

Universidade de Passo Fundo  
Faculdade de Engenharia e Arquitetura  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e  
Ambiental

Naiara Elisa Kreling

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES EXTRACELULARES  
POR *Saccharomyces cerevisiae* E SUA APLICAÇÃO EM  
BIORREMEDIAÇÃO

Passo Fundo

2017

Naiara Elisa Kreling

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES EXTRACELULARES  
POR *Saccharomyces cerevisiae* E SUA APLICAÇÃO EM  
BIORREMEDIAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, da Faculdade de Engenharia Civil e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, sob a orientação da Prof. Dr<sup>a</sup> Luciane Maria Colla e coorientação do Prof. Dr Antônio Thomé

Passo Fundo

2017

NAIARA ELISA KRELING

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES  
EXTRACELULARES POR *Saccharomyces cerevisiae* E SUA  
APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado Produção de Biossurfactantes Extracelulares por *Saccharomyces cerevisiae* e Sua Aplicação em Biorremediação, elaborada por Naiara Elisa Kreling, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Data da aprovação: 21 de março de 2017

Comissão Examinadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fátima Menezes Bento  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr<sup>a</sup>. Telma Elita Bertolin  
Universidade de Passo Fundo - UPF

Prof. Dr. Vandrê Barbosa Brião  
Universidade de Passo Fundo - UPF

Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Maria Colla  
Orientadora

Prof. Dr. Antônio Thomé  
Coorientador

Passo Fundo

2017

*Aos meus pais Neila e Beto,  
e a minha irmã Nathana,  
pelo apoio incondicional de sempre.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade desta caminhada.

Aos meus pais e a minha irmã, pela ajuda em todos os momentos necessários, pelo incentivo aos estudos e na realização do mestrado, todo meu amor e meu muito obrigada.

Aos meus avós, primas e tios, por sempre demonstraram interesse pelo meu trabalho.

As ajudantes Kimberly e Ângela, pelo auxílio na etapa final deste trabalho. A Munise, que passou comigo finais de semana e muitos almoços trabalhando, que possamos juntas colher os frutos desta dissertação.

A profe Lu e a bolsista Ana Cláudia, com quem aprendi muito nestes dois anos, me espelhando principalmente pelo amor à pesquisa e ao ensino, minha admiração e carinho.

Aos companheiros do Laboratório de Fermentações, por todas as risadas e ajuda quando possível, é ótimo fazer parte de um grupo tão unido e dedicado como é o nosso.

Aos laboratoristas Marilda, João e Clarisse, sempre dispostos a ajudar.

As pessoas que colaboraram, direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, muito obrigada.

A UPF e ao PPGEng pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela disponibilização da estrutura e pelo incentivo à pesquisa.

A CAPES pela bolsa de estudos.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.  
Muito, nos aproxima.”*  
*(Louis Pasteur)*

*“Ninguém é burro por ser curioso.  
Aqueles que não fazem perguntas,  
permanecem sem respostas  
pelo resto de suas vidas.”*  
*(Neil deGrasse Tyson)*

## RESUMO

Os biossurfactantes são compostos produzidos por microrganismos com capacidade de realizar a emulsificação de compostos oleosos durante processos de biorremediação, promovendo a absorção das fontes de carbono disponíveis, e por consequência a biodegradação. Esses compostos podem ser produzidos por uma diversidade de microrganismos em bioprocessos industriais, nos quais se realiza a seleção de meios de cultivo e indutores apropriados para a produção do biocomposto de interesse. A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito utilizada em bioprocessos industriais já estabelecidos, como a produção de bebidas alcoólicas, entretanto, a produção de biossurfactantes extracelulares por este microrganismo não tem sido explorada. A utilização de biossurfactantes intracelulares é melhor referenciada, possuindo como desvantagem a necessidade de operações unitárias de alto custo nos processos de rompimento celular e extração do biocomposto da célula microbiana. Objetivou-se avaliar o potencial de produção de biossurfactantes extracelulares pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bem como testar a sua aplicação em processo de biorremediação de solo contaminado com biodiesel. Ao longo dos cultivos, foram selecionadas cepas de leveduras que apresentaram melhores resultados de produção de biossurfactantes em meios com diferentes concentrações (5, 20 e 35 g/L) de indutores oleosos (glicerol, óleo diesel e óleo de soja). As cepas mais produtoras foram testadas em ensaios com variação pH (4,0, 5,5 e 7,0) e temperatura (20°C, 30°C e 40°C), adaptando-se para os cultivos subsequentes as cepas que apresentaram os melhores resultados de produção de biossurfactantes. A melhor condição de cultivo e cepa selecionadas foram utilizadas para a ampliação de escala em biorreator, a fim de purificar, caracterizar o biossurfactante e aplicar o biocomposto (0,05%, 0,1% e 0,5%) obtido em processo de biorremediação de solo contaminado com 20 % de biodiesel, avaliando-se também a influência da presença do contaminante na retenção do contaminante no solo, através da realização de ensaios em solo estéril. A produção de biossurfactantes extracelulares nos meios livres de células foi avaliada diariamente através da determinação da atividade emulsificante do acompanhamento da tensão superficial. Os indutores que promoveram a maior produção de biossurfactantes foram óleo de soja e glicerol, nas concentrações de 20 g/L (4,80 UE/d) para o indutor óleo de soja e 5 g/L para o indutor glicerol (4,45 UE/d). A acidificação do meio para um pH de 5,5 e cultivo em 30°C promoveu um aumento na produtividade de emulsões (6,95 UE/d) quando utilizado o indutor glicerol na concentração de 5 g/L, sendo esta condição selecionada para a ampliação de escala em biorreator de 5 L. Na escala de 5 L, a produção de biossurfactantes promoveu atividades de emulsificação de 3,17 à 5,56 UE/d. A identificação do tipo de biossurfactante extracelular produzido através de espectrometria de massa indicou a formação de glicolípideos. No ensaio de biorremediação proposto, o biossurfactante adicionado em solo contaminado com biodiesel promoveu a emulsificação do meio e facilitou a assimilação do contaminante pelos microrganismos independente da concentração adicionada, resultando em biodegradação do contaminante em até 56,71%, ao final de 90 dias de experimento, em comparação com 50,16 % na atenuação natural. A retenção do contaminante no solo foi de até 28,74%, indicando que o efeito da adsorção do contaminante no solo pode ser erroneamente interpretada como processo de biodegradação. Os valores de produtividade de emulsões verificado neste estudo indicam possibilidade do uso de biossurfactantes extracelulares produzidos pela *S. cerevisiae*, excluindo-se a necessidade de processos de rompimento celular para obtenção deste biocomposto.

Palavras chave: glicerol, emulsificação, biorreator.

## ABSTRACT

Biosurfactants are compounds produced by microorganisms with the ability to emulsification of oily compounds during bioremediation processes, promoting the absorption of the available carbon sources, and consequently biodegradation. Such compounds may be produced by a variety of microorganisms in industrial bioprocesses, in which the selection of suitable culture media and inducers for the production of the biocompound of interest is carried out. *Saccharomyces cerevisiae* is a yeast widely used in established industrial bioprocesses, such as the production of alcoholic beverages. However, the production of extracellular biosurfactants by this microorganism has not been explored. On the other hand, the use of intracellular biosurfactants is better referenced, having as a disadvantage the need for high cost unit operations in the processes of cellular disruption and extraction of the biocompound of the microbial cell. The aim of this study was to evaluate the potential of biosurfactants production by yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as well as to test their application in bioremediation process of soil contaminated with biodiesel. Cultures of yeast strains that showed the best results of biosurfactant production in media with different concentrations (5, 20 and 35 g/L) of oily inducers (glycerol, diesel oil and soybean oil) were selected. The most productive strains were tested in pH (4.0, 5.5 and 7.0) and temperature (20°C, 30°C and 40°C), adapting the microorganism strain corresponding to the best results for the next production of biosurfactants. The best condition selected was used for scaling the bioreactor in order to purify, characterize the biosurfactant and apply the biocompound (0.05%, 0.1% and 0.5%) obtained in the process for bioremediation of soil contaminated with 20% of biodiesel, also evaluating the influence of the presence of the contaminant in the retention of the contaminant in the soil, by performing tests in sterile soil. The production of extracellular biosurfactants in the cell free media was evaluated daily by the determination of the emulsifying activity of the monitoring of the surface tension. The inducers that promoted the highest production of biosurfactants were soybean oil and glycerol at concentrations of 20 g/L (4.80 UE/d) for the soybean oil inducer and 5 g/L for the inducer glycerol (4.45 UE/d). Acidification of the medium to a pH of 5.5 and cultivation at 30°C promoted an increase in emulsion productivity (6.95 UE/d) when 5 g/L inducer glycerol was used. This condition was selected for the amplification of scale in 5 L bioreactor. In the 5 L scale, the production of biosurfactants promoted emulsification activities from 3.17 to 5.56 UE/d. Identification of the type of extracellular biosurfactant produced by mass spectrometry indicated the formation of glycolipids. In the proposed bioremediation test, the biosurfactant added in soil contaminated with biodiesel promoted the emulsification of the medium and facilitated the assimilation of the contaminant by the microorganisms independent of the added concentration, resulting in biodegradation of the contaminant by up to 56.71% at the end of 90 days of experiment, compared with 50.16% in natural attenuation. The contaminant retention in the soil was 28.74%, indicating that the adsorption effect of the contaminant on the soil can be interpreted as a biodegradation process. The values of emulsion productivity verified in this study indicate the possibility of the use of extracellular biosurfactants produced by *S. cerevisiae*, excluding the need for cellular disruption processes to obtain this biocompound.

Keywords: Glycerol, emulsification, bioreactor.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via metabólica para produção da porção polar de biossurfactantes.....	20
Figura 2 – Hidrólise de éster por enzimas e formação de ácido graxo.....	30
Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental utilizado para a produção de biossurfactantes por <i>S. cerevisiae</i> e aplicação em processo de biorremediação .....	32
Figura 4 – Biorreator de bancada utilizado na produção de biossurfactante extracelular por <i>S. cerevisiae</i> .....	36
Figura 5 – Detalhamento do processo de adaptação de cepas para as etapas de produção de biossurfactantes extracelulares .....	44
Figura 6 - Atividades emulsificantes A/O para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja em quatro dias de bioprocessos.....	46
Figura 7 - Produtividades máximas de atividade emulsificante água/óleo (UE/d), para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja*.....	48
Figura 8 – Medida de tensão superficial (mN/m) do meio de cultivo livre de células em 4 dias de bioprocessos, para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja.....	52
Figura 9 - Atividades emulsificantes A/O obtida para 5 g/L de indutor glicerol em diferentes concentrações de pH e temperatura.....	54
Figura 10 – Produtividade de atividade emulsificante A/O obtida para 5 g/L de indutor glicerol em diferentes concentrações de pH e temperatura.....	55
Figura 11 – Superfície de resposta da produtividade máxima de atividades emulsificantes A/O em função do pH e da temperatura.....	56
Figura 12 – Medida de tensão superficial (mN/m) do meio de cultivo livre de células em 4 dias de bioprocessos, para 5 g/L de indutor glicerol, em diferentes concentrações de pH e temperatura.....	58
Figura 13 – Comparação de médias entre a produtividade máxima de AE A/O (UE/d) e todos os experimentos propostos .....	59
Figura 14 – Cinética de produção de biossurfactantes provenientes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em 4 dias de cultivo.....	60
Figura 15 – Teoria da cinética de produção de biossurfactantes e sua relação com o crescimento celular e consumo de substrato.....	61
Figura 16 - Espectro de MALDI-MS de biossurfactante produzido por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , com a detecção dos íons que caracterizam as isoformas de lipídeos de manosileritritol (MEL). .....	64
Figura 17 – Liberação de CO <sub>2</sub> ao longo dos 90 dias de ensaio .....	65
Figura 18 - Percentual de retenção de contaminante no solo e de biodegradação ao longo dos 90 dias de experimento .....	68
Figura 19 – Interação de médias para os valores de retenção e biodegradação do biodeisel ao final de 90 dias de ensaio em função da adição de biossurfactantes e da atenuação natural, para o solo estéril e não estéril.....	69
Figura 20 – Biodegradação efetivada obtida para a adição dos biossurfactantes ao final de 90 dias de ensaio.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental utilizado para avaliar a influência da concentração e tipo de indutores sobre a produção de biossurfactantes por <i>S. cerevisiae</i> *.....	33
Tabela 2 - Níveis reais e codificados do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com adição de pontos centrais para produção de biossurfactantes extracelulares .....	35
Tabela 3 – Caracterização geotécnica, física e química do solo em estudo.....	38
Tabela 4 - Delineamento experimental para o processo de biorremediação .....	39
Tabela 5 – Produtividade de atividade emulsificante água/óleo para os indutores testados, em UE/d.....	47
Tabela 6 – Análise de variância das produtividades máximas (UE/d) obtidas nos cultivos com diferentes concentrações e tipos de indutores.....	47
Tabela 7 – Comparação entre trabalhos envolvendo a produção de biossurfactantes que utilizaram glicerol e glicose como substrato em relação a este estudo .....	50
Tabela 8 - Níveis de significância e efeitos da variação de pH e temperatura na produtividade máxima de emulsões A/O para o teste de curvatura.....	55
Tabela 9 – Produtividade de AE A/O, pH do meio de cultivo e tensão superficial obtida em uma fermentação durante 4 dias de cultivo em biorreator de 5 L .....	61
Tabela 10 – Resultados para as bateladas de produção de biossurfactantes extracelulares por <i>S. cerevisiae</i> para uso em biorremediação e identificação por espectrometria de massa, em 2 dias de cultivo.....	63
Tabela 11 – Teste de Tukey dos valores de evolução de CO <sub>2</sub> pela concentração de biossurfactante adicionado e atenuação natural.....	67
Tabela 12 - Teste de Tukey da remoção e biodegradação para os solos esterilizado e não esterilizado.....	70

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Fatores de influência para produção de biossurfactantes por levedura .....	18
Quadro 2 – Classificação da cinética de produção de biossurfactantes. ....	22

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Surfactantes Químicos e Biológicos: Definição e classificação.....	16
2.2	Produção de biossurfactantes por leveduras.....	17
2.2.1	Parâmetros que influenciam a produção de biossurfactantes por leveduras .....	18
2.2.1.1	Fontes de carbono e nitrogênio .....	19
2.2.1.2	Formas de cultivo, temperatura e agitação.....	21
2.3	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
2.4	Purificação e recuperação de biossurfactantes .....	24
2.5	Caracterização química dos biossurfactantes .....	25
2.6	Biorremediação: principais técnicas e fatores de influência .....	26
2.6.1	Aplicação de biossurfactantes em biorremediação.....	28
2.6.2	Biorremediação de biodiesel .....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1	Etapa I - Produção de biossurfactantes extracelulares por <i>S. cerevisiae</i> : variação da concentração e o tipo de indutor.....	33
3.2	Etapa II - Produção de biossurfactantes extracelulares por <i>S. cerevisiae</i> : variação das condições de pH e temperatura .....	34
3.3	Etapa III - Produção de biossurfactante extracelular em biorreator de bancada, purificação e caracterização.....	36
3.3.1	Purificação de biossurfactante.....	37
3.3.2	Identificação do biossurfactante produzido.....	37
3.4	Etapa IV - Ensaio de biorremediação .....	38
3.5	Determinações Analíticas.....	40
3.5.1	Atividade Emulsificante Água em Óleo.....	40
3.5.2	Tensão Superficial .....	41
3.5.3	Crescimento Celular .....	41
3.5.4	pH.....	41
3.5.5	Determinação da liberação de CO <sub>2</sub> (atividade respirométrica).....	41
3.5.6	Teor residual de contaminante.....	42
3.5.7	Teor de Umidade .....	43
3.6	Tratamento dos dados.....	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1	Etapa I - Produção de biossurfactantes extracelulares por <i>S. cerevisiae</i> : variação da concentração e o tipo de indutor.....	45
4.2	Etapa II - Produção de biossurfactantes extracelulares por <i>S. cerevisiae</i> : variação das condições de pH e temperatura .....	53

4.2.1	Determinação da melhor condição experimental para ampliação de escala .....	58
4.3	Etapa III - Produção de biossurfactante extracelular em biorreator de bancada .....	60
4.3.1	Identificação do biossurfactante produzido .....	64
4.4	Etapa IV - Ensaio de biorremediação .....	65
5	CONCLUSÕES .....	73
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

O uso do biodiesel como fonte energética, devido a sua produção ser considerada sustentável e viável em grande escala, e pela legislação atual (BRASIL, 2014) fomentar o uso de biocombustíveis em virtude do aproveitamento de biomassa disponível, aumenta a demanda por este tipo de combustível e a instalação de novas plantas de produção, especialmente no Brasil (LIN et al., 2011). Entretanto, o sistema de armazenagem e transporte deste combustível apresenta risco de falhas, como vazamento em tanques de armazenamento e acidentes envolvendo derramamentos durante o transporte (CHIARANDA, 2011). Como consequência, a contaminação superficial e subterrânea de solos compromete o meio ambiente e a saúde humana, requerendo tratamento adequado.

As técnicas de remediação tradicionais, como bombeamento e tratamento e lavagem de solos, utilizam grande quantidade de produtos químicos, água e energia para a remoção de contaminantes. Priorizando o baixo custo do processo, a preocupação com o impacto ambiental gerado na instalação e na execução do projeto de remediação dificilmente é considerado um parâmetro de importância na escolha da técnica de remediação ideal (KIM et al., 2013). Para solucionar este problema, técnicas de biorremediação e adição de biocompostos com propriedades emulsificantes, como biossurfactantes, podem ser consideradas sustentáveis e de baixo impacto ambiental, auxiliando na solubilidade e consequente biodegradação do contaminante (BEZZA et al., 2015; NIEVAS et al., 2008).

Os biossurfactantes são surfactantes de origem microbiana, os quais podem ser aplicados em vários processos da indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e ambiental (BARROS et al., 2007; GHARAEI-FATHABAD, 2011). Contudo, enfrentam dificuldades na viabilização de sua produção em grande escala, sendo necessário buscar substratos de origem renovável ou de resíduos industriais, pesquisar a obtenção de biossurfactantes que não necessitem de processos adicionais, como rompimento celular, e utilizar microrganismos que possuam como característica facilidade de operação e manipulação em escala industrial. Estas questões ainda tornam limitado o uso de biossurfactantes, pois os surfactantes químicos apresentam custo menor de fabricação (BANAT et al., 2014).

Para viabilizar a produção de biossurfactantes, uma alternativa considerada é o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismo para sintetizar este biocomposto. Esta biomassa é conhecida por seu amplo uso industrial e comercial (REED; NAGODAWITHANA, 1991), sua facilidade em ser obtida, e por não apresentar riscos de toxicidade e patogenicidade, sendo aplicada na indústria de alimentos em processos

fermentativos de pães, vinhos e cervejas (COSTA et al., 2011). Possui ainda capacidade de desenvolvimento em diferentes composições de substratos disponíveis e facilidade em ser manipulada geneticamente, através da técnica de recombinação de DNA (VILELA et al., 2000).

A cepa de *S. cerevisiae* possui em sua parede celular um composto denominado manoproteína, um biossurfactante intracelular (LIU et al., 2008; MELO et al., 2015) composto de polissacarídeos e proteínas (KLIS et al., 2002). Entretanto, a necessidade de rompimento celular para a obtenção deste biossurfactante é uma desvantagem que pode inviabilizar sua utilização. Como solução, estuda-se a possibilidade de produzir compostos extracelulares em meios de cultivo apropriados, que também possam apresentar características emulsificantes.

A aplicação ambiental de biossurfactantes em processos de biorremediação é extensamente investigada (PACWA-PLOCINICZAK et al., 2011). Contudo, poucos estudos tratam da aplicação de biossurfactantes provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* em processos que auxiliem a recuperação de solos contaminados por resíduos oleosos, fator que fomenta este trabalho.

Por se tratar de um composto orgânico, é importante analisar a adição deste biossurfactante em solos contaminados, e como seu comportamento impacta na biodisponibilidade e na adsorção do contaminante no solo (CECCHIN et al., 2016). É preciso identificar quais efeitos da biorremediação são causados pelo solo e quais são resultado da influência dos microrganismos e biossurfactantes presentes no meio, pois as propriedades específicas dos diferentes tipos de solo, como capacidade de troca catiônica, fração argilomineral e área de superfície, podem influenciar no comportamento da adsorção e da degradação de contaminantes no solo (YARON et al., 2012).

Dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, trabalhos desenvolvidos em parceria com o Laboratório de Fermentações (CEPA) e com o Grupo de Pesquisa em Geotecnia Ambiental UFGRS/UPF, no âmbito da produção de biossurfactantes e no uso de técnicas de biorremediação para tratamento de solos contaminados, mostram conhecimento e experiência aprofundado no assunto a ser desenvolvido (DECESARO, 2016; REGINATTO, 2012). O tema vem sendo trabalhado na linha de pesquisa em infraestrutura sustentável, propondo ações inovadoras, baseadas em tecnologias avançadas e em publicações internacionais, o que enriquece o trabalho a ser desenvolvido.

O objetivo geral deste trabalho foi produzir biossurfactantes pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e testar sua aplicação em biorremediação de solo argiloso contaminado com biodiesel.

Os objetivos específicos foram:

- a) Selecionar a melhor condição de cultivo para a produção de biossurfactantes extracelulares a partir de *Saccharomyces cerevisiae*;
- b) Adaptar o crescimento de cepas de *S. cerevisiae* nas condições onde foram obtidas as maiores produções de biossurfactantes;
- c) Realizar ampliação de escala de produção de biossurfactantes extracelulares, purificar e caracterizar quimicamente o biossurfactante extracelular obtido;
- d) Aplicar o biossurfactante extracelular em processo de biorremediação de solo contaminado com biodiesel.
- e) Avaliar o efeito da adição do biossurfactante sobre a retenção do contaminante em solo estéril



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, realizou-se uma revisão da literatura com o objetivo de apresentar os principais conceitos relacionados à definição de biossurfactantes, no que diferem os biossurfactantes produzidos por leveduras quanto à necessidade de fontes de carbono oleosas e não oleosas, e demais variações nas condições de cultivo que podem influenciar na quantidade de biossurfactante produzido. Buscou-se ainda correlacionar a aplicação dos biossurfactantes em processos de biorremediação, auxiliando o leitor a identificar como esse processo ocorre e como afeta na disponibilidade do contaminante no solo e na biodegradação de contaminantes oleosos pelos microrganismos autóctones.

### 2.1 Surfactantes Químicos e Biológicos: Definição e classificação

Definidos como moléculas anfipáticas, são formados por uma porção hidrofílica (polar e solúvel em água) e hidrofóbica (apolar e solúvel em lipídeos e gorduras). São compostos químicos utilizados em processos industriais, para a fabricação de produtos de limpeza, higiene, cosméticos e fármacos (NITSCKE; PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes, surfactantes de origem microbiana (bactérias, fungos ou leveduras) possuem as mesmas propriedades dos surfactantes sintéticos, com a vantagem de apresentarem maior tolerância a variações de temperatura e pH, e serem passíveis de manipulação genética. Por serem biodegradáveis em água e solos, tornam-se adequados para aplicações ambientais (ARAUJO et al., 2013).

São classificados de acordo com sua composição química e origem microbiana, e entre as classes principais encontram-se os glicolipídios (subgrupos ramnolipídios, soforolipídios), lipopeptídios e lipoproteínas (subgrupos visconina, surfactina, polimixina, dentre outros), ácidos graxos, lipídios neutros e fosforolipídios (ácidos graxos, lipídios neutros, fosfolipídios), surfactantes poliméricos (manana-lipídio-proteína, emulsan, liposan, dentre outros), manoproteínas e soforolipídios (DESAI; BANAT, 1997).

