms of Neutral and Anionic Surfactant Sorption to Solid-Phase Microextraction Fibers. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 18, p. 11053–11061, 2015.

HE, N. et al. Toward high-efficiency production of biosurfactant rhamnolipids using sequential fed-batch fermentation based on a fill-and-draw strategy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 317–324, 2017.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019.

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

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, n. June, p. 109607, 2019.

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

KARLAPUDI, A. P. et al. Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from an *Acinetobacter* M6 strain. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 223–227, 2020.

KAVITHA, V.; MANDAL, A. B.; GNANAMANI, A. Microbial biosurfactant mediated removal and/or solubilization of crude oil contamination from soil and aqueous phase:

An approach with *Bacillus licheniformis* MTCC 5514. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 24–30, out. 2014.

KHONDEE, N. et al. Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 47–54, 2015.

KIRAN, G. S. et al. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 1–10, 2014.

KIRAN, G. S. et al. Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–11, 2017.

KIRAN, G. S.; SABARATHNAM, B.; SELVIN, J. Biofilm disruption potential of a glycolipid biosurfactant from marine *Brevibacterium casei*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 432–438, 2010.

KUMAR, C. G. et al. Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 7, p. 1061–1068, 2010.

LAL, S. et al. Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. **Environmental Technology & Innovation**, v. 10, p. 243–263, maio 2018.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2327–2339, 2013.

LEE, S. H.; JUN, B. H. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.

LI, J. et al. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 112, p. 72–79, 2016.

LIN, M. et al. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 8–12, mar. 2014.

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

LIU, Q. et al. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, n. 3, p. 31–37, 2014.

LOISEAU, C. et al. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5083–5093, 2015.

LOKKO, Y. et al. Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. **New Biotechnology**, v. 40, p. 5–10, 2018.

LUNA, J. M. et al. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the

biosurfactant Lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1527–1534, 2011.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558–566, 2016.

MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, n. February, p. 110961, 2020.

MAIKUDI USMAN, M. et al. Application of biosurfactants in environmental biotechnology; remediation of oil and heavy metal. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 289–304, 2016.

MANI, P. et al. Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2016.

MAO, X. et al. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435, 2015.

MARCHANT, R. et al. Production of Biosurfactants from Nonpathogenic Bacteria. **Biosurfactants**, p. 73–82, 2014.

MERGHNI, A. et al. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 84–89, 2017.

MINUCELLI, T. et al. Sophorolipids Production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and Its Potential Application in Soil Bioremediation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 3, p. 743–753, 9 abr. 2017.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Biopolymers**, v. 104, n. 3, p. 129–147, 2015.

MOHD ISA, M. H. et al. Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods. **Food Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 1–24, 2020.

MORRIS, B. F.; LOUGHLIN, T. R. **Overview of the Exxon Valdez Oil Spill 1989-1992**. [s.l.] ACADEMIC PRESS, INC., 1994.

MOUAFI, F. E.; ABO ELSOUD, M. M.; MOHARAM, M. E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 31–37, 2016.

MOYA RAMÍREZ, I. et al. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, n. SEPTEMBER, p. 231–236, 2015.

NANJUNDAN, J. et al. Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, n. May 2018, p. 374–380, 2019.

NAUGHTON, P. J. et al. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 12–28, jul. 2019.

NIKOLOVA, C.; GUTIERREZ, T. Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. February, 2021.

NITSCHKE, M.; SILVA, S. S. E. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631–638, 2017.

OGUNMOKUN, F. A.; LIU, Z.; WALLACH, R. The influence of surfactant-application method on the effectiveness of water-repellent soil remediation. **Geoderma**, v. 362, n. November 2019, 2020.

ONAOAPO, A. Y.; ONAOAPO, O. J. Food additives, food and the concept of ‘food addiction’: Is stimulation of the brain reward circuit by food sufficient to trigger addiction? **Pathophysiology**, v. 25, n. 4, p. 263–276, dez. 2018.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. **Environmental applications of biosurfactants: Recent advances** *International Journal of Molecular Sciences*, 2011.

PATINO, J. M. R. et al. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. v. 140, p. 95–113, 2008.

PAYNE, D. E.; BOLES, B. R. Emerging interactions between matrix components during biofilm development. **Current Genetics**, v. 62, n. 1, p. 137–141, 29 fev. 2016.

PENHA, R. O. et al. Bacillus lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. **Planta**, v. 251, n. 3, p. 1–15, 2020.

PEREIRA, J. F. B. et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.

PEREZ, K. J. et al. *Bacillus* spp. isolated from puba as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–14, 2017.

PEZESHKI, S.; DELAUNE, R. United States Gulf of Mexico Coastal Marsh Vegetation Responses and Sensitivities to Oil Spill: A Review. **Environments**, v. 2, n. 4, p. 586–607, 2015.

PRIYADARSHINI, E. et al. Label free and high specific detection of mercury ions based on silver nano-liposome. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 163, p. 127–133, 2016.

PRYSHCHEPA, O.; POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 87–100, 2020.

RABODONIRINA, S. et al. Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. **Journal of Environmental Management**, v. 232, n. November 2017, p. 1–7, 2019.

RADHAKRISHNAN, N. et al. Isolation, production and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria of coastal Tamil Nadu. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 40, n. February, p. 76–82, 2011.

RAFIQUE, M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1272–1291, 2017.

- RAI, M.; DURAN, N. (EDS.). **Metal Nanoparticles in Microbiology**. [s.l.: s.n.].
- RAMADASS, K. et al. Science of the Total Environment Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil : Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp . on bioremediation. **Science of the Total Environment**, v. 636, p. 968–974, 2018.
- RANASALVA, N.; SUNIL, R.; POOVARASAN, G. Importance of Biosurfactant in Food Industry. v. 7, n. 5, p. 6–9, 2014.
- RANE, A. N. et al. Corrigendum: Agro-Industrial wastes for production of biosurfactant by bacillus subtilis ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 3389, 2017.
- RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. S. Role of Biopolymers in Industries: Their Prospective Future Applications. In: FULEKAR, M. H.; PATHAK, B.; KALE, R. K. (Eds.). . **Environment and Sustainable Development**. [s.l.] Springer India, 2014. v. 9788132211p. 133–142.
- RIBEIRO, B. G.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2020.
- ROBBEL, L.; MARAHIEL, M. A. Daptomycin, a Bacterial Lipopeptide Synthesized by a Nonribosomal Machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 36, p. 27501–27508, 3 set. 2010.
- ROCHA E SILVA, N. M. P. et al. Natural Surfactants and Their Applications for Heavy Oil Removal in Industry. **Separation & Purification Reviews**, v. 48, n. 4, p. 267–281, 2 out. 2019.
- ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 31 dez. 2018.
- RUFINO, R. D. et al. 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**, v. 2011, p. 1–7, 2011a.
- RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1–5, maio 2011b.
- SÁLEK, K.; EUSTON, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. **Process Biochemistry**, v. 85, n. July, p. 143–155, 2019.
- SANTOS, D. K. F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43–50, 2013.
- SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.
- SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 707–723, 2015.
- SATPUTE, S. K. Recent Updates on Biosurfactants in the Food Industry. In: **Microbial Cell Factories**. Boca Raton : Taylor & Francis, CRC Press, 2018.: CRC Press, 2018. p. 1–20.

SATPUTE, S. K. et al. Inhibition of pathogenic bacterial biofilms on PDMS based implants by *L. acidophilus* derived biosurfactant. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–15, 2019.

SHARMA, D. **Biosurfactants in Food**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2016.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 83–96, 2009.

SHIRAIISHI, Y.; TOSHIMA, N. Oxidation of ethylene catalyzed by colloidal dispersions of poly(sodium acrylate)-protected silver nanoclusters. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 169, n. 1–3, p. 59–66, 2000.

SILVA, I. A. et al. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. **PeerJ**, v. 8, p. e9064, 2020.

SILVA, R. DE C. F. S. et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, 2007.

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

SOARES, M. DE O. et al. Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, v. 115, n. February, 2020.

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

SOBRINHO, H. B. DE S. et al. Application of Biosurfactant from. **Journal of Life Sciences**, v. 7, n. 6, p. 559–569, 2013b.

SOUKUPOVÁ, J. et al. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. **Materials Chemistry and Physics**, v. 111, n. 1, p. 77–81, 2008.

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

TANG, J. et al. Removal of heavy metal from sludge by the combined application of a biodegradable biosurfactant and complexing agent in enhanced electrokinetic treatment. **Chemosphere**, v. 189, p. 599–608, dez. 2017.

TAVAKOLY SANY, S. B. et al. Human health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons from consumption of blood cockle and exposure to contaminated sediments and water along the Klang Strait, Malaysia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 84, n. 1–2, p. 268–279, jul. 2014.

TEHRANI, G. M. et al. Predictive environmental impact assessment of total petroleum hydrocarbons in petrochemical wastewater effluent and surface sediment.

Environmental Earth Sciences, v. 75, n. 2, p. 1–13, 2016.

VECINO, X. et al. Optimization of liquid–liquid extraction of biosurfactants from corn steep liquor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 9, p. 1629–1637, 2015.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 175–180, jun. 2011.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-Types , Sources and Applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181–192, 2015.

WANG, T. et al. The immobilization of heavy metals in soil by bioaugmentation of a UV-mutant *Bacillus subtilis* 38 assisted by novoGro biostimulation and changes of soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 483–490, 2014.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food additives 31. **Food additives**, n. January 2018, p. 2018–2020, 2018.

XIE, Y.; YE, R.; LIU, H. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 279, n. 1–3, p. 175–178, 2006.

YALÇIN, E.; ÇAVUŞOĞLU, K. Structural analysis and antioxidant activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus subtilis* RW-I. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 243–247, 2010.

YAN, X. et al. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, n. October 2017, p. 12–20, fev. 2019.

YOUSSEF, N. et al. In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* strains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 127–132, 2013.

YULIANI, H. et al. Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. **Energy Procedia**, v. 153, p. 274–278, 2018.

ZDZIENNICKA, A.; JAŃCZUK, B. Wetting and adhesion properties of rhamnolipid and surfactin. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 84, n. July 2017, p. 275–282, ago. 2018.

ZOUARI, R. et al. Cookies from composite wheat – sesame peels flours : Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. **FOOD CHEMISTRY**, v. 194, p. 758–769, 2016.

ZOUARI, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Use of butter milk and poultry-transforming wastes for enhanced production of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant in submerged fermentation. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 04, n. 05, p. 462–466, 2015.

CAPÍTULO 1

Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills biorremediation

Publicado no periódico internacional *Marine Pollution Bulletin*.

Qualis A1 (2019) – Fator de Impacto (2021): 4.049

DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111357

Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation

Italo José B. Durval^{1,3}, Ana Helena R. Mendonça^{2,3}, Igor V. Rocha⁴, Juliana M. Luna^{2,3},
Raquel D. Rufino^{2,3}, A. Converti⁵, L. A. Sarubbo^{2,3,*}

¹ Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil

² Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, PE, Brazil.

³ Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Rua Joaquim de Brito, n. 216, Boa Vista, 50070-280 Recife, PE, Brazil

⁴ Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, CPqAM/Fiocruz, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

⁵ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Genoa University, Pole of Chemical Engineering, Via Opera Pia 15, I-16145 Genova, Italy

* **Corresponding author**

Abstract

In this study, *Bacillus cereus* was cultivated in a mineral medium composed of 2% frying oil and 0.12% peptone to produce a biosurfactant. The production was scaled up from flasks to 1.2-, 3.0- and 50-L bioreactors, where surface tension achieved 28.7, 27.5 and 32 mN/m and biosurfactant concentration 4.3, 4.6 and 4.7 g/L, respectively. The biosurfactant was characterized as anionic, while nuclear magnetic resonance, thin-layer chromatography and gas chromatography analyses revealed its lipopeptide nature. Toxicity tests showed survival rates of the fish *Poecilia vivipara* and the bivalve *Anomalocardia brasiliiana* higher than 90% and 55%, respectively, thus suggesting the use of this biosurfactant in marine environment depollution. Moreover, the biosurfactant stimulated the growth of autochthonous microorganisms independently of the presence of motor oil in bioassays performed in seawater. These results demonstrate that the biosurfactant is biocompatible and has potential for industrial-scale production and application to bioremediation of oil spills-polluted marine environment.

Keywords: *Bacillus cereus*; Biosurfactant; Toxicity; *Poecilia vivipara*; *Anomalocardia brasiliiana*; Bioremediation.

INTRODUCTION

Oil spills cause irreparable harm to the environment, biota and marine life, thus constituting a constant danger around the world and requiring preventive and/or remediation measures. Among the accidents caused by oil spills, we can mention the oil spill that happened in Brazil in August 2019, which affected more than 3,000 km of the coast in the northeast of Brazil. This was considered the worst oil spill in Brazilian history and the biggest environmental disaster in the history of the South Atlantic basin and in tropical coastal regions worldwide. The contamination reached more than 980 localities in nine states and more than 1,000 tons of oil were collected from the beaches along the affected coast. In addition to the environmental impacts that endangered 27 species threatened with extinction, the disaster also affected economic activities, such as artisanal fishing and tourism that employed a population of approximately 870,000 people (Magris et al., 2020).

Biotechnology can play a fundamental role in remediation processes through microbial tensioactive agents known as biosurfactants (Almeida et al., 2016; Kosaric and Vardar-Sukan, 2015). Biosurfactants are molecules with potential in different industrial sectors because of several advantageous properties such as emulsification, foam formation, humectation, phase separation, surface activity and a reduction of crude oil viscosity. These properties enable environmental applications in oil transport and mobilization, the management of oil spills, cleaning oil from soil and sand, acceleration of bioremediation and microbial-enhanced oil recovery (Varjani and Upasani, 2017).

The general structure of biosurfactants consists of at least a hydrophilic and a hydrophobic part, giving these compounds an amphipathic nature. The hydrophobic part is generally comprised of fatty acids with chain length ranging from 8 to 18 carbon atoms, while the hydrophilic one may carry ester, hydroxyl, phosphate or carboxylic groups or even more complex moieties such as sugars, peptides or proteins (Henkel et al., 2017; Singh et al., 2019).

Studies reported that biosurfactants have less impact on the environment than conventional surfactants, since these natural compounds can be produced from renewable substrates, are biodegradable and less toxic than their synthetic counterparts (Karlapudi et al., 2018). Several bacteria and yeast are able to produce biosurfactants. Among bacteria, those belonging to the genus *Bacillus* are the most cited in the literature owing to their potential to produce potent biosurfactants, especially *Bacillus licheniformis* and

Bacillus subtilis (Bezerra et al., 2018; Santos et al., 2016). In a previous study conducted at our laboratory, the production conditions of a new biosurfactant from *Bacillus cereus* and its properties were defined with the aim of developing a cheap production process using low-cost raw materials (Durval et al., 2019).

In this study, we characterized a biosurfactant produced from *B. cereus* UCP 1615, evaluated its toxicity and determined its applicability as an agent for seawater bioremediation. Biosurfactant production was also scaled up to bench-scale bioreactors to determine the potential industrial production of this novel biomolecule.

MATERIALS AND METHODS

Material

All reagents were of the highest purity. SAE 20W-50 with synthetic guard (Petrobras, Brasilia, DF, Brazil) was used as the contaminant oil. This paraffin-based oil is a complex mixture of hydrocarbons and contains additives (anti-corrosion, anti-wear, antifoam, antioxidant, detergent, dispersant, alkaline reserve agent, viscosity index enhancer and pour point lowerer). Its kinematic viscosity at 40°C is 98.0 cSt and its density at 20°C 0.942 g/mL. Waste frying soybean oil was obtained from the ASA S.A. industry, PE, Brazil.

Fermentation media and conditions

The *Bacillus cereus* UCP 1615 was previously isolated from environmental water samples contaminated with petroleum derivatives spilled from ships (port area) in the Atlantic Ocean of the state of Pernambuco, Brazil, as described by Durval et al. (2019). The bacterium was cultivated adding 2% cell suspension (0.7 optical density at 600 nm), corresponding to a 24-h inoculum of 10^7 colony forming units/mL, to a 500-mL flask containing 100 mL of a mineral salt medium (0.087% K_2HPO_4 , 0.65% trisaminomethane, 0.02% KCl, 0.06% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01% NaCl and 0.005% yeast extract) supplemented with 2% waste frying soybean oil and 0.12% peptone, with pH adjusted to 7.0 ± 0.2 (Durval et al., 2018). After cultivation for 48 h at 28°C and 200 rpm, samples were withdrawn to determine surface tension and surfactant concentration.

Scale-up studies

The first scale-up of biosurfactant production was performed in a 1.2-L bioreactor (Tec-Bio-Plus, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) with 0.6-L working volume. The bioreactor was operated in batch mode with temperature controlled at 28°C and aeration rate at 1.0 vvm. The same 24-h inoculum described in the previous section was used to inoculate the production medium. Biosurfactant concentration was determined at the end of fermentation. We also conducted scale-up studies in fermentors with capacity of 3.0 L (Tec-Bio-Plus, Tecnal) and 50 L (MA502, Marconi, Piracicaba, SP, Brazil) containing 1.5 and 20 L of production medium, respectively. All the experiments were conducted in triplicate.

Surface and interfacial tension

Changes in surface tension and interfacial tension against *n*-hexadecane were determined at room temperature in cell-free broth obtained by culture centrifugation at $5000 \times g$ for 20 min with a Sigma 700 Tensiometer (KSV Instruments, Helsinki, Finland) provided with an optimally wettable ring suspended from a precision balance, which was lowered slowly into the liquid to stretch the film. The maximum force used to stretch the film was measured to calculate surface tension. Milli-Q-4 ultrapure water (Millipore, Billerica, MA, USA) was used to calibrate the equipment. Both glassware and platinum plate were sequentially washed with chromic acid, deionized water and acetone, followed by flaming with a Bunsen burner prior to use.

Isolation of biosurfactant

The culture medium was centrifuged at $5000 \times g$ for 30 min to remove cells. 6.0 M HCl was used to adjust the pH of the supernatant to 2.0, followed by the addition of an equal volume of a 2:1 (v/v) $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ solution. After vigorous shaking for 15 min, the solution was set to rest for phase separation, the organic phase removed, and the operation repeated twice more. The organic phases were pooled, and the product was concentrated in a rotary evaporator (Q344B, Quimis, São Paulo, Brasil). The resulting yellowish viscous substance was dissolved in methanol and further concentrated by solvent evaporation at 45 °C (Ibrahim et al., 2013).

Biosurfactant characterization by thin-layer chromatography

A sample of the isolated biosurfactant (0.1 g) was dissolved in methanol. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on silica gel plates (G60, Merck, Darmstadt,

Germany) to calculate the retention factors (R_f). A 7:3 (v/v) *n*-hexane:acetone solution was used to develop the chromatograms. After vaporization with anisaldehyde, heating was performed at 110 °C for 1 min for detection.

Determination of biosurfactant ionic character

The agar double diffusion method was employed to determine the ionic charge of the biosurfactant (Meylheuc et al., 2001). After preparing two rows of wells in 1% agar, the isolated biosurfactant solution was added to the wells of one row and a pure compound with known ionic charge to the wells of the other. 20 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) was the anionic substance and 50 mM barium chloride the cationic one. Precipitation lines between the wells indicating the ionic character of the biosurfactant were monitored at room temperature for 48 h.

Nuclear magnetic resonance

A Bruker INOVA 500 MHz (Varian, Palo Alto, CA, USA) spectrometer was used for ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) analyses of 20 mg of the isolated biosurfactant dissolved in 500 μL deuterated chloroform (CDCl_3 , Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) at 300 MHz and 298.1 K. The chemical shifts (δ) were analyzed on the ppm scale relative to normal tetramethylsilane (TMS).

Gas chromatography

Fatty acid composition of the isolated biosurfactant extract was determined using a gas chromatograph (CP-3380, Varian) equipped with a flame ionization detector and a HR-SS-10 capillary column (Shinwa Chemical Industries, Kyoto, Japan). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 24 mL/min. The temperature of injector and detector was 250 °C, while that of oven started at 130 °C, increased at a rate of 1 °C/min up to 170 °C and 3 °C/min up to 180 °C, and then was maintained at this value for 10 min.

Biosurfactant formulation

After fermentation, the broth was submitted to centrifugation at $5000 \times g$ for 30 min to remove cells. Potassium sorbate (0.2%) was added to the cell-free broth with the crude biosurfactant, followed by storage at 28 °C until use.

Biosurfactant toxicity tests

The fish *Poecilia vivipara* was first used in acute toxicity tests to determine the lethal concentrations of crude and formulated biosurfactant. Specimens were maintained at 26 °C in 60-L polyethylene aquaria with tap water and acclimated for one week, receiving a commercial fish food (Alcon Basic, Alcon Brasil, Camboriú, SC, Brazil). Oxygenation, water temperature and pH were determined periodically throughout the experiments, which were carried out at the Quarantine Laboratory of Sustainable Mariculture of the Fisheries and Aquaculture Department of Rural Federal University of Pernambuco (Recife, PE, Brazil) using a static acute experimental methodology. Ten specimens were placed in 2-L fiberglass boxes containing 1.5 L of seawater (salinity of 0.0026%) at 27 °C under constant aeration with a 12-h photoperiod and exposed for 96 h without food or water exchange. Four dilutions [1:10, 1:20, 1:40 and 1:80 (v/v)] of the crude (cell-free broth) and formulated biosurfactant (cell-free broth plus 0.2% potassium sorbate) in seawater were tested in triplicate, while the control was seawater alone. The lethal concentration for 50% of the specimens (LC₅₀) was determined after 96 h and expressed as mean mortality of the three replicates for each dilution tested.

The native bivalve mollusk *Anomalocardia brasiliiana* was also used for toxicity tests, which were performed at room temperature in the same laboratory as above, following the method described in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Specimens were collected from Mangue Seco Beach in the City of Igarassu, PE, Brazil, transported to the laboratory and kept in fiberglass boxes with 400 L of seawater (salinity of 2%) and a mean temperature of 26 ± 0.5 °C under constant aeration. Animals were fed a blend of the algae *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros navicula* at a concentration of 10⁴ cells/mL for 10 days prior to the experiment. Before each test, specimens were transferred to a 100-L container, acclimated and kept without food for 24 h. For acute toxicity tests, 2-L glass beakers were filled with 1.0 to 2.0 L of test solution at variable dilutions with water (salinity of 0.0026%) under constant aeration at room temperature (26 ± 0.5 °C) and a 12-h photoperiod. Animals were not fed during the 96-h experiments, which were carried out exactly as those with *P. vivipara*. The lethal concentration for 50% of the specimens (LC₅₀) was determined after 96 h and expressed as mean mortality.

Application of biosurfactant as bioremediation agent

The method described by Durval et al. (2018) was used in bioremediation tests. Briefly, 100 mL of fresh seawater were placed in 250-mL Erlenmeyer flasks and supplemented with 1% motor oil and biosurfactant solutions at half the critical micelle concentration (CMC) and at the CMC (250 mg/L and 500 mg/L, respectively). Control flasks contained seawater and motor oil. Seawater (salinity of 3%, pH 8) had been collected from the Suape Port in the municipality of Ipojuca, PE, Brazil. Flasks were incubated at 28 °C and 150 rpm, and their contents analyzed after 1, 5, 7, 21 and 30 days of incubation. The number of microorganisms was determined using the most probable number (MPN) method (APHA, 2005).

Statistical analysis

All determinations were made at least three times. Microsoft Office Excel 2003 (Version 7) was used to calculate means and standard errors, and the Tukey's test to determine statistically significant differences ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Bioreactor cultivations

Bacillus cereus UCP 1615 cultures were performed for 48 h in 1.2-, 3.0- and 50-L bioreactors at constant values of temperature (28 °C), aeration rate (1.0 vvm) and agitation speed (250 rpm). Surface tension and biosurfactant yield were determined in cell-free fermented broths, and the results were compared in Table 1 with those previously obtained in flasks (Durval et al., 2019). No statistically significant differences in surface tension were found when cultures were scaled up from flask (27.8 ± 0.2 mN/m) to either 1.2-L (28.7 ± 0.3 mN/m) or 3.0-L (27.8 ± 0.2 mN/m) bioreactors, while the biosurfactant yield increased approximately by 22 and 31%, respectively. In contrast, no proportional increase occurred when the 50-L bioreactor was used, although the yield was about 17% higher than that obtained in flasks.

Joshi et al. (2008) described similar surface tension reduction (to 28 mN/m) during *Bacillus licheniformis* R2 cultivation in a 5-L fermentor, but the biosurfactant yield was only 1100 mg/L. Al-Bahry et al. (2013) reported a yield of 2290 mg/L biosurfactant production by *B. subtilis* B20 cultivated in molasses in a 5-L fermentor, while Fooladi et al. (2018) also using *B. pumilus* 2IR in a 5-L fermentor, obtained a biosurfactant yield of 1060 mg/L. Under optimum conditions of 10% waste glycerol and 1.25% palm oil,

Bacillus sp. GY19 cells immobilized on chitosan produced in a stirred tank fermentor as much as 7120 mg/L of a lipopeptide biosurfactant (Khondee et al., 2015). Therefore, compared to other biosurfactants produced *Bacillus* species described in the literature, the yields obtained in the present study can be considered satisfactory and promising.

