



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química- FEQ

LETÍCIA MARTINI BRAZ

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR PSEUDOMONAS E APLICAÇÃO NA
DESSORÇÃO DE PESTICIDAS EM LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO

CAMPINAS-SP

2023

LETÍCIA MARTINI BRAZ

PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR PSEUDOMONAS E APLICAÇÃO NA
DESSORÇÃO DE PESTICIDAS EM LATOSSOLO VERMELHO-AMARELO

Tese de doutorado apresentada à
Universidade Estadual de Campinas,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de doutora em Engenharia
Química.

Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Co-orientadora: Prof^a Dra. Grazielle Santos Silva Andrade

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA LETÍCIA MARTINI BRAZ
E ORIENTADA PELO PROFESSOR DR.
ELIAS BASILE TAMBOURGI.

CAMPINAS-SP

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

B739p Braz, Letícia Martini, 1992-
Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* e aplicação na dessorção de pesticidas em latossolo vermelho-amarelo / Letícia Martini Braz. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Elias Basile Tambourgi.

Coorientador: Grazielle Santos Silva Andrade.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Glicolipídios. 2. Melaço. 3. Dessorção. 4. Ácido diclorofenoxiacético. 5. Atrazina. I. Tambourgi, Elias Basile, 1957-. II. Andrade, Grazielle Santos Silva. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Rhamnolipids production by *Pseudomonas* and application in the desorption of pesticides in red-yellow soil

Palavras-chave em inglês:

Glycolipids

Molasses

Desorption

Dichlorophenoxyacetic acid

Atrazine

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora:

Elias Basile Tambourgi [Orientador]

Elisângela de Jesus Cândido Moraes

Thayse Alves de Lima e Silva

Sérgio Ricardo Lourenço

Gislaine Cristina Sales Brugnoli da Cunha

Data de defesa: 18-07-2023

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3346-0404>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5131555005429294>

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por **LETÍCIA MARTINI BRAZ** e aprovada em 18 de julho de 2023 pela Comissão Examinadora da defesa, constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

Presidente e Orientador

FEQ/ UNICAMP

Profa. Dra. Elisângela de Jesus Cândido Moraes

Escola de Engenharia de Lorena EEL – USP

Videoconferência

Profa. Dra. Thayse Alves de Lima e Silva

FEQ/ Unicamp

Videoconferência

Profa. Dra. Gislaine Cristina Sales Brugnoli da Cunha

Universidade de Ribeirão Preto UNAERP

Videoconferência

Prof. Dr. Sergio Ricardo Lourenço

Universidade Federal do ABC

Videoconferência

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA / Sistema de Fluxo de Dissertação / Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha, meu pequeno infinito amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde e força para superar as dificuldades e me guiar na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais e irmãos, pessoas especiais que amo muito e que independente do momento pelos quais passavam sempre me apoiaram e incentivaram a alcançar os meus objetivos. Amo vocês!

À minha família. Por todo carinho, conselhos e conversas. Agradeço a Deus por Ele ter me colocado nesta família. Sempre lembrarei com muito saudosismo de todos os momentos de alegrias compartilhados com vocês.

Ao meu marido, que me auxiliou e incentivou nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, acreditando em mim quando eu mesma já não acreditava.

Ao meu orientador, professor Elias e minha co-orientadora, professora Graziella. Agradeço por toda paciência, dedicação, confiança e conhecimentos transmitidos.

Por fim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para que este momento chegasse! Fica aqui o meu MUITO OBRIGADA!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, de acordo com processo 88882.329713/2019-01.

RESUMO

Tendo em vista a crescente busca por processos e produtos sustentáveis e que não afetem negativamente o meio ambiente, estudos que apresentem tecnologias que auxiliam neste tópico são desejadas. Esse crescimento está relacionado com a conscientização dos consumidores, fomentada pelas organizações reguladoras internacionais. Existe uma demanda por parte de diversos segmentos industriais, para o desenvolvimento de soluções verdes, em busca de produtos de uso final (100% biodegradáveis), com baixo custo. O potencial de aplicação de biossurfactantes produzidos a partir de microrganismos é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, emulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial, propriedades as quais podem ser exploradas para aplicação na indústria química, alimentícia, farmacêutica e processos de biorremediação de solos e águas contaminados com óleos e orgânicos persistentes.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de crescimento das cepas de *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC9027 em substrato de melaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono para a produção de ramnolipídeos, e a aplicação deste biossurfactante para a dessorção de pesticidas de solos contaminados. Para isso, a influência do tempo de cultivo e da concentração de substrato (% m/v melaço) na produção de biossurfactante foram investigados.

Os resultados mostraram que *P. fluorescens* obteve seu ponto máximo de produção de biossurfactantes em torno das 30 horas de fermentação, em que se verificou a menor tensão superficial do meio ($46,54 \pm 1,1$ mN/m) e maior concentração de ramnose ($243,95 \pm 38,3$ mg/L) obtidos com substrato a 3% de melaço, enquanto a atividade emulsificante ficou em torno de 56%. No entanto, nos testes para detecção de ramnolipídeos, nenhum foi detectado, indicando produção de outro tipo de biossurfactante que não da classe de ramnolipídeos. Por este motivo, deu-se continuidade no estudo utilizando-se a cepa de *P. aeruginosa*.

Na produção de biossurfactantes com *P. aeruginosa*, a cepa foi capaz de produzir 758,04 mg/L de ramnolipídeos com 7% m/v de concentração de substrato em um tempo de cultivo de 120 h, reduzindo a tensão superficial do meio para 34,01 mN/m. O teste de confirmação de ramnolipídeos foi positivo. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) revelou a presença de 62,3% mono- (RL1) e 37,6% di-ramnolipídeos (RL3). Os testes de estabilidade mostraram que o biossurfactante tem bom desempenho em condições extremas de temperatura, pH e concentração salina. O índice de emulsificação também foi

avaliado para diversos óleos e hidrocarbonetos, obtendo-se taxas de emulsificação de até 84,9% para o óleo de motor queimado. Além disso, o ramnolípídeo apresentou boa capacidade de remover o óleo derramado da areia, removendo 58,51% do óleo de motor queimado e 70,09% do óleo de soja pós-fritura.

Na aplicação do ramnolípídeo para dessorção dos pesticidas, os dados obtidos sugerem que a dessorção foi altamente influenciada pelo pH e pela concentração de biossurfactante utilizada. Os melhores resultados de dessorção dos herbicidas atrazina e 2,4-D foram obtidos com a concentração de 5 CMC (900 mg/L) do biossurfactante em pH neutro e alcalino, respectivamente, que dessorveram 25,67 mg de atrazina/kg solo e 13,17 mg 2,4-D/kg solo.

Os resultados indicam que o melaço, resíduo agroindustrial abundante no Brasil, pode ser utilizado como única fonte de carbono para produção de ramnolípídeos de qualidade quando em condições otimizadas, apresentando-se, portanto, como uma opção de manejo deste resíduo e, ao mesmo tempo, proporcionando o produto de produção com alto valor agregado. Além disso, os ramnolípídeos são uma alternativa promissora para uso em Remediação Aprimorada com Surfactantes, onde ajustando o pH e a concentração do biossurfactante é possível otimizar este processo, contribuindo para a recuperação de solos contaminados.

Palavras-chave: Ramnolípídeos; Melaço; Dessorção; 2,4-D; Atrazina.

ABSTRACT

In view of the growing search for sustainable processes and products that do not negatively affect the environment, studies that present technologies that help in this topic are desired. This growth is related to consumer awareness, fostered by international regulatory organizations. There is a demand on the part of several industrial segments, for the development of green solutions, in search of final use products (100% biodegradable), with low cost. The application potential of biosurfactants produced from microorganisms is based on the properties of emulsification, separation, wetting, solubilization, emulsification, corrosion inhibition, reduction of liquid viscosity and reduction of surface tension, properties which can be exploited for application in chemical, food, pharmaceutical industry and bioremediation processes of contaminated soil and water with oils and persistent organics.

In this sense, the present study aimed to evaluate the growth potential of strains of *P. fluorescens* ATCC 13525 and *P. aeruginosa* ATCC9027 on sugarcane molasses substrate as the only source of carbon for the production of rhamnolipids, and the application of this biosurfactant for the desorption of pesticides from contaminated soils. For this, the influence of cultivation time and substrate concentration (% w/v molasses) on biosurfactant production were investigated.

The results showed that *P. fluorescens* reached its peak of biosurfactant production around 30 hours of fermentation, when the lowest surface tension of the medium (46.54 ± 1.1 mN/m) and the highest concentration of rhamnose were observed. (243.95 ± 38.3 mg/L) obtained with substrate containing 3% molasses, while the emulsifying activity was around 56%. However, in the tests for the detection of rhamnolipids, none was detected, indicating the production of another type of biosurfactant that does not belong to the rhamnolipid class. For this reason, the study was continued using the *P. aeruginosa* strain.

In the production of biosurfactants with *P. aeruginosa*, the strain was able to produce 758.04 mg/L of rhamnolipids with 7% m/v of substrate concentration in a cultivation time of 120 h, reducing the surface tension of the medium to 34.01 mN/m. The rhamnolipid confirmation test was positive. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) revealed the presence of 62.3% mono- (RL1) and 37.6% di-rhamnolipids (RL3). Stability tests showed that the biosurfactant performs well under extreme conditions of temperature, pH and saline concentration. The emulsification index was also evaluated for several oils and hydrocarbons, obtaining emulsification rates of up to 84.9% for burnt engine oil. In addition, rhamnolipid

showed good ability to remove spilled oil from sand, removing 58.51% of burnt engine oil and 70.09% of post-frying soybean oil.

In the application of rhamnolipid for desorption of pesticides, the data obtained suggest that the desorption was highly influenced by the pH and the concentration of biosurfactant used. The best desorption results for atrazine and 2,4-D herbicides were obtained with a concentration of 5 CMC (900 mg/L) of the biosurfactant at neutral and alkaline pH, respectively, which desorbed 25.67 mg of atrazine/kg soil and 13.17 mg 2,4-D/kg soil.

The results indicate that molasses, an agroindustrial residue abundant in Brazil, can be used as the only source of carbon for the production of quality rhamnolipids when under optimized conditions, presenting itself, therefore, as an option for managing this residue and, at the same time, providing the production product with high added value. In addition, rhamnolipids are a promising alternative for use in Surfactants Enhanced Remediation (SER), where adjusting the pH and concentration of the biosurfactant is possible to optimize this process, contributing to the recovery of contaminated soils.

Keywords: Rhamnolipids; Molasses; Desorption; 2,4-D; Atrazine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais homólogos de ramnolipídeos produzidos por <i>Pseudomonas</i>	26
Figura 2	Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	29
Figura 3	Estrutura molecular da 2-cloro-4etilamina-6-isopropilaminas-triazina (atrazina).....	30
Figura 4	Mapa de solos do Brasil (escala 1:5.000.000)	31
Figura 5	Fluxograma de desenvolvimento do estudo	35
Figura 6	Esquema experimental dos testes para produção de biossurfactantes.....	38
Figura 7	Procedimento para extração do biossurfactante obtido na fermentação com <i>P.</i> <i>fluorescens</i> e <i>P aeruginosa</i> em meio a base de melaço.....	39
Figura 8	Esquema para teste de recuperação de óleo derramado em areia sob ação biossurfactante.....	43
Figura 9	Esquema para teste de avaliação da dessorção de herbicidas em solo sob ação biossurfactante.....	50
Figura 10	Variação da tensão superficial na produção de biossurfactantes por <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 em substrato a base de melaço.....	51
Figura 11	Diagrama de Pareto para o Planejamento Fatorial completo 3 ² utilizando <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC9027.....	53
Figura 12	Superfície de resposta para a produção de ramnolipídeos por <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 segundo Planejamento Fatorial Completo 3 ²	54
Figura 13	Variação da tensão superficial do meio de melaço ao longo da fermentação com <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	56
Figura 14	Cromatografia em camada delgada para detecção de mono e di-ramnolipídeos produzidos durante fermentação em meio de melaço com <i>P. aeruginosa</i> e <i>P.</i> <i>fluorescens</i>	57
Figura 15	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para confirmação da presença de mono e di-ramnolipídeos produzidos durante fermentação em meio de melaço com <i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	57
Figura 16	Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> em 120h de fermentação e meio melaço 7% m/v.....	59
Figura 17	Variação da concentração de açúcares, biomassa e biossurfactante ao longo das 120h de fermentação com <i>P. aeruginosa</i> em meio melaço 7% m/v.....	60
Figura 18	Estabilidade do ramnolipídeo produzido por <i>P. aeruginosa</i> (melaço 7% m/v e 120h) frente à temperatura (a), pH (b) e força iônica (c).....	61

Figura 19	Índice de emulsificação do ramnolipídeo produzido por <i>P. aeruginosa</i> (melaço 7% m/v e 120h) após 24h (a) e 72h (b).....	63
Figura 20	Comparação entre os tratamentos aplicados na dessorção da (a) 2,4-D e (b) atrazina em latossolo vermelho-amarelo em diferentes pHs (3, 7 e 9) e concentrações de ramnolipídeos (0; 0,5 CMC; 1 CMC; 5 CMC).....	68
Figura 21	Isotermas de sorção para 2,4-D e atrazina obtidas experimentalmente e segundo modelos de Freundlich, Langmuir e Gunary. a) 2,4-D em pH 3; b) 2,4-D em pH 7; c) 2,4-D em pH 9; d) atrazina em pH 3; e) atrazina em pH 7; f) atrazina em pH 9.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.....	24
Tabela 2	Concentrações de melaço e tempos de fermentação avaliados na produção de biossurfactantes por <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i>	38
Tabela 3	Caracterização química do melaço utilizado como substrato na produção de biossurfactantes por <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027....	49
Tabela 4	Concentração de ramnose na produção de biossurfactantes por <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 em substrato a base de melaço.....	50
Tabela 5	Produção de ramnolípídeos de acordo com Planejamento Fatorial Completo 3 ² utilizando <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	51
Tabela 6	ANOVA para produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i>	52
Tabela 7	Tempos de retenção dos picos de mono e di-ramnolípídeos produzidos por <i>P. aeruginosa</i> em meio de melaço 7% m/v e 120h de fermentação.....	58
Tabela 8	Caracterização físico-química do latossolo vermelho-amarelo utilizado neste estudo.....	65
Tabela 9	Resultados da contaminação artificial do latossolo com atrazina e 2,4-D.....	66
Tabela 10	Análise de Tukey para avaliação da significância da concentração de ramnolípídeos e pH na dessorção da atrazina e 2,4-D em latossolo vermelho-amarelo.....	69
Tabela 11	Análise de Tukey para avaliação da significância entre a Interação Ramnolípídeo X pH na dessorção de atrazina e 2,4-D de latossolo vermelho-amarelo.....	70
Tabela 12	Parâmetros para as isotermas de sorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo segundo modelos de Freundlich, Langmuir e Gunary.....	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Biossurfactantes: Propriedades e principais características	22
3.2 Microrganismos produtores e tipos de biossurfactantes	24
3.3 Resíduos agroindustriais aplicados à produção de biossurfactantes.....	26
3.4 Contaminação de recursos naturais por pesticidas	28
3.5 Latossolo vermelho-amarelo brasileiro	30
3.6 Descontaminação de solos com pesticidas utilizando-se biossurfactantes.....	32
4. METODOLOGIA	35
4.1 Fluxograma do estudo.....	35
4.2 Produção de biossurfactantes.....	36
4.2.1 Microrganismo e meio de manutenção	36
4.2.2 Inóculo.....	36
4.2.3 Caracterização química básica do melaço	36
4.2.4 Meio para produção de biossurfactantes	37
4.2.5 Produção com <i>P. fluorescens</i> e <i>P. aeruginosa</i>	37
4.2.6 Extração do biossurfactante.....	39
4.2.7 Confirmação da produção de ramnolípídeo	39
4.3 Tensão superficial e CMC	40
4.4 Concentração de biomassa, ramnose e açúcares	41
4.5 Cálculo de parâmetros cinéticos da fermentação	41
4.6 Avaliação da estabilidade do biossurfactante frente à temperatura, pH e salinidade ..	42
4.7 Índice de emulsificação	42
4.8 Remoção de óleo derramado em areia	43
4.9 Dessorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo	44
4.9.1 Caracterização do latossolo	44

4.9.2	Contaminação artificial do latossolo	44
4.9.4	Quantificação dos pesticidas em CLAE.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Caracterização do substrato.....	49
5.2	Produção de biossurfactantes com <i>P. fluorescens</i>	50
5.3	Produção de biossurfactantes com <i>P. aeruginosa</i>	52
5.4	Identificação de ramnolipídeos	56
5.5	Concentração Micelar Crítica (CMC).....	58
5.6	Parâmetros cinéticos da fermentação.....	59
5.7	Testes de estabilidade.....	61
5.8	Índice de emulsificação	63
5.9	Remoção de óleo derramado em areia	64
5.10	Dessorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo	65
5.10.1	Caracterização do solo	65
5.10.2	Contaminação artificial do latossolo vermelho- amarelo com 2,4-D e atrazina.....	66
5.10.3	Dessorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo utilizando biossurfactante.....	67
5.10.4	Isotermas de sorção	72
6.	CONCLUSÕES	76
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
APÊNDICE A		92
APÊNDICE B		95
APÊNDICE C		98

Capítulo 1
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a poluição do meio ambiente e a busca por tecnologias de produção que proporcionem um desenvolvimento sustentável está cada vez mais intensa. Em contrapartida, o aumento do consumo por parte da sociedade aparece como um empecilho, resultando na destruição de diversos ecossistemas.