As propriedades dos biossurfactantes são, principalmente, a redução da tensão superficial e a formação de emulsões. A emulsificação baseia-se na dispersão de um líquido em outro, levando a mistura de dois líquidos imiscíveis (SATPUTE et al., 2010). A redução da tensão superficial ocorre quando a concentração de células de biossurfactantes no meio aumenta, formando micelas (moléculas biossurfactantes agregadas). A concentração destas moléculas no meio estabelece a Concentração Micelar Crítica (CMC), definida como a

mínima concentração de surfactante necessária para que a tensão superficial seja reduzida ao máximo (LUNA, 2010; PREVIDELLO et al., 2006).

Os biossurfactantes podem ser divididos em: biossurfactantes de baixo ou alto peso molecular. Os de baixo peso molecular são formados por carboidratos e ácidos graxos alifáticos, como os glicolipídeos, raminolipídeos e surfactina, e estão associados a redução da tensão superficial do meio. Os de alto peso molecular são formados por lipoproteínas, polissacarídeos e proteínas, e caracterizam-se como importantes formadores de emulsões (ROSENBERG; RON, 1999).

## 2.2 Produção de biossurfactantes por leveduras

A produção de biossurfactantes por leveduras ocorre quando adicionados ao meio de cultivo fontes de carbono solúveis em água (como açúcares na forma de glicose e sacarose), com a combinação de substratos hidrofóbicos (hidrocarbonetos, óleos e gorduras). Esta combinação entre um substrato solúvel em água e outro hidrofóbico faz com que maiores produções sejam atingidas, pois os agentes formadores de emulsão são gerados apenas quando substratos imiscíveis em água são adicionados ao meio e metabolizados pela célula (BHARDWAJ et al., 2013).

Uma das grandes dificuldades encontradas na produção de biossurfactantes em escala industrial são as fontes de substrato a serem utilizadas, devido principalmente ao alto custo que representam. Com isto, alternativas de substratos pesquisados são principalmente resíduos e subprodutos de produções industriais, provenientes da fabricação de pães, cervejas e da indústria agrícola. Isto é vantajoso para o meio ambiente, pois reduziria o volume de resíduos gerados e aterrados, reutilizando-os como fonte de nutriente para os microrganismos (FARIA, 2010).

Sari et al. (2014) confirmaram a produção de biossurfactantes extracelulares pelas leveduras *Pseudozyma hubeiensis*, *Pseudozyma antarctica* e *Pseudozyma aphidis*. Utilizado 4% de glicose e 4% de óleo de soja como fontes de carbono, atingiram redução da tensão superficial de 57,3 para 35,8, 37,2 e 44,3 mN/m, respectivamente.

Fai et al. (2015) estudaram a otimização de produção de biossurfactantes por *Pseudozyma tsukubaensis* utilizando água residuária da produção de mandioca. As melhores condições verificadas foram de 80% de água residuária a uma temperatura de 30°C, com agitação de 200 rpm por 48 horas. A menor tensão superficial obtida foi de 26,78 mN/m e produção de biomassa de 10,5 g/L.

Ilori et al. (2008) isolaram *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* obtidas de uma lagoa poluída e avaliaram seu potencial de produção de biossurfactantes em meio de cultivo contendo 1% de óleo diesel durante 7 dias. A atividade emulsificante das leveduras foi de 61,4% e 64,2%, respectivamente, sendo que a atividade emulsificante aumentava proporcionalmente com o crescimento celular.

Luna et al. (2014) investigaram a produção de biossurfactantes por *Candida Sphaerica* em meio de cultivo contendo 9% de óleo de amendoim e 9% de resíduo da produção de milho, utilizando frascos para cultivo e um biorreator. A medida da tensão superficial da água foi reduzida de 72 mN/m para 25 mN/m quando utilizado os frascos de cultivo e para 27 mN/m quando utilizado o biorreator, e apresentando um rendimento de 21 g/L em 144 horas de cultivo. O Quadro 1 resume os principais parâmetros das referências acima citadas:

Quadro 1 – Fatores de influência para produção de biossurfactantes por levedura

Levedura	Fonte de carbono	Quantidade adicionada	Tempo de cultivo	Variável de resposta	Valor	Fonte
<i>Pseudozyma hubeiensis</i> <i>Pseudozyma antarctica</i> <i>Pseudozyma aphidis</i>	Glicose e óleo de soja	4 % e 4%	10 dias	Tensão superficial	35,8, 7,2 e 44,3 mN/m	Sari et al. (2014)
<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>	Água residuária de mandioca	80%	2 dias	Tensão superficial Produção de Biomassa	26,78 mN/m 10,5 g/L	Fai et al. (2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida albicans</i>	Óleo diesel	1%	7 dias	Atividade emulsificante	61,4% 64,2%	Ilori et al. (2008)
<i>Candida Sphaerica</i>	Óleo de amendoim e resíduo de milho	9%	6 dias	Tensão superficial Produção de Biomassa	27 mN/m 21 g/L	Luna et al. (2014)

### 2.2.1 Parâmetros que influenciam a produção de biossurfactantes por leveduras

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos podem ser influenciados por: fontes de carbono e nitrogênio, presença de micronutrientes, pH, temperatura e agitação do meio. Estes fatores afetam a quantidade de biossurfactante a ser produzido e na determinação dos requerimentos nutricionais necessários as células. A

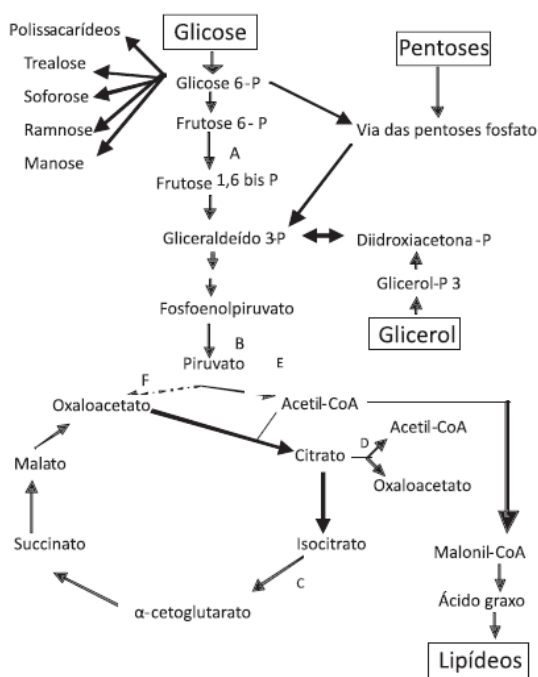
produção é induzida através da inserção de compostos lipofílicos no meio de cultivo, exposição da célula a condições de estresse (como baixa concentração de nutrientes), variações no pH, na temperatura e na velocidade de agitação (FONTES et al., 2008).

### **2.2.1.1 Fontes de carbono e nitrogênio**

Os substratos solúveis em água (glicose e sacarose, por exemplo), são utilizados por primeiro pelas células microbianas para o metabolismo celular e para a formação da fração polar da molécula do biossurfactante. O substrato hidrofóbico é então utilizado em um segundo momento, exclusivamente para a produção da fração apolar (hidrocarbônica) da molécula anfipática do biossurfactante. As diversas vias metabólicas utilizadas nos processos de produção dos biossurfactantes irão depender principalmente da fonte de carbono (ou da fonte de substrato) utilizada no meio de cultivo (FARIA, 2010).

O substrato solúvel em água é degradado até a formação de glicerol-6-fosfato (um dos principais carboidratos presentes na porção hidrofílica de biossurfactantes). A glicose é então oxidada a piruvato, e convertida a Acetil-CoA através da glicólise. A união da Acetil-CoA com o oxaloacetato produz malonil coenzima A e em seguida ácidos graxos, que atuam como fatores principais para a síntese de lipídios. Algumas enzimas chaves que auxiliam na formação deste processo são: fosfofrutoquinase (A); Piruvato quinase (B); Isocitrato desidrogenas (C); Citrato liase (D – estão apenas presentes em leveduras oleaginosas e fungos); Piruvato desidrogenas (E) e Piruvato carboxilase (F). A rota metabólica dos compostos solúveis em microrganismos para a produção de biossurfactantes é apresentada na Figura 1 (FONTES et al., 2008).

Figura 1 - Via metabólica para produção da porção polar de biossurfactantes



Fonte: Fontes et al. (2008)

Quando utilizado um hidrocarboneto como fonte de carbono, o metabolismo encaminha-se para a glicogênese e para a via lipolítica, desta mesma forma produzindo ácidos graxos ou sacarídeos. Com a formação do ácido graxo, este é convertido a acetilcoenzima A através de  $\beta$ -oxidação ou propionilcoenzima A, se os ácidos graxos forem de cadeia ímpar. A partir da formação da acetilcoenzima A, as reações envolvidas são inversas as daquelas envolvidas na glicólise para a formação de glicose-6-fosfato, que dará origem aos polissacarídeos e dissacarídeos que serão formados para a porção hidrofílica. Assim, pode-se afirmar que a formação do biossurfactante pode ser alterado pelo comprimento da cadeia de *n*-alcano utilizadas como fonte de carbono (FONTES et al., 2008).

Quanto à fonte de nitrogênio, necessária para a produção de proteínas e enzimas, diversas fontes têm sido estudadas, tais como: extrato de levedura, peptona, ureia, sulfato de amônio, nitratos, extratos de carne e de malte. Dentre estes, o extrato de levedura é o mais utilizado como fonte de nitrogênio, variando a sua concentração de acordo com o microrganismo e o meio de produção (FARIA, 2010).

Oliveira (2014) utilizou para a produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* concentrações de 1g/L, 3 g/L ou 5g/L de sacarose, melão, manipueira (resíduo da produção de mandioca) e soro de queijo. A produção de biossurfactantes obtida foi de 1,12 g/L,

0,35g/L, 1,4g/L e 5,1 g/L para a manipueira, o melão, o soro de queijo e a sacarose, respectivamente.

### **2.2.1.2 Formas de cultivo, temperatura e agitação**

O crescimento dos microrganismos que produzem biossurfactantes geralmente está associado à quantidade de nutrientes disponíveis (ARAUJO et al., 2013). A cinética de produção apresenta muitas variações, e poucas generalizações podem ser feitas a respeito (DESAI; BANAT,1997). Entretanto, por conveniência, os parâmetros cinéticos são agrupados em quatro grupos principais conforme mostra o Quadro 2. Dentre as formas de produção de biossurfactantes, as mais utilizadas para leveduras são as fermentações por batelada simples e batelada alimentada. Estas formas de cultivo são utilizadas para bioprocessos pois possuem características que tornam sua aplicação atrativa, como uso de menos equipamentos (o que exige menor manutenção e acompanhamento), e melhor controle da manutenção da assepsia, assegurando a presença apenas do microrganismo necessário ao processo (FONTES et al., 2008).

O controle e otimização das condições de cultivo (temperatura, pH, agitação e aeração), está diretamente ligada ao sucesso em casos de ampliação de escala de produção, fator que pode ser definitivo para torna-los economicamente competitivos se comparados aos surfactantes químicos. A maior parte das fermentações envolvendo produção de biossurfactantes ocorre em faixas de temperaturas que variam entre 25°C à 30°C, sendo este um grande fator de influencia na quantidade de biossurfactante a ser produzido e no desempenho do microrganismo utilizado. O fator de aeração e agitação também deve ser controlado, uma vez que são facilitadores da entrada de oxigênio no meio, e atuam na transferência deste para a fase aquosa do meio (FARIA, 2010).

Quadro 2 – Classificação da cinética de produção de biossurfactantes.

<b>Grupo</b>	<b>Definição</b>
Produção associada ao crescimento	Relação direta entre crescimento celular, consumo de substrato e produção de biossurfactante, ocorrendo geralmente na fase exponencial de crescimento.
Produção sob condições de limitação de crescimento	Aumento na produção de biossurfactantes resultante da limitação de um nutriente no meio de cultivo. A maior produção ocorre na fase estacionária de crescimento, onde a disponibilidade de nutrientes é limitada.
Produção por células imobilizadas	Produção onde a multiplicação celular é inexistente. Entretanto as células ainda utilizam fontes de carbono do meio de cultivo para a produção de biossurfactantes.
Produção com suplementação de precursores	Adição de precursores ao meio de cultivo gera alterações quali e quantitativas na produção. A suplementação pode ser introduzida com compostos hidrofóbicos e hidrofílicos.

Fonte: FARIA, 2010; DESAI e BANAT (1997), adaptado.

Almeida et al. (2015) avaliaram diferentes concentrações de fontes de carbono residuais para a produção de biossurfactante por *Candida tropicalis*, como o melão, a milhocina (resíduo da produção de milho) e o óleo de canola sob diferentes condições de agitação e percentual de inóculo adicionado ao meio. A produção foi mais efetiva (rendimento de 30g/L de biossurfactante e redução da tensão superficial para 29,52 mN/m) quando utilizado 2,5% de melão, milhocina e óleo de canola no meio, sob uma agitação de 250 rpm e inóculo de 2%.

Santos et al. (2014) buscaram a otimização da condição ideal para a produção de biossurfactantes de *Candida lipolytica*, em meio de cultivo contendo 5% de gordura animal e 2,5% de milhocina (resíduo da produção de milho) como fontes de carbono. Através de um planejamento experimental 2<sup>3</sup>, avaliaram diferentes condições de agitação (200, 300 e 400 rpm), aeração (0,1 e 0,2 Volume de ar por Volume de Meio) e tempo de cultivo (48, 96 e 144 horas). A condição ideal de cultivo deu-se com agitação a 200 rpm, 144 horas de cultivo e sem aeração, favorecendo a redução da tensão superficial (21,20 mN/m) e a produção de biomassa (7,32 g/L), permitindo aumento da produção do biossurfactante.

### 2.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras em geral caracterizam-se por serem microrganismos unicelulares e eucarióticos que se reproduzem através de reprodução assexuada (COSTA, 2008). Possuem forma oval, esférica ou elíptica dependendo da subespécie a que pertencem. Devido à ausência de flagelos e meios de locomoção, é imóvel. O tamanho celular irá variar conforme espécie, nutrição e idade celular (GUIMARÃES, 2005).

Para seu desenvolvimento, necessitam principalmente de fontes de carbono, sendo os carboidratos sua maior fonte nutricional. Como exemplos de fontes de carbono que podem ser assimilados pela célula, pode-se citar açúcares como glicose, sacarose, frutose e manose. A fermentação destes açúcares pode ocorrer em presença ou ausência de oxigênio (aerobiose ou anaerobiose), produzindo gás carbônico ou álcool.

A grande vantagem do uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* objetivando bioprocessos está na ausência de riscos toxicológicos e patogênicos. Por isto, possui grande valor comercial e industrial, onde seu uso é altamente visado em processos fermentativos de pães, cervejas, vinhos e destilarias de etanol. São células que possuem capacidade de desenvolvimento em diferentes composições de substratos disponíveis, de fácil obtenção e multiplicação celular, e de fácil manipulação genética (DEL RIO, 2004).

A levedura possui facilidade em ser modificada geneticamente através da recombinação do DNA, melhoramento genético, clonagens de cepas e seleção por estresse celular (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Foi o primeiro organismo eucariótico com sua sequência genômica completamente determinada, obtendo-se informações referentes aos seus genes, proteínas e enzimas, tornando-se um modelo para estudo dos processos biológicos fundamentais. Por ser muito resistente a altas faixas de pH e concentrações de açúcar e etanol, esta levedura possui um menor risco de contaminação na fermentação industrial, aumentando o interesse de seu uso na indústria biotecnológica para a produção de glicerol, ácidos orgânicos e álcoois. (NEVOIGT, 2008).

A biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* é rica em proteínas, vitamina B, lipídios, minerais essenciais e carboidratos. De acordo com Sgarbieri et al. (1999), a composição da célula íntegra de *Saccharomyces* sp. é de 48,74% de proteínas, 8,55% de cinzas, 3,33% de lipídios e 35,00% de carboidratos. Caballero-Córdoba et al. (1997) também caracterizaram a levedura, obtendo uma composição de 48,51% de proteínas, 3,44% de lipídios, 8,3% de cinzas e 32,86% de carboidratos.



A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui uma parede celular que representa de 15% à 30% da massa seca da célula. Esta parede é responsável pela estrutura física e estabilidade da célula, possuindo permeabilidade seletiva e permitindo o transporte de nutrientes até o citoplasma, sendo composta por  $\beta$ -1,6 glucano, quitina e manoproteínas. As manoproteínas constituem a camada externa da parede celular, e são glicoproteínas (proteínas ligadas covalentemente a carboidratos) formadas por proteínas e polissacarídeos (SMITH et al., 2000).

As propriedades das manoproteínas como agentes emulsificantes foram verificadas durante a realização de testes com o composto intracelular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando diferentes óleos e solventes orgânicos (CAMERON et al., 1988). Por sua estabilidade na formação de emulsões, e por ser composto por 44% de carboidratos e 17% de proteínas, a manoproteína foi classificada como um biossurfactante polimérico de alto peso molecular por Desai e Banat (1997).

## 2.4 Purificação e recuperação de biossurfactantes

Decorrida a produção dos biossurfactantes, o passo seguinte é a purificação destes do meio de cultivo ou da fermentação a que foram submetidos, a fim de torná-los disponíveis para as aplicações a que estão destinados (BHARDWAJ et al., 2013).

A purificação de biossurfactantes dependerá principalmente de fatores relacionados às propriedades físico-químicas dos biossurfactantes produzidos, sua solubilidade em água, tipo de substrato e técnica de fermentação utilizada. O processo de recuperação varia também em função da localização do biossurfactante na célula microbiana. Quando extracelular, devem ser recuperados do meio de cultivo em que foram produzidos, através da separação do meio e da célula. Os biossurfactantes intracelulares necessitam primeiramente do rompimento da célula microbiana e após isto, os processos de recuperação propriamente ditos, que envolvem precipitações com ácidos e sais, extração com solventes e centrifugação.

Os álcoois como acetona e etanol podem ser utilizados a fim de favorecer processos de precipitação. A célula livre de meio de cultivo é misturada com uma solução de acetona ou etanol e mantida a 4°C por até 20 horas, a fim de que o solvente precipite o biossurfactante. Ácidos são altamente indicados para o processo de precipitação por serem de baixo custo e apresentarem alto percentual de recuperação de biossurfactantes. Após a precipitação, o processo geralmente é seguido por centrifugação a fim de coletar o produto puro. A extração por solventes como clorofórmio, butanol, metanol e hexano também auxiliam na separação de

biossurfactantes, entretanto estes solventes são tóxicos e podem encarecer o processo (KATEMAI, 2011).

Luna et al. (2014) isolaram o biossurfactante produzido por *Candida sphaerica* através da acidificação do meio de cultivo livre de células com ácido clorídrico (HCl) até pH 2,0 seguido de precipitação com dois volumes de etanol por 24 horas a 4°C. Após, as amostras foram centrifugadas e secas a 37°C durante 48 horas.

Muthezhilan et al. (2014) purificaram biossurfactantes de leveduras marinhas, dentre elas *Rodotorula* sp. Utilizou-se centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos do meio de cultivo, coleta do sobrenadante, redução do pH do meio até 2,0 com 1 N de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e adição de clorofórmio e metanol ao sobrenadante em uma proporção 2:1 durante 12 horas.

## 2.5 Caracterização química dos biossurfactantes

Através da caracterização química, é possível conhecer as estruturas completas que compõem o biossurfactante, onde se utilizam técnicas como cromatografia e espectroscopia. Algumas técnicas são: espectroscopia de massa e cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em camada delgada (utilização de reveladores para a identificação de biossurfactantes), infravermelho e ressonância magnética nuclear (MATSUURA, 2004; KATEMAI, 2011). A combinação destas duas técnicas é recomendada para que tenha uma caracterização completa dos compostos.

Jain et al. (2013) estudaram a caracterização química do biossurfactante proveniente da bactéria *Klebsiella* sp utilizando espectroscopia de infravermelho de Fourier para determinação da composição química e cromatografia em gel. Os estudos concluíram que o biossurfactante possui componentes de monossacarídeos como hexoses e pentoses. O biossurfactante pode ser classificado como um complexo polissacarídeo proteína. A cromatografia em gel gerou um único pico correspondente a 2366 kDa e a caracterização química pela espectroscopia demonstrou um pico entre 3391 e 3413 cm<sup>-1</sup>, e confirmou a natureza dos biossurfactantes glicopeptídicos.

Matsuura (2004) testou a caracterização química de um biossurfactante produzido por *Planococcus citreus*, através de Cromatografia em camada delgada, Espectrometria de massa e infravermelho e Espectrometria de ressonância magnética, onde se concluiu que o microrganismo produz uma mistura de oligômeros com baixo peso molecular, bem como a

identificação de frações polares e apolares na molécula, confirmando a identificação de um biossurfactante.

## 2.6 Biorremediação: principais técnicas e fatores de influência

Souza et al. (2014a) definem biorremediação como uma técnica onde hidrocarbonetos são decompostos por microrganismos, que o utilizam como fonte de carbono para a obtenção de energia, gerando como subprodutos dióxido de carbono, água e sais minerais. Quanto maior é a população microbiana que irá consumir o contaminante, mais rápido e eficiente será o processo de biorremediação.

A biorremediação conceitua-se como o tratamento de contaminantes por decomposição biológica através de ação microbiana. Estes microrganismos metabolizam componentes tóxicos para o meio ambiente para a geração de energia na forma de carbono, nitrogênio, potássio, água e sais minerais. Dentre os compostos orgânicos biodegradáveis podem-se citar hidrocarbonetos derivados do petróleo, pesticidas e solventes halogenados (SEMPLE et al., 2000; SARKAR et al., 2005).

Bento et al. (2005), mostram que esta técnica fundamenta-se em métodos naturais e simples, menos agressiva para o meio ambiente, com baixo custo se comparado a outras técnicas de remediação. É considerada uma técnica destrutiva dos contaminantes e permite que este seja degradado até atingir valores aceitáveis para o solo. Entretanto, a biorremediação ainda possui algumas desvantagens, como possibilidade de colmatação do meio poroso devido ao crescimento da biomassa e inibição por compostos competidores.

A biorremediação pode ser *in situ*, com a ação dos microrganismos no próprio local, através de injeção e recirculação de fluídos e biobarreiras permeáveis. É uma tecnologia considerada como a menos impactante para o meio ambiente, se comparada a outras técnicas que envolvam escavação e transporte de solos contaminados, o que ainda gera menor custo (MARIANO, 2006). A biorremediação *ex situ* ou *on site* ocorre pelo processo de retirada do solo contaminado do local, onde serão tratados em um sistema separado, em uma instalação situada em outro local (*ex situ*) ou na própria área contaminada (*on site*). Esse tratamento pode ocorrer em biopilhas ou reatores fechados, sendo que o tratamento com biopilhas irá acarretar um menor custo e maior facilidade de operação (CETESB, 2007).

Dentre as técnicas de biorremediação mais utilizadas, pode-se citar a bioestimulação, a bioaugmentação e a atenuação natural. A bioestimulação é uma técnica que induz ao crescimento dos microrganismos presentes no meio contaminado através da suplementação da

fonte nutricional, através do fornecimento de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio), oxigênio, substâncias para a correção do pH e aceptores de elétrons adicionados a fim de auxiliar a degradação do contaminante (HERRERO e STUCKEY, 2015). Outros nutrientes podem ser adicionados na forma de fertilizantes orgânicos e inorgânicos (tais como ureia, serragem, lodo) no local contaminado. De acordo com Mariano (2006), a maior necessidade microbiana são fontes de nitrogênio e fósforo para o incremento da biomassa, pois estes são considerados fatores limitantes na degradação de compostos.