Surface and interfacial tensions of biosurfactant

The surface-active properties of a biosurfactant are the critical micelle concentration (CMC), the ability to reduce surface and interfacial tensions and the formation of stable emulsions. The reduction in interfacial tension between crude oil and water causes the capillary force between oil and reservoir rock to decrease, leading to increased oil mobilization. Thus, there is considerable interest in the use of biosurfactants to enhance oil recovery especially in mature reservoirs (Pereira et al., 2013).

The interfacial tension (oil/water) of a biosurfactant is usually between 1 and 30 mN/m (Zhang and Miller, 1992; Bognolo, 1999). In the present study, when the biosurfactant isolated from *B. cereus* UCP 1615 was used at CMC (500 mg/L) to measure the interfacial tension, a reduction from 40 to 6 mN/m occurred in water/*n*-hexadecane mixture. This result is better than those reported for biosurfactants produced by *B. amyloliquefaciens* TSBSO 3.8 (Rahman et al., 2006) and *B. subtilis* (Veshareh et al., 2018) that reduced the interfacial tension of a trypticase soy broth culture medium and a 1:20 (v/v) diluted cell-free fermented broth to 11.4 and 13.3 mN/m, respectively. On the other hand, a very close interfacial tension reduction (to 5 mN/m) was obtained with biosurfactants produced by three strains of *B. subtilis* (Pereira et al., 2013). Studying surfactin produced by a *B. subtilis* strain grown on molasses, Al-Bahry et al. (2013) found a reduction in interfacial tension between water and *n*-hexadecane from 23 to 5 mN/m when it was used at a concentration of 2.2 g/L and even to 1 mN/m at higher concentrations.

Biosurfactant characterization

The agar double diffusion tests revealed that *B. cereus* UCP 1615 biosurfactant had an anionic nature under the conditions studied, as demonstrated by the precipitation lines between the biosurfactant and barium chloride. Silva et al. (2010) reported similar results for a biosurfactant produced by *P. aeruginosa*, which is closely related to the type of biosurfactants produced by bacteria belonging to the genus *Bacillus* (Souza et al., 2014).

TLC with the 7:3 (v/v) *n*-hexane:acetone system revealed four main apolar compounds (Fig. 1), while the gas chromatographic profile of fatty acids of the isolated biosurfactant allowed identifying the major component as C18:2 (38.05%), followed by C18:1 (30.21%), C16:0 (20.85%) and C18:3 (7.86%) (Fig. 2).

The ^1H NMR spectrum (Fig. 3) suggested the presence of hydrogens of methyl groups (0-1.0 ppm), aliphatic carbons (1.2-1.4 ppm) and hydrogens close to either double bond (1.9-2.1 ppm) or carbonyl group (2.2-2.4 ppm). An amine group and an ester one were identified at 2.7-2.8 and 4.1-4.4 ppm, respectively, while the signals in the ranges 4.0-4.1 ppm and 5.2-5.6 ppm were assigned to hydrogens next the former and to double bonds, respectively. Finally, the signal at 7.25 ppm is typical of the residual solvent (chloroform). Likewise, Faria et al. (2011), who structurally characterized surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *B. subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol, detected an ester carbonyl group by ^1H NMR analysis at 5.2 ppm, indicating a lactone ring in the biosurfactant structure. Liu et al. (2009) also identified a C₁₅-surfactin-O-methyl ester in a lipopeptide produced by *B. subtilis* HSO 121.

The ^{13}C NMR analysis (Fig. 4) confirmed the previous ^1H NMR one, showing a characteristic ester peak between 170 and 180 ppm, double bond peaks between 125 and 130 ppm and aliphatic carbons in the 10-40 ppm region. The ester group was likely the result of esterification of a carboxylic group during sample preparation. The lipid tail of the lipopeptide produced by *B. subtilis* LSFM-05 was identified by ^{13}C NMR analysis as a mixture of three different configurations (normal, iso-branched and anteiso-branched) with the different CH₃ positions consistent with chemical shifts at 11.44, 14.15, 19.19 and 22 ppm, respectively (Faria et al., 2011). We found two similar peaks in the present study. Liu et al. (2009) also reported a mixture of normal, iso-branched and anteiso-branched forms in surfactin from *B. subtilis* HSO121. Describing the characterization of a biosurfactant from three different *B. subtilis* isolates, Pereira et al. (2013) found distinct regions relative to the standard molecule as well as among the three biosurfactant extracts. In the present study, the intense peak at around 5.3 ppm was probably due to H-3 (terminal proton) of the fatty acid chain, which has also been reported elsewhere (Bottone, 2010; Liu et al., 2009). The presence of an aliphatic chain and a peptide backbone suggests *B. cereus* UCP 1615 biosurfactant is a lipopeptide.

Toxicity of biosurfactant to *Poecilia vivipara*

Poecilia vivipara is a euryhaline teleost fish belonging to the family Poeciliidae that occurs from the United States to Argentina and has been used as a bioindicator to monitor aquatic environments due to its sensitivity to environmental pollutants (Breseghelo et al., 2004). The use of *P. vivipara* in toxicity tests has confirmed its sensitivity to potassium dichromate, sodium dodecyl sulfate, copper and zinc (Meletti and Rocha, 2002). Moreover, it is phylogenetically close to *Fundulus heteroclitus*, which was used approximately thirty years ago as the first fish model for environmental studies in North America, enabling comparative studies with this species (Meletti and Rocha, 2002; Miller et al., 2014). Therefore, it is a good candidate for ecotoxicological studies in Brazil.

The lethal concentration (LC₅₀) is defined and standardized as the concentration of a toxic agent that causes 50% mortality in the population of organisms submitted to a toxicity test.

Table 2 lists the *P. vivipara* survival rates when exposed for 96 h to different dilutions of the biosurfactant. Survival was satisfactory, especially beginning with a 1:20 (v/v) dilution, with rates higher than 50%. The mean survival rate when exposed to the crude biosurfactant was 74.05%, whereas mean survival rates were higher than 90% when exposed to the formulated biosurfactant, likely due to the increased stability owing to the addition of potassium sorbate as a preservative.

Since the lower the LC₅₀ the greater the toxicity of a substance, the formulated biosurfactant proved to be less toxic than the crude one, their mean LC₅₀ being 3.84 and 2.11%, respectively. A formulated *Candida lipolytica* biosurfactant was considered to exert low toxicity to *P. vivipara* with survival rates between 70 and 95% (Santos et al., 2017b).

Toxicity of biosurfactant to *Anomalocardia brasiliana*

Anomalocardia brasiliana is a bivalve mollusk that occurs throughout the Brazilian coast, inhabiting areas protected from the action of waves and currents (Quayle and Newkirk, 1989; Boehs and Magalhães, 2004). It has special economic and social importance in the northern coast of the state of Pernambuco, is commercially exploited throughout the Brazilian coast and is used as a bioindicator of sea environmental pollution (Boehs and Magalhães, 2004; Boehs et al., 2010). Bioindicator species like this respond to contamination through changes in their physiology or accumulation of elements or substances, which are strongly influenced by the biological, physical and chemical characteristics of the surrounding environment (temperature, humidity, wind and solar

radiation) as well as the physiological, nutritional, structural and morphological characteristics of the organism (Godefroid et al., 2015). Mollusks are filter feeders that can filter 19 to 50 liters per minute and feed on suspended particles in the water. Due to their little selectivity, mollusks accumulate a variety of bacteria, parasites and heavy metals. Thus, larger accumulators of pollutants (Sande et al., 2010) are used for environmental monitoring as real representatives of the effects of pollution sources (Cao and Wang, 2016).

Table 3 lists the *A. brasiliiana* survival rates when exposed for 96 h to either crude or formulated biosurfactant. The results point out low toxicity of the biosurfactant, especially at dilutions of 1:20 (v/v) or higher. The mean LC₅₀ for the crude and formulated biosurfactant was 0.042 and 0.05, respectively. In a previous study, the same bivalve submitted to a crude biosurfactant produced by *C. lipolytica* had a 100% survival rate (Santos et al., 2017a).

Bioremediation test

Biosurfactants can enhance the removal of hydrophobic pollutants through the processes of solubilization and mobilization (Almeida et al., 2017). Solubilization capacity depends on the ability of the surfactant to increase the solubility of hydrophobic aqueous phase constituents. Therefore, the biosurfactant from *B. cereus* UCP 1615 was tested as bioremediation agent in seawater contaminated with a petroleum product.

Fig. 5 illustrates the growth curves of autochthonous bacteria (panels a and b) and filamentous fungi and yeasts (panels c and d) in seawater either in the presence or the absence of biosurfactant. Curves show a quite similar growth profile along the incubation period (30 days). A growth of autochthonous microorganisms was observed throughout the incubation at both half the (250 mg/L) and CMC (500 mg/L), except for filamentous fungi in the presence of biosurfactant at the CMC that entered the decline phase after 10 days. In the control treatment (seawater alone), the autochthonous microorganisms reached the stationary phase after 10 days, irrespective of the presence of motor oil. In contrast, the presence of biosurfactant greatly stimulated cell growth at both concentrations tested, in agreement with what has been reported for biosurfactants produced by *Burkholderia cepacia* (Rocha e Silva et al., 2014), *Candida sphaerica* (Luna et al., 2015), *C. lipolytica* (Santos et al., 2017a) and *B. methylotrophicus* (Chaprao et al., 2018). It is likely that, on the one hand, the biosurfactant was used as a nutrient in the

medium without motor oil and, on the other, it enhanced oil solubilization and dispersion, favoring cell growth both in the presence and the absence of the petroleum derivate.

CONCLUSIONS

Biosurfactants with a low production cost, high productivity and biocompatibility are advantageous to industrial production and applications. The *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant produced in the present study was characterized as a lipopeptide. Its production in bench-scale reactor was higher than 4 g/L in only 48 h using a low-cost renewable raw material, i.e., waste frying soybean oil. Tests conducted to evaluate its possible effect on microbiota and complex multicellular organisms demonstrated both benefits and low toxicity. Moreover, such a biosurfactant proved to be biocompatible and to have potential for industrial production and application to oil spills in marine environments using a stable commercial formula.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Pernambuco (FACEPE), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, the Programa de Pesquisa & Desenvolvimento da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are grateful to the laboratories of the Centre for Sciences and Technology of the Universidade Católica de Pernambuco, Brazil, and of the Università degli Studi di Genova, Italy.

REFERENCES

- Al-Bahry, S.N., Al-Wahaibi, Y.M., Elshafie, A.E., Al-Bemani, A.S., Joshi, S.J., Al-Makhmari, H.S., 2013. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 81, 141–146. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.01.006
- Almeida, D.G., Soares da Silva, R.C.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Banat, I.M., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front. Microbiol.* 7, 1718. doi: 10.3389/fmicb.2016.01718
- APHA, 2015. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st Ed. Washington, American Public Health Association.
- Bezerra, K.G.O., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2018. Saponins and microbial biosurfactants: potential raw materials for the formulation of cosmetics. *Biotechnol. Progress* 34, 1482-1493. doi: 10.1002/btpr.2682

- Boehs G, Villalba A, Ceuta LO, Luz JR., 2010. Parasites of three commercially exploited bivalve mollusc species of the estuarine region of the Cachoeira river (Ilhéus, Bahia, Brazil). *J Invertebr Pathol.* 103, 43-47. PMID:19850046. doi: 10.1016/j.jip.2009.10.008
- Boehs, G., Magalhães, A.R.M., 2004. Simbiontes associados com *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin) (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) na Ilha de Santa Catarina e região continental adjacente, Santa Catarina, Brasil, *Rev. Bras. Zool.* 21, 865–869.
- Bognolo, G., 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects.* 52, 41–52. doi:10.1016/S0927-7757(98)00684-0
- Bottone, E.J., 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 382–398. doi:10.1128/CMR.00073-09
- Breseghele, L., Cardoso, M.P., Borges-de-Oliveira, R., Costa, M.F., Barreto, J.C.B., Sabóia-Morais, S.M.T., Yamada, A.T., 2004. Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*). *Braz. J. Vet. Res Anim. Sci.* 41, 274-280. doi: 10.1590/S1413-95962004000400009
- Cao, C., Wang, W.X., 2016. Bioaccumulation and metabolomics responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* impacted by different levels of metal pollution. *Environ. Pollut.* 216, 156–165. doi:10.1016/j.envpol.2016.05.047
- Chapirão, M.J., Soares da Silva, R.C.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2018. Production of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* UCP1616 for use in the bioremediation of oil-contaminated environments. *Ecotoxicol.* 27, 1310–1322. doi: 10.1007/s10646-018-1982-9
- Durval, I.J.B., Resende, A.H.M., Figueiredo, M.A., Luna, J.M., Rufino, R.D., Sarubbo, L.A., 2019. Studies on biosurfactant produced by *Bacillus cereus* isolated from seawater with biotechnological potential for marine oil spill bioremediation. *J. Surf. Det.* 22, 349-363. doi: 10.1002/jsde.12218
- Faria, A.F., Teodoro-Martinez, D.S., Barbosa, G.N.O., Vaz, B.G., Serrano Silva, I., Garcia, J.S., Tótola, M.R., Eberlin, M.N., Grossman, M., Alves, O.L., Durrant, R.L., 2011. Production and structural characterization of surfactin(C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochem.* 46, 1951–1957. doi: 10.1016/j.procbio.2011.07.001
- Fooladi, T, Abdesahian, P., Moazami, N., Soudi, M.R., Kadier, A., Yusoff, W.M. W., Hamid, A.A., 2018. Enhanced biosurfactant production by *Bacillus pumilus* 2IR in

- fed-batch fermentation using 5-L bioreactor. Iran J. Sci. Technol. Trans. Sci. 42, 1111. doi: 10.1007/s40995-018-0599-4
- Godefroid, R.S., Fonseca, L.S., Silva, R. C., 2015. Utilização dos peixes do Rio Bacacheri como indicadores da qualidade ambiental. Rev. Meio Amb. e Sustentab. 8, 4.
- Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., Hausmann, R., 2017. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. Biotechnol. J. 12: 1600561. doi: 10.1002/biot.201600561
- Ibrahim, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S., Umar, S., 2013. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. Int. Biodeterior. Biodegrad. 81, 28-34. doi:10.1016/j.ibiod.2012.11.012
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., Desai, A.J., 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresour Technol. 99, 95-199. doi:10.1016/j.biortech.2006.12.010
- Karlapudi A.P., Venkateswarulu, T.C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B.K., Dirisala, V.R., Kodali V.P., 2018. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. Petroleum. 1-9. doi: 10.1016/j.petlm.2018.03.007
- Khondee, N., Tathong, S., Pinyakong, O., Müller, R., Soonglerdsongpha, S., Ruangchainikom, C., Tongcumpou, C., Luepromchai, E., 2015. Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized *Bacillus* sp. GY19 and their recovery by foam fractionation. Biochem. Eng. J. 93, 47–54. doi: 10.1016/j.bej.2014.09.001
- Kosaric, N., Vardar-Sukan, F., 2015. Biosurfactants. Production and Utilization - Processes, Technologies, and Economics. CRC Press Taylor & Francis Group., Boca Raton, Florida.
- Liu, X-Y, Yang, S-Z., Mu, B-Z., 2009. Production and characterization of a C15-surfactin-Omethyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. Process. Biochem. 44, 1144–51. doi: 10.1016/j.procbio.2009.06.014
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Jara, A.M.A.T., Brasileiro, P.P.F., Sarubbo, L.A., 2015. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. Colloids Surf. A. Physicochem. Eng. Asp. 480, 413-418. doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.12.014

- Magris, R. A., Giarrizzo, T., 2020. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 153, 110961. doi:10.1016/j.marpolbul.2020.110961
- Meletti, P.C., Rocha, O., 2002. Development of a chamber for in situ toxicity tests with small fishes. *Braz. J. Biol.* 62, 187-190.
- Meylheuc, T., Van Oss, C.J., Bellon-Fontaine, M.N., 2001. Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.* 91, 822-832. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01455.x
- Miller, J.L., Sherry, J., Parrott, J., Quinn, J.S., 2014. A subchronic in situ exposure method for evaluating effects in small-bodied fish at contaminated sites. *Environ. Toxicol.* 29, 54-63. doi: 10.1002/tox.20772.
- Pereira, J.F.B., Gudiña, E.J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J.A., Coutinho, J.A.P., Rodrigues, L.R., 2013. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*. 111, 259–268. doi: 10.1016/j.fuel.2013.04.040
- Quayle, D.B., Newkirk, G.F., 1989. Farming bivalve molluscs: methods for study and development. The World Aquaculture Society, Louisiana, 1989, pp. 285.
- Rahman, M.S., Ano, T., Shoda, M., 2006. Second stage production of iturin A by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *J. Biotechnol.* 125, 513–515. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.016
- Rocha e Silva, N.M.P., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2014. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal Agric Biotechnol.* 3, 132-139. doi: 10.1016/j.bcab.2013.09.005
- Sande, D.; Melo, T. A.; Oliveira, G. S. A.; Barreto, L.; Talbot, T.; Boehs, G.; Andrioli, J. L., 2010. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo. 47, 3,190-196.
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 401. doi:10.3390/ijms17030401.
- Santos, D.K.F., Meira, H.M., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2017a. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its

- toxicity for application as a bioremediation agent. *Process Biochemistry*. 54, 20-27. doi: 10.1016/j.procbio.2016.12.020
- Santos, D.K.F., Resende, A.H.M., Almeida, D.G., Soares da Silva, R.C.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Banat, I.M., Sarubbo, L.A., 2017b. *Candida lipolytica* UCP0988 Biosurfactant: Potential as a Bioremediation Agent and in Formulating a Commercial Related Product. *Front. Microbiol.* 8, 767. doi: 10.3389/fmicb.2017.00767
- Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A., 2010. Glycerol as sub-strate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 79, 174–183. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.050
- Singh, P., Patil, Y., Rale, V., 2019. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *J. Appl. Microbiol.* 126, 2-13. doi:10.1111/jam.14057
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., Oliveira, R.P.S., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 89, 88-94. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.01.007
- Varjani, S.J., Upasani, V.N., 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour Technol.* 232, 389–397. doi: 10.1016/j.biortech.2017.02.047
- Veshareh, M.J., Azad, E.G, Deihimi, T., Niazi, A., Ayatollahi, S., 2018. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting. *J Pet Explor Prod Technol.* 1–13. doi: 10.1007/s13202-018-0457-0
- Zhang, Y., Miller, R.M., 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3276–3282.

Table. 1 Surface tension and yield of biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone for 48 h under agitation of 250 rpm either in flasks or bioreactors. Results are expressed as means \pm standard deviations

Parameter	Erlenmeyer	Bioreactors		
	flasks *	1.2 L	3 L	50 L
Surface tension (mN/m)	27.8 \pm 0.2	28.7 \pm 0.3	27.5 \pm 0.1	32.0 \pm 0.5
Biosurfactant yield (mg/L)	3520 \pm 95	4300 \pm 101	4600 \pm 88	4110 \pm 79

* Data obtained by Durval et al. (2018).

Table. 2 Survival rates of the fish *Poecilia vivipara* submitted to different dilutions of crude or formulated biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone after 96 h exposure. Results are expressed as means \pm standard deviations

Biosurfactant/brine dilution (v/v)	Crude biosurfactant (%)	Formulated biosurfactant (%)
1:10	39.5 \pm 0.4	85.2 \pm 0.3
1:20	63.3 \pm 0.7	91.1 \pm 0.8
1:40	93.3 \pm 0.6	100.0 \pm 0.5
1:80	100.0 \pm 0.2	100.0 \pm 0.4

Table. 3 Survival rates of bivalve *Anomalocardia brasiliana* submitted to different dilutions of crude or formulated biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone after 96 h exposure. Results are expressed as means \pm standard deviations

Biosurfactant/brine dilution (v/v)	Crude biosurfactant (%)	Formulated biosurfactant (%)
1:10	26.7 \pm 1.1	30.2 \pm 1.1
1:20	40.1 \pm 0.2	55.6 \pm 0.7
1:40	80.3 \pm 1.3	87.1 \pm 1.8
1:80	100.0 \pm 0.4	100.1 \pm 0.5

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 Biosurfactant components detected by thin-layer chromatography (TLC). Samples were added (20 μ L) to TLC plates and developed with 7:3 (v/v) *n*-hexane:acetone solvent system. TLC plate was sprayed with anisaldehyde, followed by heating at 110 °C for 1 min.

Fig. 2 Gas chromatographic profile of fatty acids of the biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone.

Fig. 3 ^1H NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of the isolated biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone.

Fig. 4 ^{13}C NMR spectrum (CDCl_3 , 300 MHz) of the isolated biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 cultivated in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone.

Fig. 5 Influence of biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 grown in mineral medium supplemented with 2% waste frying oil and 0.12% peptone on growth of autochthonous (a) bacteria in seawater, (b) bacteria in seawater contaminated with motor oil, (c) fungi and yeasts in seawater and (d) fungi and yeasts in seawater contaminated with motor oil. (◆) Control (seawater); (■) seawater plus biosurfactant at half the Critical Micelle Concentration - CMC/2 (250 mg/L); (▲) seawater plus biosurfactant at the Critical Micelle Concentration - CMC (500 mg/L).