O mercado mundial de biossurfactantes é avaliado em US\$ 2.374 milhões e deverá atingir Taxa Composta de Crescimento Anual de 5,5% no período de 2022 a 2027 (Mordor Intelligence, 2022). Os biossurfactantes são compostos de propriedades tensoativas produzidos por microrganismos. Apresentam propriedades emulsificantes equivalentes aos sintéticos e possuem aplicação em diversas áreas como, indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, biorremediação de áreas contaminadas por derivados de petróleo, retirada de metais do solo, entre outras (Sana et al., 2017). Neste contexto, o surgimento de produtos biodegradáveis ganha destaque.

No entanto, quando comparado aos surfactantes químicos convencionais, os biossurfactantes ainda apresentam um maior custo, principalmente devido ao processo de produção (Zhao et al., 2020). Esse fator tem causado restrição no seu uso pelo mercado global (Busines Wire, 2018).

No que diz respeito a sua produção, a possibilidade de utilização de substratos renováveis em meio fermentativo é um atrativo (Kronemberger, 2007). No Brasil, o estado de São Paulo se destaca na produção agrícola de cana-de-açúcar. Na safra 2020/21, o Brasil foi responsável pela produção de 654,5 milhões de toneladas de cana-de-açúcar destinadas à produção de 41,2 milhões de toneladas de açúcar e 29,7 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2021). Entretanto, o processamento da cana-de-açúcar gera também subprodutos como o melaço, a vinhaça, a torta de filtro e o bagaço, os quais necessitam de opções para aproveitamento, haja vista a grande quantidade de cana processada. Sendo assim, a utilização de subprodutos agroindustriais na produção de biossurfactantes não só seria benéfica para a diminuição dos custos de produção destes compostos, os quais ainda são onerosos, mas também seria uma alternativa de manejo para estes resíduos.

Diversos tipos de biossurfactantes podem ser obtidos a partir de diferentes substratos e microrganismos, cada qual com propriedades peculiares, as quais os permitem serem utilizados em ramos distintos. Uma das aplicações ambientais notável dos biossurfactantes é baseada em sua capacidade de interagir com contaminantes orgânicos persistentes pouco solúveis e auxiliar na transferência destes para a fase aquosa, o que pode melhorar a sua

remoção ou extração através de tratamento biológico (Li et al., 2015; Kumari et al., 2018). Com isso a produção e utilização destes compostos tornou-se uma alternativa bastante apreciada.

Sabe-se que a atividade agroindustrial tem sido uma das principais responsáveis pela deterioração do meio ambiente, particularmente pelo lançamento indiscriminado de elevadas quantidades de herbicidas (FAO, 2019).

Uma solução potencial para a remediação de águas e solo contaminado por herbicidas é o emprego de surfactantes, os quais solubilizam e dispersam os contaminantes, limpando o solo e retornando-o a seu estado original (Mulligan et al., 1999a, b; Asçi et al., 2010).

A remediação aprimorada com surfactante (*Enhanced Remediation with Surfactante-SER*) tem sido extensivamente estudada e indicada como um método promissor para a remoção de contaminantes orgânicos (Yuan et al., 2010; Rivero Huguet e Marshall, 2011; Zhao et al., 2016). Os surfactantes químicos ainda são os mais usados, no entanto, esses surfactantes também são tóxicos e contaminantes ambientais (Yuan et al., 2010). Uma das soluções é o uso de biossurfactantes. Os biossurfactantes produzidos por microrganismos possuem Concentrações Micelares Críticas (CMC) mais baixas, capazes de diminuir consideravelmente a tensão superficial do meio e solubilizar compostos pouco solúveis, além de serem atóxicos e biodegradáveis (Rangarajan e Narayanan, 2018).

Em vista disso, a utilização de um biossurfactante se apresenta como uma alternativa sustentável e ecologicamente favorável, proporcionando a retirada dos contaminantes por meio de um processo com pequeno ou nenhum efeito sobre as características físico-químicas e microbiológicas do solo (Iturbe et al., 2008).

Destaca-se que, no levantamento bibliográfico realizado para os últimos 10 anos, existem estudos nos quais se avaliou a produção de biossurfactantes a partir de substratos de baixo valor comercial, bem como sua utilização para a descontaminação de solo, mas nenhum em que rhamnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* a partir de melaço fossem utilizados para aplicação na descontaminação de solos contaminados por 2,4-D e atrazina.

Capítulo 2
OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção otimizada de biossurfactante produzido por *Pseudomonas* utilizando fonte nutricional de baixo custo, bem como, avaliar a dessorção do pesticida 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo.

2.2 Objetivos Específicos

A fim de alcançar o objetivo geral deste trabalho, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Avaliar o crescimento e a produção de biossurfactante do tipo ramnolipídeo por *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC 9027 em substrato com melaço de cana-de-açúcar como fonte única de carbono;
- Avaliar a influência da concentração do melaço e do tempo de fermentação na produção do biossurfactante;
- Identificar e confirmar a produção de biossurfactante do tipo ramnolipídeo, selecionando uma das duas linhagens produtoras;
- Otimizar a produção do biossurfactante produzido pela linhagem bacteriana selecionada utilizando planejamento experimental fatorial completo;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante frente à temperatura, pH e salinidade, bem como seu poder emulsificante;
- Avaliar a remoção de óleo derramado em areia com a aplicação do biossurfactante produzido;
- Avaliar a influência do pH e da concentração do biossurfactante na dessorção de pesticida 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo artificialmente contaminado.

Capítulo 3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes: Propriedades e principais características

Os surfactantes são produtos químicos empregados para limpeza em geral e extensivamente utilizados pelas indústrias produtoras de detergentes, resinas, tintas, pesticidas, lubrificantes, entre outras. Devido às suas características emulsificantes, proporcionadas por suas longas cadeias carbônicas apolares (hidrofóbicas) e extremidade polar (hidrofílica), conseguem interagir tanto com as substâncias polares como com as apolares (Hamza, Iorhemen & Tay, 2016).

A presença de altas concentrações de surfactantes no meio líquido origina agregados moleculares que possuem partes hidrofílica e hidrofóbica. Esses agregados são microestruturas altamente organizadas, como as micelas, vesículas e bicamadas, os quais são provenientes de forças hidrofóbicas, van der Waals e ligações de hidrogênio (interações químicas fracas). Tais micelas se formam espontaneamente em solução aquosa a partir da chamada Concentração Micelar Crítica (CMC), as quais promovem a propriedade de emulsificação desta classe de compostos (Karlupudi et al., 2018). A tensão superficial está correlacionada com a CMC. Surfactantes eficientes possuem uma baixa CMC, isto é, menor quantidade de surfactante é necessária para o decréscimo da tensão superficial (Shavandia et al., 2012).

No entanto, quando os surfactantes são descartados no meio ambiente sem qualquer tratamento podem ser prejudiciais aos seres vivos ali presentes. Devido a sua estrutura anfifílica, os tensoativos se localizam na superfície do meio líquido, diminuem a tensão superficial da água e, conseqüentemente diminuem o oxigênio dissolvido disponível à biota ali presente, além de produzirem espumas, as quais dificultam o processo de aeração e transportam bactérias e impurezas a longas distâncias (Penteado et al., 2006).

Neste sentido destacam-se os biossurfactantes, um grupo de compostos químicos produzidos por microrganismos (bactérias, fungos ou leveduras), o qual também apresenta estrutura anfifílica e propriedades emulsificantes. Os biossurfactantes, assim como os surfactantes sintéticos, apresentam-se na forma de misturas acima da CMC e contam com vantagens por serem menos tóxicos, menos alergênicos e biodegradáveis, refletindo em um menor impacto ambiental (Schmidt et al, 2021).

A maioria dos tensoativos naturais são excretados no meio de cultivo durante o crescimento do microrganismo, onde auxiliam o transporte e translocação de substratos

insolúveis através da membrana celular (Zheng et al., 2012). Entretanto, alguns microrganismos mantêm os biossurfactantes associados à parede celular, facilitando a penetração dos hidrocarbonetos no espaço periplasmático (Shavandia et al., 2011).

Algumas vantagens dos biossurfactantes se destacam quando comparados aos surfactantes sintéticos (Schmidt et al, 2021):

- Alguns biossurfactantes apresentam tolerância à temperatura e não tem sua atividade superficial afetada, mesmo quando submetidos a altas temperaturas (90°C);
- Possuem tolerância à força iônica e pH, não precipitando em soluções salinas de até 10%, enquanto para desativar os surfactantes químicos soluções de 2-3% de sal são suficientes;
- São facilmente degradados tanto na água quanto no solo;
- Emulsões feitas com biossurfactantes podem ser facilmente quebradas por adição de enzimas, como por exemplo, a depolimerase, que pode quebrar a emulsão de hidrocarbonetos em óleo;
- Possuem alta atividade tensoativa, o que atribui aos compostos desta classe propriedades de detergência, lubrificação, solubilização, capacidade espumante e molhante e dispersão de fases (Karlupudi et al., 2018).

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa produzidos a partir de microrganismos é baseado nas propriedades de emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, emulsificação, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. A solubilidade é uma das propriedades mais importantes dos surfactantes, e está diretamente ligada ao tamanho do grupo hidrofóbico ou hidrofílico da molécula. Para um mesmo grupo hidrofílico, o aumento do grupo hidrofóbico causa o aumento da massa molecular do surfactante que, por sua vez, torna-se menos solúvel em água. Analogamente, quanto maior o grupo hidrofílico, para a mesma quantidade do grupo hidrofóbico, o surfactante torna-se mais solúvel em água (Hamza, Iorhemen & Tay, 2016).

Outra característica muito aplicada é sua capacidade de detergência, a qual consiste num processo de remoção de uma substância indesejável de uma superfície sólida por meio da aplicação de uma força mecânica na presença do composto tensoativo (Nitschke & Pastore, 2002; Gouveia et al., 2003).

Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção, nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, farmacêutica, cosmética e podem ser utilizados na formulação de xampus, géis de cabelos, desodorantes e loções pós-barba (Sana et al., 2017).

3.2 Microrganismos produtores e tipos de biossurfactantes

Muitas espécies de microrganismos têm sido descritas como produtoras de biossurfactantes, no entanto, as maiores responsáveis são as bactérias. A grande diversidade destes compostos está atribuída ao fato de que cada microrganismo é capaz de produzir um surfactante diferente com características específicas. Desta forma o tipo, quantidade e qualidade do tensoativo natural varia de acordo com o microrganismo produtor, com a natureza do substrato disponível, com a concentração de íons com nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro e manganês no meio nutricional e demais condições de cultura, como pH, temperatura, agitação, oxigenação e taxa de diluição (Fardami et al., 2022).

No que diz respeito à sua constituição química, na maioria das vezes a porção hidrofóbica é constituída por ácidos graxos de cadeia longa ou hidroxiácidos, enquanto a porção hidrofílica pode ser constituída de carboidratos, aminoácidos, peptídeo cíclico, fosfato, ácido carboxílico ou álcool (Abbasi et al., 2012).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com sua natureza bioquímica e origem microbiana, visto que cada família apresenta propriedades e funções fisiológicas diferentes. A Tabela 1 apresenta as principais classes de biossurfactantes e os respectivos microrganismos produtores.

Tabela 1- Classes de biossurfactantes e microrganismos produtores.

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUTOR
Glicolipídios	
Raminolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e Lipoproteínas	
peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>

Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>

Ácidos Graxos, Lipídios Neutros e Fosfolipídios

Ácidos graxos	<i>Corynebacterium</i>
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>

Surfactantes Poliméricos

Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>

Surfactantes Particulados

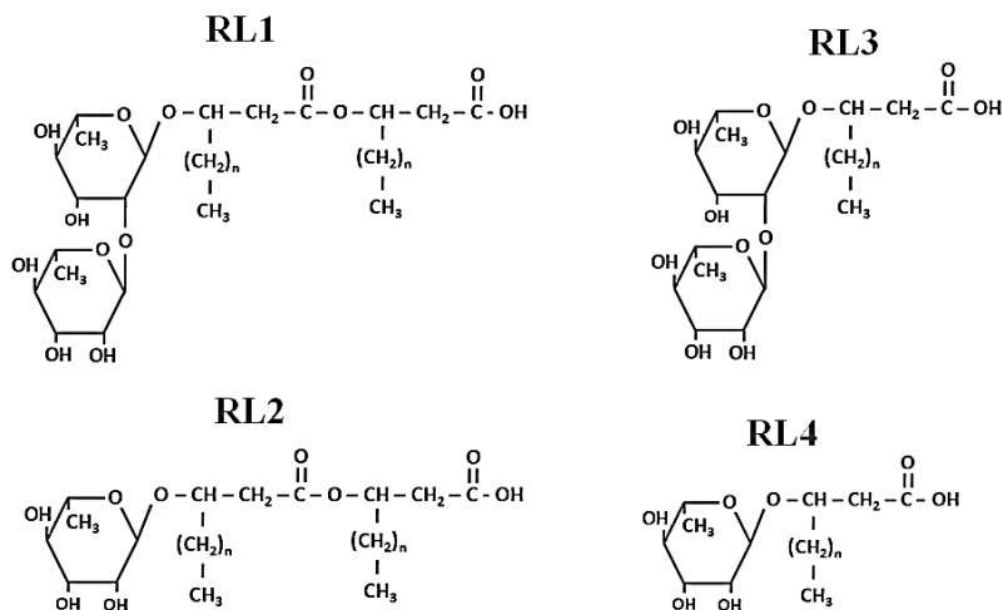
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Fonte: Pacwa-Płociniczak et al., 2011.

O gênero *Pseudomonas* está ligado à conservação ambiental, considerando sua habilidade de degradação de compostos xenobióticos. São bactérias consideradas cosmopolitas, gram-negativas, aeróbicas, oportunistas que apresentam flagelos em sua morfologia e seu metabolismo possui uma vasta versatilidade (Ghssein, G., & Ezzeddine, Z., 2022). Estudos realizados demonstraram o seu potencial na produção de biossurfactantes, especialmente ramnolipídeos, pertencentes ao grupo dos glicolipídeos (Bazsefidpar et al., 2019).

Esta classe de biossurfactantes pode conter uma ou duas unidades de L-ramnose ligadas a um ou dois β -hidroxi de ácidos graxos (Henkel et al., 2012). A ramnose é um açúcar deoxihexose (6-deoxihexose) extensamente encontrado em bactérias e plantas, sendo a L-ramnose um componente comum da parede celular e de estruturas capsulares em bactérias gram-negativas e gram-positivas (Maki & Renkonen, 2004).

O ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* é caracterizado pela mistura de homólogos de RL1 (Rha2C10C10), RL2 (RhaC10C10), RL3 (Rha2C10) e RL4 (RhaC10), e a razão destes homólogos é que determinam as propriedades do biossurfactante (Lang & Wagner, 1987).

Figura 1- Principais homólogos de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas*.

Fonte: Adaptado de Lovaglio, 2023.

Os ramnolipídeos são conhecidos por serem capazes de formar micelas em concentrações acima da CMC, aumentando a mobilidade de contaminantes orgânicos e de metais em solos e sedimentos (Chen et al., 2017; Kumari et al., 2018; Rangarajan & Narayanan, 2018). A CMC é uma informação bastante relevante, pois determina a quantidade necessária do produto para modificar as propriedades físico-químicas de uma solução e atingir o objetivo desejado.

3.3 Resíduos agroindustriais aplicados à produção de biossurfactantes

Atualmente, os biossurfactantes ainda não são capazes de competir economicamente no mercado com os surfactantes químicos. Isto se deve aos altos custos despendidos nos processos de produção (baixos rendimentos), separação e purificação destes compostos (Zhao et al., 2020). A utilização de substratos de meios de cultura alternativos de baixo custo é uma forma de reduzir o custo final de produção desses metabólitos microbianos, que podem representar 30% dos gastos totais (Chen et al., 2018). A nova alternativa que vem sendo explorada nos últimos anos é a utilização de subprodutos ou resíduos agroindustriais como substratos para a produção de biossurfactantes, como milhocina, melaço, soro de leite e óleo de soja residual (Nitschke; Costa; Contiero, 2005; Banat et al., 2014; Gudiña et al., 2016; Zhao et al., 2020;).

Resíduos ricos em carboidratos ou lipídeos, com adequada relação carbono/nitrogênio e que apresentem altas concentrações de micronutrientes são os que se caracterizam como melhores substratos para o crescimento microbiano, bem como para a produção de biossurfactantes (Barros et al., 2008).

Dentre os subprodutos agroindustriais, o melaço de cana-de-açúcar é uma ótima opção devido ao seu baixo custo e disponibilidade de nutrientes para processos biotecnológicos. No Brasil, o melaço é um subproduto abundante da indústria açucareira, sendo amplamente utilizado como substrato para a produção de etanol. Isso porque o melaço funciona como uma boa fonte de carbono para o metabolismo microbiano devido à presença de muitos açúcares redutores e parte da sacarose não cristalizada (Costa et al., 2020). Além disso, também estão presentes no melaço nitrogênio, fosfatos, cálcio e magnésio, além de nutrientes importantes para o metabolismo celular como zinco, manganês, cobre e ferro (Palmonari et al. 2020).