A bioaugmentação trata-se da técnica onde microrganismos são adicionados no ambiente contaminado a fim de acelerar e completar o processo de biodegradação (SOUZA et al. 2014a). É aplicada em casos onde os microrganismos endógenos não são capazes de efetivamente degradar o contaminante, então microrganismos específicos para a degradação do contaminante em questão são adicionados a fim de auxiliar na dissipação do contaminante, acelerando o processo de biorremediação (PIMMATA et al., 2013).

A atenuação natural é definida como um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem naturalmente, através da ação de microrganismos presentes no meio, resultando da degradação dos contaminantes. O processo ocorre sem a intervenção humana, que realiza apenas o monitoramento da pluma de contaminação. Alguns processos físico-químicos que auxiliam a atenuação natural são a sorção, volatilização, diluição e dispersão (SARKAR et al., 2005).

Os fatores de sucesso da biorremediação irão depender das condições do meio, tais como temperatura, pH, teor de oxigênio e nutrientes (ASSUNÇÃO; ROLFHS, 2012), que podem influenciar na atividade microbiana (COOKSON, 1994).

Os microrganismos necessitam de macronutrientes, sendo os mais importantes: carbono (C), o nitrogênio (N) e o fósforo (P), sendo o carbono a principal fonte nutricional para a célula microbiana. O nitrogênio é utilizado na formação de aminoácidos e enzimas, sendo absorvido em forma de amônia e nitrato por microrganismos decompositores, e como nitrogênio atmosférico pelos fixadores deste elemento. O fósforo é necessário à sintetização de ATP e DNA, e se apresenta na natureza na forma de fosfatos orgânicos e inorgânicos (SIQUEIRA et al., 1994; SPINELLI, 2005). Os micronutrientes, principalmente os metais como Fe, Ni, Co, Mo e Zn são necessários para as atividades enzimáticas, e requeridos em menores concentrações.

Mariano (2006) aponta que para a degradação de compostos, fontes de nitrogênio e fósforo são as mais requeridas, para que se efetive o incremento da biomassa e consequente

aumento na biodegradação dos compostos. Assim, pode-se concluir que a concentração de nutrientes é um fator limitante da biodegradação.

Quanto ao pH, Corseuil e Alvarez (1996), mostram que o valor ideal de é próximo a neutralidade, entretanto diversos microrganismos podem desempenhar suas funções em faixas de pH mais amplas. Spinelli (2005) sugere que o pH ótimo para a degradação está entre 7 e 8, sendo que valores acima de 9,5 inibem a degradação dos compostos. Cardoso (1992) aponta que o pH ideal para a ação dos microrganismos no solo deve encontrar-se entre 5,5 e 8,5.

A temperatura é um dos fatores que mais influenciam a atividade microbiana, pois as baixas temperaturas reduzem a permeabilidade da célula e dificultam a absorção de nutrientes e contaminantes. Já as temperaturas altas levam a alta atividade enzimática e em consequência, maior biodegradação. Com temperaturas fora da faixa de valores ótimos, as proteínas, enzimas e ácidos nucleicos são inativados (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). De acordo com Spinelli (2005), a temperatura ideal para a degradação de hidrocarbonetos varia de 18°C à 30 °C.

Como aceptores finais de elétrons, destaca-se principalmente o oxigênio (MESQUITA, 2004) e alguns outros compostos, como o nitrato, óxidos de ferro, sulfato, dióxido de carbono e água (CORSEUIL; ALVAREZ,1996).

### **2.6.1 Aplicação de biossurfactantes em biorremediação**

Biossurfactantes podem auxiliar o processo de biorremediação através da mobilização, solubilização ou emulsificação de hidrocarbonetos, resultando no aumento da biodegradação. Através da estabilidade das emulsões, os biossurfactantes tornam os hidrocarbonetos biodisponíveis para a biodegradação. A biorremediação de solos por biossurfactantes é realizada através da remoção de moléculas orgânicas adsorvidas nos poros do solo, que formam micelas quando os biossurfactantes presentes no meio estão em maior volume que a concentração micelar crítica (LIN, 2011).

Biossurfactantes de alto peso molecular, como os produzidos de forma intracelular pela levedura *S. cerevisiae*, geram aumento significativo na emulsificação de compostos oleosos. Para isto, a extremidade hidrofóbica da molécula se ligará com o óleo no interior da molécula, e a extremidade hidrofílica será ligada as partes aquosas do exterior da molécula (NIEVAS et al., 2008; COSTA et al., 2010). Este processo ocorre através da interação entre gotículas de óleos em suspensão em um líquido (comumente água). Biossurfactantes com alto

peso molecular são capazes de formar emulsões com alta eficiência, sendo por isto aplicados como aditivos a fim de estimular a biorremediação. (Edwards et al., 1994).

Morais e Abud (2013), que estudaram o potencial de biorremediação utilizando biossurfactantes. Os resultados obtidos mostraram que uma concentração de 1,5% de biossurfactante era necessário para remediar um solo arenoso contaminado com petróleo, e que quando utilizada glicose como fonte de carbono, o biossurfactante produzido pela levedura *Yarrowia lipolytica* demonstrou maiores resultados de biorremediação do contaminante (78%).

Chapirão et al. (2015) avaliaram o potencial de aplicação dos biossurfactantes de *Candida sphaerica* e *Bacillus sp.* Ambos os biossurfactantes foram capazes de remover óleo de motor de um solo arenoso em 90% e 40%, para os biossurfactantes de *C. sphaerica* e *Bacillus sp.*, respectivamente. Entretanto, quando o meio foi enriquecido com molase, a biodegradação do óleo atingiu quase 100% para o biossurfactante de *Bacillus* em 90 dias de ensaio, enquanto que o percentual de biodegradação para *C. sphaerica* atingiu menos de 50%.

Oliveira (2014) verificou a produção de biossurfactante pela bactéria *Bacillus pumilus* utilizando soro de queijo, sacarose e melão como substratos e sua aplicação na contaminação por hidrocarbonetos de um solo agrícola. O uso do biossurfactante na biorremediação do solo reduziu as concentrações de hidrocarbonetos em até 95,6%, comprovando o potencial de aplicação desta bactéria em biorremediação.

## **2.6.2 Biorremediação de biodiesel**

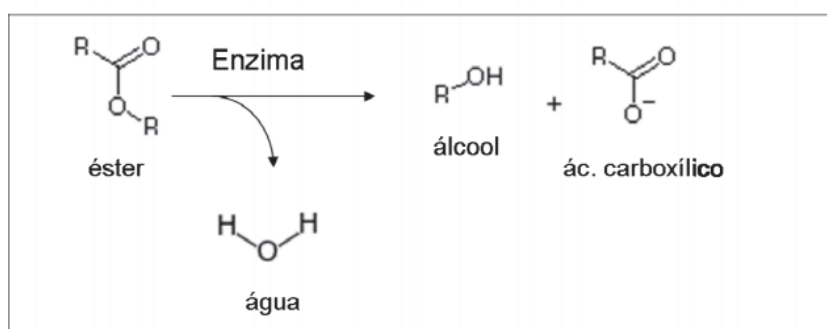
De acordo com a legislação brasileira, o biodiesel foi introduzido na matriz energética com a finalidade de estimular sua participação nas bases econômicas, sociais e ambientais. Este foi definido como um biocombustível derivado de uma biomassa de origem renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão (BRASIL, 2005). A fim de incentivar seu uso no Brasil, é estabelecida a adição obrigatória de 8% de biodiesel ao óleo diesel que é destinado ao consumidor final (BRASIL, 2014).

Composto formado por ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeias longas (de 16 a 18 carbonos), o biodiesel é originado de fontes renováveis de energia, como óleos vegetais (soja, mamona, canola, palma, girassol, amendoim, entre outros) e gorduras animais que provem de sebo bovino, suíno e de aves. Estes são constituídos de triglicerídeos, originados da combinação de glicerol e ácidos graxos. Os ácidos graxos possuem em sua formação uma cadeia hidrocarbônica alifática e um grupamento carboxila terminal (MEYER, 2011). Como

vantagens sobre o diesel, o biodiesel é oriundo de fontes renováveis, atóxico, praticamente igual desempenho no motor (em relação à potência e torque), maior lubrificidade e maior eficiência de queima (RINALDI et al, 2007).

Para a degradação do biodiesel é necessário uma série de enzimas, tais como lipases e esterases, que possuem o potencial de hidrólise de ligações éster, atuando assim em xenobióticos de origem lipídica, e obtendo como resultado álcoois e ácidos graxos como produto da oxidação (BOCZAR et al., 2001). A hidrólise a partir das enzimas lipase e esterase dá-se através da ligação do substrato com a enzima, formação de um complexo acetil-enzima com liberação de um álcool, transformação em um intermediário, conversão deste intermediário em produto (ácido ou éster) e liberação da enzima do substrato. Este processo é resumido na Figura 2 (BOCZAR et al., 2001).

Figura 2 – Hidrólise de éster por enzimas e formação de ácido graxo



Fonte: Meyer (2011).

Cecchin et al. (2016), apontam que para determinar o comportamento do contaminante no ambiente faz-se necessário conhecer as estruturas químicas e os compostos do biodiesel, que irão determinar as características físico-químicas deste composto. Os fatores que mais impactam a mobilidade de um contaminante no solo são: massa molecular, solubilidade em água, pressão de vapor e os coeficientes de partição entre os meios (coeficiente de partição octanol/água e o coeficiente de partição carbono orgânico/água).

A massa molecular de um composto orgânico refere-se a sua densidade e sua solubilidade em meio aquoso. O biodiesel, menos denso que a água, acaba permanecendo na superfície quando em contato com a água, tendendo a permanecer no topo destes, ou na franja capilar quando se tratando de lençóis freáticos. Quanto à solubilidade, o composto apresenta-se hidrofóbico (CHIARANDA, 2011).

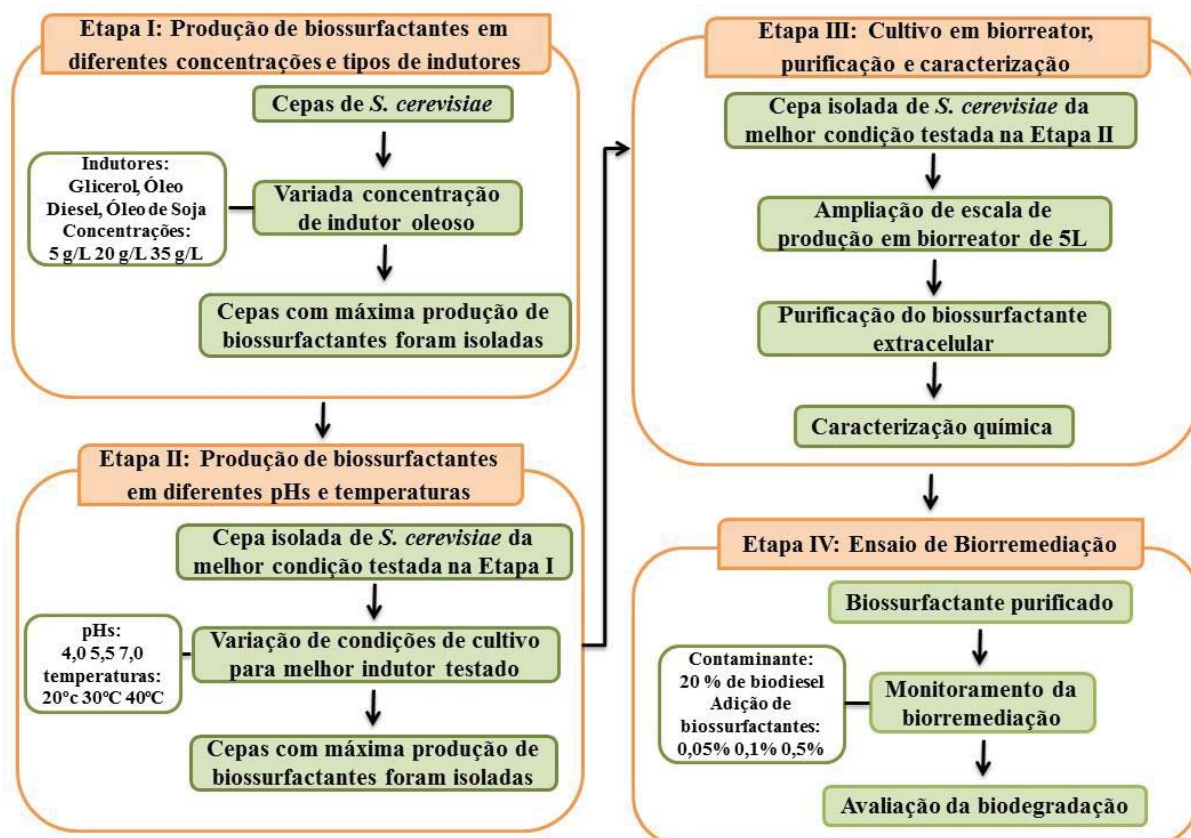
O biodiesel é estudado em casos de biorremediação, pois o aumento da demanda de produção leva a preocupação de como este composto oleoso é assimilado pelos microrganismos presentes no solo. Assim, avalia-se o uso de técnicas de biorremediação, como a bioaumentação (BONATTO, 2013) e bioestimulação (CAVELHÃO, 2011) como alternativas para a biodegradação deste contaminante.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento experimental foi realizado conforme o fluxograma da Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do delineamento experimental utilizado para a produção de biossurfactantes por *S. cerevisiae* e aplicação em processo de biorremediação



A produção de biossurfactantes pela levedura *S. cerevisiae* foi realizada em quatro etapas. Na etapa I, cultivos foram realizados utilizando-se três indutores em diferentes concentrações. Realizou-se o isolamento das cepas em todas as condições de cultivo, para que no ensaio que apresentasse o melhor resultado, fosse realizado o cultivo da etapa II.

Na etapa II, a cepa isolada da melhor condição anterior foi avaliada quanto a sua capacidade de produção de biossurfactantes variando-se as faixas de pHs e temperatura durante os cultivos. Da mesma forma, isolaram-se as cepas que em todas as condições experimentais, sendo que a cepa que apresentou melhor produtividade frente às variações propostas foi utilizada na terceira etapa (Etapa III), onde ampliou-se a escala de produção para um biorreator de bancada com capacidade de produção de 5 L. O biossurfactante extracelular obtido no biorreator foi purificado e caracterizado quimicamente.

A etapa IV objetivou a realização de um ensaio de biorremediação utilizando diferentes concentrações do biossurfactante produzido na etapa III, a fim de avaliar a aplicação ambiental deste composto como auxiliar no processo de biodegradação de contaminantes.

### 3.1 Etapa I - Produção de biossurfactantes extracelulares por *S. cerevisiae*: variação da concentração e o tipo de indutor

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nesta etapa foi obtida de estudos previamente realizados (KRELING et al., 2015). As cepas utilizadas eram mantidas sob refrigeração à 4°C em meio YED.

A Tabela 1 apresenta o planejamento experimental realizado com o intuito de variar as concentrações e tipos de indutores. Os indutores foram adicionados por serem fontes insolúveis de carbono, responsáveis pela formação da fração apolar da molécula de biossurfactante (BANAT et al., 2010). A glicose foi inserida como fonte solúvel e necessária para formar a fração polar da molécula. Diferentes fontes oleosas de carbono foram testados a fim de verificar sua capacidade de indução da produção de biossurfactantes extracelulares.

Tabela 1 – Delineamento experimental utilizado para avaliar a influência da concentração e tipo de indutores sobre a produção de biossurfactantes por *S. cerevisiae*\*

Experimento	Indutor oleoso	Concentração
E1	Glicerol	5 g/L
E2	Glicerol	20 g/L
E3	Glicerol	35 g/L
E4	Óleo Diesel	5 g/L
E5	Óleo Diesel	20 g/L
E6	Óleo Diesel	35 g/L
E7	Óleo de Soja	5 g/L
E8	Óleo de Soja	20 g/L
E9	Óleo de Soja	35 g/L

\*Ensaio realizado em duplicata.

O inóculo foi preparado com meio de cultivo composto por 20g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 20 g/L de extrato de levedura e 5g/L de indutor (glicerol, óleo diesel e óleo de soja), sendo preparado um inóculo para cada indutor utilizado.

O meio de cultivo utilizado na produção de biossurfactantes foi composto por 10 g/L de peptona, 20 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de glicose e concentrações variadas dos

indutores glicerol, óleo de soja, óleo diesel e glicose, conforme apresentado na Tabela 1. Os cultivos foram preparados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 40 mL de meio, e esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 min. Posteriormente, 10 mL de inóculo foram adicionados ao meio de cultivo. Os inóculos eram utilizados sempre na fase exponencial de crescimento, identificada por uma leitura de absorvância entre 0,800 e 1,000, através de espectrofotometria a 600 nm.

Os cultivos foram realizados em duplicata por 4 dias sob agitação constante a 150 rpm e 30°C, e amostras foram coletadas diariamente para a determinação da atividade emulsificante A/O e da tensão superficial dos meios livres de células.

Após a execução destes cultivos, realizou-se o isolamento das cepas de leveduras. As cepas foram isoladas em tubo de ensaio contendo o meio YED (20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 20 g/L de ágar), incubados por 48 h a 36°C. Após o isolamento, a levedura foi repicada em meio YED com adição de 1% de indutor (glicerol, óleo diesel e óleo de soja), e novamente cultivado em tubo inclinado por 48 h a 36°C.

A produção de atividade emulsificante foi comparada entre todos os ensaios realizados, e a cepa do microrganismo que obteve maior produção de biossurfactantes foi utilizado no ensaio subsequente (Etapa II).

### **3.2 Etapa II - Produção de biossurfactantes extracelulares por *S. cerevisiae*: variação das condições de pH e temperatura**

Para avaliar os efeitos das variações de pH e temperatura na produção de biossurfactantes extracelulares por *Saccharomyces cerevisiae*, um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com adição de três pontos centrais (Tabela 2) foi executado.

O indutor glicerol foi escolhido para este ensaio por ser o que induziu a maior produção de biossurfactantes na primeira etapa. Esse indutor é um resíduo da produção de biodiesel, sendo de grande interesse otimizar sua capacidade como fonte nutricional para a produção de biossurfactantes (BASTOS, 2011), agregando valor ao resíduo e reduzindo o custo do bioprocessamento.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* adaptada quando utilizado o indutor glicerol na concentração de 5g/L foi utilizada para o preparo do inóculo. O meio de cultivo para o preparo do inóculo continha 20g/L de glicose, 10g/L de peptona, 20g/L de extrato de levedura e 5g/L do indutor.

O meio de cultivo utilizado na produção de biossurfactantes foi composto por 10 g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 20 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de glicerol (indutor selecionado e utilizado a fim de estimular a produção de biossurfactantes extracelulares). Os meios de cultivos foram preparados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 40 mL de meio, e esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 min. Os meios de produção foram inoculados obedecendo a uma razão de inoculação de 1:5 (volume de inóculo: volume de meio), sempre que o crescimento celular atingisse a fase exponencial de crescimento, identificada por uma absorbância entre 0,800 e 1,000 através de espectrofotometria a 600 nm.

O pH do meio de cultivo foi ajustado com soluções de 1,0 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NaOH conforme delineamento experimental da Tabela 2.

A produção de biossurfactantes foi realizada por 4 dias sob agitação constante a 150 rpm e temperaturas variadas conforme o planejamento experimental da Tabela 2. Amostras foram coletadas diariamente para determinar a atividade emulsificante A/O, a tensão superficial, o crescimento celular e o pH do meio de cultivo livre de células.

Tabela 2 - Níveis reais e codificados do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com adição de pontos centrais para produção de biossurfactantes extracelulares

<b>Experimento</b>	<b>X<sub>1</sub> - pH</b>	<b>X<sub>2</sub> – Temperatura (°C)</b>
E10	4 (-1)	20 (-1)
E11	7 (+1)	20 (-1)
E12	4 (-1)	40 (+1)
E13	7 (+1)	40 (+1)
E14	5,5 (0)	30 (0)
E15	5,5 (0)	30 (0)
E16	5,5 (0)	30 (0)

Novamente, realizou-se o isolamento da levedura em meio YED com adição de 1% de indutor para cada tratamento proposto. A produção de atividade emulsificante foi comparada entre todos os ensaios realizados, e o microrganismo que obteve maior produção de biossurfactantes foi utilizado em um ensaio de ampliação de escala de produção.

### 3.3 Etapa III - Produção de biossurfactante extracelular em biorreator de bancada, purificação e caracterização

A melhor condição experimental verificada na produção com a levedura cultivada em diferentes faixas de pH e temperatura adaptada teve sua cepa isolada e sua escala de produção ampliada utilizando-se biorreator (Solab, modelo SL135), contendo 3 litros de meio de cultivo, conforme Figura 4.

Figura 4 – Biorreator de bancada utilizado na produção de biossurfactante extracelular por *S. cerevisiae*



Utilizou-se a cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* previamente isolada de um cultivo contendo 5 g/L de indutor glicerol, com pH inicial de 5,5 e 30°C de temperatura de cultivo. A levedura adaptada foi utilizada para o preparo do inóculo em 600 mL de meio de cultivo composto por 20g/L de glicose, 10g/L de peptona, 20g/L de extrato de levedura e 5g/L do indutor.

Para a produção de biossurfactantes em biorreator preparou-se 2,4 L de meio de cultivo contendo 10 g/L de glicose, 10 g/L de peptona, 20 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de glicerol. O pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 5,5 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O meio de cultivo foi preparado em béquer de 4 litros e dividido igualmente em erlenmeyers de 2 litros para esterilização em autoclave a 121°C durante 20 min. A inoculação manteve a relação de 1:5 (volume de inóculo:volume de meio).

O cultivo foi realizado por 4 dias sob agitação constante a 150 rpm e 30°C. Amostras foram coletadas diariamente para determinação da atividade emulsificante A/O, da tensão

superficial, pH e crescimento celular. O biossurfactante extracelular produzido foi posteriormente purificado e liofilizado para caracterização do tipo de biossurfactante produzido e para uso em biorremediação.

Foi necessário executar 5 bateladas de produção em biorreator, sendo uma para a determinação da produção de biossurfactantes ao longo dos 4 dias de cultivo, e as demais fermentações foram realizadas a fim de obter a quantidade necessária de biossurfactante purificado para sua caracterização química e para a aplicação em biorremediação. Estas fermentações foram realizadas por 2 dias, pois observou-se no primeiro cultivo em biorreator uma produtividade máxima de emulsões atingida neste período.

### **3.3.1 Purificação de biossurfactante**

O biossurfactante extracelular produzido no biorreator foi purificado para aplicação em um ensaio de biorremediação. A purificação foi realizada conforme método proposto por Pareilleux (1979), onde o meio livre de células centrifugado por 30 min a 3500 rpm foi acidificado para pH 2,0 com ácido clorídrico (HCl) 6 N e precipitado com metanol na proporção de 1:2 (extrato:metanol). Após 24 horas a 4°C, as amostras foram centrifugadas a uma rotação de 3900 rpm por 40 minutos. O precipitado foi coletado e liofilizado (liofilizador marca Terroni, modelo LS 3000).