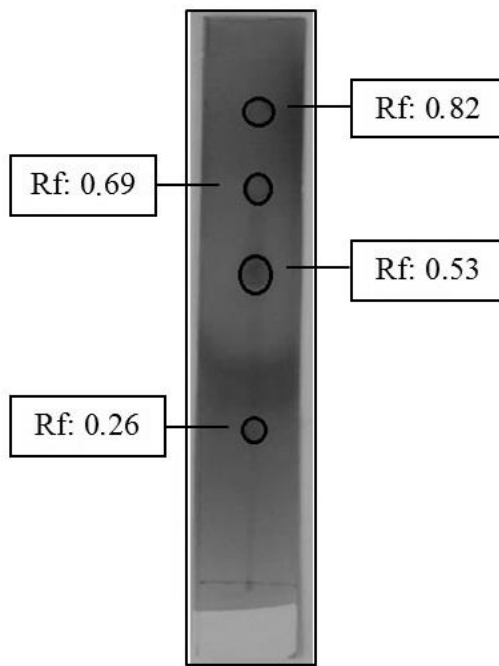


Figure1

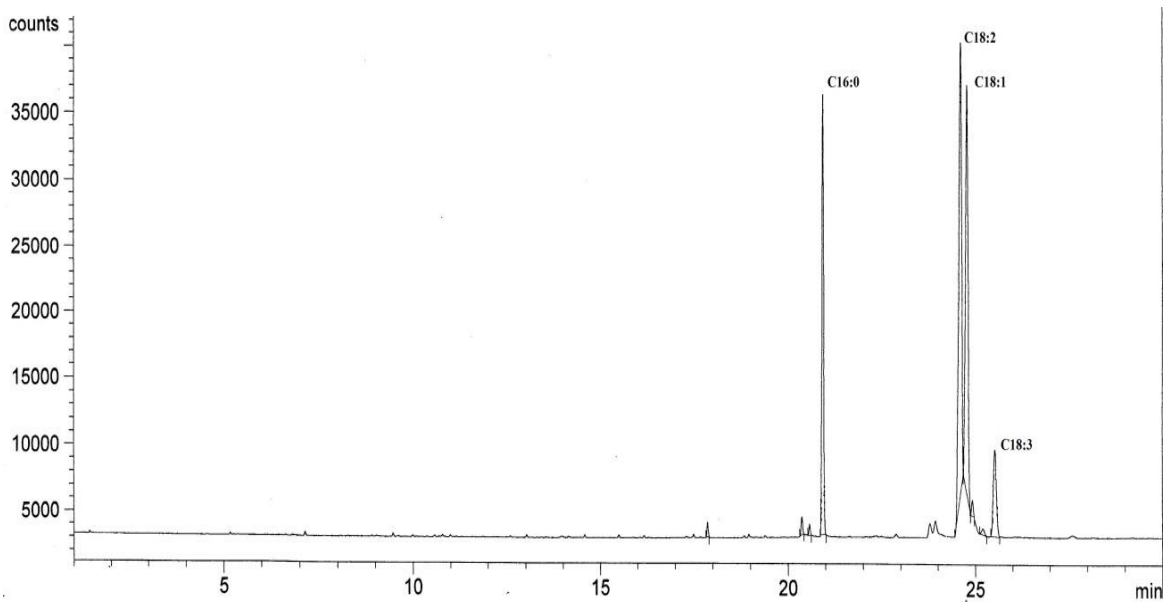


Figure 2

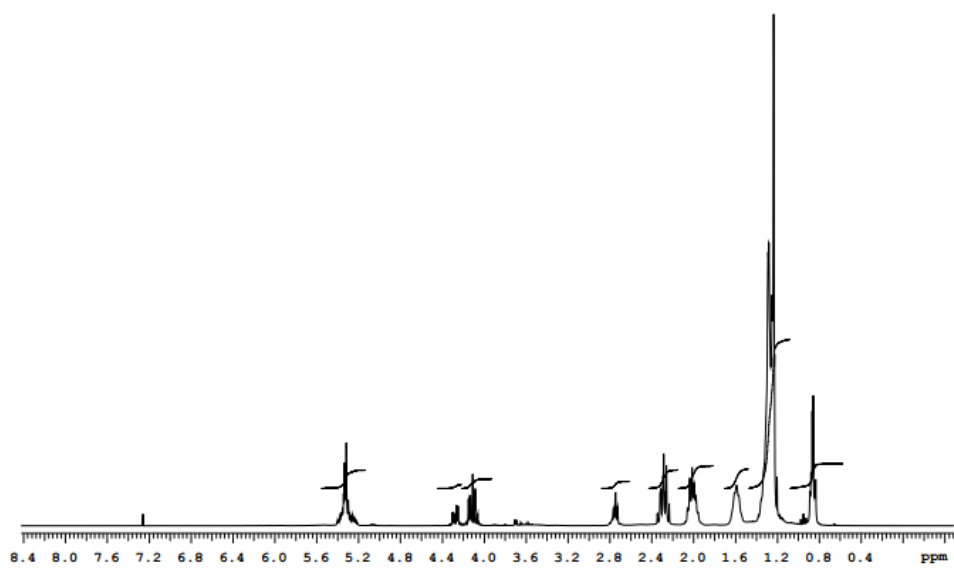


Figure 3

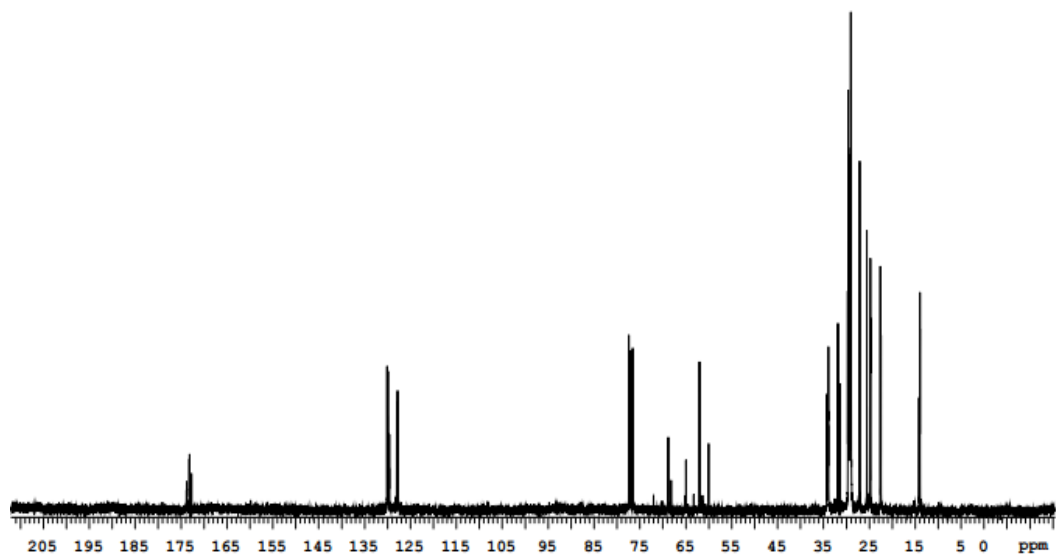


Figure 4

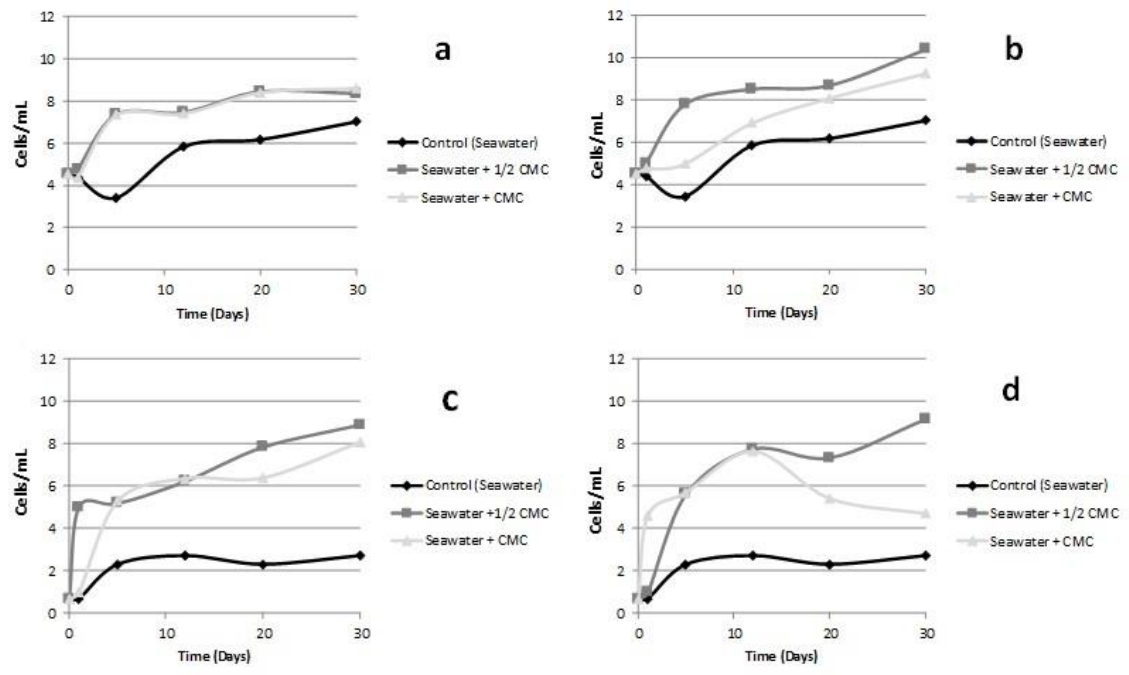


Figure 5

CAPÍTULO 2

Biosurfactant as an environmental remediation agent: toxicity, formulation and application in the removal of petroderivate in sand and rock walls

Publicado no periódico internacional *Biointerface Research in Applied Chemistry*.

Qualis A1 (2019) – Fator de Impacto (2021): 1.950

DOI: 10.33263/BRIAC121.034048

Biosurfactant as an environmental remediation agent: toxicity, formulation and application in the removal of petroderivate in sand and rock walls

Italo José B. Durval^{1,4}, Raquel D. Rufino^{2,4}, L. A. Sarubbo^{3,4,*}

¹ Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; italo.durval@gmail.com. ORCID: 0000-0002-1470-5170

²Center for Biological and Health Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; raqueldrufino@yahoo.com.br. ORCID: 0000-0001-6956-569X

³Science and Technology Center, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.; leonie.sarubbo@unicap.com.br. ORCID: 0000-0002-4746-0560

⁴Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Recife, Pernambuco, Brazil.

*Correspondence: leonie.sarubbo@unicap.com.br

Abstract

The exploitation and transportation of petroleum products are important reasons for environmental concern, since they are the major causes of accidents involving oil spills. Therefore, the biosurfactant produced by the bacterium *Bacillus cereus* UCP1615 was applied in the removal of motor oil from sand and stones from coastal regions. Bioassays carried out with the microcrustacean *Artemia salina* and seeds of three vegetables showed that the biosurfactant has reduced toxicity. The application of the biosurfactant in crude and isolated form, as a removal agent, was carried out in static and kinetic tests using sand contaminated with motor oil, in packed columns and in flasks under orbital agitation, respectively. The results showed that the biosurfactant removed $63.0 \pm 2.1\%$ of the hydrocarbon in the static test and $84.0 \pm 2.2\%$ in the dynamic test. In tests using rock walls samples, the removal rates reached $69.0 \pm 2.0\%$. Conservation tests carried out during 120 days demonstrated that the surfactant activities were maintained, especially in the presence the preservative potassium sorbate. The *B. cereus* biosurfactant has proven to be a biocompatible, effective and stable alternative for applications in environments contaminated with hydrophobic compounds, and can be industrially stored for application in the event of possible environmental disasters.

INTRODUCTION

Technological advances in containing disasters involving petroleum products have not ended up with the risk of leaks. In 2018, more than 110 thousand tons of oil were spilled in marine waters throughout the world [1]. Unfortunately, oil spills are recurring events with great environmental impacts, in the short to long term due to the recalcitrance of some of the components of the oils [2].

One of the greatest examples in history occurred at the end of August 2019, when spots of crude oil, of unknown origin, began to appear on the Brazilian coast, mainly in the Northeast region. About 3,000 km of coastline were affected, with more than 200 tons of oily material removed in the first five months [1, 3]. Among the various socioeconomic impacts, it is necessary to highlight the prohibition of fishing, affecting traditional communities, and tourism, since the beaches were banned for leisure due to oil contamination [4].

Surfactants arise as a mitigating technology for oil spills as these compounds have amphipathic structures that tend to be distributed at the interfaces between fluid phases with different degrees of polarity, promoting the reduction of surface and interfacial tension. They have been included in dispersant formulations used in oil spills. This class of compounds has a diverse and significant role in several market segments, including the oil, soap and detergent industry and even in the food, pharmaceutical and cosmetics industry [5]. Biosurfactants, in turn, appear as an alternative to chemical surfactants, being derived from microorganisms and presenting the same efficiency and great diversity in terms of function and structure [6].

Biosurfactants, in turn, appear as an alternative to chemical surfactants. These biomolecules are mainly produced by microorganisms and show the same efficiency and great diversity in terms of structure and function when compared to their chemical counterparts [6]. Biosurfactants have several advantages over chemical surfactants, as they can be produced from renewable sources, are biodegradable, have activity under a wide range of environmental conditions and reduced toxicity [7]. Biosurfactants can assist in the recovery of contaminated soils and / or removal of hydrophobic compounds [8] and heavy metals [9], in addition to being able to assist in livestock [10] and agriculture as an alternative to pesticides [11] or increasing the wettability and uniform distribution of fertilizers in the soil [12].

Bacillus species are cosmopolitan and morphologically diverse. Industrial interest in this genus has grown due to the ability of several species to synthesize and secrete five groups of cyclic lipopeptide. Surfactin is the most relevant lipopeptide produced, followed by iturin and phengicin [13]. Lipopeptides stand out in the literature for their versatility, which makes them potentially useful in the industry. Research has highlighted the use of these compounds in bioremediation [11], as bioemulsifiers [14] and antibiotic, antifungal and antitumor agents [15].

Thus, this work evaluated the biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP1615, verifying its toxicity against an organism considered an environmental bioindicator and vegetable seeds, with a view to its environmental application in oil removal processes in the coastal region. In addition, the conservation of the tensioactive properties of the biomolecule in the long term was evaluated, using a possible formulation with potassium sorbate, in order to propose a commercial product as an environmental remediation agent.

MATERIALS AND METHODS MATERIAL

Materials

All chemicals were of reagent grade. Motor oil was used as contaminant oil that is commercially available for use in flex engines (gasoline, VNG and alcohol), type SAE 20W-50, with synthetic guard (PETROBRAS, Brazil). It consists of a paraffinic base lubricating oil (a complex mixture of hydrocarbons) and performance enhancing additives. The viscosity of the oil is 98.0 cSt (at 40°C) and its density is 0.9420 g/mL (at 20°C). The frying soybean oil was obtained in the industry ASA S.A., PE, Brazil.

Microorganism

The bacterium *Bacillus cereus* UCP 1615, deposited in the Culture Bank of the Catholic University of Pernambuco, was used as the biosurfactant producer.

Production and isolation of biosurfactant

The conditions of production and isolation of the biosurfactant followed the methods described by Durval et al. (2020), using a mineral medium supplemented with 2% residual frying soybean oil and 0.12% peptone, with the pH adjusted to 7.0 ± 0.2 . The surface tension of the culture medium prior to inoculation was measured as 57 mN/m. Fermentations were carried out under 250 rpm agitation for 48h, at 28 °C. The biosurfactant was extracted after centrifugation of the fermentation broth at $5000 \times g$ for

30 min to remove cells. A solution of 6.0 M HCl was added to the supernatant to adjust the pH to 2.0, followed by the addition of a 2:1 (v/v) CHCl₃/ CH₃OH solution. After vigorous manual agitation during 15 min and phase separation, the organic phase was removed, and the operation was repeated twice more. The organic phases were pooled, and the isolated biosurfactant was concentrated in a rotary evaporator.

Surface tension and Critical Micelle Concentration (CMC) determination

Surface tension was measured in cell-free metabolic broth (crude biosurfactant) using a Sigma 700 tensiometer (KSV Instruments, Helsinki, Finland) and Du Nuöy ring. The average reduction of the surface tension, in the presence of the biosurfactant from *Bacillus cereus* UCP 1615 was reported as 27 mN/m. The critical micelle concentration (CMC) of the isolated biosurfactant was determined automatically in the tensiometer. The CMC was previously determined and expressed as 0.5 g/L [16].

Determination of biosurfactant toxicity

The toxicity of the biosurfactant was determined using brine shrimp and vegetables seeds, which were obtained in local stores.

The toxicity of the isolated biosurfactant was determined at concentrations of 0.25 g/L (1/2 CMC), 0.5 g/L (CMC) and 1 g/L (2x CMC) using the microcrustacean *Artemia salina* as the bioindicator. The analyzes were carried out in penicillin tubes containing 10 larvae of the brine shrimp in 5 ml of saline water (33 mg/L). The larvae were observed for 24 hours to determine the mortality rate. Saline water was used as control and the experiments were carried out in triplicate. Toxicity (concentration of biosurfactant per 100 ml of saline water) was defined as the lowest concentration to kill all the brine shrimp [17].

The phytotoxicity of the biosurfactant was also evaluated in static test involving the seed germination and root elongation of gherkin (*Cucumis anguria*), cabbage (*Brassica oleracea*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) [18]. The cell-free metabolic broth (crude biosurfactant) and the isolated biosurfactant at concentrations of 0.25 g/L (1/2 CMC), 0.5 g/L (CMC) and 1 g/L (2x CMC) ½ were tested. Toxicity was determined in sterilized Petri dishes (10 cm) containing Whatman N° 1 filter paper. The vegetable seeds were previously treated with sodium hypochlorite. Ten seeds were inoculated in a Petri dish, followed by the addition of 5 ml of the test solution at 27 °C. After five days

of incubation in the dark, root elongation (≥ 5 mm), seed germination and germination index (GI) were calculated as follows:

Relative seed germination (%) = (number of seeds germinated in the extract/number of seeds germinated in the control) x 100

Relative root length (%) = (mean root length in the extract/mean root length in the control) x 100

GI = [(% seed germination) x (% root growth)]/100%

Controls were prepared with distilled water to replace the biosurfactant solutions. Mean and standard deviation values of triplicate samples were calculated for each concentration.

Removal of motor oil from packed columns through static assay

Glass columns measuring 55 cm in height x 6 cm in diameter were initially filled with approximately 200 g of a mixture containing the soils and 20 g of motor oil (15 cSt). The surface of the mixture was then inundated with 200 mL of the biosurfactant solutions. Isolated biosurfactant solutions at concentrations of 0.25 g/L (1/2 CMC), 0.5 g/L (CMC) and 1 g/L (2x CMC) in distilled water were prepared. Pure distilled water was used as the control. The cell-free broth, i.e., the crude biosurfactant, was also tested at the same volume. The percolation of the solutions was monitored during 24 h in a 5-min intervals, when no further percolation was observed. The the soil samples in the columns were then washed with 20 mL of hexane for the removal of oil. The solvent was evaporated at 50 °C and the amount of oil removed was calculated by gravimetry [19].

Removal of motor oil through kinetic assay

The removal of motor oil throught the kinetic assay was determined after the saturation of 50 g of soil with 5 g of motor oil. The laboratory-contaminated soil was placed in 250-mL Erlenmeyer flasks, to which 50 mL of the crude biosurfactant (cell-free metabolic broth) after fermentation and isolated biosurfactant at 1/2 CMC (0.25 g/L), at the CMC (0.5 g/L) and twice the CMC (1 g/L) were added. The flasks were maintained at 150 rpm during 24 h at 28°C. After this period, the content of the flasks was centrifuged at 5000 rpm for 1200 s and the residual oil in the supernatant and the conten of oil that remained in the soil was washed with hexane (50 mL) for three times. The solvent was

rotoevaporated at 50 °C and the amount of oil in both samples was determined by gravimetry [20].

Washing of hydrophobic compound adsorbed to porous surface

The capacity of the biosurfactant in removing motor oil adsorbed to rocks was carried out by soaking the samples of rocks in the oil until complete coverage and recording the oil volume spent. The material was then carefully placed in a 100-ml beaker with the aid of a pincers and submitted to washing with the cell-free metabolic broth (crude biosurfactant) and solutions of the isolated biosurfactant at ½ CMC (0.25 g/L), at the CMC (0.5 g/L) and at twice the CMC (1 g/L). After the process, the oil removal was calculated by gravimetry from the amount of oil remaining on the biosurfactant washed rock. [21].

Conservation of biosurfactant properties evaluation for commercial formulation

The cell-free broth (crude biosurfactant) was subjected to three conservation methods: (a) addition of 0.2% potassium sorbate; (b) heating at 80 °C for 30 min (fluent vapor), followed by the addition of 0.2% potassium sorbate; and (c) sterilization at 121 °C for 30 min for three consecutive days (fractionated tyndallization). After treatments, the crude biosurfactant was stored under different conditions, that is, at temperatures of 40 and 50 °C, under concentrations of 1, 3 and 5% NaCl and at pH 5, 7 and 9 for 120 days. Samples were taken after 15, 30, 45, 90 and 120 days to determine stability. Measurements of surface tension, emulsification index and the ability to disperse the oil in seawater were carried out to select the best conservation method [22].

Emulsification activity with motor oil

The emulsification index was determined according to Cooper and Goldenberg [23], whereby equal volumes (2 mL) of motor oil and cell-free metabolic broth were added in a graduated screwcap tube and vortexed for 2 min at high speed. The stability of the emulsion was determined after 24 h and the emulsification index was calculated by dividing the measured height of the emulsion layer by the total height of the mixture and multiplying by 100.

Motor oil displacement test (dispersant test)

The oil displacement test was performed by slowly adding 20 µL of motor oil to the surface of the seawater (40 mL) contained in a 15 cm diameter Petri dish. Then, 10

µL of the cell-free broth (crude biosurfactant) was added on the oil surface, causing clear zones to appear in the center of the oil. The diameter of the clear zones was measured with a ruler and the dispersion rate was calculated as a function of the diameter of the Petri dish. The experiments were carried out in triplicate [24].

Statistical Analysis

Surface tension, stability, and emulsification were determined at least three times. Mean and standard error values were calculated using the Microsoft Office Excel 2003 (Version7). To locate significant differences, Tukey's test ($P < 0.05$) was used by aid of software Statistica Version12.0.

RESULTS

Evaluation of biosurfactant toxicity against *Artemia salina*

The biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615, at concentrations of $\frac{1}{2}$ CMC, at the CMC and at twice the CMC, was not toxic to *Artemia salina* larvae exposed to these solutions for 24 hours, which showed a 100% survival rate.

Evaluation of the toxicity of the biosurfactant against vegetable seeds

Seeds of gherkin seeds (*Cucumis anguria*), tomatoes (*Solanum lycopersicum*) and cabbage (*Brassica oleracea*) were exposed to the biosurfactant of *Bacillus cereus* and the response of this bioassay resulted in germination indices (GI) shown in table I.

The present study showed results that indicate that the solutions of the biosurfactant in different concentrations had no inhibitory effect on seed germination, highlighting the action against tomato seeds (*Solanum lycopersicum*), with GI above 100%, exceeding the germination index of the control. In addition, leaf growth and elongation of secondary roots occurred under all conditions tested. It can be inferred that the biotenseoactive has low toxicity, with the possibility of stimulating growth in concentrations close to or below its CMC (0.5 g/L) and being considered non-toxic. The use of crude biosurfactant (cell-free metabolic broth) resulted in the lowest germination rates of the studied vegetables.

Table I: Phytotoxicity evaluation of the biosurfactant from *B. cereus* 1615 against gherkin (*Cucumis anguria*), tomato (*Solanum lycopersicum*) and cabbage (*Brassica oleracea*) seeds.

Biosurfactant	Germination Index (%)		
	Gherkin	Tomato	Cabbage
Crude (cell-free metabolic broth)	35.3±0.5	50.3±0.5	27.4±0.3
Isolated (2 x CMC)	64.5±0.1	121.4±0.5	45.6±0.4
Isolated (CMC)	89.0±0.3	205.9±0.1	57.1±0.5
Isolated (1/2 CMC)	123.5±0.2	208.8±0.3	64.7±0.6

Application of biosurfactant to remove hydrophobic contaminant in static and kinetic tests

The present study carried out static and dynamic (kinetic) tests using sand contaminated artificially with motor oil. The static test was carried out in packed glass columns, filled with sand and washed with biosurfactant solutions (Figure 1).

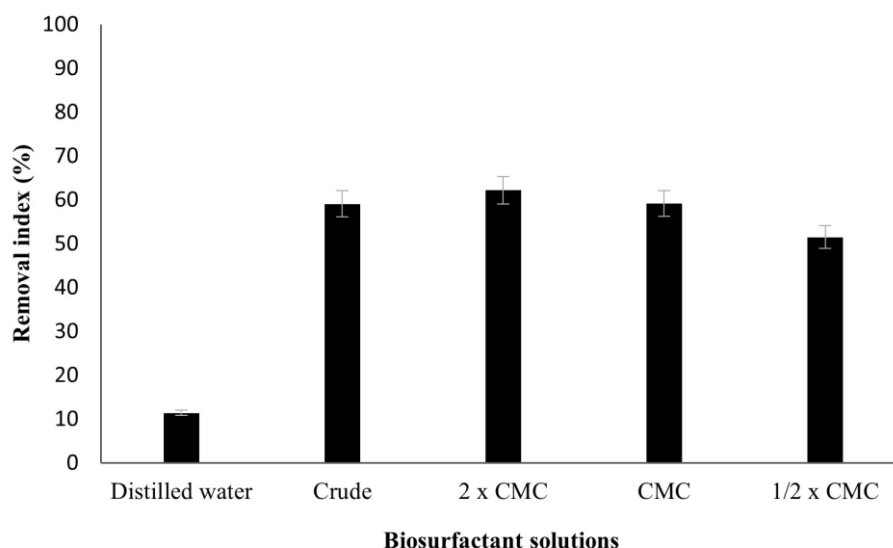


Figure 1. Removal of motor oil adsorbed to sand in packed glass columns (static assay) by the biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615.

The results of this test show a $63 \pm 2.1\%$ removal, with an 82% increase in oil removal from the sand compared to the control (water), using a concentration of twice

the CMC (1 g/L). The rate of removal from control was $10.9 \pm 0.5\%$. It is important to highlight the efficiency of the crude biosurfactant (cell-free metabolic broth), with an index close to those obtained by the solutions of the isolated biosurfactant.

Kinetics tests for removal of motor oil adsorbed on sand were performed after 24 hours of agitation, using different concentrations of the biosurfactant from *B. cereus* UCP 1615. It was possible to observe an increase of up to approximately $73 \pm 2.1\%$ in the concentration of twice the CMC, when compared with distilled water, removing $84 \pm 2.2\%$ of the oil (Figure 2).

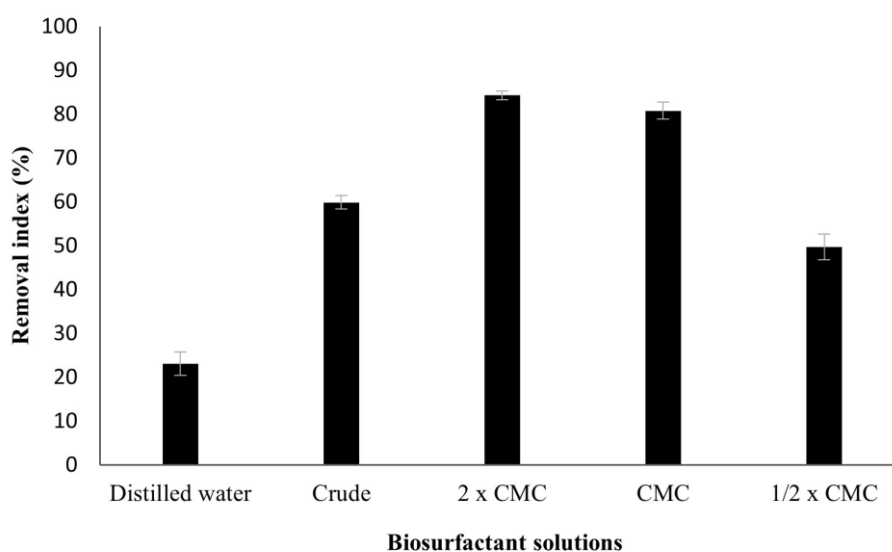


Figure 2. Removal of motor oil adsorbed to sand in flasks (kinetic assay) by the biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615 after stirring (24h).