Há anos trabalhos vêm sendo realizados no sentido de viabilizar a produção de biossurfactantes a partir da utilização de substratos de baixo custo. Patel e Desai (1997), Makkar e Camerota (2002) e Nitschke et al. (2004) utilizaram o melaço de cana-de-açúcar na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* GS3, *Bacillus subtilis* MTCC e *Bacillus subtilis* LB5a, respectivamente. Patel e Desai obtiveram 0,24 g/L de ramnose em 96 horas de cultivo. Nitschke et al (2004), mostraram uma comparação entre três diferentes substratos ricos em carboidratos: melaço de cana, soro de leite e manipueira, em que se constatou que a produção com a manipueira foi a que apresentou o biossurfactante o qual proporcionou os melhores valores de redução na tensão superficial.

Câmara et al. (2019) avaliaram a produção de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* isolada de solo artificialmente contaminado com diesel utilizando glicerol (9,36 v/v) como substrato. Os autores obtiveram 0,877 g/L de ramnolipídeos após 240 h de fermentação, o que reduziu a tensão superficial do meio de 72,02 mN/m para 35,26 mN/m. Valores maiores foram obtidos por Ray et al. (2021), que obtiveram 1,24 g/L e 1,8 g/L de biossurfactante utilizando *Pseudomonas sp.* cultivada em meio mineral suplementado com óleo cru. Kanna (2017), utilizando a mesma cepa (*P. aeruginosa* ATCC9027) em 84 h de teste com meio mineral suplementado com sacarose (20 g/L), obteve 1,2 g/L de biossurfactantes e reduziu a tensão superficial da água para 33 mN/ m.

Um vasto campo de estudos para o desenvolvimento de tecnologias de produção nacional de biossurfactantes existe, o que permite que se alcance elevados rendimentos e produtividades no processo, além de produtos de baixo custo. Tendo em vista o crescimento

do setor sucro-alcooleiro no Brasil, a utilização de subprodutos do processamento da cana-de-açúcar torna-se uma alternativa interessante a ser explorada.

3.4 Contaminação de recursos naturais por pesticidas

Uma determinada área é considerada contaminada quando, entre outros fatores, as concentrações de substâncias designadas pela legislação ambiental estão acima do limite estabelecido em lei. Acima desse limite, há um risco potencial de efeito deletério sobre a saúde humana, o que exige uma ação imediata na área (Zeitouni et al., 2007).

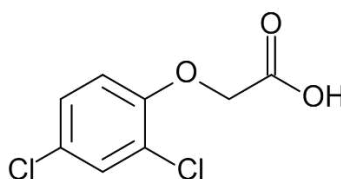
O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos têm motivado o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações, a fim de prevenir ou combater pragas e também visar a maior produtividade. Devido ao aumento do plantio de monoculturas, o aparecimento de várias pragas e o crescimento da variedade de produtos aplicados na agricultura e na pecuária, se torna necessário o monitoramento de eventuais resíduos destes pesticidas no ambiente e nos alimentos (Amarante, 2002).

Pela legislação brasileira, estes compostos são denominados de “agrotóxicos” e classificados como inseticidas, fungicidas e herbicidas. A denominação pesticida é dada à substância ou à mistura de substâncias destinadas a prevenir a ação ou destruir direta e indiretamente insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal prejudiciais à lavoura (Santisteban, 1999). Embora existam outros métodos de controle de pragas, os produtos químicos ainda são os mais utilizados atualmente (Reis et al., 2019).

Os pesticidas clorofenoxiácidos constituem importante classe de herbicidas. Esses, normalmente apresentam longo tempo de atividade residual em solos e águas, persistindo por vários meses devido à sua baixa atividade microbiológica (Lewis et al., 2016). Os herbicidas da classe dos ácidos fenólicos, com baixa persistência, permanecem no solo durante, aproximadamente, duas semanas após a aplicação. Os herbicidas dessa classe degradam-se facilmente em água, por ação da luz solar e de microorganismos. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Figura 2), membro dessa classe, é altamente seletivo, sistêmico e pós-emergente no controle de plantas infestantes nas culturas de trigo, milho, soja, arroz (irrigado e de sequeiro), cana-de-açúcar e pastagens de braquiária. Este herbicida age como inibidor da ação da enzima acetilcolinesterase causando a morte de ervas daninhas de folhas largas, considerado um herbicida barato e bastante eficiente, mesmo em baixas concentrações (Xie et al., 2010). Ao ser aplicado no ambiente, este herbicida é disperso em solos, em

sedimentos e em águas. Devido ao seu uso difundido, sua persistência, natureza polar e solubilidade em água, o herbicida 2,4-D é espalhado e seus resíduos e produtos de transformação estão presentes em diversas matrizes, tais como, água, solo, cereais e outros vegetais (Ordaz-Guillén et al., 2014; Soloneski et al., 2016). Por este motivo, é muito recomendado o monitoramento constante desta substância e de seus produtos de degradação nas diferentes matrizes, justificando assim os estudos na área.

Figura 2- Estrutura molecular do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).



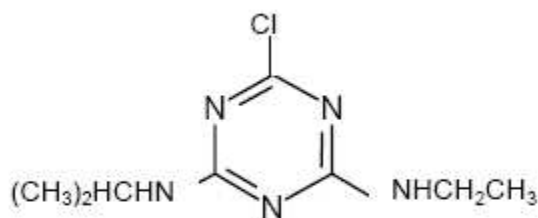
Fonte: Magnoli et al., 2020.

O composto mais conhecido do grupo das triazinas é o herbicida Atrazina, sendo utilizado em grandes quantidades como herbicida pré-emergente. A Atrazina (2-cloro-4etilamina-6-isopropilaminas-triazina) (Figura 3) é uma base fraca com características polares. Sua estabilidade pode ser explicada pela configuração eletrônica do anel heterocíclico, semelhante à do benzeno. Trata-se de herbicida pré-emergente, seletivo para o controle de ervas daninhas, utilizado principalmente em culturas de milho, cana-de-açúcar e sorgo. No meio ambiente sofre hidrólise, produzindo a 2-hidroxitriazina, sendo a dealquilação a principal reação de degradação biológica. Esse pesticida tem sido encontrado em águas subterrâneas, águas superficiais, chuvas e água de neblina (Nödler et al., 2013). A Atrazina tem sido associada a diversos problemas ambientais (contaminação do solo e de águas subterrâneas), incluindo plantas que se tornaram tóxicas pela concentração absorvida. Em sistemas anaeróbios e meios aquosos ou não, a substituição do cloro por um grupo hidroxila precede a clivagem do anel e a total degradação do composto. Sua meia-vida no solo tem sido observada no intervalo entre 1,5 até 5 anos. A atrazina é o herbicida mais frequentemente detectado em águas, com concentrações entre 0,03 a 1726 ng/L (Souza et al., 2020; Seibert et al., 2020).

Quando aplicados diretamente no solo, os pesticidas podem ser degradados por vias químicas, fotólise ou ação de microrganismos. Entretanto, as moléculas com alta persistência (baixa taxa de degradação) podem permanecer no ambiente sem sofrer qualquer alteração. Essas moléculas podem ser adsorvidas nas partículas do solo, dessorvidas a partir dessas

mesmas partículas, sofrer lixiviação (lavagem do solo pela água da chuva) e atingir os lençóis subterrâneos ou, ainda, serem levadas para águas superficiais (Qurratu e Reehan, 2016).

Figura 3- Estrutura molecular da 2-cloro-4-etilamina-6-isopropilaminas-triazina (atrazina).



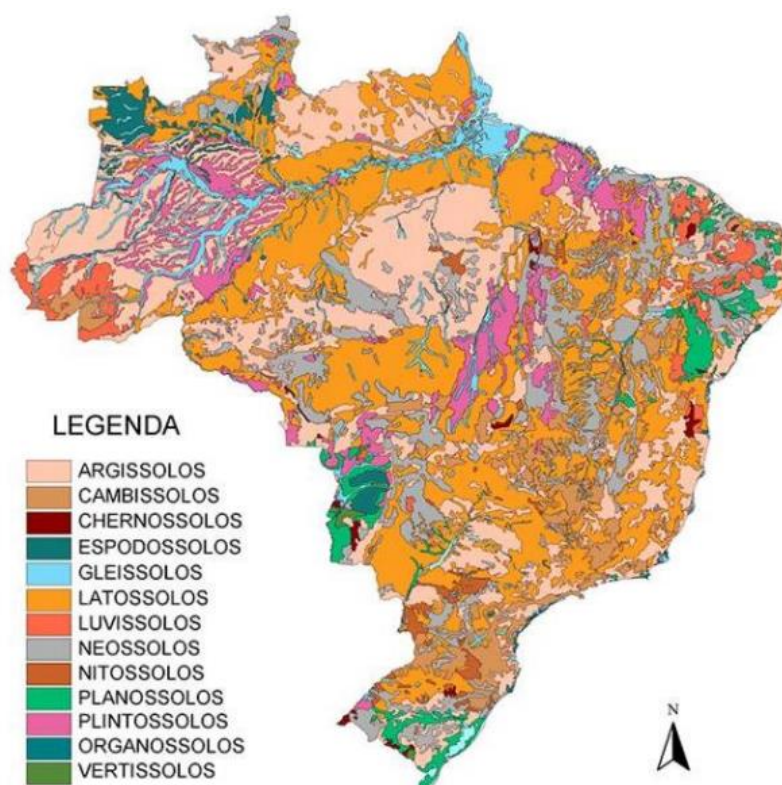
Fonte: Kleinschmitt et al., 2007.

3.5 Latossolo vermelho-amarelo brasileiro

O solo pode ser definido como “uma coleção de corpos naturais, compostos por partes sólidas, líquidas e gasosas, tridimensionais, dinâmicos, formados por materiais minerais e orgânicos que ocupam a maior parte do manto superficial das extensões continentais do nosso planeta. Nesse sentido, contêm matéria viva e podem ser vegetados na natureza onde ocorrem e, eventualmente, terem sido modificados por interferências antrópicas” (EMBRAPA, 2018)

No Brasil existem 13 grandes classes de solos amplamente distribuídos em toda a extensão do país (Figura 4). Cada classe possui suas particularidades, variando com o material de origem, processo de intemperismo, clima, microrganismos e relevo. As duas principais classes de solos predominantes no Brasil são o Latossolo e o Argissolo, ocupando 38,7 e 20% da área total do país, respectivamente (Coelho et al. 2002), sendo os solos brasileiros de regiões tropicais, em geral, de elevada acidez e fertilidade natural baixa (Santos et al., 2018).

Figura 4- Mapa de solos do Brasil (escala 1:5.000.000).



Fonte: EMBRAPA, 2014.

As características físico-químicas do solo, como, pH, textura, porosidade, entre outras, exercem grande influência na biodisponibilidade dos herbicidas para as plantas. Havendo o contato solo-herbicida, a molécula pode sofrer processos de sorção, transporte e transformação (Gavrilescu 2005), sendo a sorção, o principal processo que influencia o destino do herbicida no ambiente. Os principais mecanismos de adsorção na matriz solo-água são interação eletrostática, troca iônica, ligações de hidrogênio, ligações catiônicas e interações hidrofóbicas (Kah e Brown, 2006). A sorção é um fenômeno de superfície dependente da área de superfície do solo, tipo de interação e porosidade do adsorvente (Mironyuk et al., 2019; Sharma et al., 2017b).

Quanto menor a sorção do herbicida no solo, maior é a chance de ele ser lixiviado, volatilizado e perdido por escoamento superficial e, também, mais disponível pode estar para os microrganismos o degradarem, diminuindo sua persistência no solo (Caceres-Jensen et al. 2019).

De maneira geral, os herbicidas são menos persistentes em locais de clima tropical, quando comparado ao clima temperado, pois a temperatura é um fator principal. Nos climas tropicais, altas temperaturas e elevadas precipitações contribuem para o aumento da atividade microbiana no solo em função da maior disponibilidade de água e temperatura do solo,

resultando em maior degradação dos herbicidas. Além disso, o teor de matéria orgânica nos solos tropicais também tende a ser menor, influenciando na ocorrência de uma menor sorção e consequentemente, menor efeito residual. No entanto, com o crescente aumento da utilização de herbicidas aplicados, principalmente, como estratégias de manejar biótipos de plantas daninhas resistentes, o conhecimento da persistência dos herbicidas e do efeito residual é fundamental (Mendes et al., 2019).

3.6 Descontaminação de solos com pesticidas utilizando-se biossurfactantes

Para controlar a interação solo-herbicida no solo, a adsorção-dessorção é um processo eficaz (Lin et al., 2011). Os procedimentos de remediação atualmente mais populares, tanto para extrair poluentes orgânicos persistentes (POPs), quanto metais pesados, é a lavagem do solo. A lavagem do solo é um método que se fundamenta no princípio da transferência de um contaminante do solo para um sequestrador na fase líquida ou gasosa (Guedes et al., 2010). Água, com ou sem aditivos (ácidos, surfactantes, agentes quelantes, etc.), é empregada para solubilizar os contaminantes (Rivero, Huguet & Marshall, 2011). A técnica permite que os compostos microbianos interajam com os contaminantes pouco solúveis e a melhorem a sua transferência para a fase aquosa. Isto permite a mobilização de poluentes recalcitrantes que tenham sido incorporados na matriz do solo e a sua remoção subsequente, aumentando a eficiência da biodegradação (Lai, 2009).

De acordo com Song *et al.* (2008), o aprimoramento da técnica de dessorção do solo e lavagem é uma tecnologia promissora para a remediação dos solos contaminados com potencial aplicabilidade e viabilidade econômica. Neste contexto, a remediação com surfactante tem sido extensivamente estudada e indicada como um método promissor para a remoção de contaminantes orgânicos (Zhao et al., 2016). Apesar de os surfactantes químicos ainda serem os mais utilizados neste processo, estes também são tóxicos ao meio ambiente (Yuan et al., 2010).

No processo de remediação de áreas contaminadas, a possibilidade do uso de agentes mobilizantes de poluentes mais biocompatíveis que os surfactantes químicos comerciais torna interessante o uso dos surfactantes produzidos por microrganismos (Berselli et al., 2006).

Biossurfactantes como ramnolipídeos, surfactina, saponina e soforolipídios têm sido empregados (Mulligan et al., 2001; Mulligan & Wang, 2006; Juwarkar et al., 2007; Song et al., 2008; Asçi et al., 2010), destacando-se o uso dos ramnolipídeos para retirada de

compostos persistentes do solo. Os ramnolipídeos possuem baixas CMC, capazes de diminuir significativamente a tensão superficial do meio e solubilizar compostos pouco solúveis (Rangarajan e Narayanan, 2018). Suas diferentes estruturas promovem comportamentos distintos, como a capacidade de complexar orgânicos catiônicos e tendências a formar micelas maiores, aumentando sua solubilidade (Chen et al., 2017).

Diversos trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar a descontaminação de águas e solos contaminados com estes compostos.

Os pesticidas, DDT, 2,4-D, pentaclorofenol, bifenilas policloradas, entre outros, são exemplos de compostos aromáticos halogenados. A mineralização das bifenilas policloradas foi estudada após a adição de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* a uma cultura aclimatada de *Alcaligenes eutrophus*. Após a adição de 4 g/L de biossurfactante, o contaminante foi mineralizado 213 vezes mais do que o controle. Outros experimentos em laboratório também demonstraram que a degradação das bifenilas policloradas em solo foi melhorada após a adição de ramnolipídio (ROBINSON, 1996).

Mata-Sandoval et al. (2000) compararam a capacidade de solubilizar os pesticidas trifluralin, coumafos e atrazina, através da mistura de ramnolipídios com surfactante sintético. Na presença do biossurfactante, a capacidade de solubilização dos pesticidas aumentou duas vezes, em decorrência da ligação do biossurfactante com a molécula do pesticida, pela formação de micelas, com posterior liberação lenta do pesticida para a fase aquosa, auxiliando a biodegradação microbiana.

Lima et al. (2011) avaliaram a remoção de metais e contaminantes orgânicos do solo. Os resultados demonstraram que os biossurfactantes podem ser utilizados com êxito para a remoção simultânea de íons de metais e de poluentes orgânicos. A aplicação de lipopeptídios obtidos a partir de diferentes espécies de bactérias aumentou notavelmente tanto a taxa de remoção de cádmio (99%), bem como a de fenantreno (88%).