### **3.3.2 Identificação do biossurfactante produzido**

A identificação dos biossurfactantes produzidos para aplicação no ensaio de biorremediação foi realizada por espectrometria de massas no Laboratório ThoMSON de Espectrometria de Massas, da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

A amostra foi preparada dissolvendo 2 µg do biossurfactante em uma solução de metanol/água (1:1 v/v). Para preparar a placa de MALDI, 1 µL do biossurfactante foi colocado sobre uma placa de 384 local (aço inoxidável polido) e seco à temperatura ambiente. A amostra seca foi coberta com 1 µL de uma solução de matriz DHB (30 mg/mL em metanol). As análises foram realizadas por MALDI-MS em Bruker Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), operada em modo refletor e equipada com um laser de smart beam 337 nm. Cada espectro foi adquirido com 700 laser shots em um único disparo. A região de m/z sobre a qual os íons foram detectados foi de 1000 a 1600 m/z no modo íon positivo. A faixa de potencia do laser foi ajustada para 60% e as medições realizadas nas

seguintes condições: fonte de íons 1 = 19,0 kV, fonte de íons 2 = 16,6 kV, tensão lente = 8,7 kV, tensão refletor 1 = 21,0 kV, tensão refletor 2 = 9,70 kV, delay de extração dos íons = 1.1 ns, supressão = 500 Da.

### 3.4 Etapa IV - Ensaio de biorremediação

O solo utilizado foi coletado em uma trincheira aberta no Centro Tecnológico de Engenharia Civil (CETEC) da Universidade de Passo Fundo, RS. Este foi classificado pedologicamente por Streck et al. (2008), como um Latossolo Vermelho Distrófico Húmico e geotecnicamente como argila de alta plasticidade.

O solo apresenta pH ácido, baixa CTC e alto teor de argila (THOMÉ et al., 2014), sendo estas características típicas em solos com predominância do argilomineral caulinita. A caracterização geotécnica, física e química do solo está apresentada da Tabela 3. De modo geral, solos argilosos possuem baixa permeabilidade. Entretanto, latossolos com boa estruturação, como o apresentado no estudo, possuem uma quantidade maior de macroporos, o que facilita a passagem de água e ar (REGINATTO, 2012).

Tabela 3 – Caracterização geotécnica, física e química do solo em estudo.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
Argila (%)	72
Silte (%)	15
Areia (%)	13
Limite de Liquidez (%)	53,0
Limite de Plasticidade (%)	42,0
Peso Específico das Partículas (kN/m <sup>3</sup> )	26,7
Índice de Vazios	1,19
Peso Específico Natural (kN/m <sup>3</sup> )	16,3
Grau de Saturação (%)	75,7
Porosidade (%)	54
pH	5,1
Matéria Orgânica (%)	< 0,8
Condutividade Hidráulica (cm/s)	1,39 x 10 <sup>-3</sup>
Fósforo (mg/dm <sup>3</sup> )	0,7
Potássio (mg/dm <sup>3</sup> )	23
Alumínio (cmolc/dm <sup>3</sup> )	2,7
Cálcio (cmolc/dm <sup>3</sup> )	1,1
Magnésio (cmolc/dm <sup>3</sup> )	0,7
H+Al (cmolc/dm <sup>3</sup> )	10,9
CTC (cmolc/dm <sup>3</sup> )	12,7
Saturação de Bases (%)	15
Saturação de Alumínio (%)	60

Fonte: THOMÉ et al., 2014.

A este solo foi adicionado o composto oleoso biodiesel, adquirido junto à empresa BSBIOS, localizada em Passo Fundo/RS, que atuará como contaminante do solo.

O ensaio de biorremediação foi realizado em biorreatores hermeticamente fechados, contendo 300 gramas de solo indeformado adicionados com 20% de contaminante (biodiesel) e 15% de água destilada, totalizando uma umidade final de 35%. Concentrações variadas do biossurfactante extracelular (0,05%, 0,1% e 0,5%) foram adicionadas em relação à quantidade de contaminante adicionado ao solo.

As baixas concentrações de biossurfactante adicionado foram selecionadas para verificar sua influência no processo de emulsificação dos contaminantes no solo e não com o objetivo de que os biossurfactantes fossem adicionados nas concentrações que caracterizassem seu uso como bioestimulantes. O percentual de contaminação foi escolhido a fim de simular um tratamento de solo utilizando-se a técnica de biorremediação *ex situ*, onde devido à alta quantidade de contaminante, opta-se pela coleta e tratamento do solo desestruturado.

Para as mesmas condições propostas, e a fim de verificar a influencia da adição de biossurfactantes no processo de adsorção dos contaminantes, excluindo-se os fatores biológicos, ensaios foram realizados com o solo estéril (autoclave por 20 minutos a 120 °C). Os ensaios de biodegradação dos contaminantes em comparação com a técnica de atenuação natural e com a adsorção foram avaliados por um período de 90 dias, em duplicata, conforme planejamento experimental apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Delineamento experimental para o processo de biorremediação

<b>Experimento</b>	<b>Técnica de biorremediação</b>	<b>Contaminante</b>	<b>Solo esterilizado</b>
1	Biossurfactante – 0,05%	Biodiesel – 20%	Não
2	Biossurfactante – 0,1%	Biodiesel – 20%	Não
3	Biossurfactante – 0,5%	Biodiesel – 20%	Não
4	Atenuação Natural	Biodiesel – 20%	Não
5	Biossurfactante – 0,05%	Biodiesel – 20%	Sim
6	Biossurfactante – 0,1%	Biodiesel – 20%	Sim
7	Biossurfactante – 0,5%	Biodiesel – 20%	Sim
8	Atenuação Natural	Biodiesel – 20%	Sim

As variáveis de resposta do processo foram o teor residual de contaminante, determinado a partir dos óleos e graxas residuais após a biodegradação ou a adsorção do



contaminante no solo, a atividade respirométrica microbiana a partir da liberação de CO<sub>2</sub> e a degradação das cadeias carbônicas a partir de cromatografia gasosa. A umidade do solo foi ajustada para 35% (20 % de contaminante mais 15% de água), e foi monitorada durante o tempo de ensaio.

### 3.5 Determinações Analíticas

#### 3.5.1 Atividade Emulsificante Água em Óleo

A análise foi realizada de acordo com o método adaptado do índice de emulsificação, proposto por Cooper e Goldenberg (1987). O meio de cultivo foi centrifugado e 3,5 mL do sobrenadante coletado e adicionado em tubo de ensaio juntamente com 2 mL de biodiesel.

A mistura foi agitada em agitador Vórtex a 700 rpm por 1 min. Após 24 h de repouso foi realizada a leitura da altura da emulsão água/óleo formada e da altura total da emulsão (altura da emulsão mais altura da camada remanescente de óleo), com paquímetro eletrônico digital, gerando a atividade emulsificante água/óleo, de acordo com as Equações 1 e 2. Brancos foram realizados utilizando extrato no lugar da amostra.

$$E = \left( \frac{h_{emulsão}}{h_{total}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

$$AE_{A/O} = (E_{amostra} - E_{branco}) \quad (2)$$

Sendo: AE<sub>A/O</sub>= atividade emulsificante água em óleo (UE); H<sub>emulsão</sub>= altura da camada de emulsão; H<sub>total</sub>= altura da camada total; E= relação centesimal entre a altura da emulsão água/óleo e a altura total.

A partir dos resultados obtidos para a atividade emulsificante A/O foram calculadas as produtividades das emulsões em função do tempo de fermentação. A Equação 3 foi utilizada para o cálculo.

$$P_{AE\ A/O} = \frac{AE_{final} - AE_{inicial}}{tempo} \quad (3)$$

Sendo: P<sub>AE A/O</sub>= Produtividade de atividade emulsificante água em óleo (UE/d); AE<sub>final</sub>= atividade emulsificante no tempo final (UE); AE<sub>inicial</sub> = Atividade emulsificante no tempo inicial (UE); Tempo (dias).

### 3.5.2 Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada diariamente no meio livre de células, de acordo com o método do anel (Du-Nuoy's ring method), com tensiômetro marca Biolin Scientific, modelo Sigma 702.

### 3.5.3 Crescimento Celular

A medida do crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* foi avaliada através de construção de curva padrão de células (relação pré-estabelecida entre a concentração celular e a absorbância a 600 nm).

### 3.5.4 pH

A leitura do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada em pHmetro marca Digimed modelo DM-22, em duplicata.

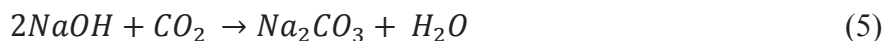
### 3.5.5 Determinação da liberação de CO<sub>2</sub> (atividade respirométrica)

A determinação da liberação de CO<sub>2</sub> nos experimentos foi baseada na metodologia do respirômetro de Bartha, conforme NBR-14.283 - Resíduos em solos – Determinação da Biodegradação pelo Método Respirométrico (ABNT, 1999). A análise foi realizada apenas para os frascos que não foram esterilizados.

Nos biorreatores contendo o solo contaminado foi colocado um béquer de 100 mL com 50 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mol/L. A cada 2 dias este béquer era retirado do biorreator, e uma alíquota de 10 mL da solução de NaOH era transferida para um erlenmeyer de 125 mL, juntamente com 10 mL de uma solução de cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>) 0,2 mol/L e 2 gotas de indicador fenolftaleína. Este precipitado foi titulado com solução 0,1 mol/L de ácido clorídrico (HCl) padronizado. Após a análise, a solução de 50 mL de NaOH era adicionada aos frascos para novas determinações.

O cálculo da quantidade de CO<sub>2</sub> produzido é possível de ser realizado pois o CO<sub>2</sub> resultante da biodegradação reage com o NaOH do interior do frasco, formando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Quando a mistura de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e excesso de NaOH é adicionada a solução de BaCl<sub>2</sub>, ocorre a

reação do  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e do  $\text{BaCl}_2$  formando o precipitado  $\text{BaCO}_3$ , sequestrando o carbonato e garantindo que o  $\text{HCl}$  reaja apenas com o  $\text{NaOH}$  excedente (Equação 5 e 6).



O volume de  $\text{HCl}$  gasto na titulação do  $\text{NaOH}$  torna possível saber, por estequiometria, a quantidade de  $\text{CO}_2$  gerada pelos microrganismos do solo em cada um dos tempos determinados, comparando-os com o volume gasto para titular o branco ( $\text{NaOH}$  sem presença de solo no interior dos frascos), conforme Equação 7:

$$C - \text{CO}_{2(\text{mg})} = (B - V) \cdot M \cdot f \cdot 6 (V_1/V_2) \quad (7)$$

Onde: B = Volume de  $\text{HCl}$  0,1 mol/L gasto no branco (mL); V = Volume de  $\text{HCl}$  0,1 mol/L gasto na amostra (mL); M = Concentração real do  $\text{HCl}$  (mol/L); 6 = Massa atômica do C (12) dividido pelo número de mols de  $\text{CO}_2$  que reagem com o  $\text{NaOH}$ ;  $V_1$  = Volume de  $\text{NaOH}$  usado na captura de  $\text{CO}_2$  (mL);  $V_2$  = Volume de  $\text{NaOH}$  usado na titulação (mL); f = fator de correção do  $\text{HCl}$ .

Para a determinação do teor residual do contaminante ao longo do tempo, amostras de solo foram retiradas dos biorreatores. Por isto, o cálculo da liberação de  $\text{CO}_2$  foi corrigido para a massa de 1 kg de solo.

### 3.5.6 Teor residual de contaminante

O percentual de remoção do contaminante foi avaliado para o solo esterilizado e não esterilizado, nos tempo inicial, 15, 30, 60 e 90 dias. Utilizou-se a metodologia de extração da USEPA 3550B (1996), pelo ultrassom de sonda (Marca UNIQUE). O ultrassom permite a quantificação de substâncias voláteis e semi-voláteis do solo. O cálculo do teor residual foi realizado através da Equação 8.

$$\text{Teor Residual (\%)} = \left( \frac{P_2 - P_1}{P_0} \right) * 100 \quad (8)$$

Onde:  $P_0$  = Quantidade de amostra de solo em peso seco utilizada na análise (g);  $P_1$  = Peso do balão de fundo chato (g);  $P_2$  = Peso do balão mais a mistura extraída do solo contaminado (g).

Para o resultado na forma de degradação será utilizada a Equação 9:

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{\%OG_{inicial} - \%OG_{final}}{\%OG_{inicial}} * 100 \quad (9)$$

Onde:  $OG_{inicial}$  = percentual inicial de óleos e graxas;  $OG_{final}$  = percentual final de óleos e graxas.

### 3.5.7 Teor de Umidade

A umidade do solo utilizado foi avaliada para o solo esterilizado e não esterilizado, nos tempos inicial, 15, 30, 60 e 90 dias, através da Equação 10, segundo a NBR 6457 (ABNT, 1986).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{cápsula} + \text{solo úmido}) - (\text{cápsula} + \text{solo seco})}{(\text{cápsula} + \text{solo seco}) - (\text{cápsula})} . 100 \quad (10)$$

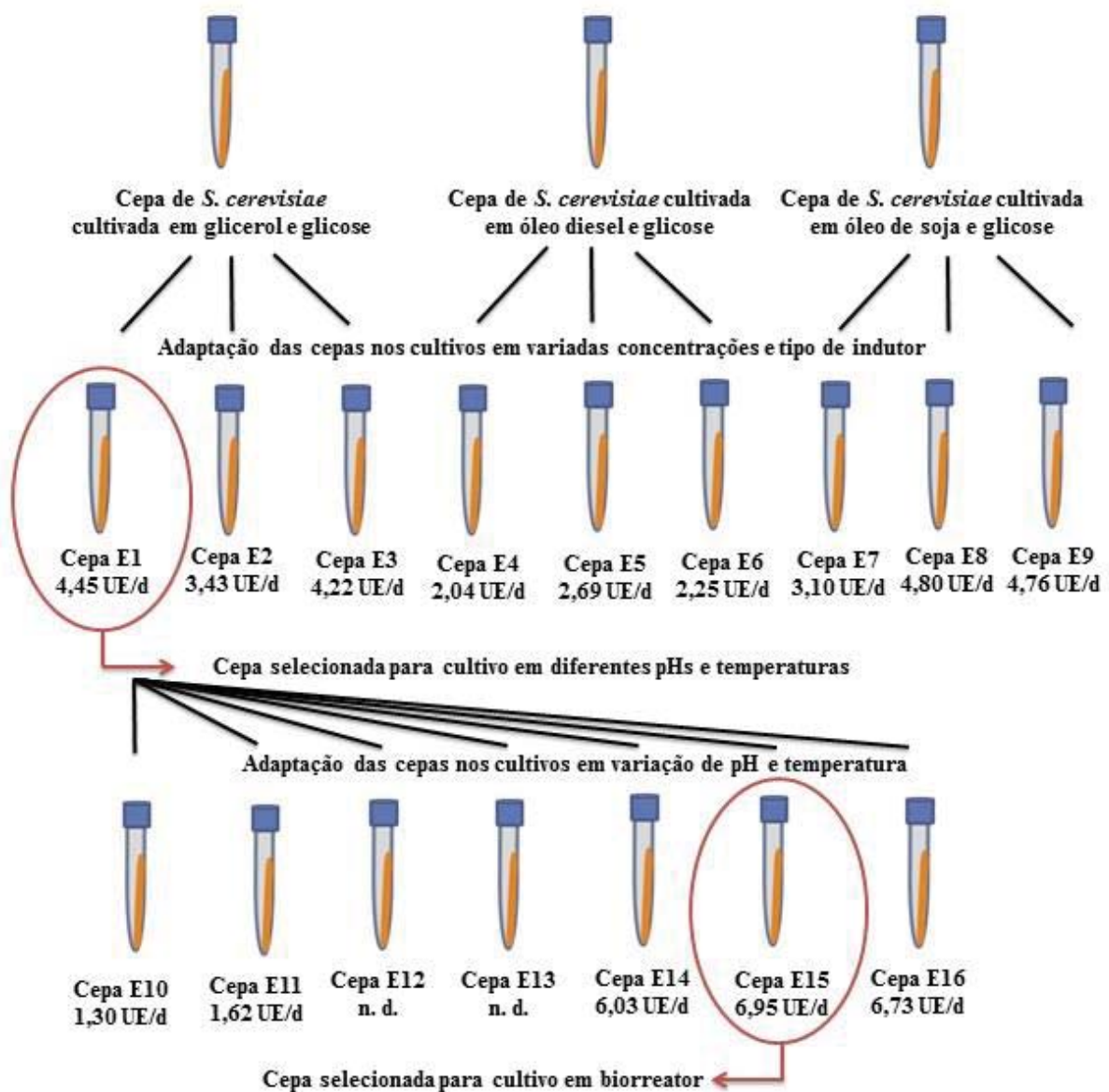
### 3.6 Tratamento dos dados

Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software Statistica 7.0®, através de análise de variância e teste de Tukey para um nível de confiança de 95%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para elucidar o processo de adaptação das cepas nas etapas do estudo, um fluxograma detalhado é apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Detalhamento do processo de adaptação de cepas para as etapas de produção de biossurfactantes extracelulares

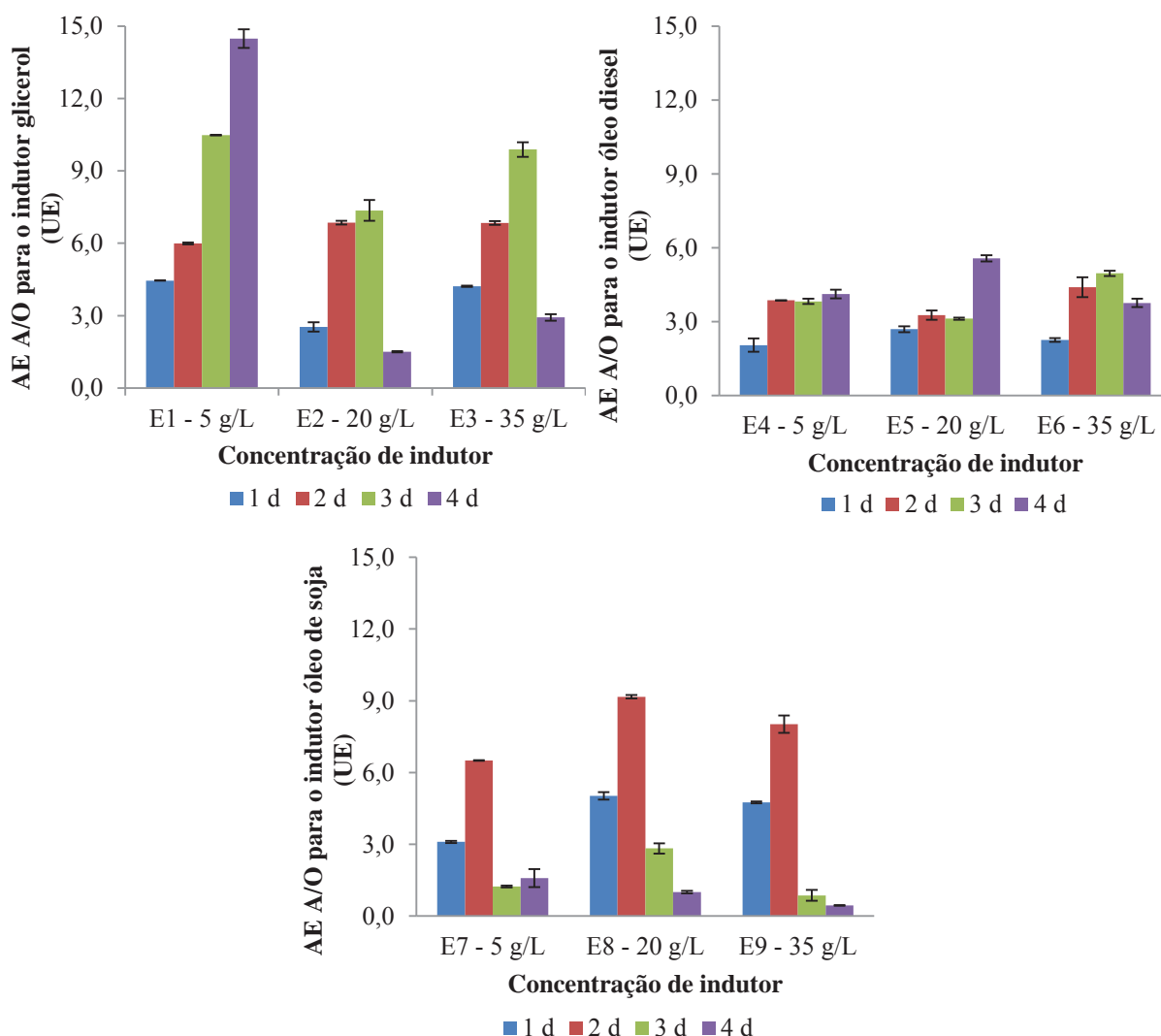


**E1:** Glicerol 5 g/L; **E2:** Glicerol 20 g/L; **E3:** Glicerol 35 g/L; **E4:** Óleo diesel 5 g/L; **E5:** Óleo diesel 20 g/L; **E6:** Óleo diesel 35 g/L; **E7:** Óleo de soja 5 g/L; **E8:** Óleo de soja 20 g/L; **E9:** Óleo de soja 35 g/L; **E10:** Glicerol 5 g/L, pH 4,0 e 20°C; **E11:** Glicerol 5 g/L, pH 7,0 e 20°C; **E12:** pH 4,0 e 40°C; **E13:** pH 7,0 e 40°C; **E14, E15, E16:** pH 5,5 e 30°C; **n. d.:** Não detectado pelo método; **UE/d:** Produtividade máxima obtida em cada cepa adaptada.

#### **4.1 Etapa I - Produção de biossurfactantes extracelulares por *S. cerevisiae*: variação da concentração e o tipo de indutor**

A Figura 6 apresenta as atividades emulsificantes água em óleo (AE A/O) obtidas nos experimentos E1 a E9, realizados com o intuito de avaliar a influência da concentração e tipo de indutor sobre a produção de biossurfactantes. Para o indutor glicerol, a concentração de 5 g/L adicionada ao meio de cultivo apresentou AE A/O que aumentaram ao longo do tempo de cultivo, sendo a máxima AE A/O, de 14,49 UE, obtida em 4 dias de cultivo. Para o óleo diesel houve aumento da AE A/O até o segundo dia de cultivo, sendo verificado um aumento na formação de AE A/O no quarto dia dos ensaios, onde a AE A/O máxima, de 5,57 UE, foi obtida em 20 g/L de indutor adicionado. Observou-se que o óleo diesel apresentou a menor formação de emulsões A/O em relação aos outros indutores testados. Quando utilizado o indutor óleo de soja, a máxima AE A/O (9,17 UE) foi obtida quando utilizado uma concentração de indutor de 20 g/L, em 2 dias de cultivo.

Figura 6 - Atividades emulsificantes A/O para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja em quatro dias de bioprocesso



A Tabela 5 apresenta as produtividades de AE A/O. Observou-se elevada produtividade para o indutor glicerol nas concentrações de 5 g/L e 35 g/L durante todo o ensaio. A máxima produtividade verificada foi de 4,45 UE/d para a concentração de 5 g/L, com tempo ideal de cultivo de 1 dia.

Para o indutor óleo diesel, as produtividades de emulsões foram baixas em relação aos demais indutores testados. A produção decaiu durante os 4 dias de cultivo para todas as concentrações, sendo a máxima produção de 2,69 UE/d, com tempo ideal de cultivo de 1 dia, para uma adição de 20 g/L de indutor.

Quando utilizado o indutor óleo de soja, elevada produção de emulsões A/O foram verificadas para as concentrações de 20 g/L e 35 g/L nos primeiros dois dias de cultivo. A

máxima produção obtida foi de 4,80 UE/d, com tempo ideal de cultivo de 1 dia para uma adição de 20 g/L de indutor.