Application of biosurfactant to wash hydrophobic compound adsorbed on rocks

Samples of rocks from the coastal environment were impregnated with motor oil and washed, without friction, with different concentrations of the biosurfactant from *B. cereus* UCP 1615. It was possible to observe removal rates of $69 \pm 2.1\%$, approximately, at the concentration twice the CMC, that is, a 69% increase in efficiency compared to the control (20.9%) (Figure 3).

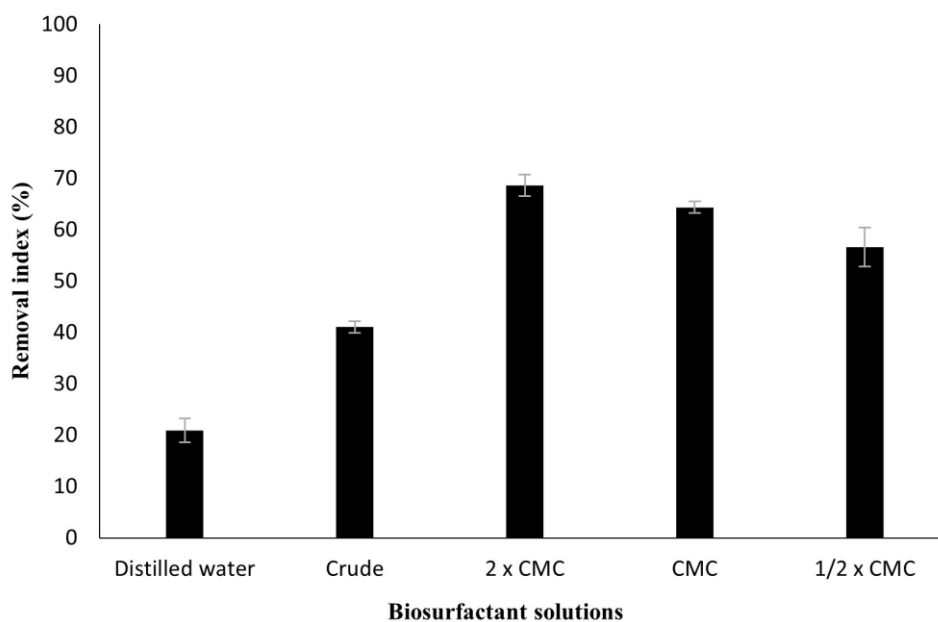


Figure 3. Removal of motor oil adsorbed to rocks by the biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615.

Formulation and conservation of the biosurfactant

During a period of 120 days, the crude biomolecule was subjected to conservation methods and its surfactant properties were evaluated. Heating methods were used separately and associated with the addition of the preservative potassium sorbate. The capacity to reduce the surface tension of the biosurfactant remained stable in the three conservation methods investigated and in the different conditions (Figures 4A and 4B), with the surface tension maintained around 28 mN/m over time, except in cases when the pH was around 5, with values close to 30 mN/m.

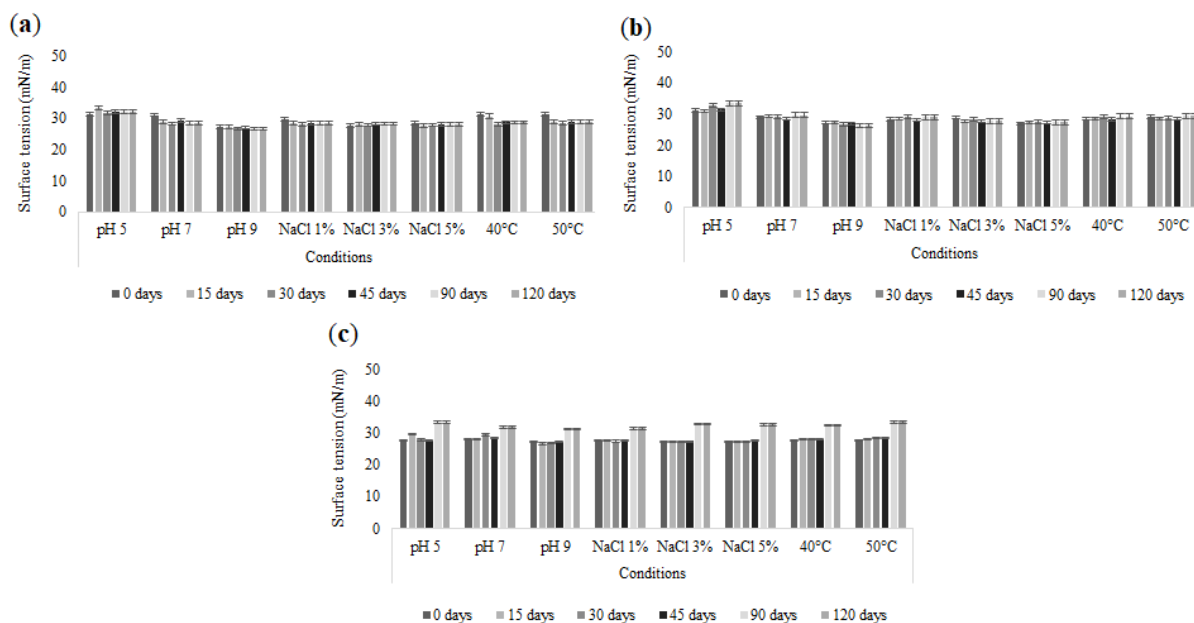


Figure 4. Surface tensions of the biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615 over 120 days of conservation with the addition of 0.2% potassium sorbate (a), fluent vaporization with the addition of 0.2% potassium sorbate (b) and fractionated tyndallization (c) at different pH (5, 7, 9), NaCl concentration (1, 3 and 5%) and temperature (40 and 50 °C). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from three independent experiments.

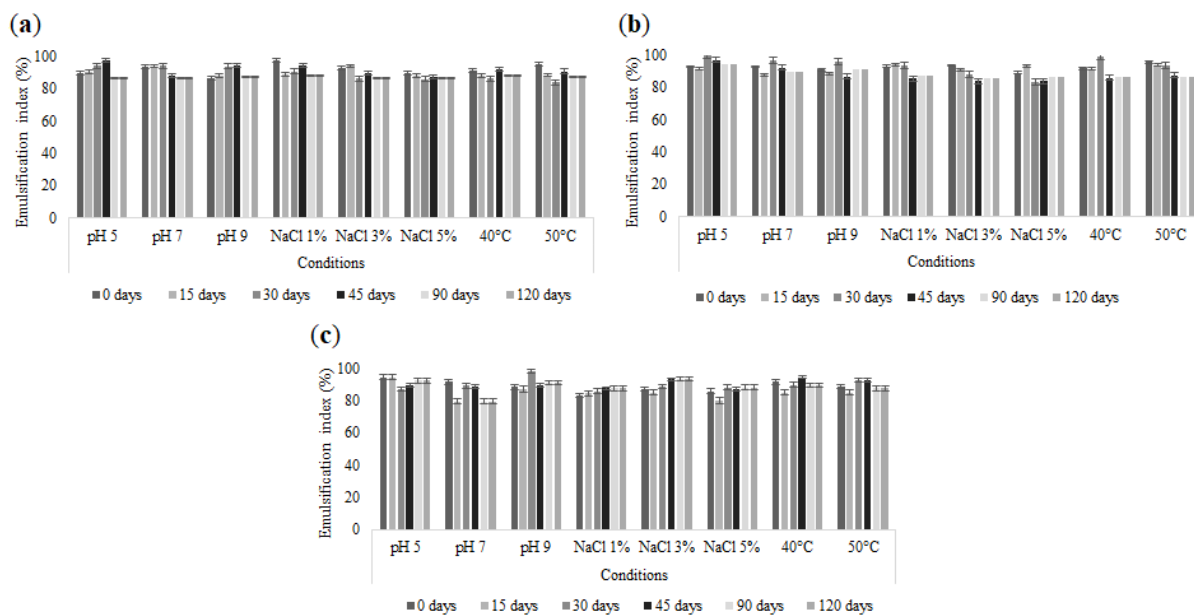


Figure 5. Motor oil emulsification indexes of the biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615 over 120 days of conservation with the addition of 0.2% potassium sorbate (a), fluent vaporization with the addition of 0.2% potassium sorbate (b) and fractionated tyndallization (c) at different pH (5, 7, 9), NaCl concentration (1, 3 and 5%) and temperature (40 and 50 °C). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from three independent experiments.

The emulsification indexes (Figure 5) of motor oil by the biosurfactant from *B. cereus* UCP 1615 remained around $90 \pm 2.1\%$, mainly when the preservative was used in

the formulation. The dispersion indexes also showed stability, with results above $75 \pm 3.0\%$ up to the 45th day, when the preservative and the heating were associated (Figures 6A and 6B). The acidic pH showed the lowest values in all cases.

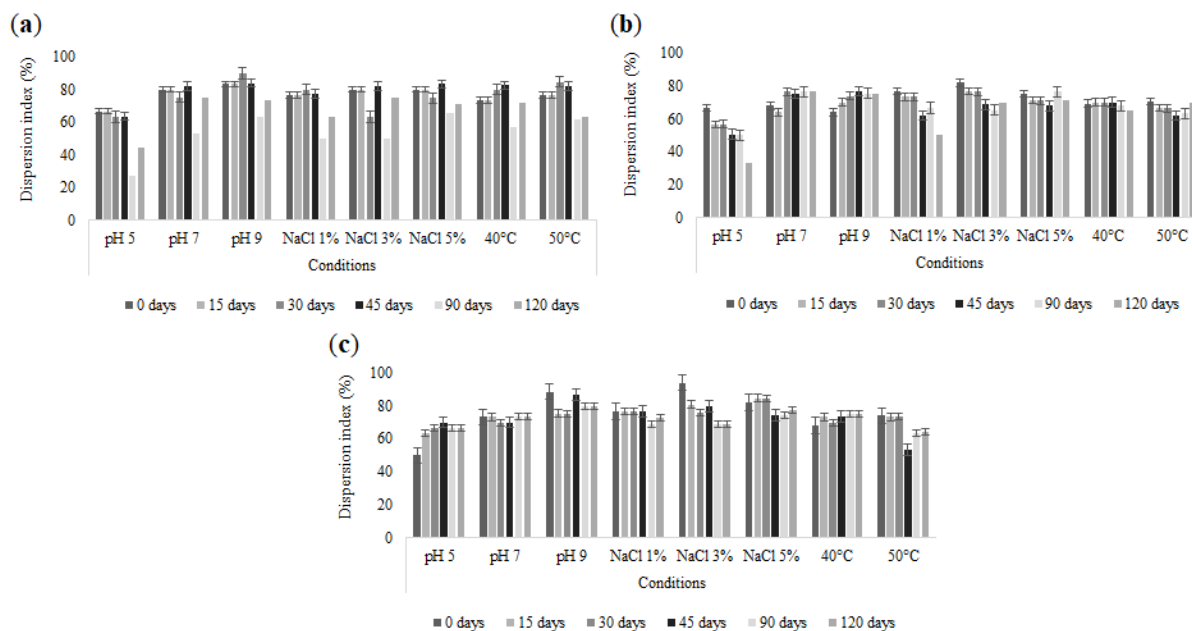


Figure 6. Motor oil dispersion by the biosurfactant from *B. cereus* UCP 1615 over 120 days of conservation with the addition of 0.2% potassium sorbate (a), fluent vaporization with the addition of 0.2% potassium sorbate (b) and fractionated tyndallization (c) at different pH (5, 7, 9), NaCl concentration (1, 3 and 5%) and temperature (40 and 50 °C). Error bars illustrate experimental errors (standard deviations), calculated from three independent experiments.

DISCUSSION

Evaluation of biosurfactant toxicity against *Artemia salina*

Artemia spp. have been widely used in research and applied in toxicology laboratories around the world for many decades, mainly for their short life cycle, simplicity in relation to laboratory handling and cost-effectiveness [25, 26]. In addition to being a bioindicator in contaminated environments, it is used to test the toxicity of a wide range of chemical products and compounds, pesticides, designed nanomaterials, antibiotic drugs, antibiofilm agents, anti-corrosion agents, drugs, food products and oil dispersants [27].

The biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615 did not prevent the hatching and life of larvae of *Artemia salina*, even when inserted in medium with a concentration of twice the CMC, demonstrating that it is not toxic for this bioindicator. This result corroborates the results described by França et al. [28] and Felix et al. [29] who evaluated

the toxicity of a *Bacillus subtilis* biosurfactant, and Santos et al. [30] using *Candida lipolytica* in their CMC and above this value.

Evaluation of the toxicity of the biosurfactant against vegetable seeds

Studies show that synthetic surfactants, both anionic and non-ionic, can bind to various membrane proteins, modifying their solubility and structure and can also inhibit, in concentrations of μ moles, the biological activity of plant enzymes [31].

Bruin et al. [32] reports that some surfactants can promote increased leakage of electrolytes, decrease the concentration of chlorophyll and induce changes in the ultrastructure of the plant cell. It is important to realize that in order to cause any effect on seed germination and subsequent plant growth, a chemical entity must penetrate the hard and thick coating of the seeds [33].

Tiquia et al. [18] states that the germination index (GI) proves to be a very sensitive parameter, because it combines the germination of seeds and the growth of seedlings (a plant embryo already developed and still closed in the seed). This test is used to assess the toxicity of the compound for different plant species. An GI value greater than 80% is considered an indication of the disappearance of toxicity.

The germination indexes (GI) obtained in this study are important to confirm the biocompatibility of this biological surfactant, an advantage described in the literature in relation to synthetic surfactants. The low or absence inhibitory effect on seed germination, associated with the observation of leaf growth and the elongation of secondary roots in all conditions tested, indicate the biocompatibility of the biosurfactant produced by *B. cereus*.

The GI indexes above 100% show that the biosurfactant has no toxicity and also contributes to seed germination, when compared to the control (distilled water), with the possibility of stimulating growth in concentrations close to or below its CMC (0.5 g/L) and being considered non-toxic.

The low IG observed when the seeds were exposed to the cell-free broth can be explained by the fact that crude extract is composed of several substances resulting from the metabolism of the microorganism, in addition to the surfactant itself; these substances can interfere with seed twinning, which justifies the low germination rates observed.

Oluwaseun et al. [34] studying the rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501, observed that there was no inhibitory effect on the seeds (*Sorghum bicolor*, *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum*, *Vigna unguiculata* and *Capsium annuum*)

tested, as well as in their root elongation; the chemical surfactant Tween 20, on the other hand, has been shown to inhibit the germination process. Rubio-Ribeaux et al. [35], evaluating the biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP 1613, found that it is non-toxic to seeds of *Solanum lycopersicum*, *Lactuca sativa* L. and *Brassica oleracea*, a result that corroborates that obtained by Santos et al. [36] for the surfactant of *Streptomyces* sp. DPUA1566 against *Lactuca sativa* L. and *Brassica oleracea* seeds, highlighting that germination rates were higher than 100% at the CMC of the surfactant.

Application of biosurfactant to remove hydrophobic contaminant in static and kinetic tests

Surfactants can assist in bioremediation processes, since they are able to increase the mobility of hydrocarbons, as well as bioavailability [37]. In addition, as the hydrophobic portion of the wetting agent (surfactant) bonds chemically to the hydrophobic coating on the soil particle, the soil becomes wettable, while the hydrophilic head attracts water molecules, allowing them to pass throughout the soil and increasing infiltration [12].

The results show that the *B. cereus* biosurfactant increased the removal of oil adsorbed to the sand when compared to the control condition. The rate of removal from the control, composed by distilled water, which has no chemical affinity with the oil, may be related to the gravitational action and the mechanical action of the discharge [38]. It is important to highlight the efficiency of the cell-free broth (crude biosurfactant), which showed an oil removal index close to those reached by solutions of the isolated biosurfactant.

Fernandes et al. [39], evaluating the biosurfactant from *B. subtilis* RI4914, observed a recovery of 40% of oil that remained in columns filled with sand after washing with water. However, very high concentrations of the partially purified biosurfactant (2 g/L) were required. The biosurfactant of *Paenibacillus* sp. D9, promoted removal of 63%, higher than the chemical surfactant Dodecyl sodium sulfate (SDS) [8].

Since the removal of the hydrophobic contaminant can be carried out with the association of chemical and mechanical techniques. The agitation applied to the removal process promoted an increase in the removal rates, demonstrating how the mechanical action can assist in decontamination. However, the agitation did not make the control removal index exceed the values obtained in the presence of biosurfactant in both tests (static and dynamic). Chaprão et al. [40] observed similar removal percentages with

Bacillus sp. and *Candida sphaerica*. Jimoh and Lin [8] obtained removal of 73% the motor oil with the biosurfactant of *Paenibacillus sp.* D9, surpassing the chemical surfactant SDS, which removed 58% of the oil. The biosurfactant from *P. aeruginosa* UCP0992, on the other hand, showed removal rates of around 80% when the cell-free metabolic broth was used, although the rates were below 60% when the purified biosurfactant was used [38].

Application of biosurfactant to wash hydrophobic compound adsorbed on rocks

Coastal regions have different characteristics, from sandy to rocky regions, due to these differences in surfaces that can be affected by possible hydrophobic contaminants, which have a recalcitrant character in the environment, contaminated soil or sediments, which requires an urgent solution regarding their solubilization and biotreatment [25].

Considering the importance of these rock formations, the capacity to remove oily contaminants in rocks and stones was evaluated. The use of the biosurfactant, even at half its CMC, contributed to the removal of the hydrophobic contaminant attached to the rock. The highest removal values were obtained at concentrations at and twice the CMC, rates that corroborate with those found in the literature. It is also noteworthy that the crude biosurfactant, i.e., the cell-free broth, promoted oil removal with greater efficiency than the control.

Ostendorf et al. [41], evaluating the biosurfactant from *Bacillus cereus* produced in a medium containing cane molasses and corn maceration liquor, observed a 60% percentage of motor oil removal with the isolated biosurfactant at the CMC, a value that corroborates the indexes for the same concentrations obtained in the present study (around 64%). Experiments carried out using the crude and isolated biosurfactant (0.5%) of *Pseudomonas cepacia*, showed removal rates of approximately 81% and 68%, respectively [21]. Comparing the results of the present study with those described in the literature, the application of this biomolecule as a washing agent in coastal regions can be considered promising.

Formulation and conversation of the biosurfactant

Biosurfactants are considered promising biotechnological products due to their versatility of applications. However, for industrial use, a formulation is needed that maintains long-term properties under diverse environmental and industrial conditions,

such as a wide pH range, high salt concentrations and high temperatures, which is important to obtain sterility in many processes [25].

The biosurfactant produced by *B. cereus* UCP 1615 maintained the ability to reduce surface tension, remaining stable under the three conservation methods investigated and under different conditions. In addition to the conservation of the surfactant property, thermostability is evident in conservation methods that use heat. The addition of potassium sorbate did not alter the property and aided stability until the 120th day.

The importance of the ability to emulsify and disperse hydrophobic compounds is described in various cleaning and remediation techniques [42]. Both skills were preserved at the end of the 120 days, with indices close to or equal to the initial ones, mainly with the addition of the preservative.

The dispersing action can contribute to the natural process of oil degradation in aquatic environments through the breakdown and consequent solubilization of oily compounds in small droplets. This property is related to both the capacity to reduce the interfacial tension and the concentration of the surfactant.

According to Taira et al. [43] the lipopeptide surfactin produced by bacteria of the genus *Bacillus* has peptides in its structure that can take different forms depending on the pH of the medium, forming larger aggregates at basic pH than at neutral pH. The morphology of the micelles of surfactin is affected by metal ions, pH and temperature [44].

Studies of formulation and conservation of biosurfactants for application in the environmental area are poorly described in the literature; however, existing studies previously conducted with *Candida bombicola* [22], *Candida lipolytica* [30], and *Pseudomonas cepacia* [45] in our laboratories indicate that the association of biosurfactants with potassium sorbate does not cause significant changes in the biomolecule's tensioactive capacity, even under different environmental conditions of pH, temperature and salinity. It is important to highlight that the preservative potassium sorbate is already widely used by the food industry because it is a fungicide.

Analyzing the studies described in the literature and the results obtained in this work, it is possible to affirm the potential of using the *B. cereus* UCP 1615 biosurfactant formulated with the preservative potassium sorbate as an efficient and stable remediation agent.

CONCLUSIONS

The biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP1615 in a low-cost medium proved to be non-toxic for the environmental bioindicator and of reduced toxicity for vegetable seeds, indicating biocompatibility for application in the bioremediation of soils and rocks contaminated with hydrophobic compounds. In addition, the association of the biosurfactant with potassium sorbate proved to be efficient for the conservation of the surfactant properties in the long term.

Funding

This study was funded by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Programa de Pesquisa & Desenvolvimento da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) and Centrais Elétricas da Paraíba (EPASA), Centrais Elétricas de Pernambuco S.A. (EPESA) and Termocabo S.A., Brazil.

Acknowledgments

The authors are grateful to the laboratories of the Centre for Sciences and Technology of the Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Brazil, to the laboratories of the Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brazil, the Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Brazil, and the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Oliveira, O.M.; Queiroz, A.F.S.; Cerqueira, J.R.; Soares, S.A.R.; Garcia, K.S.; Filho A.P.; Rosa, M.L.S.; Suzart, C.M.; Pinheiro, L.L.; Moreira, Í.T.A. Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *160*, 111597; DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.111597.