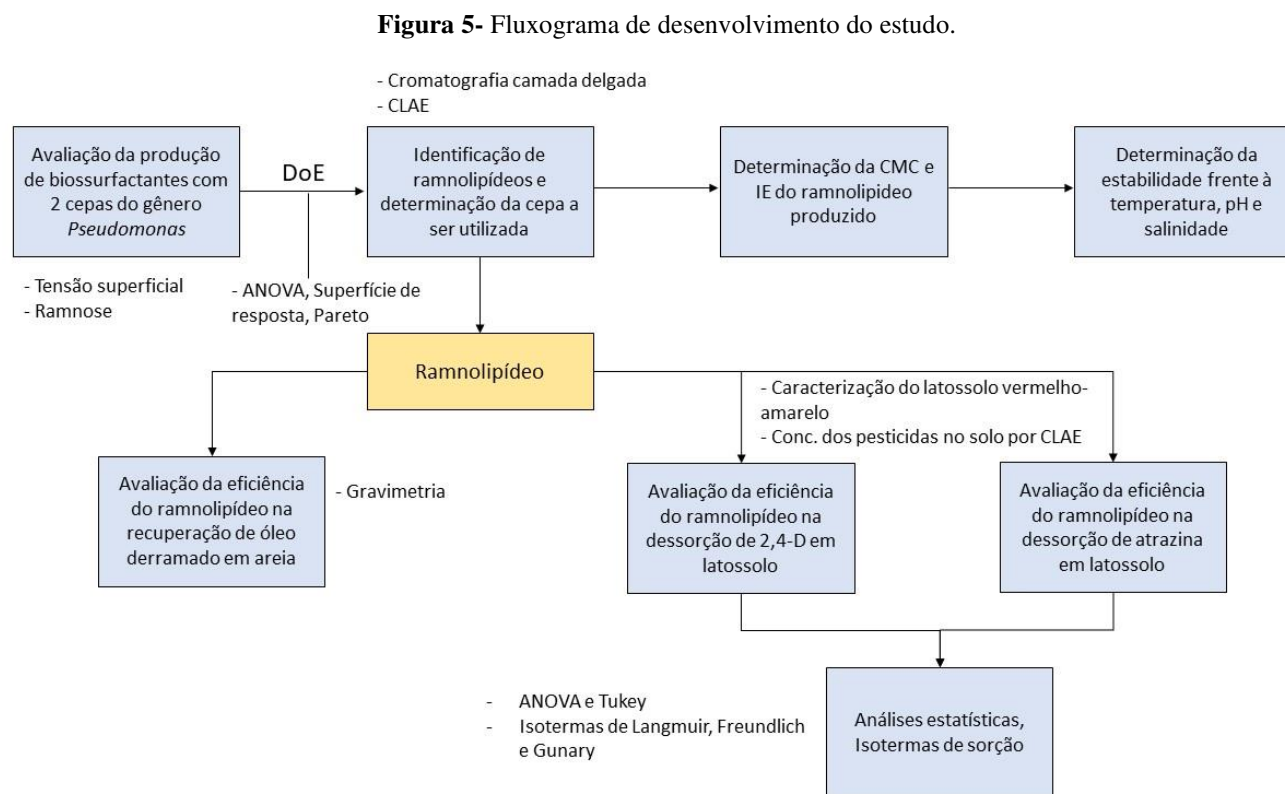
Visto isso, a utilização de biossurfactantes na descontaminação do solo com herbicidas é uma alternativa de uso interessante a ser explorado, já que se utilizará composto biodegradável para retirada de contaminante ambiental.

Capítulo 4
METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1 Fluxograma do estudo

A Figura 5 apresenta o fluxograma de desenvolvimento deste estudo.



4.2 Produção de biossurfactantes

4.2.1 Microrganismo e meio de manutenção

As cepas de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 utilizadas neste estudo foram adquiridas do banco de culturas da Fundação André Tosello, Campinas/Brasil. Cada uma era mantida em ágar nutriente sob refrigeração a 4°C até que fossem utilizadas. A cada 2 meses, uma alçada era transferida para meio fresco de manutenção autoclavado (121°C por 20 min), o qual continha 5 g/L de peptona bacteriológica (Biolog), 3 g/L de carne extrato (Kasvi) e 1 g/L de NaCl (Dinamica) em água destilada.

4.2.2 Inóculo

O inóculo foi preparado adicionando-se 5% v/v de *P. fluorescens* ou *P. aeruginosa* (Kaskatepe et al., 2015) em caldo nutriente autoclavado (121°C por 20 min), mesmo meio utilizado para manutenção do microrganismo. Após o preparo, o inóculo foi incubado por 18 horas a 30°C sob agitação orbital (100 rpm). A padronização foi realizada pela densidade óptica da solução, na qual o caldo contendo as células foi ajustado em espectrofotômetro UV-Vis (Nanocolor Macherey-Nagel) com faixa de absorbância de 0,8 a 0,9 a 600 nm.

4.2.3 Caracterização química básica do melaço

Uma caracterização prévia foi realizada antecedendo a sua utilização, com intuito de avaliar a concentração de açúcares (glicose, frutose e sacarose), Carbono e Nitrogênio Total e micronutrientes (K, P, Ca, Mg, Mn, Al, Cu, Zn, Cd, Cr, Ni e Fe), para determinar a necessidade de adição de fonte de carbono ou nitrogênio extras.

As quantificações de glicose, frutose e sacarose foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com o descrito no item 4.4 deste estudo. Carbono e Nitrogênio Total foram medidos em Analisador Elementar de Carbono, Nitrogênio, Hidrogênio e Enxofre da marca *Elementar*. As temperaturas utilizadas foram de 1150 °C no tubo de combustão, 850 °C no tubo de redução, 240 °C na coluna de CO₂, 150 °C na coluna de H₂O e 230 °C na coluna de SO₂.

Os macro e micronutrientes (K, Ca, Na, Fe, Cu, Mn, Ni, Al) foram quantificados em Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). A

amostra foi aberta em solução régia HCl + HNO₃ (3:1), filtrada em membrana PVDF 0,46 µm e injetada no equipamento.

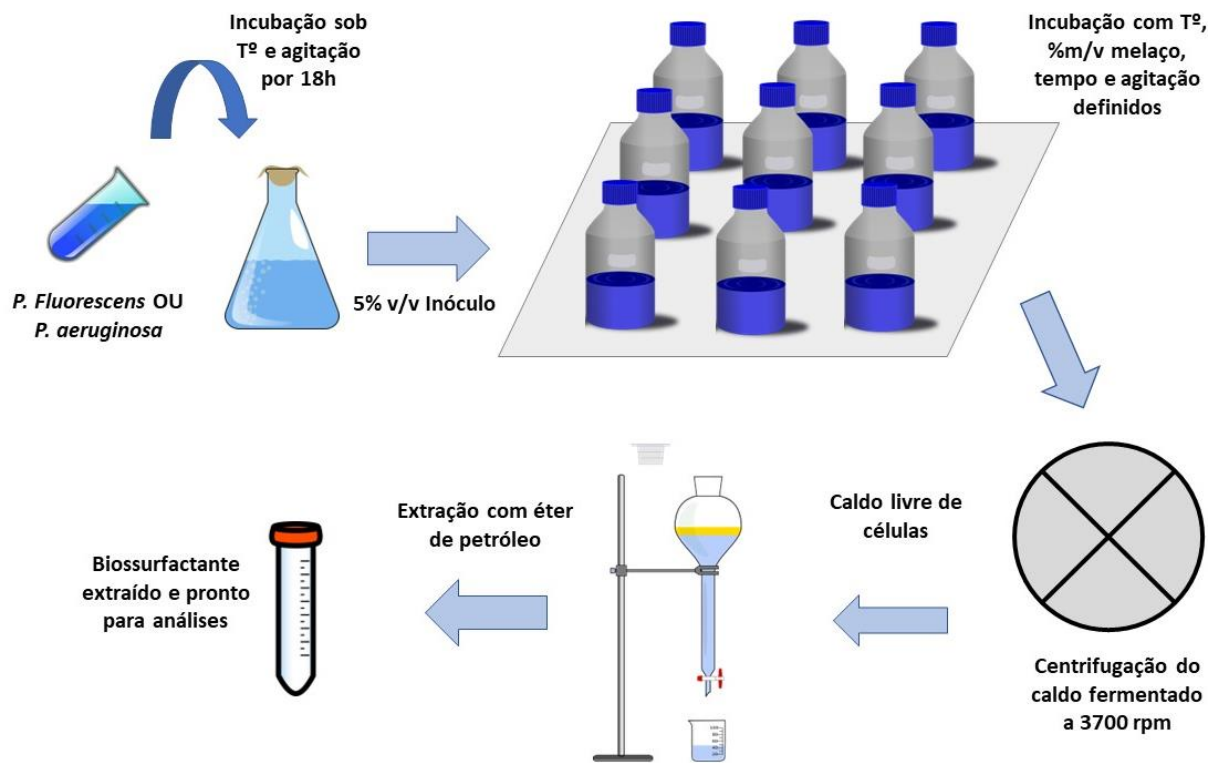
4.2.4 Meio para produção de biossurfactantes

O meio de cultura utilizado para a produção do biossurfactante foi composto de melaço diluído em diferentes concentrações (3%, 4%, 5% e 7% m/v) em meio mineral, conforme metodologia proposta por Oliveira et al. (2013). O melaço foi gentilmente cedido pela Ipiranga Agroindustrial- Mococa/SP. O meio mineral consistiu em uma solução composta por 3 g/L de NaNO₃, 0,4 g/L de MgSO₄.7H₂O, 1 g/L de KCl, 1 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de KH₂PO₄ e 1 mL/L de solução estoque salina (0,01 g/100 mL EDTA, 0,3 g/100 mL MnSO₄. H₂O, 0,01 g/100 mL FeSO₄.7H₂O, 0,01 g/100 mL CaCl₂, 0,01 g/100 mL CoCl₂.6H₂O e 0,01 g/100 mL ZnSO₄.7H₂O). O pH foi ajustado para 6,8 utilizando-se HCl (2M) ou NaOH (1 M).

4.2.5 Produção com *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*

As fermentações para produção dos biossurfactantes foram realizadas em frascos Duran® de 500 mL contendo 190 mL de meio de cultura previamente esterilizado a 121°C por 30 minutos. Os frascos foram inoculados com 10 mL de inóculo, e foram mantidos em incubadora shaker com agitação de 180 rpm a 37°C para *P. aeruginosa* e 30°C para *P. fluorescens*. Diferentes concentrações de melaço e tempos de fermentação foram avaliados, e estão apresentados na Tabela 2. Tais valores foram selecionados de acordo com os dados da literatura (Joshi et al., 2008; Oliveira et al., 2013; Da Rosa et al., 2017; Bezerra et al., 2019; Jimenez et al., 2020) e testes preliminares realizados em laboratório (curvas de crescimento de cada uma das cepas e análise de ramnose). Após o cultivo, o caldo fermentado foi centrifugado por 15 minutos a 3700 rpm para retirada das células, conforme Oliveira et al., (2013) (Figura 6). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e em ordem aleatória.

Figura 6- Esquema experimental dos testes para produção de biossurfactantes.



Fonte: Do autor, 2023.

Para a cepa com melhor desempenho na produção de ramnnolipídeos, a produção do biossurfactante foi otimizada por meio de Design experimental. Planejamento fatorial completo de três níveis (2³) foi utilizado para avaliar a eficácia da concentração de melão e tempo de fermentação (variáveis independentes) na produção de biossurfactantes (variável de resposta). A análise estatística foi realizada por meio do software Statistica® 10.0 (Statsoft).

Tabela 2- Concentrações de melão e tempos de fermentação avaliados na produção de biossurfactantes por *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*.

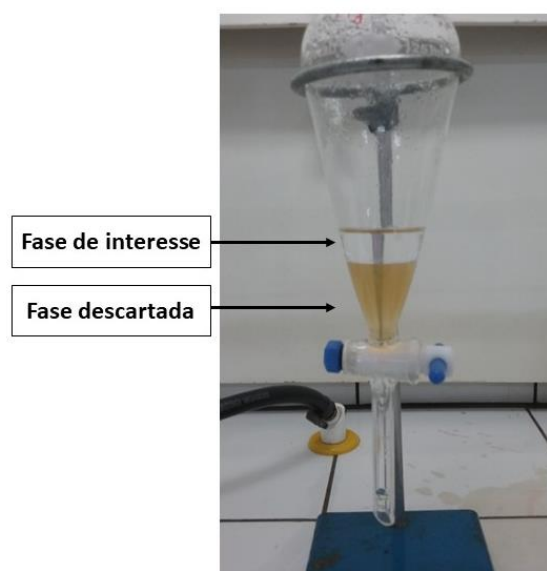
Concentração de melão (% m/v)				Tempo de fermentação (h)		
<i>P. fluorescens</i>	3	4	5	24	30	48
<i>P. aeruginosa</i>	3	5	7	72	96	120

Fonte- Do autor, 2023.

4.2.6 Extração do biossurfactante

O caldo livre de células foi acidificado a pH 2,0 (HCl 2 M) e mantido na geladeira por aproximadamente 20h (*over-night*). Após esse período, foi centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos e extraído com éter de petróleo (1:1 v/v) para recuperação do biossurfactante. O procedimento de extração foi repetido duas vezes (Figura 7). A fase hidrofílica foi descartada e a fase orgânica, que continha o biossurfactante, foi colocada em uma placa de aquecimento a 40°C até que todo o solvente orgânico fosse evaporado. Em seguida, o biossurfactante recuperado foi ressuspenso em água destilada (Oliveira et al., 2013).

Figura 7- Procedimento para extração do biossurfactante obtido na fermentação com *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em meio a base de melaço.



Fonte: Do autor, 2023.

4.2.7 Confirmação da produção de ramnolipídeo

Com o objetivo de confirmar a presença do mono e di-ramnolipídeo mais comuns produzidos pelo gênero *Pseudomonas* nas amostras de biossurfactates, a técnica de Cromatografia em Camada Delgada foi utilizando primeiramente, para posterior quantificação destes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica-gel, utilizando-se como fase móvel uma mistura de clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2); 12 µl dos

extratos obtidos a partir do caldo livre de células, além dos padrões de ramnolipídeos (Rha-C10-C10 e RhaRha-C10-C10), foram aplicados. O agente revelador era composto por anisaldeído, ácido acético acrescido e ácido sulfúrico (2:100:2).

Para análise por CLAE, as amostras de extrato contendo os ramnolipídios (extração descrita no tópico 4.2.6) foi derivatizada de acordo com Schenk et al. (1995) para serem analisadas através de um detector UV. Para a derivatização, 90 µL da amostra extraída foram evaporados e ressuspensos em acetonitrila. A amostra foi misturada com 40 µL da Solução 1 (brometo de 4-bromofenacil 40 mM em acetonitrila), 40 µL da Solução 2 (triethylamina 20 mM em acetonitrila) e 270 µL de acetonitrila. A derivatização foi realizada por 1,5 h a 60°C e 1400 rpm em um termomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG). A análise foi realizada em equipamento de CLAE (Shimadzu) acoplado a um detector de UV, conforme descrito por Müller et al. (2010). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Nucleodur 100-5 C18 ec, Macherey Nagel – 150 mm X 0,46 mm, sílica gel 5 µm) a 30°C.

As fases móveis foram 5% e 95% de metanol para as bombas A e B, respectivamente, diluídas em água ultrapura; 10 µL das amostras derivadas foram injetadas. Para a separação dos mono e di-ramnolipídeos foi estabelecido um gradiente de 80 a 100% da Solução B, conforme o seguinte protocolo: de T=0 a T=17 min → aumento da solução B de 80 a 100 %, preservando a 100% até 25 min. Em seguida, decréscimo para 80% em 5 min, totalizando 30 min para que houvesse equilíbrio. A vazão utilizada foi de 0,4 mL/min, e os ramnolipídeos foram monitorados a 254 nm. Os tempos de retenção foram 22,8±0,1 min para RhaRha-C10-C10 e 23,3±0,1 min para Rha-C10-C10.

4.3 Tensão superficial e CMC

A tensão superficial foi determinada pelo método “*drop-weight*” descrito por Berhring (2004). O caldo livre de células foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente (25°C), e a tensão superficial foi medida. A Concentração Micelar Crítica (CMC) foi determinada pela medição da tensão superficial do sobrenadante livre de células, diluindo-o sucessivamente (volumes iguais de água) até que o valor da tensão se aproximasse do valor da tensão da água. O valor da CMC foi dado pelo ponto central da curva de inflexão no gráfico “Tensão superficial X Porcentagem do sobrenadante contendo o biossurfactante” (Bueno; Silva; Garcia Cruz, 2010).

4.4 Concentração de biomassa, ramnose e açúcares

A biomassa foi quantificada pela densidade óptica do caldo de fermentação a 600 nm em um espectrofotômetro Nanocolor Macherey-Nagel e convertida em massa/volume utilizando-se uma curva padrão, de acordo com Kim et al. 2012.

A concentração de ramnose foi determinada pelo método tioglicólico descrito por Rahman et al., 2002. As amostras de biossurfactantes extraídas foram submetidas à análise em duplicata, considerando a média entre elas, e o valor obtido foi multiplicado por 3,4, que relaciona os ramnolipídeos em termos de ramnose, segundo Raza et al. (2007).

Os açúcares foram medidos por CLAE Shimadzu acoplado a um detector D-10A. Uma coluna RCM-Monosaccharide Ca^{2+} (8% de resina reticulada forma iônica de cálcio/estireno-divinilbenzeno sulfonado; $300 \times 7,8$ mm; Phenomenex, EUA) foi utilizada para separação de sacarose, glicerol e frutose. Padrões externos destes açúcares foram preparados para construção de curva de calibração (1-10 g/L). Água ultrapura foi usada como fase móvel, a temperatura do forno da coluna foi de 65°C e 20 μl de cada amostra foram injetados. Os tempos de retenção para sacarose, glicose e frutose foram de 9,53 min, 11,44 min e 14,55 min, respectivamente. A concentração total de açúcares foi calculada somando-se a concentração de glicose + frutose + sacarose.