Dentre os indutores testados, a maior produtividade de emulsões A/O foi obtida quando utilizado óleo de soja na concentração de 20 g/L (4,80 UE/d). O indutor glicerol também apresentou alta produtividade na concentração de 5 g/L, de 4,45 UE/d. Percebe-se que para os ensaios com o indutor glicerol, as altas produtividades são mantidas ao longo do período de estudo. Nos experimentos com o indutor óleo de soja, mesmo com maior produtividade, a formação de emulsões não se mantem constantes, visto que estes ensaios apresentaram grande variabilidade nas produtividades.

Tabela 5 – Produtividade de atividade emulsificante água/óleo para os indutores testados, em UE/d

<b>Experimento</b>	<b>1d</b>		<b>2d</b>		<b>3d</b>		<b>4d</b>	
E1	4,45	± 0,01	3,00	± 0,02	3,49	± 0,00	3,62	± 0,10
E2	2,53	± 0,20	3,43	± 0,04	2,45	± 0,14	0,38	± 0,01
E3	4,22	± 0,02	3,42	± 0,04	3,30	± 0,10	0,73	± 0,03
E4	2,04	± 0,27	1,93	± 0,01	1,27	± 0,03	1,03	± 0,05
E5	2,69	± 0,12	1,63	± 0,09	1,04	± 0,01	1,39	± 0,03
E6	2,25	± 0,08	2,20	± 0,20	1,65	± 0,04	0,94	± 0,04
E7	2,80	± 0,09	3,10	± 0,03	0,31	± 0,00	0,32	± 0,08
E8	4,80	± 0,05	4,47	± 0,02	0,87	± 0,04	0,19	± 0,04
E9	4,76	± 0,04	4,01	± 0,18	0,29	± 0,07	0,11	± 0,00

As máximas produtividades de atividade emulsificante água/óleo obtidas para cada concentração e para cada indutor testados foram selecionadas para análise estatística (ANOVA e Teste de Tukey), com nível de confiança de 95%, onde se observou diferença significativa ( $p=0,0000$ ) entre os dados. A Tabela 6 apresenta a análise de variância comparação entre os ensaios em função da produtividade verificada para cada concentração adicionada e do tipo de indutor testado.

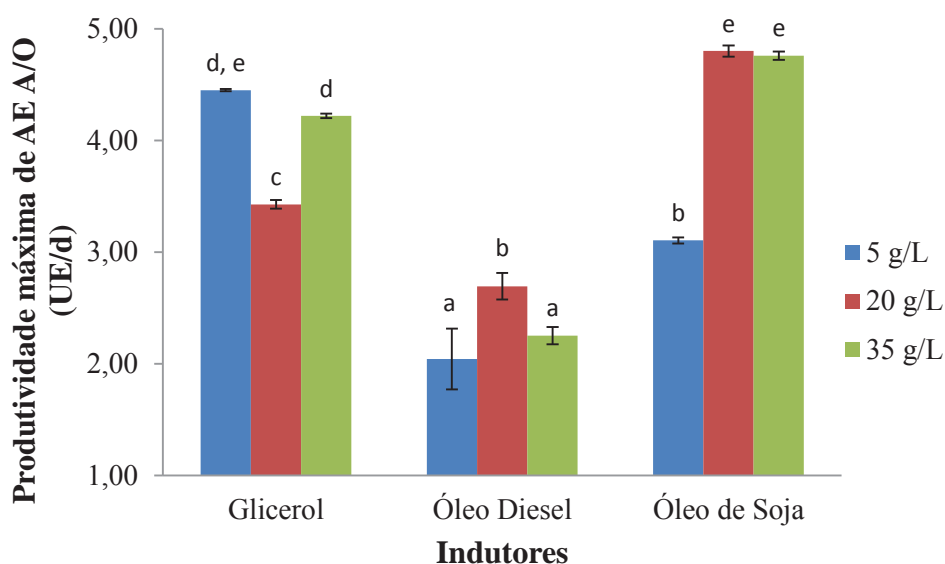
Tabela 6 – Análise de variância das produtividades máximas (UE/d) obtidas nos cultivos com diferentes concentrações e tipos de indutores

<b>Fator</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrado médio</b>	<b>Valor F</b>	<b>Nível de significância</b>
<b>Experimentos</b>	18,3868	8	2,2983	205,23	0,0000
<b>Erro</b>	0,1008	9	0,0112	-	-



O teste de Tukey apresentado na Figura 7 indica que para o indutor glicerol, a adição das concentrações de 5 g/L e 35 g/L apresentaram igualdade estatística ( $p=0,4704$ ). A concentração de 5 g/L de glicerol também apresentou-se igual a adição de 20 g/L ( $p=0,1177$ ) e 35 g/L ( $p=2077$ ) do indutor óleo de soja, onde as maiores médias de produtividade de atividade emulsificante foram obtidas. No indutor óleo diesel, todas as concentrações adicionadas apresentaram baixas médias na produtividade de atividades emulsificantes.

Figura 7 - Produtividades máximas de atividade emulsificante água/óleo (UE/d), para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja\*



\*: Ensaios realizados em duplicata  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais representam igualdade estatisticamente ( $p>0,05$ ).

A igualdade estatística entre os indutores óleo de soja (concentrações 20 g/L e 35 g/L) e do indutor glicerol (concentração 5 g/L) como melhores produtividades de biossurfactantes possibilita a escolha de um destes indutores para a execução das etapas subsequentes de experimentos. Optou-se pelo uso do indutor glicerol na concentração de 5 g/L. O glicerol possui potencial de ser utilizado como uma fonte de origem renovável para a produção de biossurfactantes pois pode ser obtido do resíduo da produção de biodiesel. Devido ao aumento na produção de biodiesel, o glicerol formado no processo de transesterificação aumenta proporcionalmente, fazendo com que este resíduo seja uma fonte de carbono de baixo custo e

fácil de ser obtido, reduzindo os custos de produção de biossurfactantes (SOUZA et al., 2014b).

A produção de biossurfactantes está associada à síntese de substratos hidrofóbicos pelos microrganismos. Esta associação ocorre de duas maneiras: pelo contato direto da superfície celular com grandes gotas de óleo, formando pouca ou nenhuma emulsão, ou pelo contato da superfície celular com pequenas gotas de óleo, resultando em emulsificação. Quando ocorrido à síntese do substrato com no primeiro caso, o biossurfactante produzido fica retido na parede celular, o que facilita o acesso e transporte dos compostos hidrofóbicos para o interior da célula. No segundo caso, o biossurfactante liberado pela célula e presente no meio de cultivo forma um complexo surfactante-hidrocarboneto que solubiliza parte do substrato, aumentando a disponibilidade destes para a célula (BEAL, 2000).

A ocorrência da adesão dos biossurfactantes a parede celular é prejudicial a sua produção, pois sua concentração no meio de cultivo diminui. Conseqüentemente, a produção de biossurfactantes extracelulares fica comprometida. Para que seja possível utilizar o biossurfactante intracelular produzido, seriam necessárias técnicas de recuperação destes biossurfactantes que ficaram aderidos à parede celular. Entretanto, isto agregaria um custo ainda maior aos processos de *downstream* a que os biossurfactantes são submetidos. Ainda, como o objetivo do trabalho é sanar a dificuldade existente no processo de produção e recuperação de biossurfactantes intracelulares, como os obtidos da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (manoproteínas), a avaliação de técnicas para rompimento celular não foram abordadas (FONTES et al., 2012)

A alta produtividade de emulsões do tipo água em óleo e da conseqüente produção de biossurfactantes quando utilizado o indutor glicerol pode ser justificada pela composição da glicerina utilizada nos meios de cultivo. Oliveira et al. (2013) estudaram as variadas composições da glicerina nos estados brasileiros, indicando que esta pode ser composta de glicerol e lipídios em percentuais que variam conforme a origem comercial deste produto. Com isto, a presença de ácidos graxos no meio de cultivo (lipídeos provenientes da glicerina), fez com que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* fosse capaz de incorporar estes ácidos graxos como fonte nutricional utilizando a estratégia de produção de biossurfactantes para facilitar sua adsorção. Assim, o glicerol é utilizado para a produção da porção hidrofílica da molécula, e o ácido graxo presente na glicerina pode ser utilizado na formação da porção hidrofóbica do biossurfactante. Weber et al. (1992) relataram a mesma capacidade de incorporação de ácidos graxos provenientes da glicerina para a produção de biossurfactantes pela espécie de levedura *Candida* (Yarrowia).

Conforme Fontes et al. (2012), o glicerol é consumido pela célula através de sua membrana celular por difusão facilitada, e em seguida convertido em diidroxiacetona fosfato (DHAP), intermediário da via glicolítica, através da ação das enzimas glicerol quinase e glicerol fosfato desidrogenase. A DHAP é convertida em gliceraldeído 3-fosfato (G3P) e em seguida em glicose pela via da gliconeogênese. A glicose (fonte de carbono) pode ser direcionada para o crescimento celular e estar presente na formação dos biossurfactantes. O G3P pode ainda ser convertido a piruvato, e de piruvato para acetil-CoA, utilizada na síntese metabólica de ácidos graxos (LEHNINGER et al., 2007).

Trabalhos relatam (Tabela 7) que a glicose e o glicerol possuem efeito positivo na produção de biossurfactantes, indicando que a formação destes biocompostos é possível mesmo na ausência de fontes hidrofóbicas de carbono, como é confirmado em nosso estudo. As produtividades obtidas pelos diversos autores foram maiores do que em nosso estudo, o que pode ser justificado devido grande parte dos biossurfactantes produzidos por *S. cerevisiae* serem intracelulares, como demonstrado anteriormente em estudos de nosso grupo de pesquisa (KRELING et al., 2015; KRELING, 2014). A produção extracelular obtida no atual trabalho foi positiva, mesmo obtendo menores produtividades de formação de emulsões A/O pois demonstra que a levedura é capaz de produzir biossurfactantes extracelulares, os quais não necessitam processos de rompimento celular para sua extração.

Tabela 7 – Comparação entre trabalhos envolvendo a produção de biossurfactantes que utilizaram glicerol e glicose como substrato em relação a este estudo

<b>Microrganismo</b>	<b>Indutores</b>	<b>Produtividade</b>	<b>Fonte</b>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Glicose (4 g/L) Glicerol (2 g/L)	23,83 UE/d	SANTOS et al. (2016a)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Glicerol (2 g/L)	8,57 UE/d	CIAPINA et al. (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>UCP0992</i>	Glicerol (3 g/L)	13,42 UE/d	SILVA et al. (2010)
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Glicerol (40 g/L)	10,57 UE/d	WU et al. (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glicose (10 g/L) Glicerol (5 g/L)	4,12 UE/d	O autor

A elevada produtividade de emulsões verificada para o indutor óleo de soja é justificado por sua característica hidrofóbica. Esta fonte de carbono insolúvel aliada à glicose como fonte solúvel de carbono torna-se a combinação ideal para síntese das frações hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas que foram o biossurfactante (SATPUTE et al.,

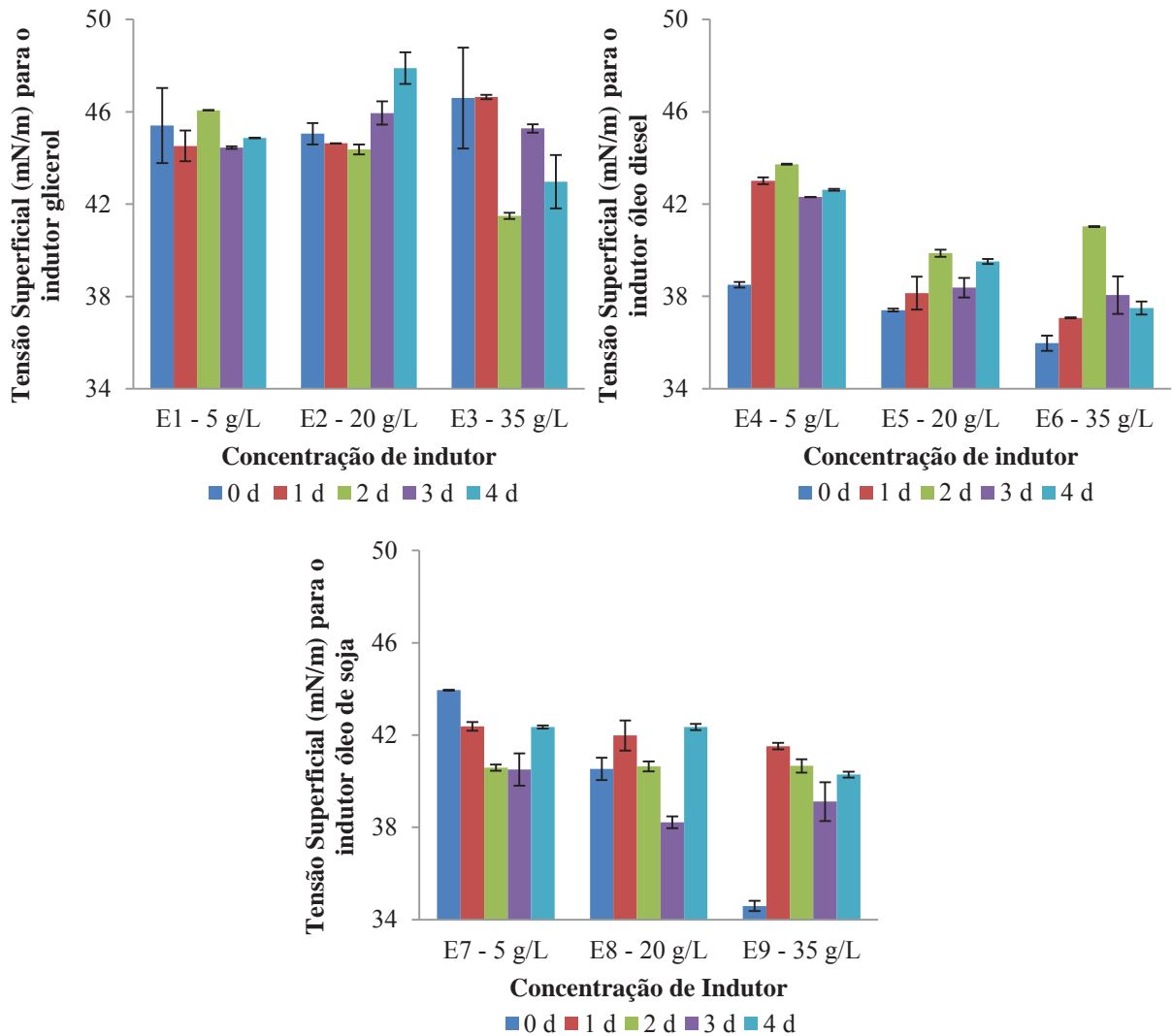
2010). Entretanto, como baixos valores de produção de emulsões foram obtidos quando utilizado o indutor óleo diesel, acredita-se que o crescimento celular e a produção de biossurfactantes em substratos de estrutura complexa é um fator limitante para a assimilação deste indutor para os microrganismos presentes (ACCORSINI et al., 2012). Por não ser um composto de origem vegetal como o óleo de soja, é provável que a sua assimilação pelo microrganismo seja menor em relação aos demais indutores testados, comprometendo a formação dos biocompostos em estudo, justificando a baixa produtividade de biossurfactantes para o ensaio com adição de óleo diesel, e baixo uso desta fonte de carbono como substrato pela levedura.

Conforme Makkar e Rockne (2003), as fontes de carbono facilmente assimiláveis são preferidas pelos microrganismos, sendo presencialmente do que as fontes de carbono complexas, como é o caso do indutor óleo diesel. Como o óleo de soja trata-se de um composto de origem vegetal, a produção de biossurfactantes torna-se maior quando utilizado este substrato.

Alcantara et al. (2012), produziram biossurfactantes extracelulares de uma cepa isolada de *Saccharomyces cerevisiae* 2031 com adições combinadas de 80 g/L de glicose e 50 g/L de óleo de cozinha, obtendo a maior atividade emulsificante, de 15,61 UE/d, em 4 d de produção. Lima e Alegre (2009) produziram biossurfactantes com a levedura *Saccharomyces lipolytica* com adição de 50 g/L de óleo diesel como indutor, obtendo produtividade de atividades emulsificantes de 0,23 UE/d. Para o estudo em uma adição de 20 g/L de indutor, maiores resultados foram obtidos (2,69 UE/d). Apesar de o valor ser maior do que o verificado pelo estudo, em relação aos demais tipos de indutores testados, o óleo diesel apresentou a menor produtividade de emulsões, sendo por isso descartado como um indutor viável para a produção de biossurfactantes por *S. cerevisiae*.

Os valores da tensão superficial obtidos para o meio de cultivo livre de células são apresentados na Figura 8.

Figura 8 – Medida de tensão superficial (mN/m) do meio de cultivo livre de células em 4 dias de bioprocesso, para os indutores glicerol, óleo diesel e óleo de soja



Percebe-se que quando o indutor glicerol foi utilizado no meio de cultivo, apenas a concentração de 35 g/L apresentou uma redução significativa no segundo dia de cultivo, de 46,60 mN/m para 41,50 mN/m. Quando o indutor óleo diesel foi adicionado ao meio de cultivo, não foram observadas reduções da tensão superficial em relação ao tempo inicial da fermentação. Ainda, o aumento da tensão superficial do meio de cultivo percebida em todas as concentrações adicionadas sugere a liberação de compostos intracelulares pela levedura *S. cerevisiae*. A adição do indutor óleo de soja no bioprocesso, nas concentrações de 5 g/L e 20 g/L, provocaram uma redução na tensão superficial de 43,95 mN/m para 40,58 mN/m no segundo dia de cultivo e de 40,53 mN/m para 42,35 mN/m no terceiro dia de cultivo, respectivamente.

As diferentes concentrações e tipos de indutores adicionados não influenciaram na tensão superficial no meio de cultivo, pois não houve redução expressiva observada durante os 4 dias de ensaio. As pequenas variações obtidas na tensão superficial não podem ser consideradas indicadores de produção de biossurfactantes extracelulares pela levedura *S. cerevisiae*. Segundo Cooper e Paddock (1984), quando um biossurfactante é adicionado ao meio, a tensão superficial pode ser reduzida até 35 mN/m. Entretanto, biossurfactantes que apresentam a propriedade de reduzir tensões são caracterizados por (UZOIGWE et al., 2015), como de baixo peso molecular, o que facilita a formação das micelas responsáveis pela desestabilização das forças de coesão de fluídos e consequente redução da tensão.

Biossurfactantes poliméricos como os produzidos de forma intracelular pela levedura *S. cerevisiae*, são caracterizados por possuir alto peso molecular, o que compromete sua estrutura micelar, interferindo na capacidade deste tipo de biossurfactante de formar micelas. Esta ação é impossibilitada devido ao arranjo molecular do meio, limitando a capacidade de redução da tensão superficial de meios (COLLA; COSTA, 2003). Com isto, a variável de resposta tensão superficial terá pouca relevância no estudo do comportamento deste biossurfactante.

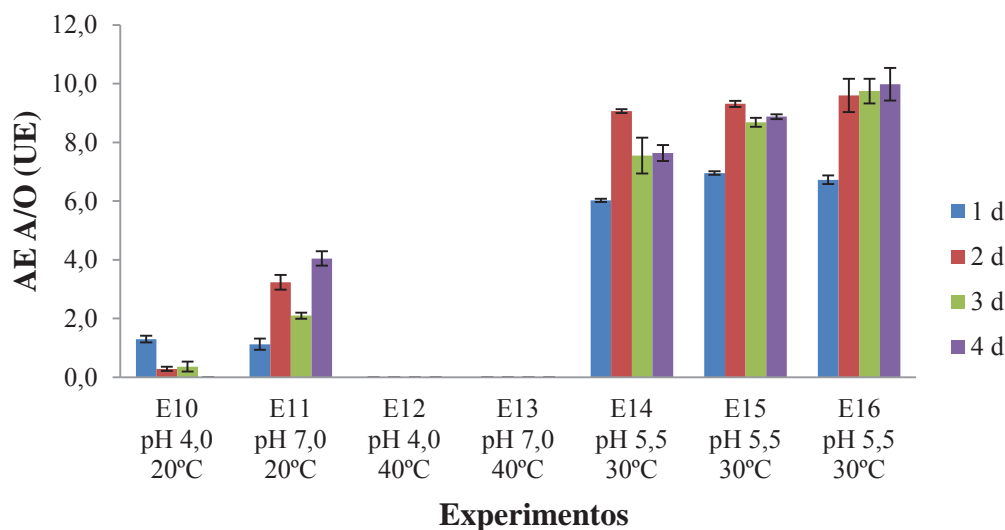
Accorsini et al. (2012), produziram biossurfactantes a partir da levedura *Candida antarctica*, utilizando glicerol como substrato por um período de 7 dias. A maior redução da tensão superficial foi de 43%, no primeiro dia de cultivo (tensão reduzida de 47 mN/m para 32 mN/m). Os valores obtidos neste estudo indicam que a redução da tensão superficial é influenciada pelo peso molecular dos biossurfactantes poliméricos, fazendo com que as reduções observadas (de 46,60 mN/m para 41,50 mN/m na adição de 35 g/L de glicerol) não sejam tão expressivas.

#### **4.2 Etapa II - Produção de biossurfactantes extracelulares por *S. cerevisiae*: variação das condições de pH e temperatura**

As atividades emulsificantes do tipo água em óleo (AE A/O) obtidas para o uso do indutor glicerol adicionado na concentração de 5 g/L, com cultivo variando-se condições de pH e temperatura, são apresentadas na Figura 9. Percebe-se que os pontos centrais (pH 5,5 e 30°C) obtiveram expressivas AE A/O em relação aos demais ensaios já iniciada no primeiro dia de cultivo. A formação de emulsões aumentou no segundo dia de ensaio, no qual obteve-se atividades de até 9,60 UE, que permaneceram altas até o final do ensaio. Baixa AE A/O foi verificada nos experimentos E10 (pH 4,0 e 20°C) e E11 (pH 7,0 e 20°C), e nos experimentos

E12 (pH 4,0 e 40°C) e E13 (pH 7,0 e 40°C) não foi observada AE A/O para nenhum tempo de cultivo.

Figura 9 - Atividades emulsificantes A/O obtida para 5 g/L de indutor glicerol em diferentes concentrações de pH e temperatura

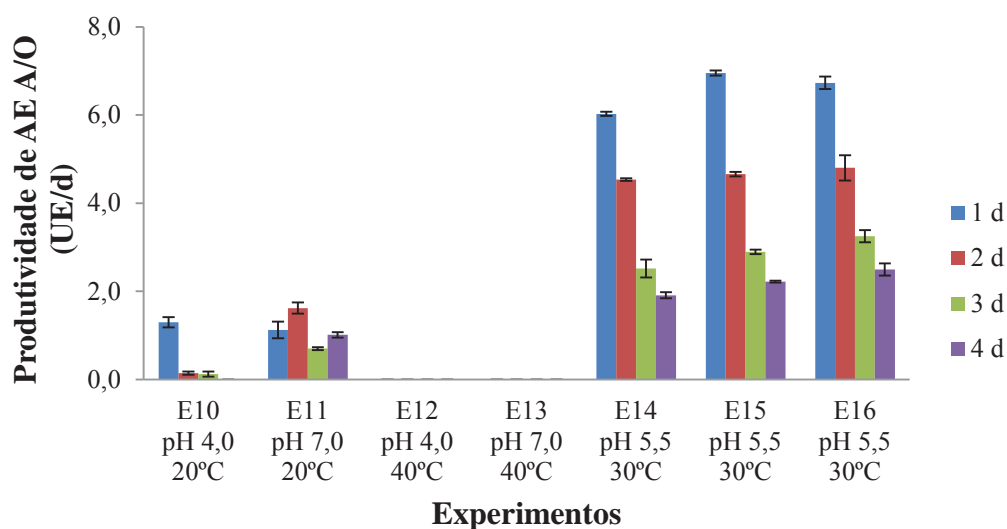


As maiores produtividades de AE A/O foram verificadas logo no primeiro dia de cultivo, para os experimentos dos pontos centrais (5,5 pH e 30°C), com produtividades de 6,03 UE/d 6,95 UE/d 6,73 UE/d. A máxima produtividade para os experimentos E10 e E11 foram de 1,30 UE/d e 1,62 UE/d, com tempo ideal de cultivo de 1 e 2 dias, respectivamente. Não foram obtidas produtividades para os ensaios E12 e E13, conforme pode ser observado na Figura 10. Isto pode ter acontecido pois segundo Marzzoco e Torres (1999), quando temperaturas extremas (muito altas ou muito baixas) são utilizadas em cultivos, gera-se maior gasto de energia para as funções básicas da célula, como por exemplo a atividade enzimática, o que influencia negativamente na produção de biocompostos de interesse.