2. Magris, R.A.; Giarrizzo, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. *Mar Pollut Bull.* **2020**, *153*, 110961; DOI: 10.1016/j.marpolbul.2020.110961.
3. Escobar, H. Mystery oil spill threatens marine sanctuary in Brazil. *Science.* **2019**, *366*, 672–672; DOI: 10.1126/science.366.6466.672.
4. Ribeiro, L.C.D.S.; Souza, K.B.; Domingues, E.P.; Magalhães, A.S. Blue water turns black: economic impact of oil spill on tourism and fishing in Brazilian Northeast. *Curr. Issues Tour.* **2020**, 1–6; DOI: 10.1080/13683500.2020.1760222.
5. Karlapudi, A.P.; Venkateswarulu, T.C.; Tammineedi, J.; Kanumuri, L.; Ravuru, B.K.; Dirisala, V.; Kodali, V.P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum.* **2018**, *4*, 241–9; DOI: 10.1016/j.petlm.2018.03.007.
6. Singh, P.; Patil, Y.; Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *126*, 2–13; DOI: 10.1111/jam.14057.
7. Geetha, S.J.; Banat, I.M.; Joshi, S.J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2018**, *14*, 23–32; DOI: 10.1016/j.bcab.2018.01.010.
8. Jimoh, A.A.; Lin, J. Bioremediation of contaminated diesel and motor oil through the optimization of biosurfactant produced by *Paenibacillus* sp. D9 on waste canola oil. *Bioremediat. J.* **2020**, *24*, 21–40; DOI: 10.1080/10889868.2020.1721425.
9. Sarubbo, L.A.; Rocha, 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. *Chem. Ecol.* **2015**, *31*, 707–23; DOI: 10.1080/02757540.2015.1095293.
10. Naughton, P.J.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I.M. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 12–28; DOI: 10.1111/jam.14243.
11. Penha, R.O.; Vandenberghe, L.P.S.; Faulds, C.; Soccol, V.T.; Soccol, C.R. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. *Planta* **2020**, *251*, 1–15; DOI: 10.1007/s00425-020-03357-7.
12. Ogunmokun, F.A.; Liu, Z.; Wallach, R. The influence of surfactant-application method on the effectiveness of water-repellent soil remediation. *Geoderma* **2020**, *362*; DOI: 10.1016/j.geoderma.2019.114081.
13. Geissler, M.; Heravi, K.M.; Henkel, M.; Hausmann, R. Lipopeptide biosurfactants

- from *bacillus* species. In *Biobased Surfactants*, 2nd ed.; Hayes, D.G., Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Eds., Elsevier Inc: Amsterdam, Netherlands, **2019**; pp. 205–240; DOI: 10.1016/B978-0-12-812705-6.00006-X.
14. Sałek, K.; Euston, S.R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochem.* **2019**, *85*, 143–55; DOI: 10.1016/j.procbio.2019.06.027.
 15. Biniarz, P.; Łukaszewicz, M.; Janek, T. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Crit. Ver. Biotechnol.* **2017**, *37*, 393–410; DOI: 10.3109/07388551.2016.1163324.
 16. Durval, I.J.B.; Resende, A.H.M.; Figueiredo, M.A.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A. Studies on Biosurfactants Produced using *Bacillus cereus* Isolated from Seawater with Biotechnological Potential for Marine Oil-Spill Bioremediation. *J. Surfactants Deterg.* **2018**, *22*, 349–63; DOI: 10.1002/jsde.12218.
 17. Sobrinho, H.B.S.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electron. J. Biotechnol.* **2013**, *16*; DOI: 10.2225/vol16-issue4-fulltext-4.
 18. Tiquia, S.M.; Tam, N.F.Y.; Hodgkiss, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* **1996**, *93*, 249–56; DOI: 10.1016/S0269-7491(96)00052-8.
 19. 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*. *J. Pet. Sci. Eng.* **2013**, *109*, 117–22; DOI: 10.1016/j.petrol.2013.08.014.
 20. Luna, J.M.; Sarubbo, L.A.; Campos-Takaki, G.M. A new Biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of stability and application in Oil Recovery. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2009**, *52*, 785–793; DOI: 10.1590/S1516-89132009000400001.
 21. Rocha e Silva, N.M.P.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2014**, *3*, 132–9; DOI: 10.1016/j.bcab.2013.09.005
 22. Freitas, B.G.; Brito, J.G.M.; Brasileiro, P.P.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos,

- V.A.; Saubbo, L.A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–9; DOI: 10.3389/fmicb.2016.01646.
23. Cooper, D.G.; Goldenberg, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 224–9.
 24. Ohno, A.; Ano, T.; Shoda, M. Production of the antifungal peptide antibiotic, iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in solid state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **1993**, *75*, 23–7; DOI: 10.1016/0922-338X(93)90172-5.
 25. Jimoh, A.A.; Lin, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *184*, 109607; DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109607.
 26. Persoone, G.; Wells, P. Artemia in aquatic toxicology: a review. In *Artemia Research and its Application*, 1st ed.; Sorgeloos, P.; Bengison, D.A, Declair, W., Jaspers, F., Eds., Universa Press: Wetteren, Belgium, **1987**; pp. 259–75.
 27. Libralato, G.; Prato, E.; Migliore, L.; Cicero, A.M.; Manfra, L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecol. Indic.* **2016**, *69*, 35–49; DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.04.017.
 28. França, Í.W.L.; Lima, A.P.; Lemos, J.A.M.; Lemos, C.G.F.; Melo, V.M.M.; De Sant’ana, H.B.; Gonçalves, L.R.B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catal. Today* **2015**, *255*, 10–5; DOI: 10.1016/j.cattod.2015.01.046.
 29. Felix, A.K.N.; Martins, J.J.L.; Almeida, J.G.L.; Giro, M.E.A.; Cavalcante, K.F.; Melo, V.M.M.; Pessoa, O.D.L.; Rocha, M.V.P.; Gonçalves, L.R.B.; Aguiar, R.S.S. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids Surf. B* **2019**, *175*, 256–63; DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.062.
 30. Santos, D.K.F.; Resende, A.H.M.; Almeida, D.G.; Silva, R.C.F.S.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Banat, I.M.; Sarubbo, L.A. *Candida lipolytica* UCP0988 biosurfactant: Potential as a bioremediation agent and in formulating a commercial related product. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–11; DOI: 10.3389/fmicb.2017.00767.
 31. Gálvez, A.; López-Galindo, A.; Peña, A. Effect of different surfactants on germination and root elongation of two horticultural crops: implications for seed coating. *New Zeal. J. Crop. Hortic. Sci.* **2019**, *47*, 83–98; DOI:

- 10.1080/01140671.2018.1538051.
32. Bruin, W.; Van der Merwe, C.; Kritzing, Q.; Bornman, R.; Korsten, L. Ultrastructural and developmental evidence of phytotoxicity on cos lettuce (*Lactuca sativa*) associated with nonylphenol exposure. *Chemosphere* **2017**, *169*, 428–36; DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.020.
 33. Jain, N.; Bhargava, A.; Pareek, V.; Sayeed Akhtar, M.; Panwar, J. Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles? *Ecotoxicology*. **2017**, *26*, 238–49; DOI: 10.1007/s10646-017-1758-7
 34. Oluwaseun, A.C.; Kola, O.; Mishra, P.; Singh, J.R.; Singh, A.K.; Cameotra, S.S.; Oluwasesan, M.B. Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. *Sustain. Chem. Pharm.* **2017**, *6*, 26–36; DOI: 10.1016/j.scp.2017.07.001.
 35. Rubio-Ribeaux, D.; Andrade, R.F.S.; Silva, G.S., Holanda, R.A.; Pele, M.A.; Nunes, P.; Vilar Junior, J.C.; Resende-Stoianoff, M.A.; Campos-Takaki, G.M. Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable-resources. *African J. Microbiol. Res.* **2017**, *21*, 981–991; DOI: 10.5897/AJMR2017.8486.
 36. Santos, E.F.; Teixeira, M.F.S.; Converti, A.; Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A. Production of a new lipoprotein biosurfactant by *Streptomyces sp.* DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *17*, 142–50; DOI: 10.1016/j.bcab.2018.10.014.
 37. Haftka, JJH; Hammer, J; Hermens, JLM. Mechanisms of Neutral and Anionic Surfactant Sorption to Solid-Phase Microextraction Fibers. *Environ Sci Technol.* **2015**, *49*, 11053–61; DOI: 10.1021/acs.est.5b02901.
 38. Silva, E.J.; Correa, P.F.; Almeida, D.G.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo L.A. Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. *Colloids Surf. B.* **2018**, *172*, 127–35; DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.034.
 39. Fernandes, P.L.; Rodrigues, E.M.; Paiva, F.R.; Ayupe, B.A.L.; Mcinerney, M.J.; Tótola, M.R. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. *Fuel* **2016**, *180*, 551–7; DOI: 10.1016/j.fuel.2016.04.080.
 40. Chaprão, M.J.; Ferreira, I.N.S.; Correa, P.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Silva, E.J.;

- Sarubbo, L.A. Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. *Electron J Biotechnol* **2015**, *18*, 471–479; DOI: 10.1016/j.ejbt.2015.09.005.
41. Ostendorf, T.A.; Silva, I.A.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production and formulation of a new low-cost biosurfactant to remediate oil-contaminated seawater. *J. Biotechnol.* **2019**, *295*, 71–79; DOI: 10.1016/j.jbiotec.2019.01.025.
42. Ivshina, I.B.; Kuyukina, M.S.; Krivoruchko, A.V.; Elkin, A.A.; Makarov, S.O.; Cunningham, C.J.; Peshkur, T.A.; Atlas, R.M.; Philp, J.C. Oil spill problems and sustainable response strategies through new technologies. *Environ. Sci. Process Impacts* **2015**, *17*, 1201–19; DOI: 10.1039/c5em00070j.
43. Taira, T.; Yanagisawa, S.; Nagano, T.; Tsuji, T. Endo A. pH-induced conformational change of natural cyclic lipopeptide surfactin and the effect on protease activity. *Colloids Surf. B.* **2017**, *156*, 382–387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.017>
44. Knoblich, A.; Matsumoto, M.; Ishiguro, R.; Murata, K.; Fujiyoshi, Y.; Ishigami, Y.; Osman, M. Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide. *Colloids Surf. B.* **1995**, *5*, 43–8; DOI: 10.1016/0927-7765(95)01207-Y.
45. Soares da Silva, R.C.F.; Almeida, D.G.; Brasileiro, P.P.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation* **2019**, *30*, 191–201; DOI: 10.1007/s10532-018-9830-4.

CAPÍTULO 3

Aplicação de um biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615 a partir de óleo de fritura residual como emulsificante em uma formulação de biscoito

Será submetido para publicação no periódico internacional *Fermentation*.

Fator de Impacto (2021): 3.975

Aplicação de um biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615 a partir de óleo de fritura residual como emulsificante em uma formulação de biscoito

Italo J. B. Durval^{1,2}, Beatriz G. Ribeiro^{1,2}, Jaciana S. Aguiar³, Bruno O. de Veras⁴,
Raquel D. Rufino^{2,5}, Attilio Converti^{2,6} e Leonie A. Sarubbo^{2,7}

¹ Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); italo.durval@gmail.com; beatrizgaldinor@gmail.com

² Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI); leonie.sarubbo@iati.org.br

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); jaciana.aguiar@ufpe.br

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); bruno.veras@ufpe.br

⁵ Escola de Saúde e Ciências da Vida, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP); raquel.rufino@unicap.br

⁶ Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA), Università degli Studi di Genova (UNIGE); converti@unige.it

⁷ Icam Tech School, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP); leonie.sarubbo@unicap.br;

* Correspondente: converti@unige.it

Resumo

Os biossurfactantes estão atraindo cada vez mais o interesse da indústria de alimentos, graças às suas propriedades emulsificantes, espumantes e solubilizantes. No entanto, o uso industrial de biossurfactantes microbianos tem sido dificultado pelos altos custos de produção associados principalmente ao uso de substratos caros. A busca por substratos alternativos de baixo custo tem sido uma das estratégias adotadas para contornar esse problema. Nesse sentido, o biossurfactante produzido pelo *Bacillus cereus* UCP1615 por fermentação em meio suplementado com óleo de soja residual para fritura como substrato de baixo custo foi avaliado como bioemulsificante para a produção de biscoitos. O biossurfactante foi avaliado quanto a sua capacidade emulsificante frente a diferentes óleos vegetais, atividade antioxidante e toxicidade, apresentando resultados favoráveis para uso em alimentos. O biossurfactante também exibiu atividade antioxidante satisfatória nas concentrações avaliadas, sem potencial citotóxico para as cepas celulares L929 (fibroblastos de ratos) e Vero (células epiteliais de rim de macaco) de acordo com o ensaio MTT. O biossurfactante foi adicionado em diferentes concentrações (0,25, 0,5 e 1%) a uma formulação padrão de massa de biscoito para avaliar as características físicas e físico-químicas do produto. Os biscoitos formulados com o biossurfactante apresentaram características energéticas e físicas semelhantes às obtidas na formulação padrão, porém com menor teor de umidade. A adição do biossurfactante também garantiu uma boa preservação da textura do biscoito após 45 dias de armazenamento. Esses resultados sugerem que o biossurfactante tem potencial para ser aplicado como um emulsificante verde, atendendo às exigências do mercado atual de produtos biocompatíveis.

Palavras-chave: biossurfactante; bioemulsificante; resíduos de óleo de fritura; *Bacillus cereus*; aditivos alimentares; biscoito

INTRODUÇÃO

A globalização e o crescimento populacional promoveram a ampliação da produção e investimento na dinâmica complexa do abastecimento de alimentos. A indústria alimentícia também tem discutido sobre vários aspectos da segurança alimentar, incluindo a origem e propriedades dos produtos e dos componentes adicionados aos alimentos. A maioria dessas substâncias adicionadas aos alimentos são aditivos importantes para o desempenho adequado do produto final, tendo função de espessantes, estabilizantes e emulsificantes [1]. Os aditivos são responsáveis por manter ou melhorar aparência, frescor, sabor, textura e/ou segurança dos alimentos [2].

A procura da indústria de alimentos por ingredientes verdes tem se intensificado, fenômeno que é reflexo do avanço dos estudos e da concorrência nesse setor, mas principalmente do crescimento da conscientização do consumidor sobre o uso de ingredientes naturais em vez de aditivos sintéticos. [3]. Esse interesse está associado à crescente demanda por alimentos naturais, orgânicos e veganos, entre outros alimentos específicos do mercado [4].

Entre os produtos promissores, de fontes biológicas, estão os biossurfactantes. O interesse demonstrado por muitas indústrias em relação aos biossurfactantes tem como razão a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, bioatividade específica e tecnologias de produção sustentáveis [5,6]. Essas características conferem aos biossurfactantes grande potencial para aplicações práticas, em particular, nas áreas alimentícia, de cosmético, de saúde, bem como na biomédica e farmácia [5].

Um dos exemplos de biossurfactante microbiano obtido por via fermentativa é o surfactante do tipo lipopeptídeo, tipicamente produzido por bactérias do gênero *Bacillus* [7,8]. As propriedades mais importantes dos lipopeptídeos são a emulsificação e redução da tensão superficial; além disso, eles também atuam como agentes antioxidantes, anti-adesivos, antibiofilmes, antibacterianos, antifúngicos, antitumorais e antivirais [6,9].

Atualmente, a produção industrial de biossurfactante ainda é limitada e os desafios/problemas são devido ao alto custo envolvido no cultivo microbiano e na recuperação do bioativo [10]. Uma das soluções para viabilizar a produção industrial dessas biomoléculas consiste na utilização resíduos agroindustriais como substratos para processos fermentativos, uma vez que o substrato representa até 50% do custo final de fabricação [7].

É importante destacar também que a indústria de alimentos é uma geradora de resíduos, e esses resíduos, por sua vez, costumam conter grandes concentrações de carboidratos, lipídios e proteínas, o que os tornam atrativos para diversos processos fermentativos [11]. Entre esses resíduos encontra-se o óleo de cozinha residual de fritura, presente em cozinhas de residências, restaurantes e indústrias. Esse óleo é considerado perigoso ao meio ambiente e à saúde humana quando descartado de maneira inadequada, e deveria ser coletado a fim de reduzir os impactos ambientais do seu descarte [12].

A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e a Organização para Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO), em trabalho sobre as perspectivas para os mercados de commodities, afirmam que em 2019, cerca de 210 milhões de toneladas de óleos vegetais foram produzidos e consumidos por seres humanos a cada ano. Portanto, a produção global anual estimada de óleo residual pós fritura está em torno de 42 milhões de toneladas [13]. A utilização de resíduos agroindustriais ou matérias-primas renováveis no processo fermentativo para produção de biossurfactantes, desta forma, está em consonância com a química verde, sendo uma importante ferramenta de inovação sustentável, que é uma demanda do mercado atual [14].

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização do biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615 como aditivo na formulação de biscoitos tipo cookies, analisando os benefícios dessa adição, além de certificar a não toxicidade deste bioemulsificante e seu potencial antioxidante.

MATERIAS E METODOS

Micro-organismo e produção do biossurfactante

A bactéria *Bacillus cereus* UCP 1615, depositada no Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco, foi utilizada como micro-organismo produtor do biossurfactante. O *Bacillus cereus* UCP 1615 foi previamente isolado de amostras de águas ambientais contaminadas com derivados de petróleo derramados de navios (área portuária) no Oceano Atlântico no estado de Pernambuco, Brasil.

Conforme descrito por Durval et al. [15], a bactéria foi cultivada adicionando 2% de suspensão de células (0,7 densidade óptica a 600 nm), correspondendo a um inóculo de 24 h de 10⁷ unidades formadoras de colônias / mL, a um frasco de 500 mL contendo 100 mL de um meio de sal mineral (0,087% K₂HPO₄, 0,65% de trisaminometano, 0,02%

de KCl, 0,06% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01% de NaCl e 0,005% de extrato de levedura) suplementado com 2% de óleo de soja para fritura de resíduos e 0,12% de peptona, com pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$. Após cultivo por 48 h a $28^\circ C$ e 250 rpm, amostras foram retiradas para determinar a concentração do biossurfactante.

Isolamento do biossurfactante

O biossurfactante foi extraído após centrifugação do caldo de fermentação a $5000 \times g$ por 30 min para remover as células. Uma solução de HCl 6,0 M foi adicionada ao sobrenadante para ajustar o pH a 2,0, seguido pela adição de uma solução 2: 1 (v / v) de $CHCl_3 / CH_3OH$. Após agitação manual vigorosa durante 15 min e separação das fases, a fase orgânica foi removida e a operação foi repetida mais duas vezes. As fases orgânicas foram reunidas e o biossurfactante isolado foi concentrado em um evaporador rotativo[15]. O processo de extração isola a biomolécula do caldo fermentativo, e posterior processo de esterilização elimina as células remanescentes do processo fermentativo.

Avaliação do potencial citotóxico do biossurfactante (ensaio MTT)

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) [16,17].

A linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos) e Vero (células epiteliais renais de macaco verde africano) foram mantidas em meio de cultura DMEM (Meio Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado e 1 % de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a $37^\circ C$ em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO_2 e 95% de umidade.

As células foram plaqueadas (10^5 células/mL) em placas de 96 poços e incubadas por 24 h e em seguida 10 μL das soluções do biossurfactante foram adicionadas aos poços na concentração final de 3,12 a 400 $\mu g/mL$. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 μL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 μL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 7.0 demo.

Uma escala de intensidade foi usada para a determinação da toxicidade. Amostras com atividade inibitória entre 95 e 100% foram consideradas tóxicas; aqueles com atividade inibitória entre 70 e 90% foram considerados moderadamente tóxicos e aqueles com atividade inibitória inferior a 50% foram considerados não tóxicos [18].

Atividades antioxidante

Capacidade oxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método do fosfomolibdênio [19]. O ensaio baseou-se na redução do Molibdênio⁺⁶ a Molibdênio⁺⁵ pela amostra e posterior formação de um complexo Fosfato/Molibdênio⁺⁵ esverdeado. Tubos contendo as amostras e reagentes (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) foram incubados a 100 °C por 90 min. Posteriormente, as absorvâncias de cada solução foram medidas a 695 nm contra um branco. O CAT foi expresso em relação a uma solução de ácido ascórbico na concentração de 1mg/mL, considerada 100%. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

Ensaio DPPH

A avaliação da atividade antioxidante do biossurfactante pelo método de sequestro de radical livre foi medida por meio da doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) [20]. As medições foram realizadas em triplicado e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH removido. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno butilado (BTH) foi usado como padrões. A inibição percentual (I%) foi calculada usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorvância do controle e As é a absorvância da amostra.

Ensaio ABTS

A atividade antioxidante do biossurfactante pelo ensaio ABTS [(2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)] foi baseada na geração do radical cromóforo catiônico obtido da oxidação de ABTS por persulfato de potássio [20]. As medições foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição calculadas com base na porcentagem de ABTS removido. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e Hidroxitolueno butilado (BTH) foi usado como padrão. O percentual de inibição (I%) foi calculado usando a seguinte equação: $I\% = [(Ac - As) / (Ac)] \times 100$, onde Ac é a absorvância do controle e As é a absorvância da amostra.

Atividade emulsionante

A atividade de emulsificação do biossurfactante foi feita pelo método descrito por Gaur et al. [16]. Os óleos vegetais (óleo soja, óleo de milho, óleo de canola e óleo de amendoim) foram adicionados, na proporção 1:1 (v/v), a uma solução aquosa de biossurfactante, nas concentrações de 1%, 0,5% e 0,25%, em tubo de vidro e o conteúdo foi agitado em vórtex por 2 min a 50 Hz. Após 24 h, o índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado de acordo com a Eq. (1):

$$E_{24} = (h_e / h_t) \times 100 \quad (1)$$

onde: h_e é a altura da camada de emulsão e h_t é a altura total da mistura.

Todas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente.

Formulação e preparação dos biscoitos

O biossurfactante foi testado em uma formulação de biscoito padrão descrita por Ribeiro et al. [21] (Tabela 1). O extrato contendo o biossurfactante foi usado nesta formulação como aditivo, em três concentrações diferentes (1%, 0,5% e 0,25%) em relação à massa total, para a análise das propriedades físicas e físico-químicas.

A massa também foi preparada segundo o método descrito por Ribeiro et al. [21]. Os ingredientes, adquiridos em comércio local, foram misturados em uma batedeira (Arno Ciranda) por 7 min, sendo posteriormente dispostas em tábua de polietileno e moldadas em formato circular com auxílio de (moldes) em aço inox com 50mm de diâmetro, para padronização dos biscoitos. As peças foram mantidas no forno por 5 min a 150°C, seguido por um aumento da temperatura para 180°C por mais 15 min, com posterior resfriamento, pesagem, embalagem (a vácuo) e armazenamento em temperatura ambiente por 24 h.

Tabela 1. Composição da formulação de massa de biscoito

Ingredientes	Formulação padrão (%)
Farinha de trigo branca	47,0
Margarina	20,0
Açúcar	15,0
Essência de baunilha	3,0
Fermento químico	1,0
Clara do ovo pasteurizada	40,0
Gema do ovo pasteurizada	4,0

Propriedades físicas dos biscoitos

O peso, o diâmetro, espessura e o fator de espalhamento dos biscoitos, com ou sem o biossurfactante, foram avaliados [22,23]. O diâmetro foi medido selecionando-se aleatoriamente quatro amostras e colocando-as lado a lado para a medição do diâmetro total, os biscoitos foram então girados a 90° e o diâmetro foi medido novamente. O diâmetro final foi expresso como a média das duas medidas divididas por quatro. A espessura foi medida empilhando quatro biscoitos um em cima do outro quatro vezes. O fator de espalhamento foi determinado dividindo o diâmetro pela altura.

Propriedades e valor energético dos biscoitos

As propriedades físico-químicas dos biscoitos foram determinadas com base nos métodos de análise da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) [24]. O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, considerando a perda de peso das amostras submetidas ao aquecimento em estufa a 105°C até atingir peso constante. A concentração de proteína total foi calculada pelo método de Kjeldahl, baseado na digestão ácida da matéria orgânica seguida de destilação, sendo o nitrogênio posteriormente dosado por titulação; o valor do nitrogênio foi então multiplicado por um fator de 6,25. O método gravimétrico foi utilizado para a determinação do resíduo mineral fixo (cinza) com base na determinação da perda de peso das amostras submetidas à incineração a 550°C. O método de extração de Bligh e Dyer [25] foi empregado para quantificar lipídios. O valor energético foi determinado pela soma dos valores de carboidratos, lipídios e proteínas multiplicados por 4, 9 e 4, respectivamente [26].

Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura (TPA) foi feita determinando a firmeza, coesividade, adesividade e elasticidade da massa do biscoito, com e sem o biossurfactante, após assar, usando um analisador de textura do tipo Brookfield CT3, com uma célula de carga de 245 N. As amostras foram comprimidas a uma velocidade constante de 1 mm/s usando uma placa de polimetilmetacrilato (largura: 60 mm). Para o TPA, uma segunda compressão foi realizada após um intervalo de 5 s e a firmeza foi definida como a força da metade da altura da amostra durante a primeira compressão. A coesão foi definida como a razão entre o trabalho de compressão no segundo ciclo de compressão e o trabalho de

compressão no primeiro ciclo. A elasticidade foi calculada usando a altura relativa da amostra restante quando a força inicial foi registrada durante a segunda compressão [27].

Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente usando o procedimento de uma via do Statistica® (versão 7.0), seguido por um modelo de análise de variância linear de uma via (ANOVA). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão determinados a partir de experiências em triplicado. As diferenças foram examinadas pelo teste post hoc de Tukey, com nível de significância de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Citotoxicidade do biossurfactante

Os ensaios de citotoxicidade estão entre os primeiros métodos de bioensaios in vitro usados para prever a toxicidade de substâncias, e continua sendo realizado em vários laboratórios em todo o mundo [28]. Ele é importante para avaliação, triagem de segurança e classificação de compostos. Desta forma, o biossurfactante foi submetido aos ensaios de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) com intuito de monitorar a resposta de células, em cultura, e assim determinar sua viabilidade para consumo humano.

O resultado do ensaio de citotoxicidade para diferentes concentrações do biossurfactante, determinado pela observação da viabilidade celular das linhagens (fibroblasto de camundongos) e Vero (células epiteliais renais de macaco verde africano), está apresentada na Tabela 1. É importante salientar que substâncias que possibilitem percentuais de viabilidade celular maiores ou iguais a 80% são consideradas sem atividade citotóxica [29].

Tabela 2. Viabilidade celular das linhagens L929 e Vero após contato com diferentes concentrações de biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP 1615, em porcentagem. Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata

Concentrações (μ /mL)	Viabilidade celular (%)	
	Linhagem L929	Linhagem Vero
Controle	99,99 \pm 3,33	100,03 \pm 2,80
3,12	111,41 \pm 5,18	102,66 \pm 5,79
6,25	103,00 \pm 5,42	103,51 \pm 5,28
12,5	103,80 \pm 2,56	101,25 \pm 4,96
25	92,89 \pm 2,56	98,13 \pm 3,56
50	92,17 \pm 2,49	94,84 \pm 5,60
100	98,61 \pm 0,56	86,05 \pm 5,21
200	104,30 \pm 2,09	74,77 \pm 6,40
400	53,89 \pm 1,80	12,13 \pm 0,55

De acordo com a Tabela 2, as células da linhagem L929 apresentaram viabilidade celular de 54%, quando submetidas as maiores concentrações do biossurfactante (400 μ g/mL), enquanto nas concentrações que variaram de 3,12 a 200 μ g/mL a viabilidade apresentou valores acima de 93%. Frente às linhagens Vero, a solução nas maiores concentrações (400, 200 e 100 μ g/mL) apresentou viabilidade celular de 12,13, 74,77 e 86,05%, respectivamente e nas concentrações 3,12 a 50 μ g/mL apresentou viabilidade celular acima de 95% (Tabela 2).

Os resultados do MTT revelam que o biossurfactante tem potencial de aplicação em alimentos, pois não apresentou citotoxicidade a partir de uma concentração de até 100 μ g/mL, equivalente a 0,1 g/L, para ambas as linhagens, destacando que para a linhagem L929 na concentração de 200 μ g/mL (0,2g/L), a viabilidade foi de 100%. Os resultados observados são corroborados por Ribeiro et al. [21] para o biossurfactante de *Saccharomyces cerevisiae*, que quando aplicado na formulação de biscoitos também não apresentou toxicidade para as linhagens L929 e RAW 264.7 (macrófago de camundongo).