4.5 Cálculo de parâmetros cinéticos da fermentação

Os parâmetros de cultivo de rendimento foram calculados a partir dos dados de produção de ramnolipídeos obtidos nos experimentos. As taxas volumétricas de produção de biomassa (Q_X ; $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e biossurfactante (Q_P ; $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) foram determinadas pelas equações 1 e 2, respectivamente:

$$Q_X = \frac{X - X_0}{t} \quad (1)$$

$$Q_P = \frac{P - P_0}{t} \quad (2)$$

onde X_0 (gL^{-1}) e X (gL^{-1}) são os valores inicial e máximo de concentração celular (biomassa), respectivamente; t é o tempo necessário para atingir X ; P_0 (gL^{-1}) and P (gL^{-1})

são as concentrações inicial e máxima do biossurfactante, respectivamente; e t (h) é o tempo necessário para atingir P .

Os rendimentos em biomassa ($Y_{X/S}$; $g g^{-1}$) e biossurfactante ($Y_{P/X}$; $Y_{P/S}$; $g g^{-1}$) foram determinados pelas equações 3, 4 e 5, respectivamente:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (5)$$

onde S_0 ($g L^{-1}$) and S ($g L^{-1}$) são os valores inicial e máximo de concentração de substrato, respectivamente;

4.6 Avaliação da estabilidade do biossurfactante frente à temperatura, pH e salinidade

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada utilizando-se o caldo livre de células obtido na condição otimizada do planejamento fatorial. O método foi baseado em Barros (2008). A avaliação foi feita medindo-se a tensão superficial do biossurfactante quando exposto a diferentes condições de pH (2, 4, 6, 8 e 12 obtidos adicionando-se HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M), concentração salina (NaCl 2,5%, 5,0%, 10,0% e 20,0% m/v nas proporções de 1:1 e 1:2 NaCl/caldo livre de células) e temperaturas (100°C por 20, 40, 60, 100 e 140 min e 121°C por 40 e 60 min).

4.7 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (%) foi determinado pelo método de Cooper e Goldenberg (1987). Amostras de 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (óleo de soja, óleo de motor queimado, tolueno e óleo mineral) foram adicionadas a tubos de ensaio com 4 mL do caldo livre de células e submetidas a agitação por 2 minutos utilizando-se um agitador vórtex. Após 24h e 72h em local protegido da luz e em temperatura ambiente, as amostras foram lidas e os resultados expressos em porcentagem, calculados de acordo com a equação 6.

$$IE (\%) = \frac{AE}{AT} \times 100 \quad (6)$$

em que,

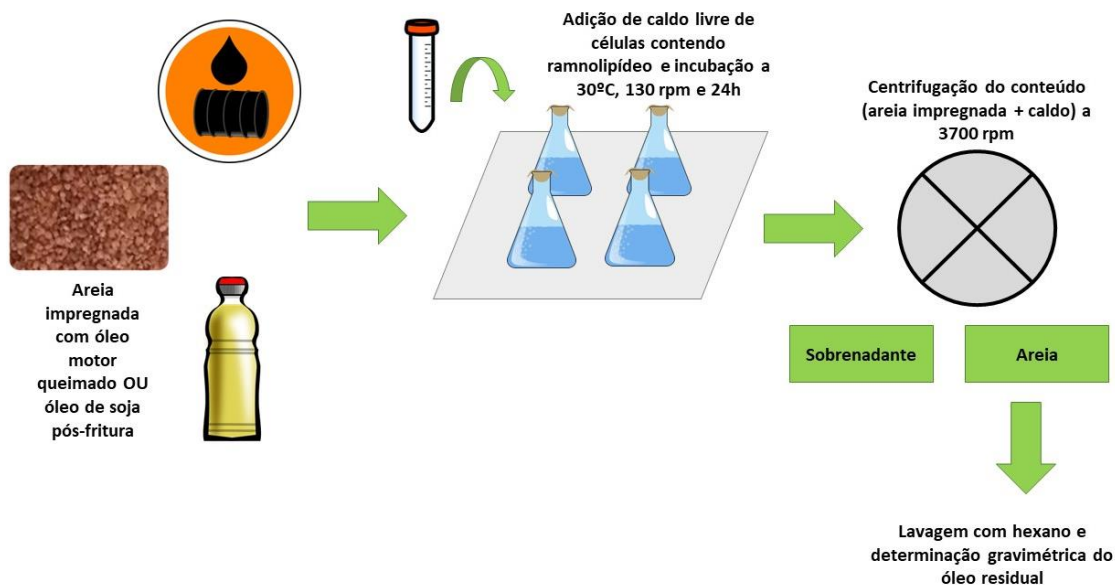
AE = altura da emulsão (cm)

AT = altura total (cm)

4.8 Remoção de óleo derramado em areia

A ação dos ramnolipídeos na remoção de óleos derramados na areia foi avaliada de acordo com Luna et al., 2011. O teste foi realizado com óleo de soja residual (óleo pós-fritura) e óleo motor queimado residual, gentilmente cedidos por um restaurante e uma oficina mecânica, respectivamente. Areia de rio (10 g) foi impregnada com 1,0 mL de óleo (óleo de soja pós-fritura ou óleo motor), a qual foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL, e 30 mL de caldo livre de células contendo biossurfactante foram adicionados. O caldo livre de células utilizado no teste correspondeu ao caldo otimizado para ramnolipídeos. A areia foi mantida em contato com a solução de biossurfactante por 24 h sob agitação a 130 rpm e temperatura de 30°C em incubadora shaker, e posteriormente separada por centrifugação a 3500 rpm por 10 min. A quantidade de óleo residual na areia após a ação do biossurfactante foi determinada gravimetricamente como a quantidade de material extraído da areia por hexano.

Figura 8- Esquema para teste de recuperação de óleo derramado em areia sob ação biossurfactante.



Fonte: Do autor, 2023.

4.9 Dessorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo

4.9.1 Caracterização do latossolo

O solo utilizado nos testes de sorção de herbicida foi o latossolo tropical vermelho-amarelo, coletado em uma propriedade rural no município de São José do Rio Pardo-SP. A amostragem foi realizada aleatoriamente. A escolha do latossolo vermelho-amarelo deu-se pelo fato de ser um dos solos brasileiros mais abundantes e representativo da região sudeste, maior produtora de cana-de-açúcar e grande produtora de milho.

Análise da caracterização química e física do solo foram realizadas. Matéria orgânica (MO), pH, fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), acidez livre (H^+) e alumínio (Al), além de textura e CTC (capacidade de troca catiônica) foram medidos, tudo conforme Andrade et al. (2001). Antes de ser utilizado, o solo foi esterilizado em autoclave por 30 minutos por 3 vezes para eliminar os possíveis microrganismos presentes e seco em estufa por 24 horas.

4.9.2 Contaminação artificial do latossolo

A sorção de dois pesticidas, 2,4-D e atrazina, foram avaliadas neste trabalho. Latossolo vermelho-amarelo foi contaminado artificialmente com soluções padrão Sigma de 2,4-D 50 mg/L e atrazina 50 mg/L, com base na metodologia de Rocha et al., (2013). Para isso, foram utilizados frascos Duran® de 500 ml contendo 50 g de solo e 250 ml de solução de herbicida (2,4-D ou atrazina), os quais foram incubados em agitador a 130 rpm e 30°C por 24 horas. As soluções de agrotóxicos foram preparadas em CaCl 0,01 M. Decorrido o tempo, o sistema foi filtrado em filtro de papel xarope e o solo colocado em estufa para secagem, enquanto o sobrenadante foi utilizado para quantificar a adsorção do 2,4-D e da atrazina. A porcentagem foi calculada pela diferença na concentração do herbicida na solução contaminante e no sobrenadante do teste.

O coeficiente linear de adsorção (K_d) foi obtido através da equação 7:

$$K_d = \frac{c_s}{c_e} \quad (7)$$

em que,

K_d = coeficiente de sorção linear (mL/g)

C_s = concentração de herbicida no solo (ug/mL)

C_e = concentração do herbicida na solução de equilíbrio (ug/mL).

O coeficiente de sorção linear normalizado para o teor de carbono orgânico do solo (K_{oc}) foi calculado pela equação 8 (Vieira et al., 1999):

$$K_{oc} = \left(\frac{K_d}{CO} \right) \times 100 \quad (8)$$

em que,

K_{oc} = coeficiente de sorção linear normalizado para carbono orgânico (mL/g);

CO = carbono orgânico do solo (g/kg) = $MOS/1,72$

MOS = matéria orgânica do solo (g/dm³)

4.9.3 Dessorção dos herbicidas

A avaliação da atividade ramnolipídica na recuperação de 2,4-D e atrazina do solo contaminado foi realizada em “frascos de antibiótico” de 30 mL contendo 2 g de solo seco artificialmente contaminado com os herbicidas e 6 mL de solução ramnolipídica. Diferentes concentrações de ramnolipídeos (0,5 CMC, 1 CMC e 5 CMC) e pH (3, 7 e 9) foram avaliados na dessorção dos herbicidas do solo. Os valores de pH das soluções biossurfactantes foram ajustados com HCl 0,1M ou NaOH 0,1M. Além disso, foi utilizada água destilada como controle, que também teve seu pH ajustado para as 3 condições avaliadas. Os frascos foram incubados em agitador a 30°C e 130 rpm por 24 h (Pierangeli et al., 2005).

Figura 9- Esquema para teste de avaliação da dessorção de herbicidas em solo sob ação biossurfactante.



O teste foi realizado em triplicata, e os dados foram avaliados estatisticamente por meio da Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey utilizando-se o programa Origin 2021.

A capacidade de dessorção no equilíbrio (q_e , mg/g) foi determinada pela equação 9, onde C_e é a concentração do herbicida no equilíbrio (mg/L).

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} \times V \quad (9)$$

As isotermas de dessorção foram analisadas utilizando-se os modelos de Langmuir (Langmuir, 1918), Freundlich (Freundlich, 1906) e Gunary (Gunary, 1970). O modelo de isoterma de Langmuir é representado pela equação 10, onde $q_{m\text{áx}}$ (mg/g) é a capacidade máxima de dessorção correspondente à sorção em monocamada na superfície e k_L (L/g) é a constante de Langmuir, que indica a afinidade do herbicida para o solo.

$$q_e = \frac{q_{m\text{áx}} k_L C_e}{1 + k_L C_e} \quad (10)$$

A isoterma de Freundlich é mostrada pela equação 11, onde k_F (mg/g) e n (adimensional) são constantes isotérmicas de Freundlich, indicando a capacidade de dessorção

e intensidade de dessorção, respectivamente, além da favorabilidade do processo de dessorção.

$$q_e = k_F C_e^{1/n} \quad (11)$$

A isoterma de Gunary é representada pela equação 12, onde k_{G1} , k_{G2} e k_{G3} são os coeficientes de sorção de Gunary.

$$q_e = \frac{C_e}{k_{G1} + k_{G2} \cdot C_e + k_{G3} C_e^{0.5}} \quad (12)$$

O ajuste das isotermas e o cálculo dos parâmetros de sorção foram realizados no programa *Origin* 2021 utilizando-se regressão não linear.

4.9.4 Quantificação dos pesticidas em CLAE

Atrazina e 2,4-D foram quantificados em um CLAE Agilent 1220 Infinity LC acoplado com um detector UV-Vis e uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m). Para a separação da atrazina, as fases móveis utilizadas foram ácido fórmico 0,05% e acetonitrila para as bombas A e B, respectivamente. O protocolo gradiente foi aplicado de acordo com 0 min $\rightarrow$ 95% A; 2 min $\rightarrow$ 80% A e 20% B; 4 min $\rightarrow$ 60% A e 40% B; 6 min $\rightarrow$ 20% A e 80% B; 11 min $\rightarrow$ 95% A e 5% B, utilizando-se uma taxa de fluxo de 1 mL/min e injeção de 30 μ L.

Para 2,4-D, foi utilizada solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% na bomba A e solução de ácido fórmico a 0,1% em ACN na bomba B, com volume de injeção de 30 μ L, vazão de 0,8 mL/min, T = 30°C e comprimento de onda de 230 nm. O gradiente foi realizado de acordo com o protocolo t=0 $\rightarrow$ 75% A e 25% B; t=4 para t=12 $\rightarrow$ 40% A e 60% B; t=12 para t=13 40% A e 60% B; t=13 para t=14 $\rightarrow$ 75% A e 25% B.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do substrato

A tabela 3 apresenta a caracterização do melaço utilizado como substrato nas fermentações, e confirma a disponibilidade de açúcares de fácil assimilação microbiana, além da presença de alguns micronutrientes essenciais ao processo fermentativo.

Tabela 3- Caracterização química do melaço utilizado como substrato na produção de biossurfactantes por *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Parâmetro	Concentração	Desvio
Sacarose (g/L)	655,0759	10,3584
Glicose (g/L)	34,55115	0,0037
Frutose (g/L)	34,31825	0,0045
C (%)	48,295	0,155
N (%)	0,29	0,01
Na (mg/g)	0,113	0,012
Ca (mg/g)	0,998	0,110
K (mg/g)	8,42	0,92
Al (mg/g)	0,0278	0,0030
Cu (mg/g)	0,018	0,0032
Fe (mg/g)	0,0414	0,0050
Mn (mg/g)	<0,01	---
Ni (mg/g)	<0,0045	---

Fonte: Do autor, 2023.

Alta concentração de sacarose, glicose e frutose foram obtidas, evidenciando-se a disponibilidade de nutrientes para o crescimento microbiano. Por outro lado, concentrações muito altas de açúcares podem inibir a produção de biossurfactantes por excesso de substrato (Joshi et al., 2008; Jimenez et al., 2020), fato que deixou clara a necessidade de diluição do melaço, de maneira a torná-lo apto para o objetivo em questão. Estudos sugerem que concentrações em torno de 20 a 70 g/L (o equivalente a 2% m/v - 7% m/v) de melaço oferecem boa fonte nutritiva para produção dos biotensioativos sem causar inibição (Joshi et al., 2008; Oliveira et al., 2013).

Tratando-se do Nitrogênio, baixa concentração de N total foi obtida (0,29% m/m), proporcionando razão C/N de 15:1. De acordo com a literatura, razões C/N na faixa de 13 a 20 são ótimas para produção de biossurfactantes pelo gênero *Pseudomonas*. Hrušová et al, (2020) obtiveram a condição otimizada de produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* em

substrato a base de biomassa florestal com razão C/N de 13,5. Ma et al, (2016) avaliaram a produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* em óleo de palma e a razão C/N de 20 foi a que proporcionou o melhor desempenho de produção. Sendo assim, o melaço apresentou-se como uma ótima alternativa para uso em substrato fermentativo, visto que, além de possuir fonte de C e razão C/N ótimas para a produção dos biossurfactantes, também contém outros macro e micronutrientes importantes para o processo, como Na, Ca, K, Fe e Cu.

5.2 Produção de biossurfactantes com *P. fluorescens*

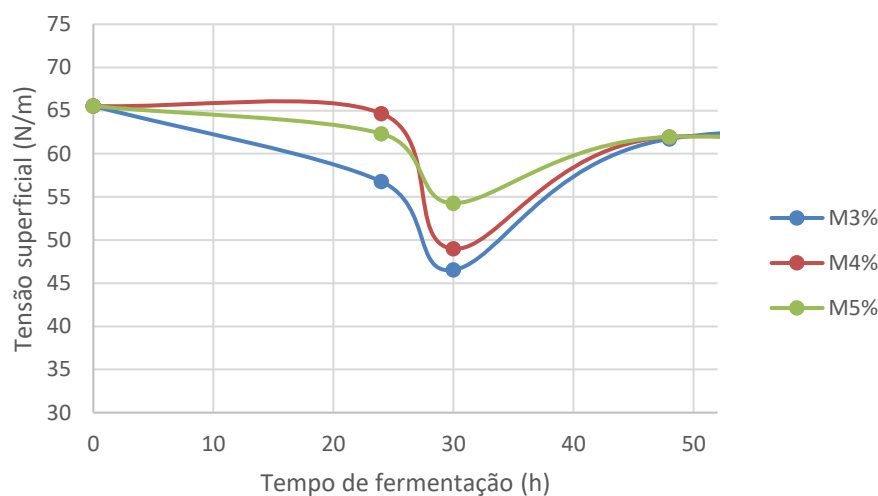
A tabela 4 e figura 10 apresentam os dados obtidos na produção dos biossurfactantes. Nota-se que *P. fluorescens* obteve seu ponto máximo de produção em torno das 30 horas de fermentação, em que se verificou a menor tensão superficial do meio ($46,54 \pm 1,1$ mN/m) e maior concentração de ramnose ($243,95 \pm 38,3$ mg/L) obtidos com substrato a 3% de melaço.

Tabela 4- Concentração de ramnose na produção de biossurfactantes por *P. fluorescens* ATCC 13525 em substrato a base de melaço.