Comparando-se com a Etapa I, a formação de emulsões A/O aumentou de 5,99 UE para atividades emulsificantes maiores que 9,00 UE, no segundo dia de cultivo. Isto indica que a redução do pH para 5,5 ocasionou um aumento na produção de biossurfactantes em relação a produção na etapa em que o pH dos meios não eram acidificados no início do cultivo.

O tempo de cultivo para a maior produção de biossurfactantes foi levado em consideração a fim de reduzir os custos do bioprocessamento, sendo por isso utilizada como variável de resposta deste estudo.

Figura 10 – Produtividade de atividade emulsificante A/O obtida para 5 g/L de indutor glicerol em diferentes concentrações de pH e temperatura



A análise estatística realizada para um nível de 95% de confiança mostrou que nenhum efeito foi significativo na produção de atividades emulsificantes A/O. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ), medida da qualidade do modelo em relação à estimativa correta dos valores da variável de resposta do modelo matemático foi de 0,36, indicando que os dados não se ajustam ao modelo linear proposto.

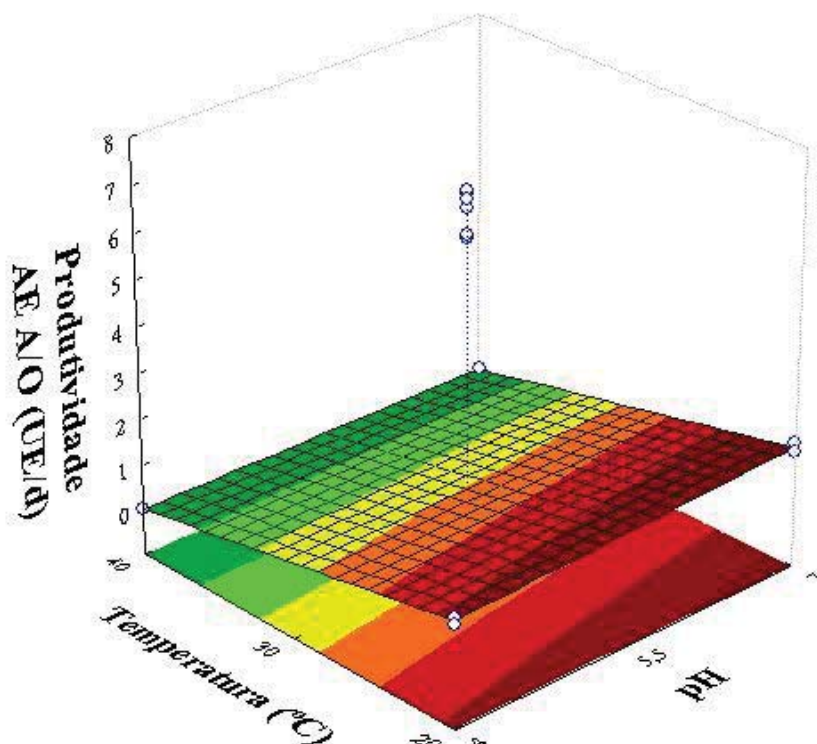
Quando realizado o teste de curvatura a 95% de confiança (Tabela 8) tem-se significativo e negativo ( $p=0,0001$ ) o efeito da temperatura, indicando que temperaturas menores favorecem a produtividade de emulsões A/O. O efeito da curvatura também foi significativo ( $p=0,0000$ ) e positivo, indicando a existência de pontos de máximo entre os ensaios apresentados. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo foi de 0,99, indicando a existência de um modelo quadrático. O modelo utilizado é preditivo ( $F_{\text{calculado}}=275,10 > F_{\text{tabelado}}=3,63$ ), validando a superfície de resposta apresentado na Figura 11.

Tabela 8 - Níveis de significância e efeitos da variação de pH e temperatura na produtividade máxima de emulsões A/O para o teste de curvatura

Fatores	p (<0,05)	Efeito
$X_1$ [pH]	0,5095	0,1624
$X_2$ [temperatura]	0,0001	-1,4581
$X_1.X_2$	0,5095	-0,1612
Curvatura	0,0000	11,6805



Figura 11 – Superfície de resposta da produtividade máxima de atividades emulsificantes A/O em função do pH e da temperatura



Conforme observado na análise de variância, o efeito significativo e negativo da temperatura indica maiores produtividades de biossurfactantes em temperaturas menores, dentro da faixa de temperatura avaliada nesse estudo. É importante que a temperatura seja analisada em bioprocessos, visto que reações enzimáticas envolvidas no metabolismo dos microrganismos podem sofrer alterações conforme a mudança de temperatura do meio (CIAPINA et al., 2006). O estudo das condições de temperatura e pH são fundamentais quando estuda-se a ampliação de escala de produção de biossurfactantes, a fim de torna-los competitivos economicamente quando comparados aos surfactantes químicos, pois altas temperaturas de cultivo geram maior gasto quando considerada uma produção industrial (FARIA, 2010).

Saharan et al. (2011) relatam que grande parte das fermentações visando produção de biossurfactantes ocorrem em temperaturas entre 25°C e 30°C. A temperatura influencia diretamente nas taxas de crescimento, atividade enzimática e composição celular dos microrganismos. Em temperaturas muito altas ou muito baixas, a energia necessária para a manutenção do microrganismo aumenta, o que leva a uma redução no rendimento e na formação dos produtos desejados.

Com o objetivo de obter maiores produtividades de atividades emulsificantes A/O, considera-se o ponto de máximo encontrado no teste de curvatura como um ponto de ótimo. Entretanto, optou-se por não realizar uma otimização do planejamento experimental, visto que autores (WIN et al., 1996; MUKHTAR; HAQ, 2006) descrevem que a temperatura ideal de cultivo para a levedura *S. cerevisiae* como sendo de 30°C e pH 5,5, e temperaturas fora desta faixa poderiam reduzir a produção de atividades emulsificantes. Temperaturas elevadas podem levar a desnaturação das enzimas necessárias à assimilação de nutrientes provenientes do meio de cultivo, e o crescimento celular da levedura e a formação de subprodutos, como os biossurfactantes, são comprometidos.

Uma otimização de cultivo realizada por Hassan et al. (2016) também indicou uma temperatura ideal de 30 °C na produção de ramnolipídeos, onde atingiu-se a máxima atividade emulsificante obtida para o isolado M2H214. Câmara et al. (2016) avaliaram as condições de cultivo do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que a temperatura que apresentou maior concentração, de 1,285 g/L, foi a de 30°C. O estudo também indicou que temperaturas próximas a 30°C são ideais para a produção de biossurfactantes.

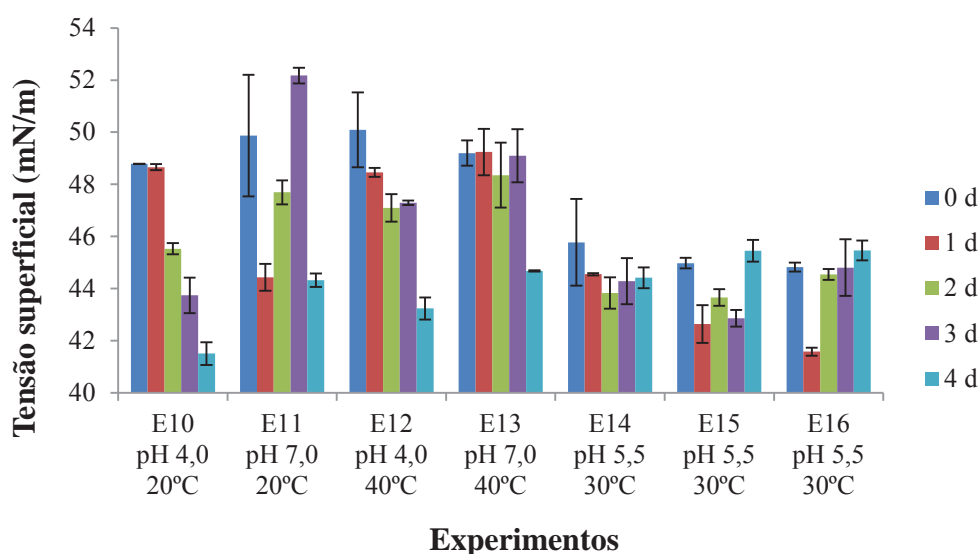
A acidez do meio de cultivo é um parâmetro correlacionado com a eficiência da produção de biossurfactantes produzidos por leveduras, como as do gênero *Candida sp.* Rufino (2014), demonstrou na produção de biossurfactantes por *Candida lipolytica* que o pH inicial ajustado a 5,5 sofreu aumento próximo a 7,0 ao final de 3 dias de cultivo. Paralelamente, o rendimento do biossurfactante também aumentava, indicando uma correlação entre a acidez do meio e a produção de lipopeptídeos. Bednarski et al. (2004) observou rendimentos de 13,4 g/L de biossurfactantes de levedura quando o pH inicial do meio de cultivo foi ajustado para 5,5. Menores valores foram verificados quando o pH não foi corrigido inicialmente.

Os resultados obtidos nos estudos apresentados corroboram os dados obtidos, demonstrando que a acidez no meio aumenta a produtividade de atividades emulsificantes do tipo água/óleo em relação aos experimentos onde não ajustou-se inicialmente o pH do meio de cultivo (4,12 UE/d quando utilizado 5 g/L de glicerol em relação a 6,95 UE/d obtido para 5 g/L de glicerol quando o pH inicial foi ajustado para 5,5). Isto pode ser justificado pelo fato de que o pH ácido favorece o crescimento celular (WIN et al., 1996), e com maior número de células no meio, ocorre o aumento da produção de biossurfactantes.

A tensão superficial do meio de cultivo livre de células ao longo dos 4 dias de cultivo está apresentada na Figura 12. Para os experimentos E1, E2, E3 e E4, houve significativa redução da tensão superficial, de 48,79 mN/m para 41,51 mN/m, 49,87 mN/m para 44,32

mN/m, 50,10 mN/m para 43,24 e 49,20 mN/m para 44,68 mN/m, respectivamente. Todas as reduções apresentadas foram verificadas no quarto dia de cultivo. Para os experimentos dos pontos centrais, não houve redução da tensão superficial considerável entre o tempo inicial e final de cultivo.

Figura 12 – Medida de tensão superficial (mN/m) do meio de cultivo livre de células em 4 dias de bioprocessamento, para 5 g/L de indutor glicerol, em diferentes concentrações de pH e temperatura



Os valores obtidos de tensão superficial em diferentes pHs e temperatura apresentaram pouca alteração se comparados aos do ensaio anterior, quando variado a concentração de glicerol. Assim, pode-se afirmar que o pH e a temperatura não interferiram na redução da tensão superficial. Em virtude deste fator, a análise de variância apresentada levou em consideração apenas a formação de emulsões do tipo água em óleo, variável de resposta adequada para biossurfactantes de alto peso molecular.

#### 4.2.1 Determinação da melhor condição experimental para ampliação de escala

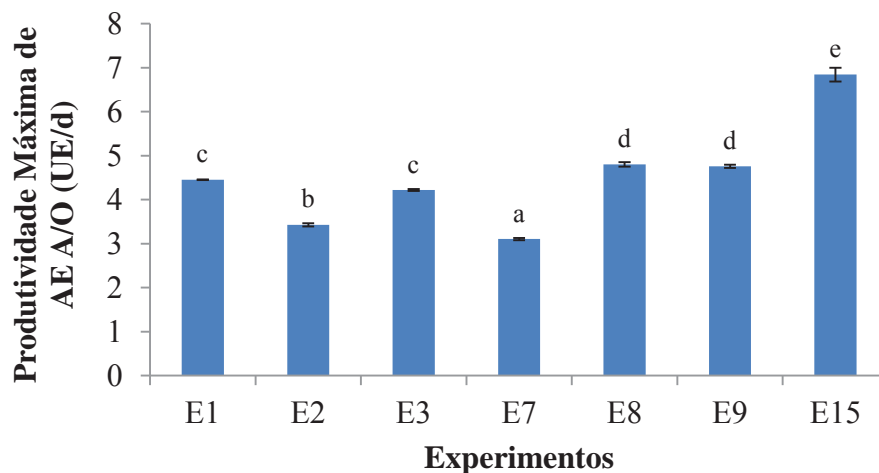
Para determinar a maior produtividade de atividade emulsificante A/O entre os dois ensaios anteriormente executados (um experimento variando a concentração e tipo de indutores e outro variando o pH e temperatura para uma concentração e um tipo de indutor fixa), uma análise de variância e teste de Tukey foram realizados utilizando um nível de significância de 95% para os experimentos que obtiveram uma produtividade máxima maior

do que 3,00 UE/d, comparando-se as máximas produtividades de AE A/O obtidas nestes experimentos.

A análise de variância da produtividade máxima indicou diferença significativa ( $p=0,0000$ ) entre os experimentos. A comparação entre as médias (teste de Tukey) da Figura 13 indica igualdade estatística entre os experimentos E1 e E3 ( $p=0,0916$ ) e E8 e E9 ( $p=0,9903$ ). O ensaio E15 ( $p=0,0002$ ) demonstrou a maior produtividade entre todos os experimentos, sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos avaliados.

Considerando o início de maiores produtividades de atividades emulsificantes A/O em pH de 5,5 e temperatura de 30°C, optou-se por isolar a cepa do ponto central da produção de biossurfactantes com a cepa exposta a diferentes condições de pH e temperatura, para um cultivo utilizando indutor glicerol em uma concentração de 5 g/L para a ampliação de escala de produção em biorreator de bancada.

Figura 13 – Comparação de médias entre a produtividade máxima de AE A/O (UE/d) e todos os experimentos propostos



**E1:** Glicerol, 5 g/L; **E2:** Glicerol, 20 g/L; **E3:** Glicerol, 35 g/L; **E7:** Óleo de soja, 5 g/L; **E8:** Óleo de soja, 20 g/L; **E9:** Óleo de soja, 35 g/L; **E15:** Glicerol, 5 g/L, pH 5,5 e temperatura 30°C (média entre os pontos centrais).

O ensaio em biorreator foi monitorado por um período de 4 dias, tendo em vista que variações na produção poderiam ocorrer quando realizado um cultivo de maior escala de produção.

### 4.3 Etapa III - Produção de biossurfactante extracelular em biorreator de bancada

O cultivo em biorreator foi realizado com o objetivo de verificar se a produtividade de biossurfactantes permanecia em um volume maior de fermentação e a fim de obter-se o biocomposto em quantidade suficiente para a realização do ensaio de biorremediação.

Na primeira batelada realizada realizou-se o estudo da cinética de produção, avaliando-se a atividade emulsificante A/O, o crescimento celular, a tensão superficial e o pH do meio de cultivo durante 4 dias. Os demais bioprocessos (item 4.5) foram realizados para obter a quantidade de biossurfactante necessária para a identificação do tipo de biossurfactante produzido e para a aplicação em ensaio de biorremediação.

A relação entre o crescimento celular e a atividade emulsificante é apresentada na Figura 14. Conforme apontam Desai e Banat (1997), este tipo de cinética pode ser classificado como crescimento semi associado à produção de biossurfactantes, onde existe uma relação paralela entre o crescimento, a produção de biossurfactantes e o consumo de substrato. Ainda, existem relatos de que a produção de biossurfactantes pode ser de ambos os tipos, associada e não associada ao crescimento (Figura 15), como é o caso da produção de emulsão por *A. calcoaceticus*, um tipo biossurfactante polimérico similar ao produzido de forma intracelular pela levedura *S. cerevisiae*.

Figura 14 – Cinética de produção de biossurfactantes provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* em 4 dias de cultivo.

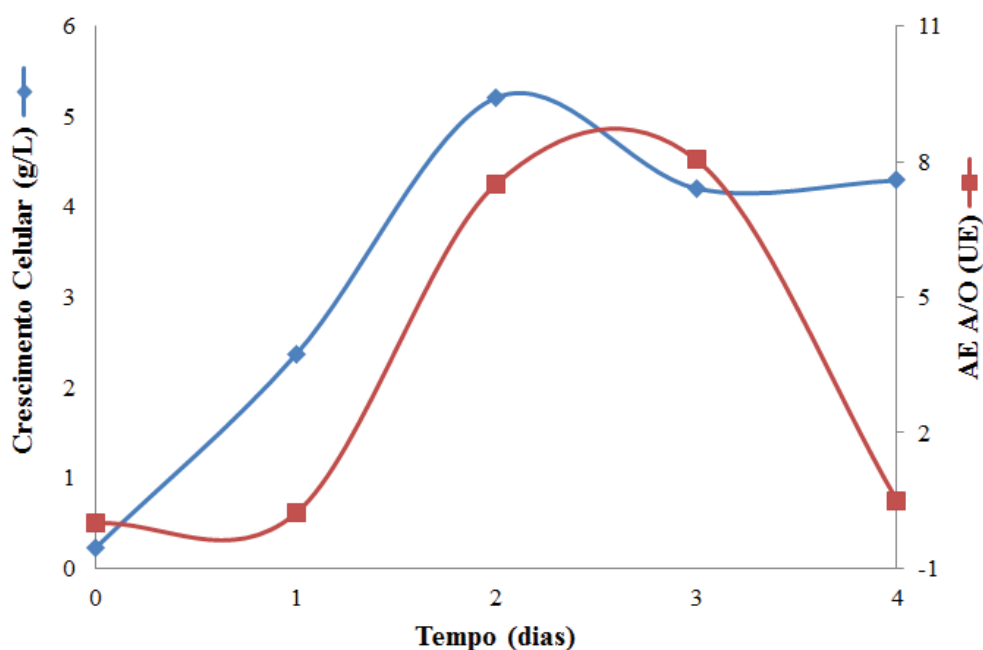
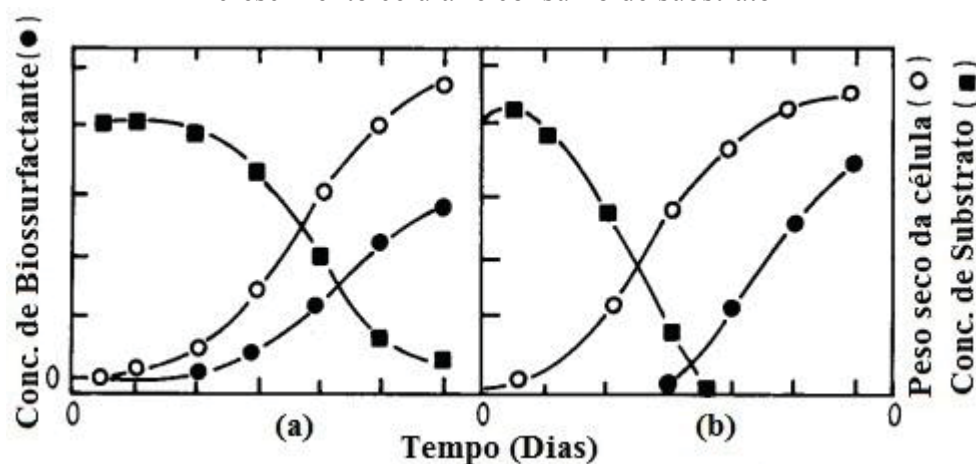


Figura 15 – Teoria da cinética de produção de biossurfactantes e sua relação com o crescimento celular e consumo de substrato



(a): Produção associada ao crescimento; (b): Produção sob condições limitantes de crescimento.

Fonte: Desai; Banat (1997).

Os resultados de pH, tensão superficial e produtividade de AE A/O, expressa em UE/d, a fim de relacionar a formação de emulsões com o tempo necessário de cultivo, estão apresentados na Tabela 9.

O aumento da escala de produção de biossurfactantes provocou mudanças no comportamento das produtividades de AE A/O. O tempo de cultivo ideal para este sistema foi de 2 dias, o dobro do que o necessário para cultivos em erlenmeyers contendo 50 mL de meio para a produção. Em termos de produtividade, a formação de emulsões A/O decaiu de 6,84 UE/d para 3,85 UE/d considerando os ensaios na escala de 50 mL e os ensaios em biorreator (3 L de meio).

Tabela 9 – Produtividade de AE A/O, pH do meio de cultivo e tensão superficial obtida em uma fermentação durante 4 dias de cultivo em biorreator de 5 L

Tempo de cultivo	Produtividade de AE A/O (UE/d)	pH	Tensão Superficial (mN/m)
0 d	-	5,61 ± 0,01	51,30 ± 0,83
1 d	0,22 ± 0,00	5,48 ± 0,00	46,53 ± 0,37
2 d	3,85 ± 0,14	5,23 ± 0,01	45,65 ± 0,49
3 d	2,75 ± 0,10	4,96 ± 0,01	49,90 ± 0,04
4 d	0,12 ± 0,00	7,71 ± 0,01	42,58 ± 0,13

Em relação à tensão superficial do meio de cultivo livre de células, o mesmo comportamento observado nos experimentos em erlenmeyers foi confirmado na ampliação de escala. Nota-se que a tensão superficial diminuiu, chegando a atingir um valor 17% menor do

que o inicial no 4º dia de cultivo. Entretanto, este valor não representa uma redução significativa para caracterizar o biossurfactante como redutor de tensão, conforme explicado anteriormente.

Para os valores de pH obtidos durante o monitoramento da produção de biossurfactantes, é possível observar uma relação direta entre este, a formação de emulsões A/O e o crescimento celular. À medida que o pH do meio se acidifica, é observado um aumento na formação de emulsões A/O e no crescimento celular, mantendo-se esta relação até o terceiro dia de cultivo. Quando o crescimento celular é estagnado, a produção de atividades emulsificantes diminui, e um aumento no pH do meio é observado.

Isto acontece pois o tempo de crescimento e consequente produção de biossurfactantes para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se como ideal em 2 dias de cultivo, quando o pH ainda se mantém ligeiramente ácido. Após atingida a fase estacionária de crescimento, algumas substâncias que levam ao aumento do pH podem ter sido liberadas para o meio, interferindo e reduzindo a produção de biossurfactantes.

Pacheco et al. (2010) produziu biossurfactantes provenientes de *Rhodococcus erythropolis* em um biorreator de 2 litros utilizando 10 g/L de glicerol como indutor, sendo que a fase exponencial de crescimento iniciou em 7 horas de cultivo, permanecendo constante até 27 horas. Após este período, observou-se o início da fase estacionária e a redução da concentração de glicerol para 2,9 g/L. A produção de biossurfactantes iniciou paralelamente com o crescimento exponencial, continuando mesmo após a redução do crescimento celular, caracterizando uma produção semi associada ao crescimento.