A avaliação da viabilidade de utilização do biossurfactante de *Candida bombicola* URM 3718 na formulação de um cupcake foi considerada positiva após a determinação de sua toxicidade para as linhagens celulares L929 e Vero, para concentrações de até 50 μ g/mL[30]. A citotoxicidade de um outro biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* MMC, demonstrou 63% de sobrevivência celular usando uma concentração de 10⁴ μ g/mL

do biossurfactante, diante da linhagem BHK-21(células de rim de filhote de hamster)[31]. Para o biossurfactante produzido por *Lactobacillus helveticus* também não foi observado potencial citotóxico contra a linhagem celular de L929 em concentrações de até 25×10^3 $\mu\text{g/mL}$ [32].

Atividade antioxidante do biossurfactante

A oxidação afeta a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos, podendo ocorrer desde o processamento até o armazenamento dos alimentos, resultando em deterioração do valor nutricional, cor, sabor, textura e segurança dos produtos alimentícios. O método mais eficaz, conveniente e econômico empregado para controlar a oxidação é o uso de antioxidantes [33]. A indústria de alimentos utiliza os antioxidantes para estabilizar os lipídios dos alimentos, pois esse é o composto mais sensível ao processo de oxidação [34]. Além da preservação dos alimentos, os antioxidantes também são usados em áreas relacionadas à saúde e bem-estar devido à sua capacidade de proteger o corpo contra danos oxidativos.

Os resultados da avaliação da capacidade oxidativa do biossurfactante após ensaios de capacidade antioxidante total (CAT), e eliminação de radical DPPH e radical ABTS, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Índice de capacidade antioxidante total (CAT) e de inibição oxidativa a partir da eliminação de radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e radical ABTS [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] em diferentes concentrações do biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP 1615. Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata

Concentração do biossurfactante (mg/mL)	CAT (%)	DPPH (%)	ABTS (%)
40,00	476,43 \pm 12,34	28,45 \pm 3,24	36,67 \pm 4,23
20,00	353,46 \pm 10,45	19,34 \pm 5,34	25,62 \pm 3,52
10,00	218,25 \pm 14,37	11,23 \pm 3,28	18,24 \pm 4,23
5,00	147,56 \pm 17,45	4,34 \pm 1,35	10,23 \pm 3,60
2,50	98,35 \pm 8,56	2,14 \pm 1,11	7,24 \pm 2,49
1,25	49,56 \pm 4,03	0,35 \pm 0,04	4,65 \pm 0,97
0,625	27,45 \pm 3,15	0,00 \pm 0,00	3,35 \pm 1,38
0,312	15,34 \pm 7,36	0,00 \pm 0,00	2,84 \pm 1,87

O biossurfactante apresentou resultados promissores em relação à técnica de redução do complexo fosfomolibdênio, quando comparados os percentuais da capacidade antioxidante total (CAT) do biossurfactante com a do ácido ascórbico na concentração de 1 mg/mL. A menor concentração (3,12 mg/mL) de biossurfactante apresentou índice de 15,34%. A partir de uma concentração de 2,5 mg/mL, o índice de oxidação passou de 100%, chegando a valores de 476,43% com 40mg/mL. Percebe-se uma tendência linear do aumento da atividade antioxidante com o aumento das concentrações de biossurfactante.

Considerando-se que 1%, valor que equivale a 10mg/mL, foi a concentração máxima do biossurfactante testada neste trabalho para a aplicação na formulação de biscoitos, e que nesta concentração a CAT foi de 218,25%, o uso do biossurfactante demonstrou potencial para proteção da oxidação em alimentos. A presença de atividade oxidante total neste estudo corrobora com os índices para biossurfactantes de *Candida bombicola* [30] e *Saccharomyces cerevisiae* [21], avaliados também para uso em alimentos.

Na avaliação da capacidade do biossurfactante em prevenir a redução do radical DPPH, os índices foram baixos, mesmo para a maior concentração testada (40 mg/mL), prevenindo apenas 28,45% da oxidação (Tabela 3). Já a avaliação da atividade antioxidante diante do método de sequestro do cátion radical do ABTS, exibiu índice de 36,67% para 40mg/mL do biossurfactante. Dessa forma, o biossurfactante estudado não apresenta potencial antioxidante suficiente para ser utilizado como único agente antioxidante em uma formulação.

Capacidade emulsificante

A estabilidade é um indicador importante para medir o valor comercial de produtos alimentícios à base de emulsões água-óleo. No entanto, estas emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis devido à alta área interfacial da fase dispersa [35]. A organização estrutural dos surfactantes e sua natureza anfifílica os capacita como emulsificantes de excelência para agir na interface óleo-água, promovendo aumento da estabilidade termodinâmica de sistemas instáveis; além disso, suas características os tornam capazes de interagir com carboidratos e proteínas de produtos alimentícios [36].

A escolha dos óleos vegetais para o teste de emulsificação seguiu o critério de relevância e aplicação na indústria de alimentos. O óleo de soja possui destaque na produção e consumo mundial, enquanto que os outros óleos selecionados possuem

propriedades benéficas e funcionais específicas interessantes para o consumo humano. O óleo de amendoim contém alto teor de vitamina E, o de canola tem menor teor de ácidos graxos saturados e contém ômega 3, enquanto o óleo de milho contém ácidos essenciais, sendo considerado de alta qualidade [37].

A capacidade emulsificante do biossurfactante de *B. cereus*, em diferentes concentrações, para os óleos vegetais, está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Índice de emulsificação (E_{24}) do biossurfactante de *B. cereus* UCP 1615 para diferentes óleos vegetais. Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata

Concentração do biossurfactante (%)	Óleos vegetais			
	Milho	Soja	Amendoim	Canola
1.00	64,5 \pm 1,1	56,0 \pm 1,0	68,1 \pm 0,0	65,8 \pm 1,5
0.50	65,9 \pm 1,4	54,0 \pm 0,0	62,7 \pm 1,7	64,4 \pm 1,6
0.25	42,1 \pm 1,1	47,7 \pm 1,3	53,5 \pm 1,5	36,0 \pm 2,0

Os resultados obtidos indicaram que o biossurfactante foi capaz de emulsificar satisfatoriamente os óleos estudados. O aumento na concentração do biossurfactante, conforme esperado, aumentou os percentuais de emulsificação. Os melhores índices foram observados para a concentração de 0.5% e 1%, com índices de emulsificação com valores entre 54-68%.

São poucos os estudos com biossurfactantes de *Bacillus* para emulsificação de óleos vegetais, ou mesmo com sua aplicação como bioemulsificante em alimentos. O estudo com *B. subtilis* ICA56 demonstrou um índice de emulsificação acima de 50% para óleo de soja [38]. Estudos com bioemulsificantes produzidos por espécies de *Candida albicans* demonstram índices de emulsificação em torno de 50% para óleos de amêndoa, mostarda, oliva e soja [39]. O bioemulsificante de *C. utilis* óleo, apresentou índices em torno de 30% para os óleos de milho e girassol em diferentes condições de pH e salinidade [40]. Já o biossurfactante produzido por *C. bombicola* apresentou índices de 56% para o óleo de milho, 51% para óleo de soja, 69% para óleo de amendoim e 50% para o óleo de canola [30]. Dessa forma, os resultados observados na literatura corroboram com os produzidos no presente estudo.

Caracterização dos biscoitos

As concentrações de biossurfactante escolhidas para esse estudo foram definidas baseadas nas concentrações máximas recomendadas para a maioria dos aditivos do tipo emulsionantes, autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil e pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA [41,42]. A Figura 1 ilustra os biscoitos após o assar. Os valores médios das propriedades físicas dos biscoitos (peso, diâmetro, espessura e fator de espalhamento) são apresentados na Tabela 5.

Figura 1. Biscoitos antes (1) e após a assar (2). (A): Formulação padrão; (B): Formulação A; (C): Formulação B; e (D): Formulação C.

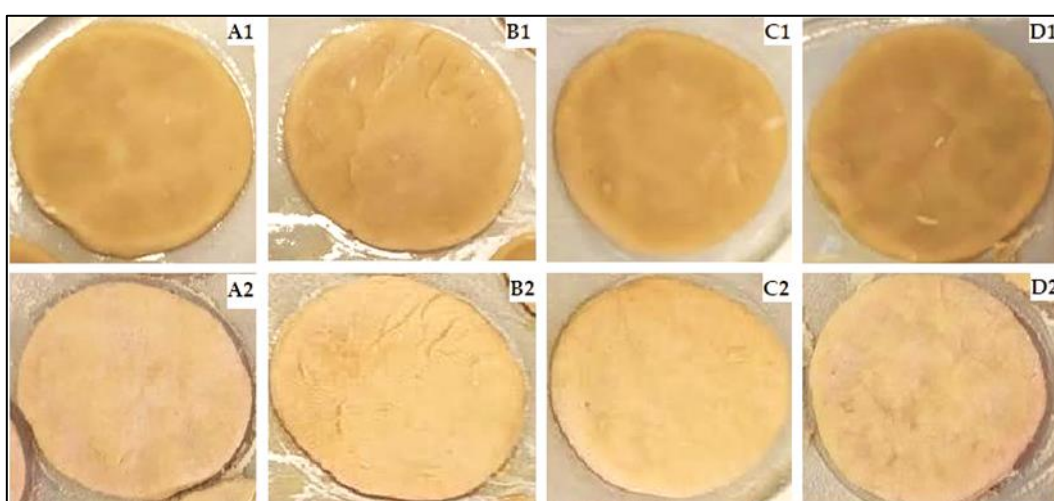


Tabela 5. Propriedades físicas dos biscoitos, depois de assar, da formulação padrão, formulação A (1 % de biossurfactante), formulação B (0.5% de biossurfactante) e formulação C (0.25% de biossurfactante). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata

Formulação	Peso (g)	Diâmetro (mm)	Altura (mm)	Fator de espalhamento
Padrão	5,85 \pm 0,02 ^a	48,66 \pm 0,31 ^a	6,42 \pm 0,15 ^a	7,59 \pm 0,19 ^a
A	4,88 \pm 0,25 ^b	48,87 \pm 0,40 ^a	5,79 \pm 0,14 ^b	8,44 \pm 0,19 ^b
B	5,87 \pm 0,53 ^a	49,11 \pm 0,16 ^a	6,08 \pm 0,04 ^c	8,08 \pm 0,06 ^c
C	5,37 \pm 0,14 ^{ba}	50,18 \pm 0,09 ^b	6,50 \pm 0,16 ^{da}	7,72 \pm 0,18 ^{da}

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

Para complementar a observação dos dados feita pelo teste ANOVA, foi realizado o teste de *Turkey* que avaliou a diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a formulação

padrão e as demais formulações contendo concentrações do biossurfactante (A, B e C), em relação aos parâmetros (peso, diâmetro, altura e fator de espalhamento) avaliados. Os valores obtidos para cada propriedade, nas diferentes formulações, foram comparados estatisticamente tendo a formulação padrão como valor de referência. A diferença significativa está representada pela presença das letras (a,b,c,d) sobrescritas nos valores de cada coluna (variáveis avaliadas).

Ao observar o parâmetro fator de espalhamento, pode-se observar que quanto maior a concentração de biossurfactante, maior o fator de espalhamento. Além dos benefícios na homogeneização da massa, a adição do biossurfactante de *B. cereus* UCP 1615 promoveu aumento na quantidade de lipídeos nos biscoitos, devido à presença de ácidos graxos em sua porção apolar, como comprovado em trabalhos [15]. Isso refletiu uma maior taxa de espalhamento (aumento de diâmetro) durante a cocção, o que provavelmente pode estar relacionado ao aumento da mobilidade do sistema quando a fração lipídica derrete.

A taxa de espalhamento influencia diretamente nos parâmetros diâmetro e altura, sendo assim é possível observar que a altura das formulações apresenta diferenças significativas entre si. Quanto maior o fator de espalhamento, menor a altura do biscoito. É interessante observar que a maior concentração de biossurfactante (formulação C), apresenta similaridade com o padrão, indicativo que a influência não está na quantidade do biossurfactante, e sim na interação dos ingredientes com o biossurfactante, demonstrando que a avaliação das concentrações em formulações se faz necessário.

A composição físico-química e o valor energético dos biscoitos assados estão apresentados na Tabela 6. Os valores obtidos para cada variável físico-química, nas diferentes formulações, foram comparados estatisticamente entre elas, sendo a formulação padrão considerada como valor de referência. A diferença significativa é representada pela presença das letras (a,b,c,d) sobrescritas nos valores de cada linha (variável). Este estudo é necessário para avaliar se a adição do biossurfactante manteve o padrão de identidade e qualidade pré-estabelecidos para o biscoito.

Tabela 6. Composição físico-química e valor energético dos biscoitos preparados com a formulação padrão, formulação A (1 % de biossurfactante), formulação B (0.5% de biossurfactante) e formulação C (0.25% de biossurfactante). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata

Variável	Formulação Padrão	Formulação A	Formulação B	Formulação C
Umidade (%)	6,35 \pm 0,04 ^a	5,44 \pm 0,06 ^{ba}	4,87 \pm 0,06 ^{cb}	5,87 \pm 1,24 ^{cba}
Cinzas (%)	1,60 \pm 0,08 ^a	1,92 \pm 0,07 ^{db}	1,74 \pm 0,17 ^{ba}	1,66 \pm 0,01 ^{cba}
Lipídeos (%)	11,1 \pm 0,13 ^a	13,83 \pm 0,82 ^b	11,69 \pm 0,69 ^a	11,47 \pm 0,31 ^a
Proteínas (%)	1,07 \pm 0,00 ^a	1,02 \pm 0,06 ^b	1,07 \pm 0,00 ^a	1,07 \pm 0,00 ^a
Carboidratos (%)	87,83 \pm 0,13 ^a	85,14 \pm 0,88 ^b	87,74 \pm 0,69 ^a	87,47 \pm 0,31 ^a
Valor Energético (cal)	455,52 \pm 0,67 ^a	469,17 \pm 4,10 ^b	455,97 \pm 3,46 ^a	457,33 \pm 1,56 ^a

^{a,b,c,d}Letras diferentes na mesma linha denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

Pode-se observar que houve uma redução de até 24% para os valores da umidade na formulação B, quando comparados com o valor da formulação padrão. Sendo assim, a utilização do biossurfactante é bastante promissora, visto que pode influenciar na durabilidade do biscoito, uma vez que a diminuição da umidade reduz as condições para proliferação de micro-organismos. O teor de cinzas só apresentou diferença significativa, em torno de 20%, quando a maior concentração do biossurfactante foi utilizada.

Considerando que 78% dos ácidos graxos da composição do biossurfactante são insaturados e essenciais [15], sugere-se que sua adição não compromete os aspectos nutricionais do biscoito. A composição bioquímica do biossurfactante de *B. cereus* UCP 1615 refletiu diretamente na quantidade de lipídeos nos biscoitos, promovendo um aumento destes na formulação A em relação às demais, e no aumento proporcional no valor energético dos biscoitos.

Um cupcake e um biscoito produzidos utilizando um biossurfactante do tipo glicolípido em sua composição, também apresentaram o mesmo aumento calórico [21,30]. O teor de proteína não foi afetado, o que pode estar relacionado à baixa concentração de proteína no biossurfactante.

Perfil de Textura

Os estudos do perfil de textura de alimentos começaram pela necessidade de uma maior compreensão da sensibilidade sensorial humana em relação aos alimentos, e com o passar do tempo, adquiriram mais relevância devido à necessidade da presença de ingredientes funcionais e tecnologias inovadoras que melhorassem a textura, para garantir a qualidade, em atendimento à preferência dos consumidores [43].

Na Tabela 7 encontra-se a Análise do Perfil de Textura (TPA) dos biscoitos após a adição do biossurfactante. Os valores obtidos para cada componente da textura, nas diferentes formulações, foram comparados estatisticamente entre elas, sendo a formulação padrão utilizada como valor de referência. A comparação das características que compõe a textura, em cada tempo, tem a diferença significativa representada pela presença das letras (a,b,c,d) sobrescritas nos valores de cada componente analisado. Já a diferença apresentada pelos biscoitos antes e depois da estocagem por 120 dias é simbolizada por um asterisco (*). Sendo assim, observou-se, através das análises do método de *Turkey*, que a adição do biossurfactante não causou alteração significativa na maioria das variáveis (firmeza, coesividade e elasticidade) analisadas.

Tabela 7. Análise do Perfil de Textura (TPA) da massa com 24 horas e 120 dias pós assada, para as formulações: padrão, A (1% de biossurfactante), B (0,5% de biossurfactante) e C (0,25% de biossurfactante). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata

Formulação	Firmeza (N)		Coesividade (mm)		Elasticidade (mm)	
	24h	45d	24h	45d	24h	45d
Padrão	2133,70 $\pm 570,75^a$	2440,30 $\pm 94,80^a$	0,34 $\pm 0,03^a$	0,49 $\pm 0,03^{a*}$	0,40 $\pm 0,00^a$	0,60 $\pm 0,00^a$
A	2827,70 $\pm 82,59^a$	1882,00 $\pm 63,32^{a*}$	0,31 $\pm 0,04^{ba}$	0,42 $\pm 0,06^a$	0,63 $\pm 0,12^b$	0,63 $\pm 0,06^a$
B	4557,00 $\pm 566,77^b$	2310,00 $\pm 763,42^{a*}$	0,45 $\pm 0,03^{ca}$	0,52 $\pm 0,02^{a*}$	0,60 $\pm 0,00^{cb}$	0,57 $\pm 0,06^a$
C	3234,70 $\pm 236,90^a$	1969,30 $\pm 278,44^{a*}$	0,49 $\pm 0,07^c$	0,42 $\pm 0,06^a$	0,63 $\pm 0,06^{cb}$	0,63 $\pm 0,06^a$

^{a,b,c,d}Letras diferentes na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$, teste de Tukey).

* Na mesma linha denotam diferenças significativas ($p \leq 0,05$, teste de Tukey), após armazenamento.

As similaridades entre os resultados observados para as diferentes formulações são importantes para manter as características típicas de um biscoito tipo cookie, e o

bioemulsificante utilizado demonstrou ser eficiente, atuando na melhoria das propriedades avaliadas quando se comparam os resultados obtidos com os apresentados pela formulação padrão. Destaca-se uma diferença considerável na firmeza do biscoito da formulação B, principalmente em relação à formulação padrão, fato que permite inferir que nesta concentração houve a promoção da crocância, com aumento significativo também da coesão e elasticidade, características que promovem melhor mastigabilidade.

Zouri et al. [27], relataram que a adição do biossurfactante *B. subtilis* a 0,1% em uma formulação de biscoito promoveu a melhoria significativa no perfil da textura da massa, sendo a ação deste bioemulsificante mais pronunciada do que a de um emulsificante comercial (glicerol monoestearato). Numa formulação de muffin apresentada por Kiran et al. [44] em que um lipopeptídeo foi incorporado em uma concentração de 0,75%, do produto, observou-se uma melhora na suavidade final devido ao aumento da elasticidade e coesão, bem como a diminuição da firmeza.

Na literatura encontram-se outros relatos sobre o potencial de biossurfactantes microbianos [1,3,45]; contudo, são poucos exemplos de aplicação em formulações de produtos para consumo humano. Entre esses estudos, pode-se citar a adição ou substituição de bioemulsionantes microbianos em formulações de maioneses [46], e recentemente na de cupcakes [30] e biscoitos [21].

A menor concentração de biossurfactante (formulação C), não promoveu alteração significativa no perfil de textura em relação ao padrão. Contudo, ao contrário do padrão, a coesão manteve-se após 45 dias de armazenamento. Campos et al. [40] observaram que o uso de um bioemulsificante produzido por *Candida utilis* na concentração de 0,7% ofereceu maior estabilidade e firmeza, para uma formulação de molho de salada, após 30 dias de armazenamento, sendo considerado um bom emulsionante comparando com outros comerciais (goma Guar e carboximetilcelulose).

Para a produção de alimentos, deve ser considerada a vida útil das emulsões durante o armazenamento a longo prazo para garantir a qualidade invariável dos produtos alimentícios. Estudos mostraram que as composições de fase oleosa e tipos de emulsificantes têm efeitos significativos na estabilidade a longo prazo e nas propriedades sensoriais, por exemplo: espalhabilidade, viscosidade, aparência [35].

Como o biossurfactante não teve efeito negativo significativo, sob ponto de vista estatístico, no perfil de textura do biscoito, pode ser considerado um ingrediente potencial para a indústria alimentícia. Uma avaliação simples do aroma, sabor, cor e textura não

revelou diferenças significativas entre as formulações contendo o biossurfactante e a formulação padrão. Contudo, são necessários testes de avaliação sensorial, e a adição do biossurfactante em outras formulações de produtos farináceos para determinar se a biomolécula pode ser incorporada a outros alimentos sem comprometer as características desejadas com o objetivo de ampliar as aplicações desse biossurfactante.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o biossurfactante produzido em meio contendo óleo de fritura apresenta potencial para uso como biomulsificante em sistemas alimentares. O biossurfactante não é tóxico, o que sugere seu uso seguro, e possui considerável atividade antioxidante. A utilização do biossurfactante como integrante do produto farináceo mostra resultados promissores em relação às propriedades físicas, físico-químicas e texturais dos biscoitos formulados. Contudo, outros estudos são necessários para viabilizar economicamente a produção deste surfactante microbiano em escala industrial para utilização como emulsificante em alimentos.

Contribuições do autor: Conceptualização, L.A.S.; metodologia, I.J.B.D., B.G.R.; J.S.A. e B.O.V.; validação, L.A.S.; A.C. e R.D.R.; análise formal, L.A.S.; investigação, I.J.B.D. e B.G.R.; recursos, L.A.S.; curadoria de dados, I.J.B.D., B.G.R. e R.D.R.; escrita - preparação do rascunho original, I.J.B.D. e R.D.R.; redação - revisão e edição, L.A.S. e A.C.; visualização, L.A.S. e A.C.; supervisão, L.A.S.; administração do projeto, L.A.S.; financiamento, L.A.S.; aquisição, L.A.S.; e R.D.R. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Este estudo foi financiado pelas agências de fomento brasileiras à Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código Financeiro 001)

Agradecimentos: Os autores agradecem aos Laboratórios da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brasil.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro, B.G.; Guerra, J.M.C.; Sarubbo, L.A. Biosurfactants: Production and Application Prospects in the Food Industry. *Biotechnol. Prog.* **2020**, 1–16, doi:10.1002/btpr.3030.