Corridas	Tempo de cultivo (h)	Concentração de melaço (%)	Ramnose (mg/L)
1	48	3	$28,39 \pm 3,7$
2	48	4	$21,29 \pm 5,9$
3	48	5	$17,80 \pm 5,0$
4	30	3	$243,95 \pm 38,3$
5	30	4	$189,60 \pm 26,8$
6	30	5	$120,81 \pm 4,5$
7	24	3	$7,65 \pm 0,2$
8	24	4	$11,79 \pm 5,0$
9	24	5	$9,55 \pm 2,0$

Fonte: Do autor, 2023.

Figura 10- Variação da tensão superficial na produção de biossurfactantes por *P. fluorescens* ATCC 13525 em substrato a base de melaço.



Fonte: Do autor, 2023.

O resultado obtido neste estudo é similar a outros encontrados na literatura para o gênero *Pseudomonas*. Patel e Desai (1997) utilizaram o melaço de cana-de-açúcar na produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* GS3 e obtiveram 0,24 g/L de ramnose em 96 horas de cultivo.

Lima et al., (2010) avaliaram a produção de biossurfactantes por *P. fluorescens* UCP1514 em meio a base de óleo de semente de girassol (pós-fritura), óleo queimado de motor e milhocina. Tensões superficiais de 31,68 e 33,72 mN/m foram obtidos nas condições dos meios contendo, respectivamente (5% de milhocina e 5% de óleo queimado de motor) e (10% milhocina e 5% óleo de girassol pós-fritura).

Lima et al., (2010) obtiveram biossurfactante produzido por *P. fluorescens* em meio contendo caldo de abacaxi e óleo de girassol. O tensoativo foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72,0 mN/m para 27,5 mN/m. Os índices de emulsificação em óleo de girassol chegaram a 61,54%.

Abuseoud et al., (2008) avaliaram a produção de biossurfactante por *P. fluorescens*. A tensão superficial foi reduzida para menos de 32 mN/m e índice de emulsificação E24 de 65% foi obtido em 36 a 48h. O biossurfactante foi investigado e o teste para ramnose foi positivo, assim como o biossurfactante obtido neste estudo, o que sugere que também possa ser um ramnolipídeo.

Com relação ao Índice de emulsificação (IE_{24h}), feito com a mistura do caldo livre de células das 30h de fermentação, obteve-se neste estudo índices de 48% $\pm$ 16% para a condição de melaço 3% m/v, 56% $\pm$ 3,5 para a condição de melaço 4% m/v e 54% $\pm$ 5,3 para a condição de melaço a 5% m/v.

Nota-se que, independentemente da quantidade de biossurfactantes presentes no meio, expressos pela tensão superficial e concentração de ramnose, os IE_{24h} ficaram todos na faixa de 48-56%. Isso sugere que mesmo em baixas concentrações do biossurfactante, uma boa atividade emulsificante pode ser obtida, característica interessante para procedimentos de recuperação de óleo derramado e solubilização de compostos hidrofóbicos.

Entretanto, mesmo com os bons resultados de emulsificação obtidos, os resultados de tensão superficial dos biossurfactantes produzidos pela *P. fluorescens* não foram satisfatórios para a aplicação proposta neste estudo, levando à escolha da cepa de *P. aeruginosa* para produção do biossurfactante utilizado no decorrer do trabalho.

5.3 Produção de biossurfactantes com *P. aeruginosa*

Para avaliar a influência do tempo de cultivo e da concentração de melaço na produção de ramnolipídeos, um planejamento experimental fatorial completo 2³ foi realizado. Conforme mostrado na Tabela 5, os resultados revelaram que *P. aeruginosa* ATCC9027 foi capaz de produzir o biossurfactante durante seu crescimento em meio contendo melaço como única fonte de carbono. A produção de ramnolipídeos variou de 285,83 $\pm$ 7,6 (corrida 7) a 758,04 $\pm$ 37,4 mg/L (corrida 3). Pode-se notar que, ao fixar o tempo de fermentação, o aumento da concentração de melaço aumentou diretamente a produção de ramnolipídeos. Este resultado está de acordo com outros achados na literatura, que mostram a mesma tendência; quanto maior a concentração de glicose, maior o crescimento e produção de ramnolipídeos devido à crescente disponibilidade de carbono para o crescimento e produção de ramnolipídeos pela bactéria (Goswami et al., 2015).

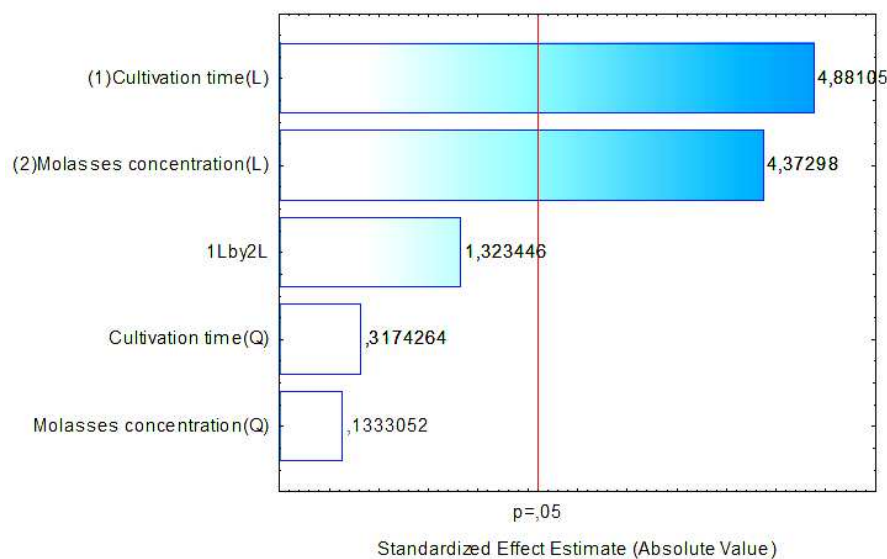
Tabela 5- Produção de ramnolipídeos de acordo com Planejamento Fatorial Completo 3^2 utilizando *P. aeruginosa* ATCC9027.

Corridas	Valores reais (valores codificados)		Produção de ramnolipídeos (Y) (mg L ⁻¹)
	Tempo de cultivo (X ₁) (h)	Concentração de melaço (X ₂) (%)	
1	120 (+1)	3 (-1)	435,33 ± 0,9
2	120 (+1)	5 (0)	559,39 ± 62,9
3	120 (+1)	7 (+1)	758,04 ± 37,4
4	96 (0)	3 (-1)	349,90 ± 15,5
5	96 (0)	5 (0)	461,96 ± 6,0
6	96 (0)	7 (+1)	560,84 ± 59,4
7	72 (-1)	3 (-1)	285,83 ± 7,6
8	72 (-1)	5 (0)	332,64 ± 35,7
9	72 (-1)	7 (+1)	406,37 ± 41,5

Fonte: Do autor, 2023.

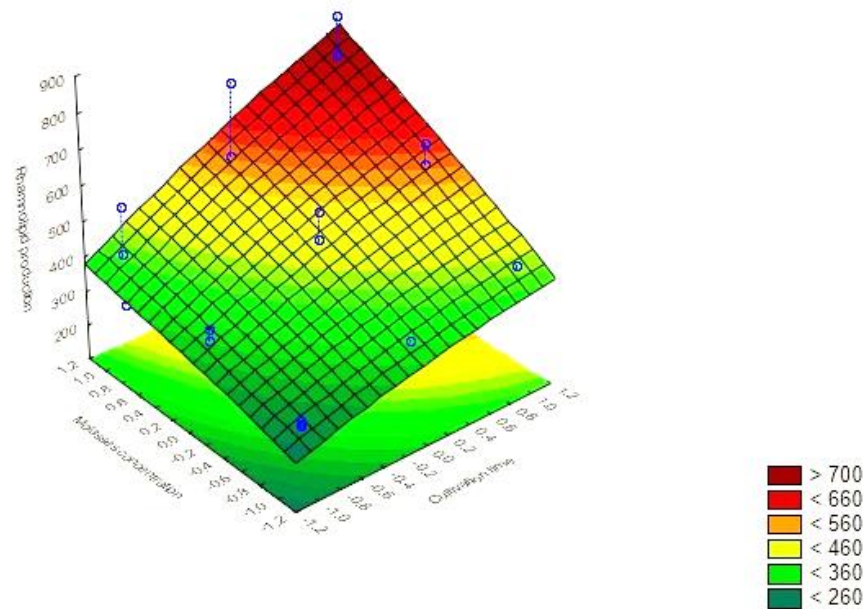
A análise do diagrama de Pareto (Figura 11) indica que, tanto a concentração de melaço, quanto o tempo de fermentação, foram significativos para a produção de ramnolipídios (nível de confiança de 95%), e o gráfico da superfície de resposta (Figura 12) indica que a produção aumentou junto com a concentração de melaço e o tempo. De fato, ao analisar a superfície de resposta gerada na otimização, foi sugerido que mais ramnolipídeos poderiam ser produzidos se a fermentação fosse realizada por mais tempo.

Figura 11- Diagrama de Pareto para o Planejamento Fatorial completo 3^2 utilizando *P. aeruginosa* ATCC9027.



Fonte: Do autor, 2023.

Figura 12- Superfície de resposta para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 segundo Planejamento Fatorial Completo 3².



Fonte: Do autor, 2023.

Os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA) aplicada à produção de ramnolipídeos são apresentados na Tabela 6 e revelam que o modelo não apresentou falta de ajuste. Os dados experimentais podem ser representados pelo modelo polinomial linear usando valores codificados, descritos na Equação 9, com ajuste de 70,88%.

$$Y = 229,54 + 225,40 X_1 + 201,94 X_2 \quad (9)$$

onde Y é a produção de ramnolipídeos (mg/L), X_1 é o tempo de cultivo (h) e X_2 é a concentração de melaço (%).

Tabela 6- ANOVA para produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa*

	SS	df	MS	F	p-valor
Cultivation time (X_1)	229590,1	2	114795,1	11,96274	0,000496
Molasses concentration (X_2)	183675,4	2	91837,7	9,57036	0,001475
Interaction 1 by 2 ($X_1 \cdot X_2$)	16807,6	1	16807,6	1,75151	0,202252
Lack of fit	3899,8	3	1299,9	0,13547	0,937592
Pure error	172729,0	18	9596,1		
Total SS	606701,9	26			

Fonte: Do autor, 2023.

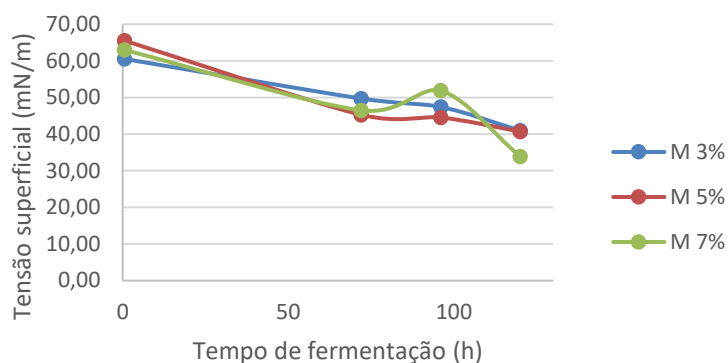
O modelo indicou que o valor ótimo previsto de produção de ramnolipídeos (704,17 mg/L) pode ser obtido com 7% de melaço e 120 h de fermentação, e foi validado por meio da realização de novos testes nas condições otimizadas, que obtiveram 940 mg/L de ramnolipídeos, correspondendo a 133,5% do valor previsto pelo modelo de delineamento experimental, ou seja, o modelo apresentou boa reprodutibilidade.

Com relação à fonte de carbono utilizada como substrato na fermentação, esta parece afetar a quantidade de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*. Câmara et al. (2019) avaliaram a produção de biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* isolada de solo artificialmente contaminado com diesel utilizando glicerol (9,36 v/v) como substrato. Os autores obtiveram 0,877 g/L de ramnolipídeos após 240 h de fermentação, o que reduziu a tensão superficial do meio de 72,02 mN/m para 35,26 mN/m. Valores maiores foram obtidos por Ray et al. (2021), que obtiveram 1,24 g/L e 1,8 g/L de biossurfactante utilizando *Pseudomonas sp.* cultivada em meio mineral suplementado com óleo cru. Kanna (2017), utilizando a mesma cepa do presente estudo (*P. aeruginosa* ATCC9027) em 84 h de teste com meio mineral suplementado com sacarose (20 g/L), obteve 1,2 g/L de biossurfactantes e reduziu a tensão superficial da água para 33 mN/m.

De acordo com relatos da literatura, a produção de ramnolipídeos pela cepa de *P. aeruginosa* a partir de uma fonte de carbono hidrofóbica é geralmente maior do que a produção usando uma fonte de carbono hidrofílica, como por exemplo, o melaço. Uma hipótese é que uma fonte hidrofílica como substrato já esteja disponível para o microrganismo, enquanto uma fonte hidrofóbica requer emulsificação das cadeias lipídicas, exigindo a produção de biossurfactantes pela célula.

Quanto à tensão superficial do meio durante os ensaios, o gráfico (Figura 13) mostra a variação dos valores de acordo com as diferentes concentrações de melaço e tempos avaliados. Para identificar qualquer microrganismo como produtor de biossurfactante, a redução da tensão superficial deve ser superior a 8 mN/m em comparação com a água (Haba et al., 2000). Os ramnolipídeos podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para menos de 30 mN/m. Os resultados de menor tensão superficial apresentados pelos ramnolipídeos produzidos a partir do melaço neste estudo (melaço 7%; 120h) demonstraram a grande atividade superficial exibida por este biossurfactante, que reduziu a tensão superficial de 72 mN/m para 34 mN/m, mesmo em baixas concentrações de ramnolipídeos.

Figura 13- Variação da tensão superficial do meio de melaço ao longo da fermentação com *P. aeruginosa*.



Fonte: Do autor, 2023.

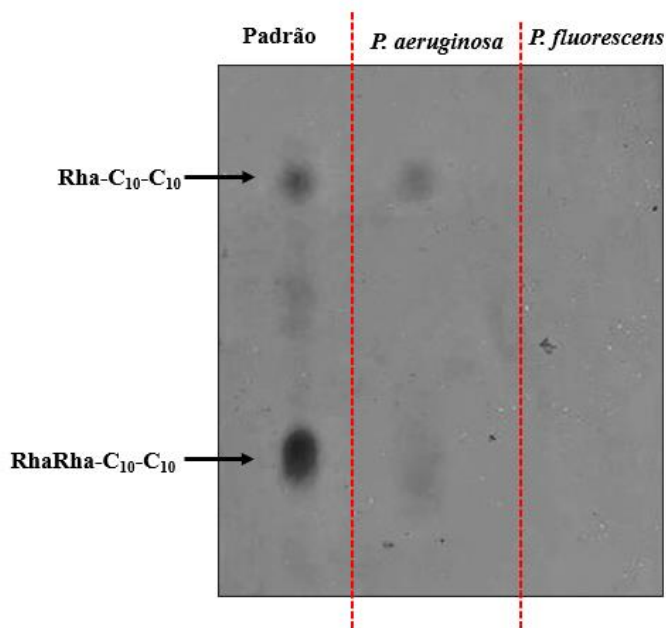
Phulpoto et al. (2021) encontraram valores de tensão superficial semelhantes de $33,05 \pm 0,1$ mN/m para biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* sp. S2 WE utilizando glicerol e uréia como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, para o cultivo.

5.4 Identificação de ramnolipídeos

O poder surfactante e as características físico-químicas dos biossurfactantes dependem de sua composição homóloga, que pode variar de acordo com a fonte de carbono utilizada, tempo de fermentação, cepa e condições do processo (Ji et al., 2016). A análise por CLAE do biossurfactante produzido em condições otimizadas confirmou a presença de ramnolipídeos na produção com *P. aeruginosa*, entretanto na produção com *P. fluorescens* não foi detectada a presença de ramnolipídeo, como mostra a figura 14.

Possivelmente, outra classe de biossurfactante ou metabólito foi produzido pela cepa, o qual foi responsável pela redução da tensão superficial do meio e atividade emulsificante, como a viscosina ou alginatos. A produção de ramnolipídeos está ligada à presença ou não de gene específico para ligação da cadeia lipídica à unidade de ramnose, gene este que pode não estar ativado ou contido nesta cepa (*P. fluorescens* ATCC 13525), justificando a não produção específica do biossurfactante desejado (Germer et al., 2020).