Para este estudo, identifica-se um comportamento semelhante na produção de biossurfactantes conforme relatado pelo autor. Durante a fase exponencial de crescimento, ocorrida entre o primeiro e o segundo dia, a produção de atividades emulsificantes água/óleo também aumenta. Quando atingida a fase estacionária de crescimento, a produção de biossurfactantes diminui, ao passo que o crescimento celular mantém-se constante, como é característica desta etapa.

Santos et al. (2016b) estudaram a produção de biossurfactantes por *C. lipolytica* em um biorreator de 2 litros onde foram utilizados 5% de gordura animal e 2,5% de óleo de milho por 6 dias indicaram que a produção máxima de 10 g/L de biossurfactante ocorreu no 4 dia de cultivo, indicando que a produção de biossurfactantes por esta levedura é um processo metabólico secundário. Entretanto, este comportamento não foi confirmado por este estudo, indicando que a formação do biossurfactante acompanhou o crescimento inicial da *S.*

*cerevisiae*, possuindo uma característica de produção que acompanha o incremento de biomassa no cultivo.

A fim de obter a quantidade de biossurfactante necessária de 3,12 g para o ensaio de biorremediação, 4 bateladas de produção foram executadas, sendo verificada a produção de atividade emulsificante A/O no tempo inicial e final de cultivo (2 dias), conforme apresentado na Tabela 10. Em seguida, o biossurfactante foi precipitado e purificado através de método proposto por Pareilleux (1979), liofilizado e moído.

Tabela 10 – Resultados para as bateladas de produção de biossurfactantes extracelulares por *S. cerevisiae* para uso em biorremediação e identificação por espectrometria de massa, em 2 dias de cultivo

Batelada	AE A/O (UE)	Produtividade de AE A/O (UE/d)	Tensão Superficial (mN/m)	
			Inicial	Final
1 <sup>a</sup>	7,59 ± 0,08	3,77 ± 0,04	50,87 ± ,20	43,68 ± 0,16
2 <sup>a</sup>	6,40 ± 0,07	3,17 ± 0,03	47,84 ± 0,20	43,67 ± 0,16
3 <sup>a</sup>	8,15 ± 0,06	4,05 ± 0,03	51,86 ± 2,60	43,59 ± 0,11
4 <sup>a</sup>	11,25 ± 0,19	5,56 ± 0,09	52,57 ± 0,99	42,83 ± 0,33

Observa-se que os valores obtidos de produtividade de AE A/O assemelham-se a máxima obtida no ensaio anteriormente realizado, para o estudo do tempo ideal de cultivo (2 dias). O aumento na produtividade obtida na quarta batelada é resultado do uso de uma segunda bomba de aeração conectada ao biorreator. Esta bomba foi adicionada pois percebeu-se durante os cultivos que a produção de biossurfactantes era comprometida devido a baixa inserção de oxigênio no meio. Com a adição da segunda bomba de aeração, houve maior formação de emulsões A/O. É relatado em alguns estudos (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2000; SANTOS et al., 2014) que a aeração provoca aumento na produção de biossurfactantes, facilitando a transferência de oxigênio de sua fase gasosa para a fase aquosa. Para a levedura *S. cerevisiae*, um microrganismo facultativo, esta condição de aeração torna-se necessária, visto que por ser uma levedura anaeróbia facultativa, a ausência de oxigênio em processos fermentativos não impede o crescimento celular (SILVA et al., 2001), mas pode comprometer a produção de biossurfactantes.

A tensão superficial final apresentou o mesmo comportamento entre as bateladas, com redução em relação ao início do cultivo. Entretanto, os valores observados ainda são considerados altos para biossurfactantes que possuam como característica a redução da tensão superficial.



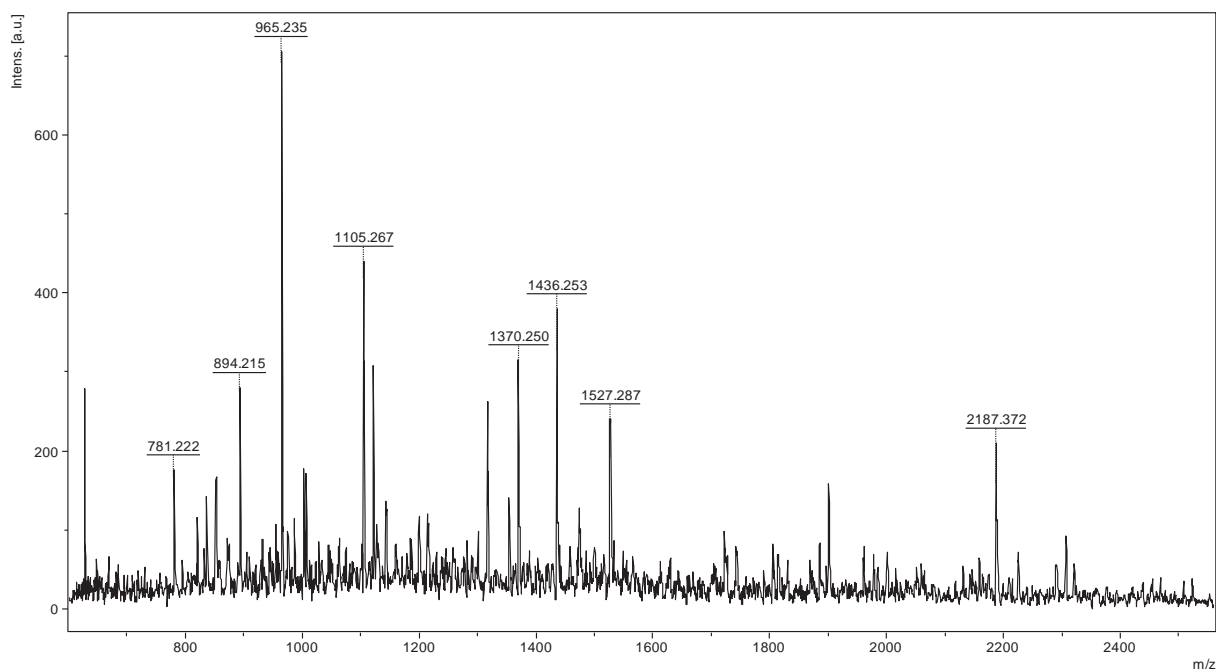
### 4.3.1 Identificação do biossurfactante produzido

A análise da espectrometria de massa foi realizada para o biossurfactante produzido com o indutor glicerol, experimento com maior produtividade de AE A/O.

O espectro de massa realizado indica um perfil caracterizado pelos íons com picos de valores de  $m/z$  781, 894, 965, 1105, 1370, 1436, 1527 e 2187 (Figura 16), que representam as famílias de biossurfactantes extracelulares produzidos por *S. cerevisiae* como lipídeos de manosileritritol (MEL). Esta subclasse de biossurfactantes pertence a classe dos glicolipídeos, e caracterizam-se por serem capazes de formar microemulsões água/óleo estáveis, sendo composta de 4-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-meso-erythritol como a fração hidrofílica e ácidos graxos e/ou acetil na fração hidrofóbica (MORITA et al., 2013).

O espectro assemelha-se ao produzido pela levedura *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34, produzidos em diferentes meios de cultivo, sendo que todos obtiveram picos na faixa de 900  $m/z$ , semelhantes aos resultados obtidos para este estudo (FAN et al., 2014). Recentemente, Selvakumar et al. (2016) caracterizaram o biossurfactante extracelular produzido pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* como glicolipídeo devido a sua composição de 109 mg/mL de carboidratos e 50 mg/mL de lipídios.

Figura 16 - Espectro de MALDI-MS de biossurfactante produzido por *Saccharomyces cerevisiae*, com a detecção dos íons que caracterizam as isoformas de lipídeos de manosileritritol (MEL).

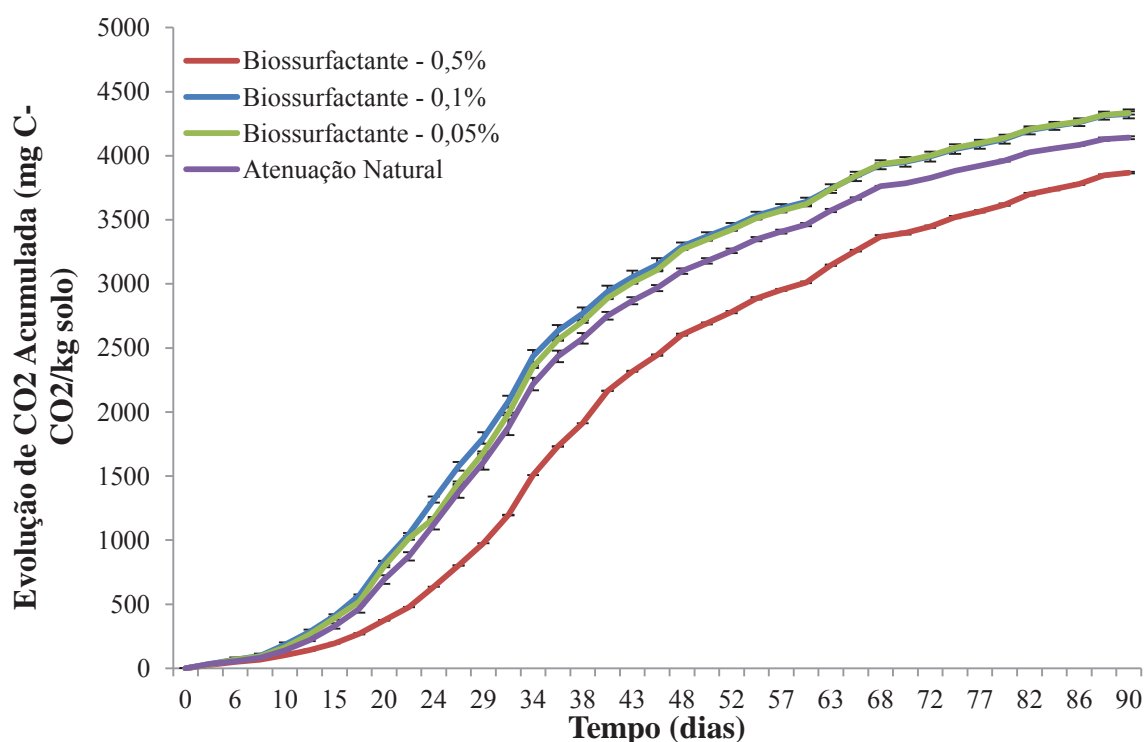


A produção de biossurfactantes extracelulares pertencentes à classe dos glicolipídeos pela levedura *S. cerevisiae* e de biossurfactantes intracelulares de manoproteínas mostra que a levedura é capaz de produzir ambos os tipos de biossurfactantes. Isto aumenta o potencial de uso do biossurfactante proveniente da levedura em diversas áreas, incluindo o uso ambiental e industrial (MINUCELLI et al., 2015), onde os glicopeptídicos são muito aplicados. Este novo indicativo confirma o alto potencial, ainda não totalmente explorado, do uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

#### 4.4 Etapa IV - Ensaio de biorremediação

A Figura 17 apresenta os resultados de evolução de CO<sub>2</sub> ao longo dos 90 dias do ensaio de biorremediação. Observa-se que nos primeiros 15 dias de experimento a atividade respiratória foi baixa, indicando uma adaptação dos microrganismos à alta concentração do contaminante. Posteriormente, até os 68 dias de ensaio, percebe-se um incremento na atividade respiratória, provavelmente gerado pelo aumento do número de microrganismos autóctones, e consequente uso do contaminante como fonte nutricional de carbono.

Figura 17 – Liberação de CO<sub>2</sub> ao longo dos 90 dias de ensaio



Os tratamentos com adição de 0,1% e 0,05% de biossurfactante demonstraram um valor acumulado de CO<sub>2</sub> de 4326,95 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo e de 4334,00 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo, respectivamente. Estes valores foram maiores se comparados a atenuação natural (4141,65 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo) e a adição de 0,5% de biossurfactante (3868,24 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo). Para este ensaio, não foi realizado um experimento controle (sem a adição de contaminante), pois estudos anteriores (KRELING, 2014; DECESARO et al., 2016) indicaram baixa atividade respiratória este tratamento utilizando-se o mesmo tipo de solo (241,85 e 218,00 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo), respectivamente, sabendo-se previamente que a atividade neste ensaio seria a menor se comparado aos demais tratamentos propostos.

Ao comparar os experimentos com adição de biossurfactantes em relação à atenuação natural, percebe-se que a adição de concentrações de 0,1% e 0,05% de biossurfactantes obteve valores de evolução de CO<sub>2</sub> mais elevados em relação à técnica de atenuação natural, fator que pode ser atribuído à adição de biossurfactantes no meio. A adição de biossurfactantes possibilita maior acessibilidade do contaminante ao microrganismo, o que leva ao aumento da evolução de CO<sub>2</sub> e conseqüente crescimento microbiano.

O uso de biossurfactantes na concentração de 0,5% demonstrou menor valor de evolução de CO<sub>2</sub> em relação à técnica de atenuação natural. Mariano (2006) indicou que a conversão do contaminante pelos microrganismos depende da velocidade do metabolismo microbiano e da capacidade de transferência do contaminante para a célula (biodisponibilidade). Entretanto, acredita-se que a biodisponibilidade do contaminante não tenha sido afetada pela concentração de biossurfactante adicionado, pois a biodegradação do biodiesel ocorreu em percentuais próximos as demais concentrações estudadas.

A determinação da biodegradação de compostos oleosos por respirometria é uma das possibilidades de se analisar a metabolização de contaminantes pelos microrganismos em condições aeróbias, sendo necessário também verificar a biodegradação através de técnicas quantitativas de remoção dos compostos oleosos, como será exposto posteriormente.

Ainda, ao comparar os valores de CO<sub>2</sub> liberado na presença de contaminantes oleosos quando utilizado a técnica de bioestimulação e quando utilizado a adição de biossurfactantes, percebe-se que os valores encontrados são sempre maiores para a técnica de bioestimulação, conforme foi observado por Kreling (2014). A bioestimulação com adição de manoproteína e de ficocianina, resultou em elevados valores de CO<sub>2</sub> acumulado (8547,26 mg C-CO<sub>2</sub>/kg de solo). Isto se deve a quantidade de carbono presente nos bioestimulantes orgânicos, que podem mascarar o valor real do CO<sub>2</sub> liberado. Como as concentrações de biossurfactantes utilizadas são menores, é esperada menor atividade respirométrica no período de estudo.

Através da estabilidade de emulsões, os biossurfactantes tornam hidrocarbonetos biodisponíveis para a biodegradação. Biossurfactantes de alto peso molecular, como o produzido pela levedura *S. cerevisiae*, aumentam a solubilidade do contaminante a partir da ligação entre a fração hidrofóbica da molécula com o óleo, e a fração hidrofílica com a parte aquosa do exterior da molécula, ocorrendo a emulsificação do meio. A solubilização facilita o transporte de contaminantes adsorvidos na fase sólida para a fase aquosa (CHU; CHAN, 2003).

A análise de variância realizada dos valores de evolução de CO<sub>2</sub> ao final de 90 dias em função da concentração adicionada de biossurfactantes e da técnica de atenuação natural demonstrou diferença significativa entre os dados ( $p=0,00005$ ). A Tabela 11 apresenta a comparação entre as médias da evolução de CO<sub>2</sub> em função da adição de biossurfactantes e da técnica de atenuação natural realizada pelo teste de Tukey com nível de 95% de confiança ( $p>0,05$ ).

É observado que a adição de biossurfactantes no meio resultou em um aumento da atividade respirométrica, o que indica o uso do contaminante como fonte de carbono mesmo em concentrações baixas de biossurfactante adicionado, provando que a adição de biossurfactantes leva a emulsificação do contaminante com as partículas do solo, favorecendo a biodegradação.

Tabela 11 – Teste de Tukey dos valores de evolução de CO<sub>2</sub> pela concentração de biossurfactante adicionado e atenuação natural

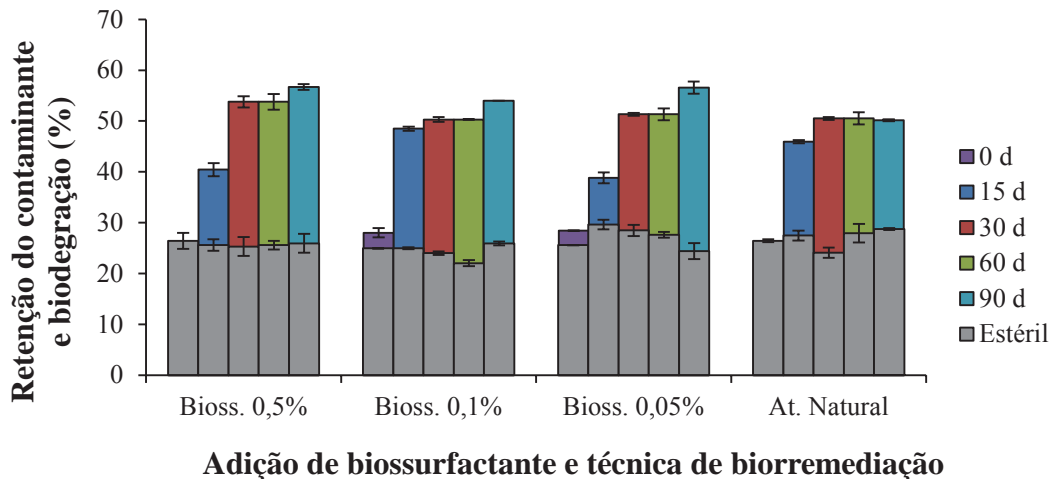
<b>Conc. de biossurfactante adicionado e técnica de biorremediação</b>	<b>CO<sub>2</sub> Liberado (mg C-CO<sub>2</sub>/kg solo)</b>
Biossurfactante - 0,5%	3868,24 ± 5,87 <sup>a</sup>
Biossurfactante - 0,1%	4326,95 ± 35,37 <sup>c</sup>
Biossurfactante - 0,05%	4334,00 ± 12,81 <sup>c</sup>
Atenuação Natural	4141,65 ± 11,18 <sup>b</sup>

Não foi observada diferença ( $p<0,05$ ) entre os valores de CO<sub>2</sub> liberado para as concentrações de 0,1% e 0,05% de biossurfactante ( $p=0,9826$ ). Entretanto, diferenças significativas foram observadas quando utilizada a técnica de atenuação natural e a adição de 0,5% de biossurfactante ( $p=0,0007$ ).

Ressalta-se que a técnica de evolução de CO<sub>2</sub> é uma das maneiras de avaliar a biodegradação, sendo ainda necessária uma análise quantitativa da remoção do contaminante adicionado. Em virtude disso, realizou-se a determinação do percentual de remoção do

contaminante nos tempos inicial, 15, 30, 60 e 90 dias de ensaio. Para os mesmos tratamentos propostos, esterilizou-se o solo com o objetivo de verificar a adsorção do contaminante, conforme apresentado na Figura 18.

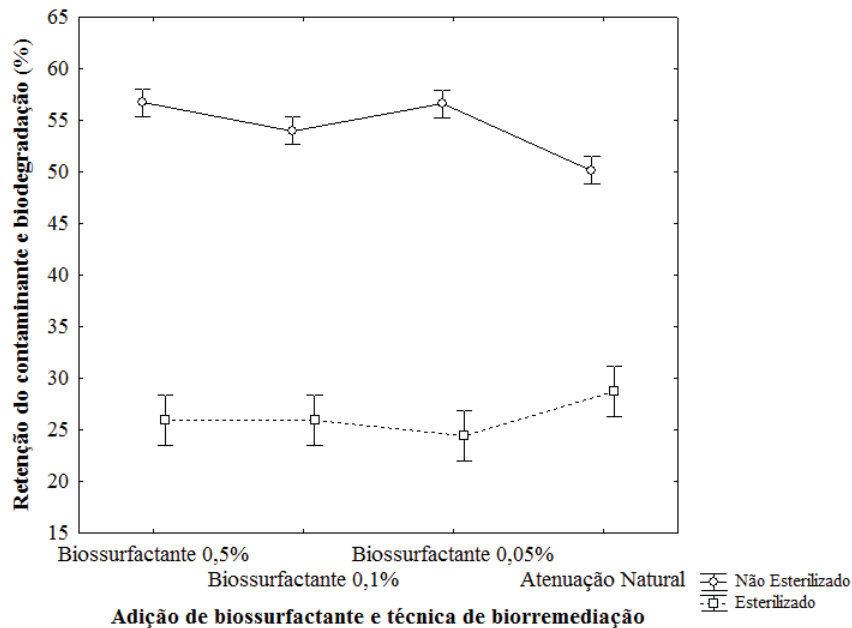
Figura 18 - Percentual de retenção de contaminante no solo e de biodegradação ao longo dos 90 dias de experimento



Analisando os percentuais de biodegradação, percebe-se que a maior biodegradação do contaminante ocorreu para a adição de 0,5% e 0,05% de biossurfactante (56,71% e 56,58, respectivamente), seguido pela adição de 0,1% de biossurfactante (53,98%) e pela técnica de atenuação natural (50,17%). Nos tratamentos em que o solo estava estéril, onde a influência dos microrganismos é nula, o contaminante que não é removido pela extração fica adsorvido nas partículas do solo. Nota-se valores próximos a 25% de retenção do biodiesel nas partículas do solo durante os 90 dias de experimento. Este percentual, antes considerado como ação microbiana, deve ser desconsiderado como biodegradação. Este valor deve ser atribuído a adsorção do biodiesel no solo, onde parte do contaminante adere as partículas do solo, caracterizando um fenômeno de adsorção (CECCHIN, 2016).

A análise de variância dos valores de biodegradação e de retenção do contaminante em função dos tratamentos realizados e do tipo de solo (estéril e não estéril) indicou que houve diferença significativa ( $p=0,0179$ ) entre os solos esterilizados e não esterilizado, conforme o gráfico de interação de médias apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Interação de médias para os valores de retenção e biodegradação do biodeisel ao final de 90 dias de ensaio em função da adição de biossurfactantes e da atenuação natural, para o solo estéril e não estéril



O teste de Tukey realizado (Tabela 12) para verificar a diferença entre as médias dos experimentos indicou igualdade estatística entre todos os teores de remoção dos contaminantes quando adicionado concentrações de 0,05%, 0,1% e 0,5% de biossurfactante, sendo estes experimentos estatisticamente diferentes da atenuação natural ( $p=0,01648$ ), indicando que a adição de biossurfactantes, independente da quantidade adicionada, promoveu maior biodegradação do contaminante.

Para o solo esterilizado, a adição de biossurfactantes não influenciou no processo de retenção do contaminante na partícula do solo, conforme pode ser observada a igualdade estatística entre todos os experimentos propostos, incluindo a atenuação natural.

Tabela 12 - Teste de Tukey da remoção e biodegradação para os solos esterilizado e não esterilizado

Conc. de biossurfactante adicionado e técnica de biorremediação	Retenção do contaminante e biodegradação (%)
Biossurfactante - 0,5%	56,71 ± 0,58 <sup>c</sup>
Biossurfactante - 0,1%	53,99 ± 0,03 <sup>c</sup>
Biossurfactante - 0,05%	56,59 ± 1,20 <sup>c</sup>
Atenuação Natural	50,16 ± 0,19 <sup>b</sup>
Biossurfactante - 0,5% - Estéril	25,94 ± 1,86 <sup>a</sup>
Biossurfactante - 0,1% - Estéril	25,90 ± 0,38 <sup>a</sup>
Biossurfactante - 0,05% - Estéril	24,40 ± 1,57 <sup>a</sup>
Atenuação Natural - Estéril	28,74 ± 0,20 <sup>a</sup>

Os valores de biodegradação apresentados na Tabela 12 indicam que a adição de biossurfactantes no solo favoreceu a degradação do composto oleoso frente à técnica de atenuação natural, independente da quantidade de biossurfactante adicionada.