2. Durval, I.J.B.; da Silva, I.A.; Sarubbo, L.A. Application of Microbial Biosurfactants in the Food Industry. In *Microbial Biosurfactants. Environmental and Microbial Biotechnology*; Inamuddin, Ahamed, M.I., Prasad, R., Eds.; Springer: Singapore, 2021; Vol. 112, pp. 1–10, doi: 10.1007/978-981-15-6607-3_1.
3. Sałek, K.; Euston, S.R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochem.* **2019**, *85*, 143–155, doi:10.1016/j.procbio.2019.06.027.
4. Nitschke, M.; Silva, S.S. e. Recent food applications of microbial surfactants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, *58*, 631–638, doi:10.1080/10408398.2016.1208635.
5. Liu, K.; Sun, Y.; Cao, M.; Wang, J.; Lu, J.R.; Xu, H. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *45*, 57–67, doi:10.1016/j.cocis.2019.12.005.
6. Drakontis, C.E.; Amin, S. Biosurfactants: Formulations, properties, and applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2020**, *48*, 77–90, doi:10.1016/j.cocis.2020.03.013.
7. Farias, C.B.B.; Almeida, F.C.G.; Silva, I.A.; Souza, T.C.; Meira, H.M.; Soares da Silva, R. de C.F.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Converti, A.; Banat, I.M.; et al. Production of green surfactants: Market prospects. *Electron. J. Biotechnol.* **2021**, *51*, 28–39, doi:10.1016/j.ejbt.2021.02.002.
8. Geissler, M.; Heravi, K.M.; Henkel, M.; Hausmann, R. Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus* Species. In *Biobased Surfactants*; Elsevier, 2019; pp. 205–240, doi: 10.1016/B978-0-12-812705-6.00006-X.
9. Carolin C, F.; Kumar, P.S.; Ngueagni, P.T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *407*, 124827, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124827.
10. Markande, A.R.; Patel, D.; Varjani, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresour. Technol.* **2021**, *330*, 124963, doi:10.1016/j.biortech.2021.124963.
11. Santos, F.F. dos; Freitas, K.M.L. de; Pereira, A. da S.; Fontes-Sant’Ana, G.C.; Rocha-Leão, M.H.M. da; Amaral, P.F.F. Butter whey and corn steep liquor as sole raw materials to obtain a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica* for food oil-in-water emulsions. *Ciência Rural* **2021**, *51*, 1–12, doi:10.1590/0103-8478cr20200323.
12. Foo, W.H.; Chia, W.Y.; Tang, D.Y.Y.; Koay, S.S.N.; Lim, S.S.; Chew, K.W. The conundrum of waste cooking oil: Transforming hazard into energy. *J. Hazard. Mater.*

- 2021, 417, 126129, doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126129.
13. OECD-FAO. *OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028*, 15th ed.; OECD Publishing: Paris, France, 2019, pp. 1-140, doi:10.1787/agr_outlook-2019-en.
 14. Freitas Ferreira, J. de; Vieira, E.A.; Nitschke, M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 737–744, doi:10.1016/j.foodres.2018.09.005.
 15. Durval, I.J.B.; Mendonça, A.H.R.; Rocha, I. V.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Converti, A.; Sarubbo, L.A. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, *157*, 111357, doi:10.1016/j.marpolbul.2020.111357.
 16. Alley, M.C.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Hursey, M.; Czerwinski, M.J.; Fine, D.L.; Abbott, B.J.; Mayo, J.G.; Shoemaker, R.; Boyd, M.R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 584–588.
 17. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 18. Rodrigues, F.A.R.; Bomfim, I. da S.; Cavalcanti, B.C.; Pessoa, C.; Goncalves, R.S.B.; Wardell, J.L.; Wardell, S.M.S. V.; de Souza, M.V.N. Mefloquine-Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83*, 126–131, doi:10.1111/cbdd.12210.
 19. Prazeres, L.D.K.T.; Aragão, T.P.; Brito, S.A.; Almeida, C.L.F.; Silva, A.D.; De Paula, M.M.F.; Farias, J.S.; Vieira, L.D.; Damasceno, B.P.G.L.; Rolim, L.A.; et al. Antioxidant and Antiulcerogenic Activity of the Dry Extract of Pods of *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. (Fabaceae). *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/1983137.
 20. Veras, B. de O.; Oliveira, M.B.M. de; Oliveira, F.G. da S.; Santos, Y.Q. dos; Oliveira, J.R.S. de; Lima, V.L. de M.; Almeida, J.R.G. da S.; Navarro, D.M. do A.F.; Aguiar, J.C.R. de O.F. de; Aguiar, J. dos S.; et al. Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *247*, doi:10.1016/j.jep.2019.112265.
 21. Gaur, V.K.; Regar, R.K.; Dhiman, N.; Gautam, K.; Srivastava, J.K.; Patnaik, S.;

- Kamthan, M.; Manickam, N. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresour. Technol.* **2019**, 285, 121314, doi:10.1016/j.biortech.2019.121314.
22. Ribeiro, B.G.; Guerra, J.M.C.; Sarubbo, L.A. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. *Front. Bioengineering Biotechnol.* **2020**, 8, 1–13, doi:10.3389/fbioe.2020.00434.
23. Aziah, A.A.N.; Noor, A.Y.M.; Ho, L.H. Physicochemical and organoleptic properties of cookies incorporated with legume flour. *Int. Food Res. J.* **2012**, 19, 1539–1543, doi:10.1080/23311932.2016.1172389.
24. Mudgil, D.; Barak, S.; Khatkar, B.S. Cookie texture, spread ratio and sensory acceptability of cookies as a function of soluble dietary fiber, baking time and different water levels. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**, 80, 537–542, doi:10.1016/j.lwt.2017.03.009.
25. Feldsine, P.; Abeyta, C.; Andrews, W.H. AOAC International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. *J. AOAC Int.* **2002**, 85, 1187–1200, doi:10.1093/jaoac/85.5.1187.
26. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37.
27. Pires, T.C.S.P.; Dias, M.I.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R. Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: Valorization as new food ingredients. *Food Chem.* **2017**, 220, 337–343, doi:10.1016/j.foodchem.2016.10.026.
28. Zouari, R.; Besbes, S.; Ellouze-Chaabouni, S.; Ghribi-Aydi, D. Cookies from composite wheat-sesame peels flours: Dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. *Food Chem.* **2016**, 194, 758–769, doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.064.
29. Tolosa, L.; Donato, M.T.; Gómez-Lechón, M.J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 1st ed.; Vinken, M., Rogiers, V. Eds.; Humana Press: New York, USA, 2015; Volume 1250, pp. 333–348, doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
30. Silva, J. de A.G.; da Silva, G.C.; Silva, M.G. de F.; da Silva, V.F.; Aguiar, J. dos S.; da Silva, T.G.; Leite, S.P. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae). *African J.*

- Pharm. Pharmacol.* **2017**, *11*, 321–326, doi:10.5897/AJPP2017.4798.
31. Silva, I.A.; Veras, B.O.; Ribeiro, B.G.; Aguiar, J.S.; Campos Guerra, J.M.; Luna, J.M.; Sarubbo, L.A. Production of cupcake-like dessert containing microbial biosurfactant as an emulsifier. *PeerJ* **2020**, *8*, e9064, doi:10.7717/peerj.9064.
 32. Basit, M.; Rasool, M.H.; Naqvi, S.A.R.; Waseem, M.; Aslam, B. Biosurfactants production potential of native strains of *Bacillus cereus* and their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2018**, *31*, 251–256.
 33. Sharma, D.; Saharan, B.S.; Chauhan, N.; Bansal, A.; Procha, S. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *Sci. World J.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/493548.
 34. Shahidi, F.; Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 757–781, doi:10.1016/j.jff.2015.01.047.
 35. Cömert, E.D.; Gökmen, V. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 76–93, doi:10.1016/j.foodres.2017.10.056.
 36. Zhu, Q.; Pan, Y.; Jia, X.; Li, J.; Zhang, M.; Yin, L. Review on the Stability Mechanism and Application of Water-in-Oil Emulsions Encapsulating Various Additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2019**, *18*, 1660–1675, doi:10.1111/1541-4337.12482.
 37. Satpute, S.K.; Zinjarde, S.S.; Banat, I.M. Recent Updates on Biosurfactants in the Food Industry. In *Microbial Cell Factories*; CRC Press: Boca Raton : Taylor & Francis, CRC Press, 2018., 2018; pp. 1–20.
 38. El-Hamidi, M.; Zaher, F.A. Production of vegetable oils in the world and in Egypt: an overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2018**, *42*, doi:10.1186/s42269-018-0019-0.
 39. França, Í.W.L. De; Lima, A.P.; Lemos, J.A.M.; Lemos, C.G.F.; Melo, V.M.M.; De Sant’ana, H.B.; Gonçalves, L.R.B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catal. Today* **2015**, *255*, 10–15, doi:10.1016/j.cattod.2015.01.046.
 40. Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Sarubbo, L.A. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. *Biodegradation* **2019**, *30*, 313–324, doi:10.1007/s10532-019-09877-8.
 41. ANVISA. Diário oficial da união - Resolução da diretoria colegiada - RDC N° 239, DE 26 DE JULHO DE 2018. Available online: <https://www.in.gov.br/materia/>

- /asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34380515 (Accessed on 25 June 2021.)
42. FDA Food Additive Status List | FDA. *U.S Food Drug Adm.* **2019**, 1–95.
 43. Chen, J.; Rosenthal, A. Food texture and structure. In *Modifying Food Texture: Novel Ingredients and Processing Techniques*; Elsevier Ltd., 2015; Vol. 1, pp. 3–24, doi: 10.1016/B978-1-78242-333-1.00001-2.
 44. Kiran, G.S.; Priyadharsini, S.; Sajayan, A.; Priyadharsini, G.B.; Poulouse, N.; Selvin, J. Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–11, doi:10.3389/fmicb.2017.01138.
 45. Anjum, F.; Gautam, G.; Edgard, G.; Negi, S. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 262–269, doi:10.1016/j.biortech.2016.02.091.
 46. Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Stamford, T.C.M.; Sarubbo, L.A. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicol. Reports* **2015**, *2*, 1164–1170, doi:10.1016/j.toxrep.2015.08.009.

CAPÍTULO 4

Utilização de biossurfactante na síntese verde de nanopartículas de prata para aplicação como agente antifúngico

Utilização de biossurfactante na síntese verde de nanopartículas de prata para aplicação como agente antifúngico

Italo José B. Durval^{1,4}, Hugo M. Meira^{2,4}, Raquel D. Rufino^{3,4}, L. A. Sarubbo^{2,4,*}

¹ Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil; italo.durval@gmail.com

² Icam Tech School, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil; leonie.sarubbo@unicap.br; hugo_morais15@hotmail.com

³ Escola de Saúde e Ciências da Vida, Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, CEP: 50050-900, Recife, Pernambuco, Brasil; raquel.rufino@unicap.br

⁴ Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Rua Potyra, n. 31, Prado, CEP: 50751-310, Recife, Pernambuco, Brasil; leonie.sarubbo@iati.org.br

Resumo

As nanopartículas de prata têm grande potencial em uma ampla gama de aplicações. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi sintetizar de forma simples e verde, pelo método de *Tollens*, nanopartículas de prata, utilizando como estabilizador o biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* UCP 1615. As nanopartículas obtidas foram identificadas e caracterizadas morfológicamente usando as técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Visível), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e potencial zeta. A máxima absorção de UV-visível observada foi em 400 nm para nanopartículas de prata recém-formadas, enquanto para nanopartículas de prata estocadas por 120 dias, o pico foi observado em 430 nm. A micrografia MEV confirmou a formação de nanopartículas, com estruturas predominantemente esféricas. O tamanho médio das nanopartículas formadas foi estimado em 20 nm. A presença do biossurfactante promoveu estabilidade, sendo observado um potencial zeta de - 23,4 mV. O potencial antimicrobiano das AgNPs foi avaliado em diferentes concentrações, contra três fungos patogênicos (*Aspergillus niger*, *Penicillium fellutanum* e *Cladosporium cladosporioides*). Até 100% de inibição para *Penicillium fellutanum* e 85% de inibição para *Aspergillus niger* foi observada na concentração de AgNPs de 16,50 µg/mL em meio ágar batata dextrose (PDA). Desta forma, observa-se o potencial de utilização do biossurfactante como estabilizador de nanopartículas de prata e sua aplicação como agente antimicrobiano.

Palavras-chave: surfactante microbiano; nanopartículas; materiais nanométricos; *Bacillus cereus*.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem crescendo em virtude da grande quantidade de aplicações eficazes em diversos setores, que vão desde técnicas químicas tradicionais às tecnologias medicinais e ambientais (AHMAD et al., 2019). Estipula-se que uma partícula é nano se o seu diâmetro for de 1 a 100 nanômetros (bilionésimo de metro), sendo inclusive nesta faixa encontradas as nanopartículas (NPs) consideradas mais práticas e eficazes, tradicionalmente sintetizadas por vias químicas (MOUSAVI et al., 2018). Entretanto, o tamanho das nanopartículas de prata (AgNPs), por exemplo, pode ser ajustado de acordo com a aplicação desejada, como no caso das AgNPs preparadas para a entrega do medicamento, que são maiores do que 100 nm para acomodar a quantidade de medicamento a ser entregue (LEE; JUN, 2019).

As AgNPs têm sido usadas em uma ampla variedade de aplicações, por apresentarem propriedades não tóxicas, inorgânicas e antibacterianas (ESWARI; DHAGAT; MISHRA, 2018). Devido a essas características, as AgNPs podem contribuir para diversas aplicações, como entrega de drogas, pomadas, nanomedicina, detecção química, armazenamento de dados, biologia celular, agricultura, cosméticos, têxteis, indústria de alimentos, atividade de degradação de corante orgânico fotocatalítico, antioxidantes e agentes antimicrobianos (AHMAD et al., 2019).

A razão do interesse do uso da prata na forma de nanopartículas, especialmente para aplicações médicas, é que na forma de sais de prata, a liberação da prata pode ser muito rápida e incontrolável, e na forma de metal a granel, a liberação é muito ineficiente (LE et al., 2010). Além disso, as NPs exibem área superficial notavelmente alta, para relação de volume e reatividade intrínseca, propriedades físico-químicas novas e distintas dos materiais convencionais (BEZZA; TICHAPONDWA; CHIRWA, 2020).

Segundo Desireddy et al. (2013), as AgNPs têm um potencial pouco explorado em comparação com nanopartículas de ouro relativamente estáveis. Estudos mostraram que as propriedades físicas, ópticas e catalíticas das AgNPs são fortemente influenciadas por seu tamanho, distribuição, forma morfológica (haste, triângulo, redondo, octaédrico, poliédrico, etc.) e propriedades de superfície que podem ser modificadas por diversos métodos sintéticos, agentes redutores e estabilizadores (LEE; JUN, 2019).

As NPs são compostas por três camadas: (1) a camada superficial, que pode ser funcionalizada com uma variedade de pequenas moléculas, íons metálicos, surfactantes e polímeros; (2) a camada de casca, que é um material quimicamente diferente do núcleo

em todos os aspectos; e o (3) o núcleo, que é essencialmente a parte central da NP e geralmente se refere ao próprio NP (KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

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

O conceito de síntese verde faz parte do princípio de economia/eficiência atômica da química verde, que apresenta metodologias que reduzem ou omitem o uso ou produção de matérias-primas, produtos, subprodutos, solventes, reagentes e assim por diante, que podem deteriorar significativamente a saúde humana e o meio ambiente (MOUSAVI et al., 2018). Estudos relatam a síntese verde de AgNPs usando produtos naturais como extratos de plantas, vitaminas, polímeros biodegradáveis, biossurfactantes e enzimas como agentes redutores e niveladores/estabilizadores (BEZZA; TICHAPONDWA; CHIRWA, 2020).

Entre as abordagens de síntese verde de nanopartículas de prata, tem -se o método de *Tollens*, onde os sacarídeos são usados para reduzir os íons de prata na presença de amônia (ESWARI; DHAGAT; MISHRA, 2018). Le et al. (2010) propôs associar a este método estabilizadores, entre eles surfactantes, para compor a camada superficial, núcleo externo, da NP. Como alternativa biológica e sustentável aos surfactantes químicos, pode-se utilizar os biossurfactantes, que além de estabilizadores, também podem atuar como um agente redutor (funcionalidade dupla) (JIMOH; LIN, 2019).

Biossurfactantes são compostos tensoativos com estruturas bioquímicas diversas produzidos por micro-organismos, podendo ser aplicados industrialmente em processos fermentativos, especialmente utilizando substratos imiscíveis em água como fontes nutricionais (BEZZA; TICHAPONDWA; CHIRWA, 2020). Eles apresentam vantagens sobre os similares químicos, como biocompatibilidade, baixa toxicidade, diversidade de aplicações e funcionalidade sob condições extremas (LIU et al., 2020).

Baseado nestes fatos, o objetivo deste trabalho foi produzir dispersões aquosas mais estáveis de AgNPs usando a técnica de *Tollens* modificada. As nanopartículas

produzidas também foram avaliadas quanto a sua capacidade fungicida diante de fungos patogênicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção e isolamento do biossurfactante

A bactéria *Bacillus cereus* UCP 1615, depositada no Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco, foi utilizada como micro-organismo produtor do biossurfactante. A bactéria *Bacillus cereus* UCP 1615, depositada no Banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco, foi utilizada como micro-organismo produtor do biossurfactante.

O biossurfactante lipopeptídico foi produzido por via fermentativa em meio mineral suplementado com óleo residual de fritura, conforme descrito por Durval et al. (2020). A bactéria foi cultivada adicionando 2% de suspensão de células (0,7 densidade óptica a 600 nm), correspondendo a um inóculo de 24 h de 10^7 unidades formadoras de colônias / mL, a um Erlenmeyer contendo 500 mL de um meio de sal mineral (0,087% K_2HPO_4 , 0,65% de trisaminometano, 0,02% de KCl, 0,06% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01% de NaCl e 0,005% de extrato de levedura) suplementado com 2% de óleo de soja para fritura de resíduos e 0,12% de peptona, com pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$. O cultivo foi conduzido por 48 h a $28^\circ C$ e 250 rpm.

O biossurfactante foi extraído e isolado do líquido metabólico livre de células, obtido após centrifugação do caldo de fermentação a $5000 \times g$ por 30 min para remover as células. Uma solução de HCl 6,0 M foi adicionada ao sobrenadante para ajustar o pH a 2,0, seguido pela adição de uma solução 2:1 (v / v) de $CHCl_3$ / CH_3OH . Após agitação manual vigorosa durante 15 min e separação das fases, a fase orgânica foi removida e a operação foi repetida mais duas vezes. As fases orgânicas foram reunidas e o biossurfactante isolado foi concentrado em um evaporador rotativo.

Síntese de nanopartículas de prata

Todos os reagentes apresentaram grau analítico e foram usados sem purificação adicional. A técnica utilizada foi adaptada de Le et al. (2010). Primeiramente, 1,7 g ($1,0 \times 10^{-2}$ mol) de nitrato de prata ($AgNO_3$) foi dissolvido em 100 mL de água deionizada. A solução de $AgNO_3$ foi então precipitada com 0,62 g ($1,55 \times 10^{-2}$ mol) de hidróxido de sódio. O precipitado obtido, composto de Ag_2O , foi filtrado e dissolvido em 100 mL de

amônia aquosa (NH₃) (0,4% p/p, $2,3 \times 10^{-2}$ mol) até uma solução transparente de complexo de prata-amônio, [Ag(NH₃)₂]⁺ (aquoso), ser formada. Em seguida, 2,5 g ($8,9 \times 10^{-3}$ mol) do biossurfactante isolado (BS) foram adicionados gota a gota ao complexo e a solução resultante foi agitada suavemente por 2 h em temperatura ambiente até a obtenção de uma mistura homogênea. Finalmente, 2 g ($1,11 \times 10^{-2}$ mol) de glicose foram adicionados à mistura em temperatura ambiente com agitação suave.

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

Propriedades e características das nanopartículas de prata

A propriedade absorptiva da suspensão de BS-AgNP foi analisada usando espectroscopia UV-visível, no tempo zero e após 120 dias de estocagem. As amostras foram observadas na faixa de comprimento de onda entre 320 e 700 nm. Enquanto o potencial zeta, e conseqüentemente a estabilidade das nanopartículas em suspensão, foi determinado utilizando o equipamento Zeta-Meter 4.0.

A análise preliminar da morfologia e do tamanho das nanopartículas de prata sintetizados foram feitas através de um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM-5600), utilizando uma tensão de aceleração de 30 KV. Antes da análise, uma pequena alíquota da suspensão de nanopartículas foi depositada na superfície de uma fita de carbono, secas em temperatura ambiente e posteriormente uma fina camada de revestimento de platina foi feita para tornar as amostras condutoras.

Determinação da atividade antifúngica das nanopartículas

Três espécies de fungos (*Aspergillus niger* UFPEDA 5117, *Penicillium fellutanum* UFPEDA 6472 e *Cladosporium cladosporioides* UFPEDA 6703) foram obtidas na Coleção de Culturas de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos

da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Os três gêneros dos fungos utilizados são conhecidos como patógenos em vegetais e em humanos.

O ensaio *in vitro* para atividade antifúngica foi realizado com meio de crescimento fúngico BDA (Agar Dextrose Batata) com soluções de nanopartículas de prata sintetizadas adicionadas. Foram adicionados 200 µL da solução das nanopartículas de prata com objetivo de obter as concentrações finais de nanopartículas de prata de cerca de 1,65 µg/L, 8,25 µg/L, 16,50 µg/L por placa de Petri. Após o preparo das placas Foi inoculado o fungo, e as placas foram incubadas a 30 ° C por 48 h, e o tamanho dos halos de inibição foram registrados (JOANNA et al., 2018).

O crescimento radial do micélio fúngico foi medido e registrado após o período de incubação dos fungos em diferentes meios de cultura contendo diferentes concentrações de BS-AgNPs. A seguinte equação foi usada para o cálculo da taxa de inibição (%).

$$\text{Taxa de inibição (\%)} = R - r / R$$

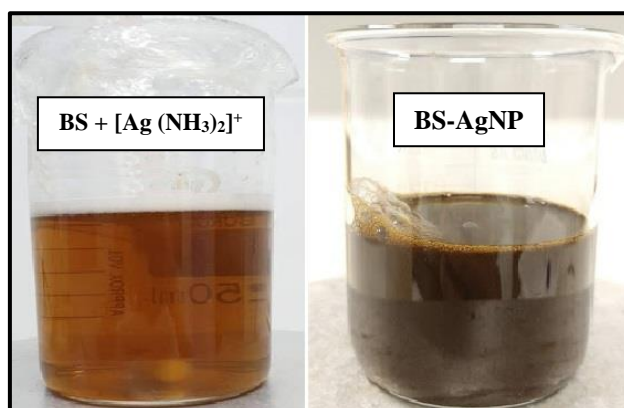
onde “R” é o crescimento radial de micélios fúngicos na amostra da placa de controle e “r” é o crescimento radial de micélios fúngicos na placa contendo BS-AgNP (TYAGI et al., 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das nanopartículas de prata sintetizadas

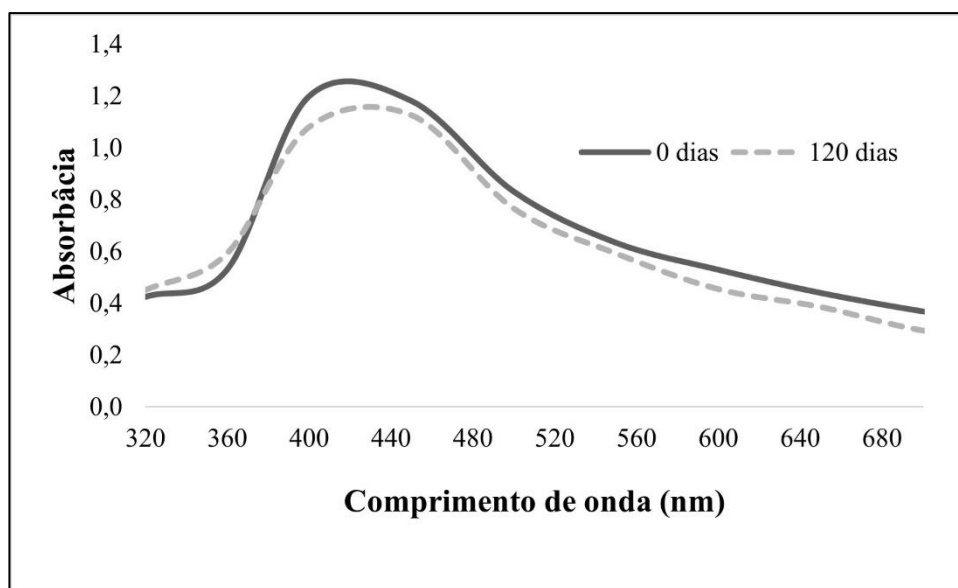
A observação da síntese das nanopartículas foi realizada segundo Tyagi et al. (2020) através da mudança de cor da solução (Figura 1).

Figura. 1. Mudança na cor da solução após o processo de redução da solução do complexo de prata, mostrando a formação das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNPs).



A Figura 2 apresenta a confirmação da produção da nanopartícula através da presença de um pico máximo de absorção característico de nanopartículas de prata, entre 400 e 450 nm, obtido por espectrofotometria de luz UV-visível, correspondente à ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) (TYAGI et al., 2020).

Figura 2. Espectro de UV-visível das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNPs), com 0 e 120 dias de formadas.



As NPs feitas de metais de cunhagem têm às suas propriedades ópticas únicas provenientes do comportamento específico sob irradiação de luz, ou seja, o aparecimento da LSPR (PRYSHCHEPA; POMASTOWSKI; BUSZEWSKI, 2020). Garcia (2011) destaca que a principal característica da LSPR em NPs é que a oscilação dos elétrons excitados é limitada pelo volume dos NPs. Sendo assim, a assinatura espectral UV-vis serve para avaliar a presença, uniformidade e tamanho das AgNPs estabilizadas com o biossurfactante.

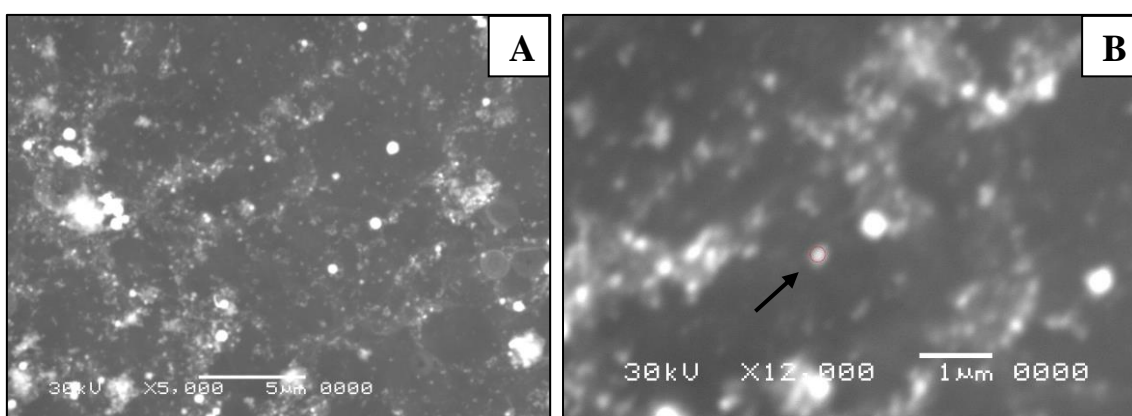
O pico de absorção plasmônico, decorrente da LSPR característico das NPs, é observado na BS-AgNP recém sintetizada, próximo aos 400 nm, assim como em um estudo com AgNP estabilizada com lipopeptídeo de *Bacillus subtilis* crescido em óleo de girassol. Neste, se definiu o diâmetro das nanopartículas de prata coloidal em aproximadamente 20 nm (BEZZA; TICHAPONDWA; CHIRWA, 2020). NPs esféricas de prata, apresentam a banda de luz de absorção LSPR normalmente próximo de 400 nm, indicativo que possibilita inferir que as BS-AgNPs possuem este formato (ELAKKIYA et al., 2020). Já o pico observado após 120 dias, está próximo de 440nm; este, por sua

vez, corrobora com a AgNP estabilizada com rhamnolípídeo produzido por *Pseudomonas auroginosa*, que apresentou o pico característico em 428 nm e tamanho da partícula em torno de 160 nm (ELAKKIYA et al., 2020).