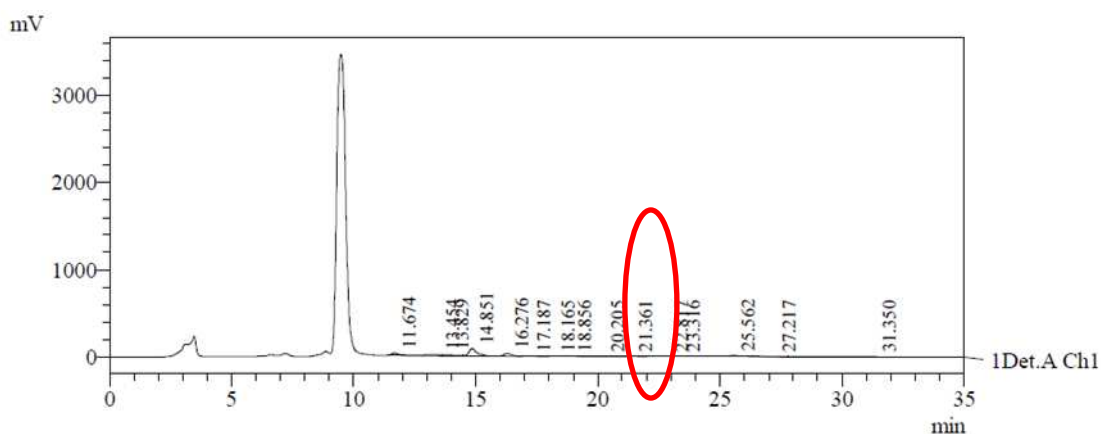
Figura 14- Cromatografia em camada delgada para detecção de mono e di-ramnolipídeos produzidos durante fermentação em meio de melaço com *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*.



Fonte: Do autor, 2023.

No que se refere à produção de biossurfactante por *P. aeruginosa* ATCC 9027, a presença dos mono-ramnolipídeos RL 1 (Rha-C10-C10) foi predominante em relação aos di-ramnolipídeos RL 3 (Rha-Rha-C10-C10), detectando-se as proporções de 62,3% e 37,6%, respectivamente. Em CLAE, os picos para RL 1 e RL 3 foram obtidos em 23,31 e 22,82 min, respectivamente, como exposto na figura 15 e tabela 7. Segundo Abdel-Mawgoud et al. (2010), RL1 e RL3 são as espécies mais abundantes de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*.

Figura 15- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para confirmação da presença de mono e di-ramnolipídeos produzidos durante fermentação em meio de melaço com *P. aeruginosa*.



Fonte: Do autor, 2023.

Tabela 7- Tempos de retenção dos picos de mono e di-ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* em meio de melaço 7% m/v e 120h de fermentação.

		Pico	Tempo retenção (min)	Área (mV*min)
		1	11.674	520045
		2	13.454	666262
		3	13.829	473938
		4	14.851	2018377
		5	16.276	732760
		6	17.187	127592
		7	18.165	76739
		8	18.856	131303
		9	20.205	106777
		10	21.361	204612
RhaRha-C10-C10	→	11	22.817	234435
Rha-C10-C10	→	12	23.316	238115
		13	25.562	1373855
		14	27.217	305123
		15	31.350	712057

Fonte: Do autor, 2023.

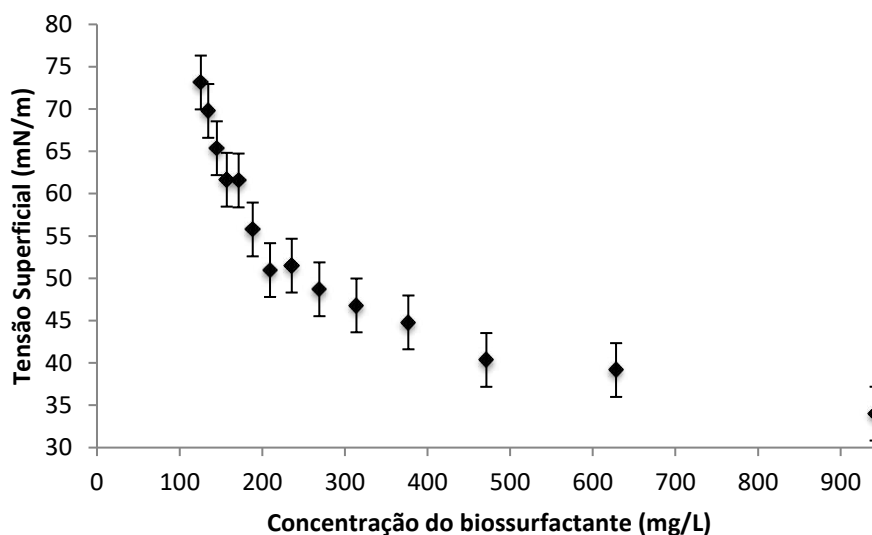
Thio et al., 2022 avaliaram a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas sp.* LM19 utilizando destilado de óleo de palma como substrato, e a análise de CLAE demonstrou que 90,82% da fração mono-ramnolipídica e 89,58% da fração di-ramnolipídica eram compostas por cadeia lipídica C10-C10. Zhao et al., (2019) e Rocha et al. (2020) avaliaram a influência da proporção de mono e di-ramnolipídeos na recuperação de óleo. Os resultados de ambos os autores demonstraram que os mono-ramnolipídeos se destacaram em relação aos di-ramnolipídeos, e que possuem melhor mecanismo de incorporação de óleo em micelas, isto devido às suas características físico-químicas tensoativas mais eficazes. Estas conclusões estão de acordo com o resultado obtido neste trabalho. A mistura ramnolipídica obtida, a qual continha maior proporção de mono-ramnolipídeos, promoveu excelentes taxas de emulsificação e recuperação de óleo na areia.

5.5 Concentração Micelar Crítica (CMC)

A capacidade de um surfactante reduzir a tensão superficial do meio está diretamente ligada à sua concentração micelar crítica (CMC), que corresponde à concentração mínima necessária para a formação de micelas e à tensão máxima de redução na superfície do líquido (RAMNANI et al., 2005). Os ramnolipídeos produzidos pelo gênero *Pseudomonas* possuem uma ampla gama de CMCs, com valores variando de 13 mg/L (KASKATEPE et al., 2015) a 600 mg/L (SILVA et al., 2017). Neste trabalho, em condições otimizadas, os ramnolipídeos

produzidos por *P. aeruginosa* ATCC9027 em meio de melaço apresentaram tensão superficial de $34,01 \pm 8$ mN/m. A figura 16 mostra o perfil da tensão superficial em diferentes concentrações de biossurfactante, atingindo um CMC próximo a 180 mg/L.

Figura 16- Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* em 120h de fermentação e meio melaço 7% m/v



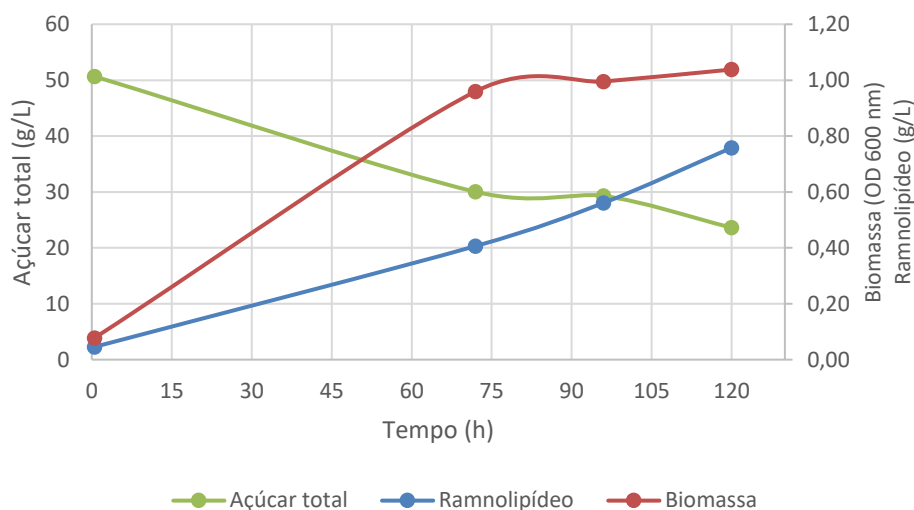
Fonte: Do autor, 2023.

5.6 Parâmetros cinéticos da fermentação

Nas condições ótimas, produziu-se 2,16 g/L de biomassa e a concentração de açúcar após 120 h de fermentação foi de 23,61 g/L, a qual provavelmente seria consumida se a fermentação tivesse sido realizada por mais tempo. Com base nesses resultados, foi possível determinar os rendimentos e a produtividade da produção de ramnolipídeos. A produtividade de biomassa e ramnolipídeos foram $Q_X = 0,016$ g/L.h e $Q_P = 0,006$ g/L.h, respectivamente. Em termos de rendimento, obteve-se $Y_{X/S} = 0,071$ g de biomassa por g de melaço, $Y_{P/X} = 0,369$ g de ramnolipídios por g de biomassa e $Y_{P/S} = 0,026$ g de ramnolipídios por g de melaço.

O gráfico (Figura 17) apresenta a variação da concentração de substrato (açúcares = glicose + frutose + sacarose), biomassa e ramnolipídeos durante a fermentação.

Figura 17- Variação da concentração de açúcares, biomassa e biossurfactante ao longo das 120h de fermentação com *P. aeruginosa* em meio melaço 7% m/v.



Fonte: Do autor, 2023.

A produtividade volumétrica máxima foi observada em 0,016 g/L/h, próxima à obtida por Patel & Desai (1997), que obtiveram 0,0161 g/L.h com *P. aeruginosa* GS3 em melaço de milho. Ao avaliar a conversão de substrato em rendimento de biossurfactante, $Y_{P/S}$ semelhantes foram obtidos na literatura quando comparados com o rendimento obtido neste estudo ($Y_{P/S} = 0,026$ g de ramnolipídeos por g de melaço). Radzuan et al. (2017) avaliaram a cinética da produção de ramnolipídeos usando glicose como fonte de carbono para *P. aeruginosa* PAO1 e observaram um valor de $Y_{P/S}$ de 0,017 g/g com 20 g/L de glicose. Ramírez et al. (2016) avaliaram a produção de ramnolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* e obtiveram $Y_{P/S} = 0,013$ g/g, $Y_{P/S} = 0,018$ g/g e $Y_{P/S} = 0,058$ g/g utilizando-se 20,50 e 100 g/L de substrato à base de resíduo de azeitonas, respectivamente. Chen et al. (2018) encontraram $Y_{P/S} = 0,073$ g/g usando melaço como fonte de carbono para cultivo de *P. aeruginosa*.

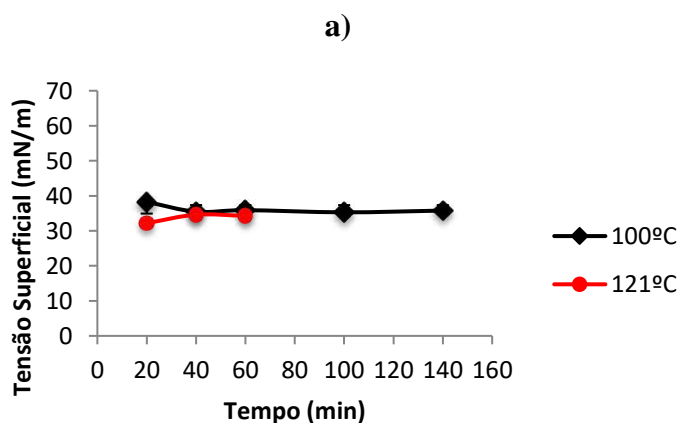
Com relação a $Y_{P/X}$, quando se compara o valor obtido neste estudo ($Y_{P/X} = 0,369$ g de ramnolipídeos por g de biomassa), que utilizou melaço como substrato, com outros na literatura, valores maiores foram obtidos por Kumar et al. (2015) ($Y_{P/X} = 1,02$ g/g), Sana et al. (2017) $Y_{P/X} = 7,5$ g/g e Pacheco et al. (2012) $Y_{P/X} = 4,9$ g/g, que utilizaram substratos hidrofóbicos, serragem, gordura de peixe e glicerol, respectivamente. No entanto, um rendimento menor de $Y_{P/X} = 0,2$ g/g foi obtido por Radzuan, 2017, utilizando glicose como substrato.

5.7 Testes de estabilidade

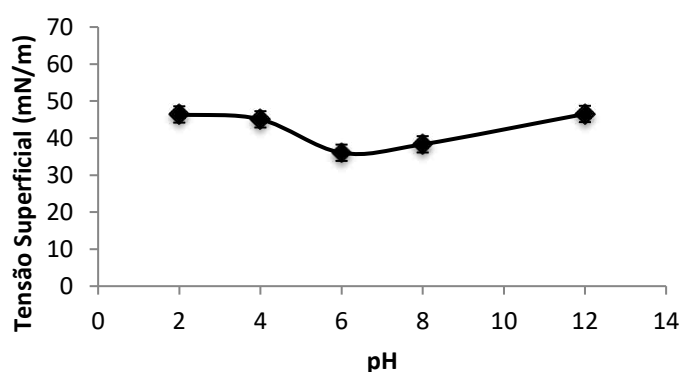
A fim de avaliar a estabilidade da atividade de superfície dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* ATCC9027, estes foram submetidos a testes de estabilidade frente à temperatura, pH e concentração salina. Em geral, os ramnolipídeos apresentaram boa estabilidade de tensão superficial frente às mudanças avaliadas.

A figura 18a mostra a influência da temperatura na tensão superficial dos ramnolipídeos. A 100°C, a tensão superficial diminuiu ao longo do tempo até 40 minutos, de 37,66 para $35,3 \pm 0,15$ mN/m. Após esse tempo, esta permaneceu constante por um período máximo de 140 minutos. Já a 121°C, a tensão superficial aumentou com o tempo (até 40 minutos) e após, permaneceu constante, por até 60 minutos, no mesmo valor, indicando que após os 40 minutos de incubação, a tensão permaneceu constante, independentemente da variação de temperatura. Em relação ao pH, observou-se (Figura 18b) que, em valores extremos de pH (pH 2, 4 e 12), a tensão superficial da solução de ramnolipídeos aumentou e atingiu o valor de 46,4 mN/m. No entanto, em valores de pH próximos à neutralidade (pH 6), o valor da tensão voltou ao inicial (34 mN/m), sugerindo que, em pH extremo os ramnolipídeos apenas precipitam, sem alterar sua estrutura. Isso é uma vantagem, pois, mesmo quando expostos a valores extremos de pH, o biossurfactante mantém sua estrutura química original. Com relação a estabilidade frente à concentração salina, a tensão superficial utilizando duas diferentes razões NaCl/biossurfactante (1:1 e 1:2) também foi avaliada (Figura 18c). Para ambas as relações, o aumento da concentração salina em até 10% m/v aumentou a tensão superficial para 46 mN/m, que permaneceu constante em 20% m/v.

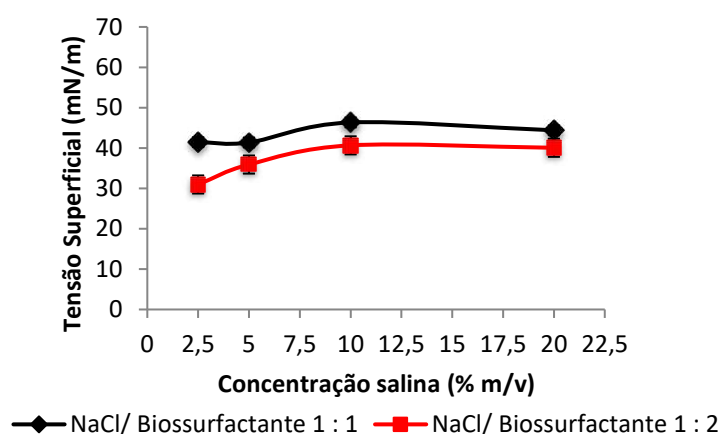
Figura 18- Estabilidade do ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* (melaço 7% m/v e 120h) frente à temperatura (a), pH (b) e força iônica (c).



b)



c)



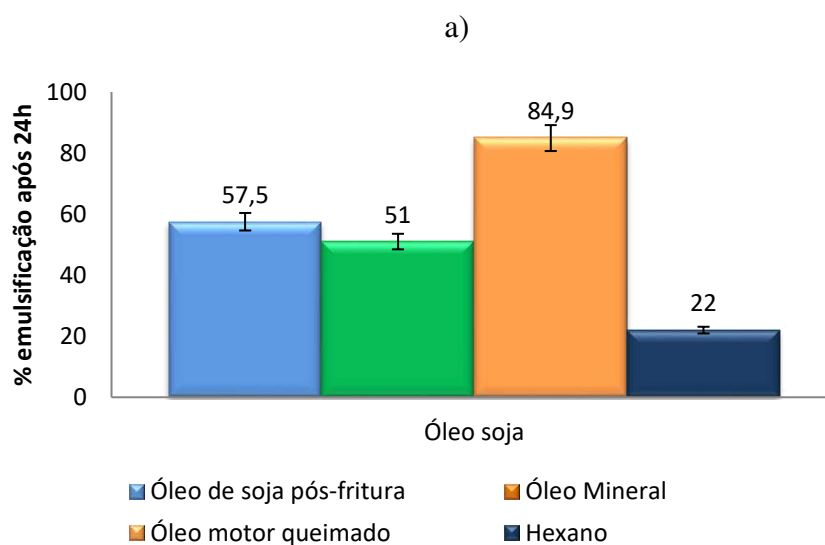
Fonte: Do autor, 2023.