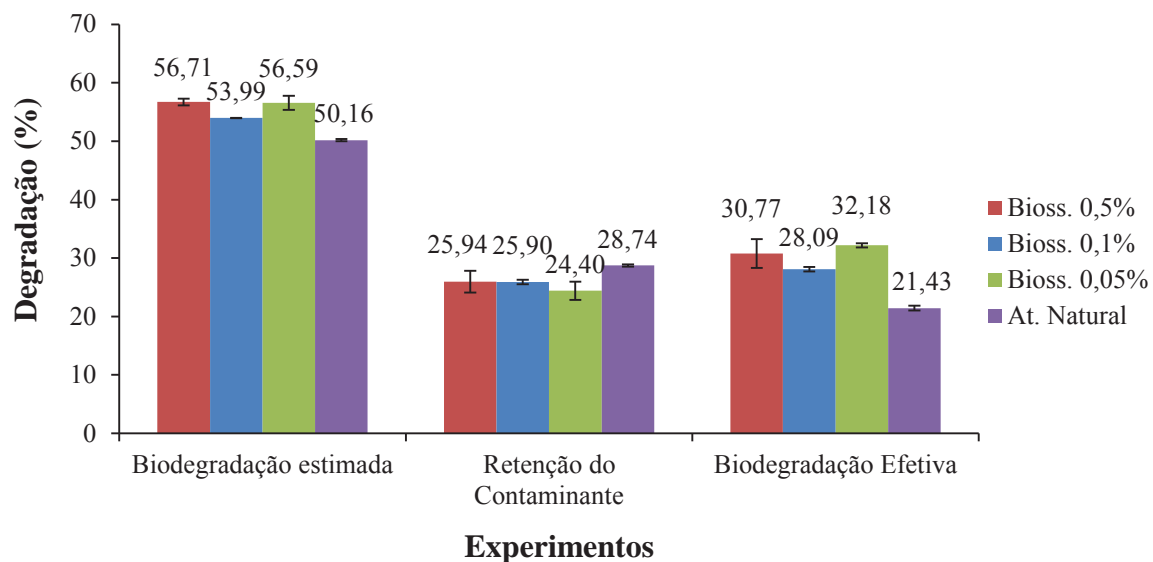
Por não ser considerada uma técnica de bioestimulação quando não atende as proporções de C:N:P:K a serem adicionadas no solo, é possível afirmar que os biossurfactantes produzidos por *S. cerevisiae* atuaram no meio de forma a emulsificar o contaminante com as partículas de água disponíveis no solo. O processo de emulsificação permite maior acesso dos microrganismos à fonte de carbono fornecida pelo contaminante, levando a maiores valores de biodegradação do contaminante.

Decesaro (2016) testou a influência de concentrações variadas de biossurfactantes (1,0%, 0,5% e 0,1%) do gênero *Bacillus* sp. na biorremediação de solo contaminado com 20% de biodiesel, atingindo valores de biodegradação de até 57,25% quando utilizado uma adição de 0,5% de biossurfactante. Os valores obtidos neste estudo assimilam-se em teores de remoção (56,71%) quando utilizada a mesma concentração de biossurfactantes para o mesmo percentual de contaminante adicionado. Isto indica a eficiência da inclusão de biossurfactantes na remoção de compostos oleosos.

A Figura 20 apresenta os valores efetivos de biodegradação dos contaminantes, onde se exclui o efeito da adsorção em solos. Assim, pode-se efetivamente considerar que o biossurfactante auxiliou na biodegradação e consequente metabolização do contaminante pelos microrganismos, aumentando em até 32% a degradação dos compostos oleosos. Quando não leva-se em consideração o efeito do fenômeno da adsorção do contaminante pelas partículas do solo, o efeito da biodegradação pelos microrganismos pode ser superestimada. Assim, deve-se descontar os valores de retenção do contaminante no solo que até então foram

considerados como resultado da biodegradação microbiana e atribuí-lo ao processo de adsorção.

Figura 20 – Biodegradação efetiva obtida para a adição dos biossurfactantes ao final de 90 dias de ensaio



Mesmo considerando-se o processo de retenção de contaminante nas partículas do solo, muitos autores demonstraram que a adição de compostos que auxiliam a biodegradação, e que maior remoção do contaminante é atingida em relação à técnica de atenuação natural (GUARINO et al., 2017).

O uso de biossurfactantes promoveu maior interação entre o biodiesel e as células microbianas autóctones. Além disso, por ser um biocomposto de origem vegetal e animal, o biodiesel é melhor assimilado pelos microrganismos em relação a outros compostos oleosos, como óleo diesel e gasolina. Na metabolização do biodiesel, os ácidos graxos que compõem o biodiesel são convertidos em acetil-CoA através de beta-oxidação, e posteriormente em CO<sub>2</sub> pelo ciclo de Krebs (BERG et al., 2006).

O uso de biossurfactantes em processos de biorremediação também foi explorado por Sobrinho et al. (2008), que aplicaram um biossurfactante de *Candida sphaerica* na remoção de óleo de motor de solos arenosos, utilizando 60 gramas de solo contaminado com 5 mL de óleo. As concentrações do biossurfactante variaram entre 0,05%, 0,08% e 0,1%. Os resultados demonstraram que a concentração de 0,1% de biossurfactante removeu 65% do óleo de motor, enquanto que os percentuais de 0,08% e 0,05% removeram 55% e 30%, respectivamente. Isto comprovou a eficiência do biossurfactante para aplicações ambientais.



Os percentuais de biorremediação obtidos comprovam que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de produzir um biossurfactante extracelular, que não necessita de um processo adicional de rompimento celular para obtenção do biocomposto. Mesmo obtendo menor produtividade de emulsões em relação a outros biossurfactantes sintetizados por outras leveduras, a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou uma resposta positiva quanto a formação e liberação de compostos com propriedades surfactantes para o meio de cultivo, excluindo-se a necessidade de um processo adicional de rompimento celular, influenciando positivamente na redução do custo do bioprocessamento.

Tanto a biomassa quanto a fonte de carbono (glicerol) adicionados ao meio de cultivo podem ser obtidos de resíduos industriais, possibilitando o uso destes como matéria prima para a produção de biossurfactantes, reduzindo custos de processos e viabilizando a aplicação ambiental do biocomposto obtido, principalmente em processos de biorremediação (SANTOS et al., 2014).

## 5 CONCLUSÕES

As seguintes conclusões foram obtidas pelo estudo:

- A melhor condição de cultivo para a produção de biossurfactantes extracelulares a partir de *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida quando utilizado o indutor glicerol na concentração de 5g/L, com um pH inicial ajustado para 5,5 e temperatura de cultivo de 30°C, onde obteve-se a máxima produtividade de atividade emulsificante água/óleo, de 6,95 UE/d;

- No aumento de escala de produção para 3 litros, a produtividade máxima de atividade emulsificante água/óleo foi de 3,85 UE/d, verificada no segundo dia de cultivo. O biossurfactante extracelular produzido é caracterizado como glicolípídeo;

- A adição do biossurfactante em solo argiloso contaminado com 20% de biodiesel foi eficiente e apresentou potencial de uso em processos de biorremediação. A máxima biodegradação obtida ao final de 90 dias de experimento foi de 56,71%, sendo maior do que a verificada quando utilizada a técnica de atenuação natural (50,17%).

- A retenção do contaminante no solo atingiu valores próximos a 25% para todas as condições avaliadas. Este percentual não deve ser atribuído à biodegradação, mas sim ao processo de adsorção do contaminante nas partículas do solo. Isto indica que o fenômeno da adsorção, quando não considerado, superestima o efeito da biodegradação;

- O biossurfactante de *Saccharomyces cerevisiae* demonstrou potencial de ser produzido de forma extracelular, excluindo-se a necessidade de processos adicionais de rompimento de parede celular para obter este biocomposto.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Testar a produção de biossurfactantes extracelulares em diferentes concentrações do indutor glicerol na condição de cultivo pH 5,5 e 30°C;
- Produzir o biossurfactante em biorreatores de 20L;
- Avaliar a adição do biossurfactante produzido na biorremediação de diferentes compostos oleosos, como o óleo diesel;
- Verificar a remoção do contaminante quando adicionado o biossurfactante em outros tipos de solos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico. **NBR 14.283**. Rio de Janeiro, 1999.
- ABNT. Associação Brasileira De Normas Técnicas. Amostras de solo: Preparação de ensaios de compactação e caracterização. **NBR 6457**. Rio de Janeiro, 1986.
- ACCORSINI, F. R.; MUTTON, M. J. R.; LEMOS, E. G. M.; BENINCASA, M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 4, p. 313-316, 2000.
- ALCANTARA, V. A.; PAJARES, I. G.; SIMBAHAN, J. F.; RUBIO, M. L. D. Substrate dependent production and isolation of an extracellular biosurfactant from *Saccharomyces cerevisiae* 2031. **Philipp. J. Sci**, v. 141, p. 13-24, 2012.
- ALMEIDA, D. G.; SILVA, R. C. F.; BRASILEIRO, P. P. F.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Utilização de planejamento experimental na produção de biosurfactante pela levedura *candida tropicalis* a partir de resíduos industriais. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2686-2693, 2015.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013.
- ASSUNÇÃO, L. P. G.; ROHLFS D. B. Biorremediação de áreas contaminadas. **Programa de Pós Graduação em Biociências Forenses**. Goiás, 2012.
- BANAT, I. M. FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTIONOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T. J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BANAT, I. M.; SATPURE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 697, p. 1-18, 2014.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.
- BASTOS, C. S. **Utilização de resíduos da produção de biodiesel como base de meio de cultura para leveduras de interesse comercial**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

- BEAL, R.; BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 1, p. 158-168, 2000.
- BEDNARSKI, W.; ADAMCZAK, M.; TOMASIK, J.; PLASZCZYK. Application of oil refinery waste in the biosynthesis of glycolipids by yeast. **Bioresource technology**, v. 95, n. 1, p. 15-18, 2004.
- BENTO F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. ; STRYER, L. Biochemistry, 6ª Ed., W. H. Freeman, New York, 2006.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, NKHALAMBAYAUSI, E. M. C. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 168-178, 2015.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. K. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal Petroleum e Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 160-166, 2013.
- BOCZAR, B. A.; FORNEY, L. J.; BEGLEY, W. M.; LARSON. R. J.; FEDERLE, T. W. Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. **Water Research**, v. 35, n. 17, p. 4208-4216, 2001.
- BONATTO, 2013. **Bioaugmentação in situ em solo residual de basalto contaminado com biodiesel**. 117 f., 2013. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.
- BRASIL. Lei nº11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Altera as leis nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 jan. 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm)> Acesso em: 30 out. 2015.
- BRASIL. Lei nº. 13.033, de 24 de setembro de 2014. Dispõe sobre a adição obrigatória de biodiesel ao diesel comercializado com o consumidor final; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, e 8.723, de 28 de outubro de 1993; revoga dispositivos da Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005; e dá outras providências. Presidência da República, Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos, 2014.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M., PACHECO, M.T.B., SGARBIERI, V.C. Composição química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n 2, p. 102-106, 1997.

CÂMARA, J. M. D. A.; SOUSA, M. A. S. B.; NETO, E. L. B.; MAFRA, G. P. Otimização da produção do biossurfactante ramnolipídeo produzido por *Pseudomona aeruginosa*. In: **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2016.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CARDOSO, E. J. B. N.. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N. (coord.), TSAI, S. M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, p. 360, 1992.

CAVELHÃO, G. **Biorremediação de resíduo contaminado com diesel proveniente do beneficiamento de geôdos de ágata**. 2011. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

CECCHIN, I.; REGINATTO, C.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M.; REDDY, K. R. Influence of physicochemical factors on biodiesel retention in clayey residual soil. **Journal of Environmental Engineering**, v. 142, n. 4, p. 04015093-1-04015093-8, 2016.

CETESB. **Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental**. 2007. Disponível em: <<http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/manual-de-gerenciamento/>>. Acesso em 24 de set. 2015.

CIAPINA, E. M. P.; MELO, W. C.; SANTA ANNA, L. M. M.; SANTOS, A. S.; FREIRE, D. M. G.; PEREIRA, N. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 29-32, 2006.

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. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 471-479, 2015.

CHIARANDA, H. S. **Alterações biogeoquímicas em águas subterrâneas impactadas por biodiesel de soja e misturas de diesel/biodiesel (B20)**. 2001, 221 f. Tese (Doutor em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

CHU, W.; CHAN, K. H. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. **Science of the Total Environment**, v. 307, n. 1, p. 83-92, 2003.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor**, v. 13, p. 85-103, 2003.

COOKSON, J. T. **Bioremediation Engineering: Design and Application**. McGraw-Hill. New York. 1994.

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COOPER, David G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.

CORSEUIL, HENRY X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p.311-318,1996.

COSTA, A. G. **Determinação das melhores condições de extração de manoproteínas da parede celular de leveduras e sua aplicação**. 2008. Dissertação apresentada ao programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, 2008.

COSTA, A. G.; MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2011.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511-1516, 2010.

DECESARO, A. **Produção de biossurfactantes a partir de resíduos da indústria de laticínios para aplicação em processos de biorremediação**. 93 f, 2016. Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Engenharia Civil e Ambiental (Mestre em Engenharia). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2016.

DECESARO, A.; RIGON, M. R.; THOMÉ, A.; COLLA, L. M. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947-54, 2013.

DECESARO, A.; RAMPPEL, A.; MACHADO, T. S.; THOMÉ, A.; REDDY, K.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M. Bioremediation of soil contaminated with diesel and biodiesel fuel using biostimulation with microalgae biomass. **Journal of Environmental Engineering**. p. 04016091-1-04016091-8, 2016.

DEL RIO, D. **Biossorção de cádmio por levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

EDWARDS, D. A.; LIU, Z.; LUTHY, R. G. Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems. **Journal of Environmental Engineering**, v. 120, n. 1, p. 5-22, 1994.

FAI, A. E. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, C. J.; GHISELLI, G.; PASTORE, G. M. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 535-542, 2015.

FAN, L.; DONG, Y.; FAN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, Q. Production and identification of mannosylerythritol lipid-A homologs from the ustilaginomycetous yeast *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34. **Carbohydrate research**, v. 392, p. 1-6, 2014.

FARIA, A. F. **Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FONTES, G. C.; RAMOS, N. M.; AMARAL, P. F. F.; NELE, M.; COELHO, M. A. Z. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 3, p. 483-494, 2012.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**, v. 1, n. 1, p. 58-69, 2011.

GUARINO, C.; SPADA, V.; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation-Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Chemosphere**, v. 170, p. 10-16, 2017.

GUIMARRÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

HASSAN, M.; ESSAM, T.; YASSIN, A. S.; SALAMA, A. Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett–Burman design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 573-579, 2016.

HERRERO, M.; STUCKEY, D. C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. **Chemosphere**, v. 140, p. 119-128, 2015.

ILORI, M. O.; ADEBUSOYE, S. A.; OJO, A. C. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2539-2545, 2008.

JAIN, R. M.; MODY, K.; JOSHI, N.; MISHRA, A.; JHA, B. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 52-58, 2013.

KATEMAI, W. Biosurfactants from yeasts. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2011.

KIM, D.; HWANG, B.; MOON, D.; KIM, Y.; BAEK, K. Environmental assessment on a soil washing process of a Pb-contaminated shooting range site: a case study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 12, p. 8417-8424, 2013.



KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 239-256, 2002.

KRELING, N. **Biorremediação de solo contaminado com biodiesel utilizando biomassa e manoproteínas obtidas através da levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2014, 53 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenheiro Ambiental), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2014.

KRELING, N. E.; ZAPAROLI, M.; RODIGUERI, G.; COLLA, L. M.; Produção de biossurfactantes intra e extracelulares a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2015, Fortaleza.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica, 4ª. Edição, **Editora Sarvier**, 2007.

LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M. Evaluation of emulsifier stability of biosurfactant produced by *Saccharomyces lipolytica* CCT-0913. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 285-290, 2009.

LIN, L.; CUNSHAN, Z.; VITTAYAPADUNG, S.; XIANGQIAN, S.; MINGDONG, D. Opportunities and challenges for biodiesel fuel. **Applied Energy**, Reino Unido, v. 88, p. 1020–1031, 2011.

LIU, X. Y.; WANG, Q.; CUI, S. W.; LIU, H. Z. A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 239-247, 2008.

LUNA, J. M. **Otimização, caracterização e aplicações biotecnológicas do biossurfactante de baixo custo lunasan produzido por *Candida Sphaerica* UCP 0995**. 2010. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; JARA, A. M. A. T.; BRASILEIRO, P. P. F.; SARUBBO, L. A. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 480, p. 413-418, 2014.

MAKKAR, R. S.; ROCKNE, K. J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 22, n. 10, p. 2280-2292, 2003.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. Tese (Doutor em Geociência e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, 2006.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Guanabara koogan, 360 p., 1999.

MATSUURA, A. B. J. **Produção e caracterização de biossurfactantes visando à aplicação industrial e em processos de biorremediação**. 2004. 98 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

MELO, A. N. F.; SOUZA, E. L.; ARAUJO, V. B. S.; MAGNANI, M. Stability, nutritional and sensory characteristics of French salad dressing made with mannoprotein from spent brewer's yeast. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 771-774, 2015.

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química de biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. Tese. (Doutor em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. 2011. Dissertação (Mestre em Microrbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MINUCELI, T. **Produção de sofrorolipídios de *Candidabombicola* ATCC 22214 em substratos industriais de baixo custo e aplicação em biorremediação**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Utilização de biossurfactantes produzidos a partir de resíduos agroindustriais na biorremediação do petróleo. **Scientia Plena**, v. 8, n. 10, 2013.

MORITA, T.; KAWAMURA, D.; MORITA, N.; FUKUOKA, T.; IMURA, T.; SAKAI, H.; ABE, M.; KITAMOTO, D. Characterization of Mannosylerythritol Lipids Containing Hexadecatetraenoic Acid Produced from Cuttlefish Oil by *Pseudozyma churashimaensis* OK96. **Journal of oleo science**, v. 62, n. 5, p. 319-327, 2013.

MUTHEZHILAN, R.; RAGUL, R.; PUSHPAM, A. C.; HUSSAIN, A. J. Production and Purification of Biosurfactant from Marine Yeast Isolated from Kelambakkam Salterns. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 11, n. 1, p. 59-67, 2014.

MUKHTAR, H.; HAQ, I. U. Kinetics of invertase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic medium. **In: 1st International Conference on Natural Resources Engineering & Technology, 2006**.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 3, p. 379-412, 2008.

NIEVAS, M. L.; COMMENDATORE, J. L.; ESTEVES, V. B. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. **Journal of hazardous materials**, v. 154, n. 1, p. 96-104, 2008.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, J. G. **Utilização de melão, manipueira e soro de queijo como substratos para produção de biossurfactante por *Bacillus pumilus* e a sua aplicação em biorremediação de solo**. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em microbiologia), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2014.

- OLIVEIRA, J. S.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C.; MÜLLER, M. D. Composição química da glicerina produzida por usinas de biodiesel no Brasil e potencial de uso na alimentação animal. **Ciência rural**, v. 43, n. 3, P. 509-512, 2013.
- OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 34-50, 2000.
- PACHECO, G. J.; CIAPINA, E. M. P.; GOMES, E. B.; JUNIOR, N. P. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* and its application to oil removal. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 685-693, 2010.
- PACWA-PLÓCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633-654, 2011.
- PAREILLEUX, A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: formation of a biosurfactant; effects on respiratory activity and growth. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, v. 8, n. 1-2, p. 91-101, 1979.
- PIMMATA, P.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 196-204, 2013.
- PREVIDELLO, B. A. F.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 600-606, 2006.
- REED, G., NAGODAWITHANA, T. W.; **Yeast technology**. 2.ed., New York:Van Nostrand Reinhold, 378p., 1991.
- REGINATTO, C. **Bioventilação em um solo argiloso contaminado com mistura de diesel e biodiesel**. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Área de concentração Infraestrutura e Meio Ambiente, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012.
- RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1374-1380, 2007.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154-162, 1999.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 34-38, 2014.
- SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 1, p. 1-14, 2011.

- SANTOS, D. K. F.; MEIRA, H. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. L.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochemistry**, p. 1-8, 2016a.
- SANTOS, D. K. F.; BRANDÃO, Y. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L.A. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 48-57, 2014.
- SANTOS, F. F.; SILVA, L. V.; FREITAS, K. M. L.; LEÃO, M. H. M. R.; AMARAL, P. F. F. Utilização de resíduos como substrato para produção de biossurfactantes por *Yarrowia lipolytica*. **In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2016b.
- SARI, M.; KUSHARYOTO, W.; ARTIKA, I. Made. Screening for Biosurfactant-producing Yeast: Confirmation of Biosurfactant Production. **Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 106, 2014.
- SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 1, p. 187 – 195, 2005.
- SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127-144, 2010.
- SELVAKUMAR, K.; ANIBABIYANS, R.; MADHAN, R. Extracellular glycolipids from *Saccharomyces cerevisiae* as bioemulsifying agents in food processing. **Innovare journal of food science**, v. 4, n.1, p. 3-6, 2016.
- SEMPLE, K.T.; Reid, B.J.; Fermor, T.R. Impact of composting strategies on treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, 112:269-283, 2000.
- SGARBIERI, V.C., ALVIM, I.D., VILELA, E.S.D., BALDINI, V.L.S., BRAGAGNOLO, N. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.5, p.119-125, 1999.
- SIQUEIRA, J. O. et al. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. **EMBRAPA, SPI**, Brasília, DF, 1994.
- SILVA, D. P.; PESSOA, J. A.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 91, n. 3, p. 605-613, 2001.
- SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183, 2010.

SMITH, A.; ZHANG, Z.; THOMAS, C. R.; MOXHAM, K. E.; MIDDELBERG, A. P. J. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 18, p. 9871-9874, 2000.

SOBRINHO, H. B. S.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SALGUEIRO, A. A.; CAMPOSTAKAKI, G. M.; LEITE, L. F. C.; SARUBBO, L. A. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912-917, 2008.

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

SOUZA, M.; DANTAS, I. T.; FELIZ, A. K. N.; SANT'ANA, H. B.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Crude glycerol from biodiesel industry as substrate for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 2, p. 295-301, 2014b.

SPINELLI, L. F. **Biorremediação, Toxicidade e Lesão Celular em derrames de gasolina**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia/Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

STRECK, E. V. Solos do Rio Grande do Sul. 2. ed. Porto Alegre: **EMATER/RS**, Brasil, 2008.

THOMÉ, A.; REGINATTO, C.; CHECCHIN, I. COLLA, L. M. Bioventing in a residual clayey soil contaminated with a blend of biodiesel and diesel oil. **Journal of Environmental Engineering**, v. 140, n. 11, p. 06014005-1-06014005-6, 2014.

USEPA, U. S. **ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY**. 1996. Method 3550B: Ultrasonic Extraction. Disponível em: <<http://www.trincoll.edu/~henderson/textfi~1/416%20notes/3550b.pdf>>. Acesso em: Set. 2015.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1-6, 2015.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIN, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista Nutrição**, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000.

WEBER, L.; DOGE, C.; HAUFE, G.; HOMMEL, R.; KLEBER, H. P. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. **Biocatalysis**, v. 5, n. 4, p. 267-272, 1992.

WIN, S. S.; IMPOOLSUP, A.; NOOMHORM, A. Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 117-123, 1996.

WU, J.; YEH, K.; LU, W.; LIN, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1157-1164, 2008.

YARON, B.; DROR, I.; BERKOWITZ, B. **Soil-Subsurface Change - Chemical Pollutant Impacts**. Springer, 378 p, 2012.