Conforme ilustrado na Figura 2, o pico máximo de absorção de BS-AgNPs deslocou-se de 400 para 440 nm após 120 dias de estocagem. A mudança do pico máximo é um indicativo do aumento do tamanho do diâmetro das nanopartículas. Esse aumento no tamanho das partículas pode ser um exemplo do fenômeno de amadurecimento de Ostwald, no qual as partículas menores em solução perdem estabilidade e se reorganizam em partículas maiores, com objetivo de atingir mais estabilidade termodinâmica, fazendo com que a razão entre a superfície e a área seja minimizada (GOMMES, 2019).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para avaliar a morfologia das nanopartículas. As medidas de diâmetro aferidas por MEV possibilitou estimar o diâmetro real das nanopartículas (Figura 3).

Figura 3. Figuras de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas sintetizadas com o biossurfactante (BS-AgNP). Figura 3A: ampliação de 5kx; figura B: ampliação de 12kx vezes.



Na observação da solução de BS-AgNP com uma ampliação de 5000 vezes (Figura 3A) no MEV, pontos com aglomeração de NP são vistos, os quais atrapalham a caracterização do tamanho da partícula; contudo, quando ampliado 12000 vezes, observa-se (seta indicativa, Figura 3B) a AgNP não agregada e arredondada com diâmetro aproximado de 160 nm. Isso quer dizer que as partículas não foram completamente separadas umas das outras e exibem alta área de superfície e formam aglomerados (NEHAL; SINGH, 2021).

O MEV de Elakkiya et al. (2020) com AgNP sintetizada com biossurfactante retratou alta densidade de estruturas com faixa de diâmetro de 30-150 nm, além de também observar uma distribuição aleatória de partículas de prata nas amostras. O aspecto arredondado corrobora com o fato de que NPs esféricas de prata possuem a banda de luz de absorção LSPR normalmente próximo a 400 nm (PRYSHCHEPA; POMASTOWSKI; BUSZEWSKI, 2020).

A estabilidade coloidal foi observada através do potencial Zeta das NPs, determinado em $-23,4 \text{ mV} \pm 1,4$. Este valor de potencial zeta é distante de zero; sendo assim, apresenta uma maior repulsão eletrostática entre as partículas, resultando em menos chances de ocorrer agregação ou precipitação.

No trabalho publicado por Nehal e Singh (2020), um extrato livre de células, rico em lipopeptídeos, obtido pela fermentação de *Bacillus paramycoides* em meio suplementado com óleo de oliva, foi adicionado à solução de AgNO_3 e boro-hidreto de sódio (NaBH_4). No final do processo químico gerou-se nanossuspensões estáveis de potencial zeta com pico ótimo em $-38,7 \text{ mV}$. Outro trabalho, utilizando metodologia similar só que com rhamnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* obteve valor de $-31,6 \text{ mV}$ (ELAKKIYA et al., 2020).

Já em um estudo, também com rhamnolipídeo de *P. aeruginosa*, mas que formou a AgNP através da reação dele com AgNO_4 com solução em pH 12, demonstrou-se o aumento da estabilidade com o potencial, passando de $-23,8 \text{ mV}$ para $-56,3 \text{ mV}$ quando utilizado o biossurfactante (KHALID et al., 2019).

Determinação da atividade antifúngica

Muitos fungos filamentosos patógenos de plantas e de seres humanos podem causar danos devastadores à agricultura, bem como, doenças potencialmente fatais em seres humanos (SHANG et al., 2016; SHEPHARD, 2016). Na agricultura provocam redução no rendimento das colheitas, perda na porcentagem de germinação, desenvolvimento de descoloração e deformação por doenças das plantas e alteração bioquímica na semente. Em humanos, os danos à saúde estão muitas vezes associados a ação desses micro-organismos de forma direta ou com a ingestão de compostos químicos tóxicos e micotoxinas produzidos por eles (TOLA; KEBEDE, 2016).

Por esses motivos, o presente trabalho avaliou o potencial fungicida da nanopartícula de prata, contra fungos de gêneros conhecidos pela sua patogenicidade para

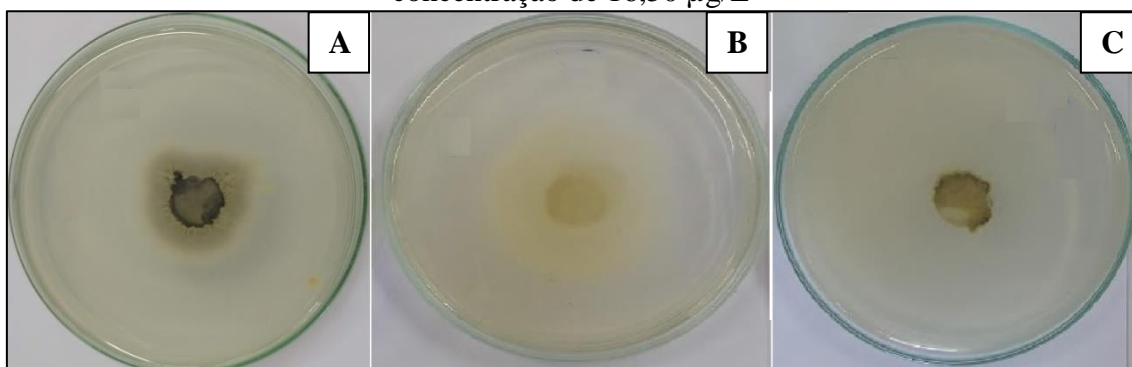
humanos e vegetais. A Tabela 1 ilustra a taxa de inibição (%) de *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium fellutanum* promovida pela adição de diferentes concentrações BS-AgNPs no meio de crescimento BDA (Agar Batata Dextrose).

Tabela 1: Taxa de inibição (%) causada por nanopartículas de prata sintetizada com biossurfactante (BS- AgNPs) contra *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium fellutanum* em meio BDA (Agar Batata Dextrose). Dados expressos como média \pm D.P. de determinações em triplicata.

Concentração da BS-AgNP ($\mu\text{g/L}$)	Taxa de inibição (%)		
	<i>A. niger</i>	<i>C. cladosporioides</i>	<i>P. fellutanum</i>
1,65	74,20 \pm 1,51	41,48 \pm 4,19	97,78 \pm 0,00
8,25	78,70 \pm 0,68	66,67 \pm 0,00	97,78 \pm 0,00
16,50	85,78 \pm 2,65	65,50 \pm 1,65	100,00 \pm 0,00

A inibição observada contra *P. fellutanum* destaca-se por ser próxima a 100% nas diferentes concentrações, tendo inibição absoluta com 16,50 $\mu\text{g/L}$ de BS-AgNP. Os níveis mais baixos de inibição, entre 41,48% e 66,67%, foram observados para *C. cladosporioides*. Por outro lado, o aumento de inibição com 85,78% foi observado para *A. niger*, na maior concentração do BS-AgNP, e de 74,20% na menor concentração. Observou-se que à medida que a concentração de nanopartículas no meio de crescimento aumenta, a porcentagem da taxa de inibição do crescimento do fungo aumenta em todas as condições. O halo de inibição promovido pela maior concentração da BS-AgNP é visualizado na Figura 4.

Figura 4. Halo de inibição dos micélios dos fungos *Aspergillus niger* (A), *Cladosporium cladosporioides* (B) e *Penicillium fellutanum* (C) em meio BDA (Agar Batata Dextrose) contendo nanopartículas de prata sintetizadas com biossurfactante na concentração de 16,50 $\mu\text{g/L}$



Um estudo que avaliou a taxa inibitória promovida por uma nanopartícula de prata, sintetizada por método verde, contra os fitopatógenos *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, e *Fusarium spp* apresentou inibição acima de 90% para todos os fungos em meio BDA na maior concentração da nanopartículas (25 µ/mL) (TYAGI et al., 2020). Uma AgNPs biossintetizada por uma bactéria endolítica mostrou forte atividade antifúngica contra o patógeno *Fusarium graminearum*, com valores acima de 50% em concentrações entre 10 e 20 µ/mL, o que se atribuiu, pelo menos parcialmente, à inibição na germinação de esporos, crescimento do tubo germinativo, produção de micotoxinas e danos às membranas celulares (IBRAHIM et al., 2020).

Outro estudo, que sintetizou a AgNP por via ecológica com tetrafosfato de luteolina com função de agente redutor e estabilizador, relacionou o tamanho das nanopartículas (9 – 21nm) a atividade antimicrobiana contra patógenos vegetais, observando que quanto menor o diâmetro da NP, maior a eficiência (OSONGA et al., 2020).

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

CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou êxito na síntese verde de uma nanopartícula de prata, utilizando biossurfactante como agente estabilizador, através do método de *Tollens*. Foi observado que os BS-AgNPs apresentaram estabilidade ao longo de 120 dias, mesmo tendo sido observado um possível aumento do tamanho das nanopartículas com o tempo. As AgNPs, numa avaliação preliminar, são esféricas e uniformes. Além disso, pode-se concluir que em termos de atividade antifúngica, as nanopartículas apresentaram efeito inibitório, sendo este dependente da dose de AgNPs. Portanto, pode-se concluir que biossurfactantes têm potencial de uso como estabilizadores de nanopartículas através de um processo de síntese ecológico.

Agradecimentos Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES- Código Financeiro 001). Os

autores agradecem à Icam Tech School da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) e ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI), Brasil.

Conflito de interesse: Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, T. M. et al. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. **BioNanoScience**, v. 8, n. 1, p. 5–16, 2018.

AHMAD, S. et al. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 5087–5107, jul. 2019.

BEZZA, F. A.; TICHAPONDWA, S. M.; CHIRWA, E. M. N. Synthesis of biosurfactant stabilized silver nanoparticles, characterization and their potential application for bactericidal purposes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 393, n. October 2019, p. 122319, 2020.

DESIREDDY, A. et al. Ultrastable silver nanoparticles. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 399–402, 2013.

DURVAL, I. J. B. et al. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, n. September 2018, p. 111357, ago. 2020.

ELAKKIYA, V. T. et al. Swift production of rhamnolipid biosurfactant, biopolymer and synthesis of biosurfactant-wrapped silver nanoparticles and its enhanced oil recovery. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 7, p. 1892–1899, 2020.

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

GARCIA, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 44, n. 28, 2011.

GOMMES, C. J. Ostwald ripening of confined nanoparticles: Chemomechanical coupling in nanopores. **Nanoscale**, v. 11, n. 15, p. 7386–7393, 2019.

IBRAHIM, E. et al. Green-synthesization of silver nanoparticles using endophytic bacteria isolated from garlic and its antifungal activity against wheat fusarium head blight pathogen fusarium graminearum. **Nanomaterials**, v. 10, n. 2, 2020.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, n. June, p. 109607, 2019.

JOANNA, C. et al. A nonspecific synergistic effect of biogenic silver nanoparticles and biosurfactant towards environmental bacteria and fungi. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 3, p. 352–359, 2018.

KHALID, H. F. et al. Biosurfactant coated silver and iron oxide nanoparticles with enhanced anti-biofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Hazardous Materials**, v. 364, n. October 2018, p. 441–448, 2019.

- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019.
- LE, A. T. et al. Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 6, p. 910–916, 2010.
- LEE, S. H.; JUN, B. H. Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, 2019.
- LIU, K. et al. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 45, p. 57–67, 2020.
- MOUSAVI, S. M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. sup3, p. S855–S872, 2018.
- NEHAL, N.; SINGH, P. Role of nanotechnology for improving properties of biosurfactant from newly isolated bacterial strains from Rajasthan. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2021.
- OSONGA, F. J. et al. Size and shape-dependent antimicrobial activities of silver and gold nanoparticles: A model study as potential fungicides. **Molecules**, v. 25, n. 11, 2020.
- PRYSHCHEPA, O.; POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 87–100, 2020.
- RAFIQUE, M. et al. A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 45, n. 7, p. 1272–1291, 2017.
- SHANG, Y. et al. Divergent and convergent evolution of fungal pathogenicity. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 1374–1387, 2016.
- SHEPHARD, G. S. Current status of mycotoxin analysis: A critical review. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 842–848, 2016.
- TOLA, M.; KEBEDE, B. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 2016.
- TYAGI, P. K. et al. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles Against Various Plant Pathogenic Fungi and its Safety Evaluation on *Drosophila melanogaster*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 6587–6596, 2020.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem as seguintes conclusões:

- O *scale-up* de produção do biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP 1615 de frascos para biorreatores demonstra ser viável para a produção da biomolécula em escala industrial.
- A propriedades tensoativas do biossurfactante são compatíveis com outras descritas na literatura para biossurfactantes eficientes.
- A elucidação do biossurfactante demonstra sua natureza lipopeptídica, estrutura normalmente encontrada para biossurfactantes derivados de *Bacillus*.
- O biossurfactante demonstra biocompatibilidade e toxicidade reduzida frente a espécies marinhas.
- O biossurfactante demonstra biocompatibilidade e toxicidade reduzida frente a espécies vegetais.
- O biossurfactante demonstra potencial de aplicação como agente de biorremediação de compostos hidrofóbicos em ambiente marinho.
- O biossurfactante apresenta capacidade de solubilização e dispersão de contaminantes hidrofóbicos em ambientes marinhos.
- O biossurfactante apresenta capacidade de solubilização e dispersão de contaminantes hidrofóbicos em solos.
- O biossurfactante formulado apresenta vida de prateleira prolongada.
- O biossurfactante tem potencial de aplicação como agente remediador estável, eficiente e efetivo em solos, rochas e água contaminados com poluentes hidrofóbicos.
- O biossurfactante tem potencial para uso como biomulsificante em sistemas alimentares.
- O biossurfactante não apresenta citotoxicidade em concentrações de efetividade de ação emulsificante.
- O biossurfactante apresenta considerável atividade antioxidante.
- O biossurfactante tem potencial para síntese de nanopartículas de prata.
- A nanopartícula de prata produzida com biossurfactante tem potencial fungicida.
- O biossurfactante se apresenta como um insumo biotecnológico de alto valor agregado para diferentes setores industriais.



Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation



Italo José B. Durval^{a,c}, Ana Helena R. Mendonça^{b,c}, Igor V. Rocha^d, Juliana M. Luna^{b,c},
Raquel D. Rufino^{b,c}, A. Converti^e, L.A. Sarubbo^{b,c,*}

^a Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil

^b Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, PE, Brazil

^c Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Rua Joaquim de Brito, n. 216, Boa Vista, 50070-280 Recife, PE, Brazil

^d Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, CPqAM/Fiocruz, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brazil

^e Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Genoa University, Pole of Chemical Engineering, Via Opera Pia 15, I-16145 Genova, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacillus cereus
Biosurfactant
Toxicity
Poecilia vivipara
Anomalocardia brasiliensis
Bioremediation

ABSTRACT

In this study, *Bacillus cereus* was cultivated in a mineral medium composed of 2% frying oil and 0.12% peptone to produce a biosurfactant. The production was scaled up from flasks to 1.2-, 3.0- and 50-L bioreactors, where surface tension achieved 28.7, 27.5 and 32 mN/m and biosurfactant concentration 4.3, 4.6 and 4.7 g/L, respectively. The biosurfactant was characterized as anionic, while nuclear magnetic resonance, thin-layer chromatography and gas chromatography analyses revealed its lipopeptide nature. Toxicity tests showed survival rates of the fish *Poecilia vivipara* and the bivalve *Anomalocardia brasiliensis* higher than 90% and 55%, respectively, thus suggesting the use of this biosurfactant in marine environment depollution. Moreover, the biosurfactant stimulated the growth of autochthonous microorganisms independently of the presence of motor oil in bioassays performed in seawater. These results demonstrate that the biosurfactant is biocompatible and has potential for industrial-scale production and application to bioremediation of oil spills-polluted marine environment.

* Corresponding author at: Catholic University of Pernambuco, Rua do Príncipe, n. 526, Boa Vista, 50050-900 Recife, PE, Brazil.

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




<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111357>

Received 28 September 2018; Received in revised form 6 April 2020; Accepted 4 June 2020

Available online 07 June 2020

0025-326X/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Biosurfactant as an Environmental Remediation Agent: Toxicity, Formulation, and Application in the Removal of Petroderivate in Sand and Rock Walls

Italo Durval^{1,4} , Raquel Rufino^{2,4} , Leonie Sarubbo^{3,4*} 

¹ Northeast Biotechnology Network (RENORBIO), Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; italo.durval@gmail.com (I.D.);

² Center for Biological and Health Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; raqueldrufino@yahoo.com.br (R.R.);

³ Science and Technology Center, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.; leonie.sarubbo@unicap.com.br (L.S.);

⁴ Advanced Institute of Technology and Innovation (IATI), Recife, Pernambuco, Brazil

* Correspondence: leonie.sarubbo@unicap.com.br;

Scopus Author ID 6506290276

Received: 13.04.2021; Revised: 6.04.2021; Accepted: 9.04.2021; Published: 19.04.2021

Abstract: The exploitation and transportation of petroleum products are important reasons for environmental concern since they are the major causes of accidents involving oil spills. Therefore, the biosurfactant produced by the bacterium *Bacillus cereus* UCP1615 was applied in the removal of motor oil from sand and stones from coastal regions. Bioassays carried out with the microcrustacean *Artemia salina* and three vegetables' seeds showed that the biosurfactant has reduced toxicity. The application of the biosurfactant in crude and isolated form, as a removal agent, was carried out in static and kinetic tests using sand contaminated with motor oil, in packed columns, and in flasks under orbital agitation, respectively. The results showed that the biosurfactant removed $63.0 \pm 2.1\%$ of the hydrocarbon in the static test and $84.0 \pm 2.2\%$ in the dynamic test. In tests using rock wall samples, the removal rates reached $69.0 \pm 2.0\%$. Conservation tests carried out during 120 days demonstrated that the surfactant activities were maintained, especially in the presence of the preservative potassium sorbate. The *B. cereus* biosurfactant has proven to be a biocompatible, effective, and stable alternative for applications in environments contaminated with hydrophobic compounds and can be industrially stored for application in the event of possible environmental disasters.

Keywords: bioremediation; petroderivates; biosurfactant.

© 2021 by the authors. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ANEXO C – Produção científica (2017-2021)

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

ANO 2021

DURVAL, I. J. B.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant as an Environmental Remediation Agent: Toxicity, Formulation, and Application in the Removal of Petroderivate in Sand and Rock Walls. **Biointerface Research In Applied Chemistry**, v.12, p.34 - 48, 2021.

LIRA, I. R. A. S.; SANTOS, E. M. S.; SANTOS, J.C.V.; SILVA, RENATA RAIANNY; SILVA, Y. A.; DURVAL, I. J. B.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M. Production of Biosurfactant by *Candida guilliermondii* and Application in a Mayonnaise Emulsion. **Chemical Engineering Transactions**, v.87, p.259 - 264, 2021.

J.C.V.; SANTOS, E. M. S.; SILVA, Y. A.; LIRA, I. R. A. S.; Silva, Renata Raianny; DURVAL, I. J. B.; SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M. Application of *Candida lipolytica* Biosurfactant for Bioremediation of Motor Oil from Contaminated Environment. **Chemical Engineering Transactions**, v.86, p.649 - 654, 2021.

ANO 2020

DURVAL, ITALO JOSÉ B.; RESENDE, ANA HELENA M.; ROCHA, IGOR V.; LUNA, JULIANA M.; RUFINO, RAQUEL D.; CONVERTI, A.; SARUBBO, L.A. Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. **Marine Pollution Bulletin.**, v.157, p.1-8, 2020.

BEZERRA, K. G. O.; DURVAL, I. J. B.; SILVA, I. A.; ALMEIDA, F. C. G.; MELO, Y. T. F.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Emulsifying Capacity of Biosurfactants from *Chenopodium Quinoa* and *Pseudomonas Aeruginosa* UCP 0992 with Focus of Application in the Cosmetic Industry. **Chemical Engineering Transactions**, v.79, p.211 - 2016, 2020.

SILVA, I. A.; BEZERRA, K. G. O.; DURVAL, I. J. B.; FARIAS, C. B. B.; SILVA JUNIOR, C. J. G.; SANTOS, E. M. S.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Evaluation of the Emulsifying and Antioxidant Capacity of the Biosurfactant Produced by *Candida bombicola* URM 3718. **Chemical Engineering Transactions**, v.79, p.67 - 72, 2020.

ANO 2019

DURVAL, I. J. B.; RESENDE, A. H. M.; FIGUEIREDO, MARIANA A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Studies on Biosurfactants Produced using *Bacillus cereus* Isolated from Seawater with Biotechnological Potential for Marine Oil-Spill Bioremediation. **Journal of Surfactants and Detergents**. v.22, p.1 -8, 2019.

DURVAL, I. J. B.; RESENDE, A. H. M.; OSTENDORF, T. A.; BEZERRA, K. G. O.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Application of *Bacillus cereus* UCP 1615 Biosurfactant for Increase Dispersion and Removal of Motor Oil from Contaminated Sea Water. **Chemical Engineering Transactions**, v.74, p.319 - 324, 2019.

CAMPELLO FILHO, A. A. P.; DURVAL, I. J. B.; CHAPRAO, M. J.; SANTOS, L. B.; SOARES DA SILVA, R. C. F.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Application of Biosurfactant Formulated as an Alternative Collector in a Bench Scale-Induced Saturation Tower for the Treatment of Industrial Effluents. **Chemical Engineering Transactions**, v.74, p.331 - 336, 2019.

RIBEIRO, B. G.; SANTOS, M. M.; PINTO, M. I. S.; MEIRA, H. M.; DURVAL, I. J. B.; GUERRA, J. M. C.; SARUBBO, L. A. Production and Optimization of the Extraction Conditions of the Biosurfactant from *Candida Utilis* UFPEDA1009 with Potential Application in the Food Industry. **Chemical Engineering Transactions**, v.74, p.1477 - 1482, 2019.

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

ANO 2021

DURVAL, I.J.B.; SILVA, I. A.; SARUBBO, L. A. Application of Microbial Biosurfactants in the Food Industry. In: Environmental and Microbial Biotechnology.1 ed.: **Springer Singapore**, 2021, p. 1-10.

SILVA, M. G. C.; DURVAL, I. J. B.; SILVA, M. E. P.; SARUBBO, L. A. Potential Applications of Anti-Adhesive Biosurfactants. In: Environmental and Microbial Biotechnology.1 ed.: **Springer Singapore**, 2021, p. 213-225.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS

ANO 2019

SILVA, IVISON A.; OLIVEIRA, K. G.; DURVAL, I. J. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Tratamento de poluente hidrofóbico utilizando biossurfactante como coletor em sistema de flotação. In: **X Simpósio Brasileiro De Engenharia Ambiental**, 2019, Recife.

SILVA, I. A.; OLIVEIRA, K. G.; DURVAL, I. J. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Evaluation of the Emulsifiers Capacity of the Biosurfactant Produced by *Candida bombicola* URM 3718 in Food Oils. In: **XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos e XIII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, 2019, Uberlândia.

ANO 2018

DURVAL, I. J. B.; SILVA, M. G. C.; CAMPELLO FILHO, A. A. P.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Aplicação de um biossurfactante de *Bacillus cereus* UCP 1615 para aumento da remoção de óleo motor em água do mar contaminada In: **XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2018, São Paulo.

CAMPELLO FILHO, A. A. P.; DURVAL, I. J. B.; BRASILEIRO, P. P. F.; SOARES DA SILVA, R. C. F.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Aplicação de biossurfactante como coletor alternativo em uma torre de saturação induzida em estágios para tratamento de efluentes industriais In: **XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2018, São Paulo.

ANO 2017

DURVAL, I. J. B.; PINTO, M. I. S.; ALMEIDA, D. G.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from **Bacillus** sp. UCP 1615 in bioreactor and evaluation of its stability In: **XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, 2017, Aracaju - SE.

ALMEIDA, D. G.; SILVA, R. C. F. S.; DURVAL, I. J. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Application of a biosurfactant from *Candida tropicalis* UCP 0996 for hydrophobic compound biodegradation improving in seawater In: **XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, 2017, Aracaju - SE.