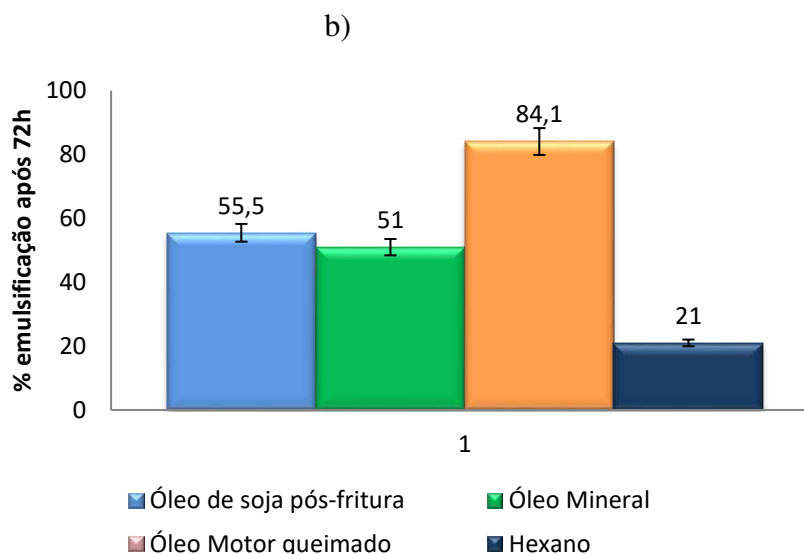
Os resultados obtidos mostraram que, embora a tensão superficial aumentasse para 46 mN/m em valores extremos de pH e concentrações de sal acima de 10%, ela ainda estava muito abaixo da tensão da água de 73 mN/m, o que torna os ramnolipídeos estáveis, termoestáveis e tolerantes à força iônica. Zhao et al. (2020) também avaliaram a influência da temperatura, pH e concentrações de NaCl na tensão superficial de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa*. Os autores obtiveram resultados semelhantes, pois valores extremos de pH e concentrações mais altas de NaCl aumentaram a tensão superficial até uma média de 40 mN/m.

5.8 Índice de emulsificação

Outra forma de analisar a aplicação prática de um tensoativo é a capacidade de produzir emulsões, ou seja, transformar líquidos imiscíveis em emulsões estáveis. Foram avaliadas as atividades emulsificantes dos ramnolipídeos frente a diferentes óleos (óleo de soja, mineral e de motor queimado) e um solvente orgânico (hexano). A figura 19ab mostra os resultados do índice de emulsificação após 24 h (EI_{24}) e 72 h (EI_{72}), respectivamente. O EI_{24} variou de 22 ± 2 a $84,9\% \pm 3$ e o EI_{72} variou de 21 ± 1 a $84,1\% \pm 2$ para todos os óleos e solventes estudados, indicando que o aumento no tempo não influenciou na atividade emulsificante do biossurfactante. Os resultados mostram que os ramnolipídeos produzidos a partir do melaço possuem maior atividade emulsificante em óleos, principalmente em óleo de motor queimado, que apresentou maior índice de emulsificação ($84,9\% \pm 3$), característica que demonstra que este ramnolipídeo tem potencial para ser utilizado na recuperação de óleos em solos contaminados.

Figura 19- Índice de emulsificação do ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* (melaço 7% m/v e 120h) após 24h (a) e 72h (b).





Fonte: Do autor, 2023.

5.9 Remoção de óleo derramado em areia

A emulsificação de compostos oleosos pode ser obtida por meio da atividade surfactante, que diminui a tensão superficial média e aumenta o deslocamento de substâncias oleosas na areia (AMANI et al., 2013). A recuperação avançada de óleo (*Enhanced oil recovery* -EOR) tem sido utilizada como um processo alternativo quando os tratamentos primários e secundários não são mais capazes de recuperar o óleo (VARJANI E UPASANI, 2016a).

Neste estudo, os ramnolipídeos presentes no caldo livre de células apresentaram bom desempenho na remoção do óleo da areia. Mesmo não purificado, o biossurfactante removeu $58,51\% \pm 0,93$ do óleo do motor e $70,09\% \pm 1,3$ do óleo residual de soja, enquanto o controle removeu apenas $19,75\% \pm 6$ e $18,80\% \pm 7,9$, respectivamente.

Silva et al., (2017) obtiveram 76% de remoção de óleo de motor em areia de granulometria semelhante a este trabalho utilizando ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas cepacia* CCT6659, cultivada em meio mineral suplementado com 0,2% de NaNO_3 , 2% de óleo de soja pós-fritura e 3% de milhocina. Sharma et al. (2017) avaliaram a ação do ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* PBS na recuperação de petróleo bruto da areia e obtiveram $56,18 \pm 1,59\%$ de recuperação em um teste de laboratório de coluna do tipo *sand-pack* utilizando o caldo livre de células, o qual continha o biossurfactante. Nesse contexto, o ramnolipídeo produzido por *P. aeruginosa* ATCC 9027 apresenta-se como uma potencial alternativa para aplicação em processos de recuperação avançada de óleo.

5.10 Dessorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo

5.10.1 Caracterização do solo

A tabela 8 apresenta os resultados da caracterização do latossolo vermelho-amarelo utilizado neste trabalho.

Tabela 8- Caracterização físico-química do latossolo vermelho-amarelo utilizado neste estudo.

Caracterização química		Caracterização física (g/kg)	
pH (in CaCl ₂)	4,4	Argila (<0.002 mm)	453
M.O. (g/dm ³)	11	Silte (0.053-0.002 mm)	217
P (mg/dm ³)	2	Areia grossa (2-0.21 mm)	170
K (mmol/dm ³)	0,5	Areia fina (0.21-0.053)	160
Ca (mmol/dm ³)	9	Areia Total	330
Mg (mmol/dm ³)	7		
H+Al (mmol/dm ³)	20		
Al (mmol/dm ³)	2		
Soma de bases (mmol/dm ³)	17		
Capacidade de Troca Catiônica (CTC) (mmol/dm ³)	37		
Saturação de bases (V%)	45		
Saturação de Al (m%)	11		

Fonte: Do autor, 2023.

Observando os resultados da caracterização, nota-se de imediato que o solo em questão é ácido (pH = 4,4) e classificado como argiloso (45,3% argila), segundo a EMBRAPA, 2006. Em relação à Capacidade de Troca Catiônica (CTC), uma baixa valor é observado (< 50 mmolc/dm³). A CTC indica a quantidade de cargas negativas no solo provenientes dos ânions da Matéria Orgânica (MO) e do húmus, entre outros; ou seja, quanto maior a CTC, maior a quantidade de cátions que o solo pode reter (Christoffoleti et al., 2008).

Era de se esperar que para o solo deste estudo fosse encontrado um valor de CTC maior por ser predominantemente argiloso. Entretanto, vale ressaltar que a CTC é influenciada pelo pH, e valores baixos de pH diminuem a CTC, o que pode explicar o baixo valor obtido.

Além disso, há uma quantidade muito baixa de matéria orgânica presente (<15 g/dm³), o que também pode ter contribuído para a baixa CTC, já que um dos principais responsáveis pela carga negativa do solo é a matéria orgânica (Christoffoleti e outros, 2008).

5.10.2 Contaminação artificial do latossolo vermelho- amarelo com 2,4-D e atrazina

A tabela 9 apresenta os resultados de adsorção da atrazina e do 2,4-D no teste de contaminação artificial do solo. O coeficiente de adsorção (K_d) foi calculado pela razão entre a quantidade de herbicida adsorvida no solo e a quantidade de herbicida na solução de equilíbrio. Considerando que a fração de matéria orgânica do solo é o principal fator responsável pela adsorção, também é possível calcular o K_{oc} através da relação entre K_d e % de carbono orgânico presente, indicando a tendência do herbicida de particionar da fase líquida à matéria orgânica do solo (Vieira et al., 1999).

Tabela 9- Resultados da contaminação artificial do latossolo com atrazina e 2,4-D.

	Atrazina	2,4-D
Concentração inicial no sobrenadante (mg/L)	58.63	49.57
Concentração final no sobrenadante (mg/L)	50.26	6.67
pH inicial	6.7	5.05
pH final	3.7	4.44
% Adsorvida	14.27	86.54
K_d (mL /g)	0.83	19,82
K_{oc} (mL/g)	13,04	310,67

Fonte: Do autor, 2023.

Pelas características apresentadas pelo solo em estudo, era esperado que os compostos aniônicos fossem melhor adsorvidos por ele, enquanto os compostos catiônicos teriam uma adsorção mais difícil, visto que a CTC e o pH obtidos foram baixos. E esse comportamento foi observado no teste de contaminação artificial do solo pelos herbicidas atrazina e 2,4-D. Levando em consideração que a contaminação artificial do solo ocorreu em pH próximo ao neutro, sendo a atrazina um herbicida de caráter básico com pK_a de 1,7, sua forma predominante era a molecular, enquanto o 2,4-D, um herbicida de caráter ácido ($pK_a = 2,6$), era encontrado predominantemente na forma de ânions, facilitando a sorção pelo solo.

Fatores como a natureza do grupo funcional da molécula (carboxila, carbonila, hidroxila e amino) podem influenciar significativamente na carga de agrotóxicos, uma das principais propriedades que regem a adsorção de compostos no solo. Compostos contendo o grupo amino podem protonar, dependendo de seu pK_a , e adsorver ao solo como cátions. A carga pode ser fraca, resultante de uma distribuição desigual de elétrons produzindo polaridade na molécula, ou pode ser forte, resultando em dissociação (Grey et al., 1997). O

pH, por sua vez, é outro fator importante e rege a ionização e a dissociação da maioria das moléculas orgânicas. Pesticidas ácidos são doadores de prótons e, em pH alcalino, tornam-se ânions (Sadegh-Zadeh, 2017).

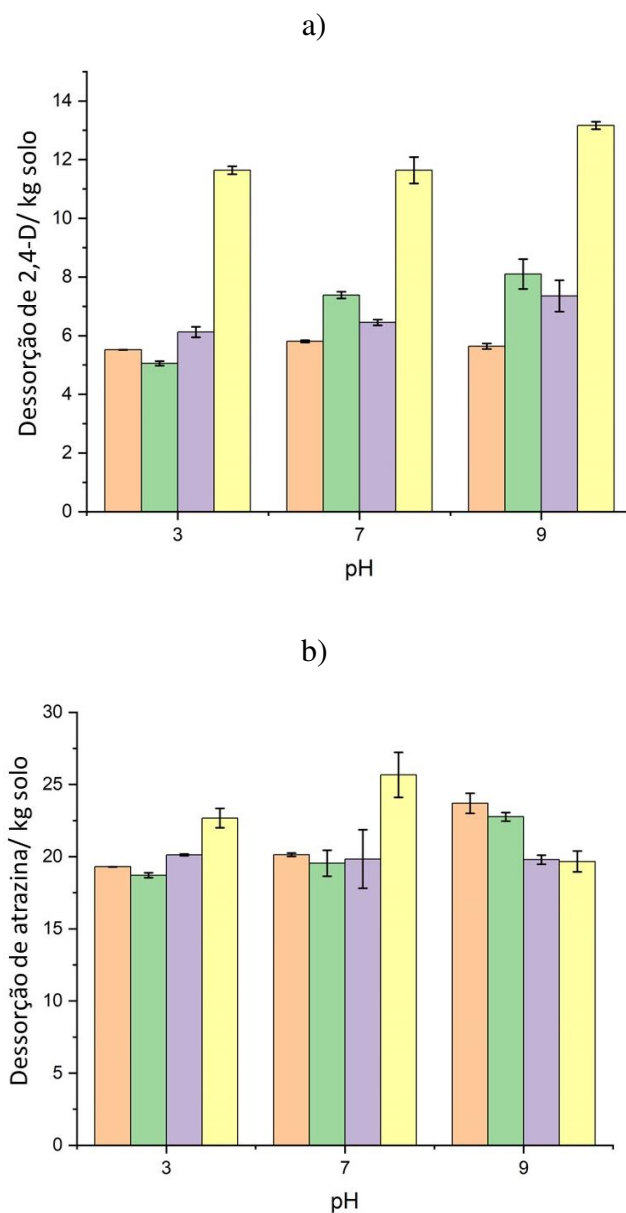
Outro fator que corrobora com a hipótese de baixa afinidade desse solo com o herbicida atrazina e maior afinidade pelo 2,4-D são os valores de Koc obtidos. Valores de Koc abaixo de 15 mL/g indicam baixa afinidade do herbicida pelo solo, como é o caso da atrazina (Koc = 13,04 mL/g), enquanto valores entre 75 e 500 mL/g indicam afinidade moderada. Quanto menor o Koc, mais móvel tende a ser o contaminante no solo e mais facilmente lixivia (Schwarzenbach et al., 1993).

Outros autores obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo. Ben-Hur et al. (2003) estudaram os efeitos da MO na afinidade do solo pela atrazina, e os resultados indicaram que solos com alto teor de MO apresentaram maior afinidade pelo herbicida. Em contraste, para os compostos 2,4-D, naftaleno e cloropirifóis, a absorção foi significativamente reduzida com o aumento do teor de MO (Li et al., 2005). Portanto, fica clara a influência das características físico-químicas do solo e dos herbicidas na sorção deste último.

5.10.3 Dessorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo utilizando biossurfactante

A figura 20 mostra a comparação dos resultados da dessorção em diferentes valores de pH e concentrações de biossurfactante avaliadas (0,5 CMC-90 mg/L ramnolipídeos, 1 CMC-180 mg/L ramnolipídeos, 5 CMC-900 mg/L ramnolipídeos e Controle) para atrazina e 2,4-D.

Figura 20- Comparação entre os tratamentos aplicados na dessorção da (a) 2,4-D e (b) atrazina em latossolo vermelho-amarelo em diferentes pHs (3, 7 e 9) e concentrações de ramnolipídeos (0- rosa; 0,5 CMC- verde; 1 CMC- lilás; 5CMC- amarelo).



Fonte: Do autor, 2023.

Moléculas hidrofóbicas polares, como atrazina e 2,4-D, por exemplo, possuem estruturas moleculares não uniformes e grupos hidrofílicos, levando-as a apresentar comportamentos diferentes e variados dentro de um sistema solo-surfactante. Há uma melhora na dessorção do herbicida 2,4-D quando o tratamento com o biossurfactante é aplicado no solo, principalmente em pH alcalino e na concentração de 900 mg/L. Para o controle, sem aplicação de ramnolipídeo, obteve-se dessorção do herbicida de até 5,64 mg/kg de solo, enquanto para as concentrações de 90 mg/L (0,5 CMC), 180 mg/L (1 CMC) e 900 mg/L (5

CMC) de ramnolipídeos, a dessorção de 2,4-D atingiu 8,10, 7,35 e 13,17 mg/kg_{solo}, respectivamente, todos em pH 9. Em um estudo realizado para avaliar a atividade de ramnolipídeos juntamente com ácidos orgânicos na dessorção de fenantreno, os autores também obtiveram as maiores dessorções em pH alcalino, 7,61 a 12,19 mg/kg_{solo} (An et al., 2011).

Para atrazina, a dessorção foi estimulada em pH ácido e neutro, obtendo 20,13; 19,54; 19,83 e 25,66 mg/kg_{solo} dessorvido nas lavagens com água, 0,5 CMC, 1 CMC e 5 CMC das soluções biossurfactantes, respectivamente, em pH 7. An et al., (2011) estudaram a dessorção de fenantreno no solo sob a ação de ramnolipídeos e ácidos orgânicos. Diferentes concentrações de biossurfactantes foram utilizadas. Os autores obtiveram 8,76 mg/kg_{solo} de dessorção do contaminante no solo usando uma solução de 50 mg/L de ramnolipídeos. Para as soluções de 100 e 200 mg/L de ramnolipídeos, a dessorção de fenantreno foi ainda maior, de 12,05 e 13,12 mg/kg, respectivamente. Wu et al., (2020) obtiveram dessorção crescente de fenantreno até uma concentração de ramnolipídeos de 1 g/L; quando sua concentração aumentou para 3 g/L, a remoção aumentou lentamente, indicando que atingiu um platô com 42% de eficiência. As tabelas 10 e 11 apresentam os dados obtidos no teste de Tukey com 95% de confiança na dessorção dos herbicidas atrazina e 2,4-D sob ação de diferentes concentrações de biossurfactante e diferentes valores de pH, bem como a interação entre eles.

Tabela 10- Análise de Tukey para avaliação da significância da concentração de ramnolipídeos e pH na dessorção da atrazina e 2,4-D em latossolo vermelho-amarelo.

Dessorção de atrazina (%)								
Conc. ramnolipídeo	Significância	Grupos			pH	Significância	Grupos	
Controle	50,3023		b		9	51,3415	a	
0,5 CMC	48,6162		b		7	50,9045	a	b
1 CMC	47,6117		b		3	48,2883		b
5 CMC	54,1822	a						

Dessorção de 2,4-D (%)								
Conc. ramnolipídeo	Significância	Grupos			pH	Significância	Grupos	
Control	2,7032			c	9	4,0054	a	
0,5 CMC	3,1148		b		7	3,6735		b
1 CMC	3,0223		b		3	3,2547		c
5 CMC	5,7378	a						

* Grupos que não possuem a mesma letra são estatisticamente diferentes.

Tabela 11- Análise de Tukey para avaliação da significância entre a Interação Ramnolípídeo X pH na dessorção de atrazina e 2,4-D de latossolo vermelho-amarelo.

Dessorção de atrazina (%)			
Tratamento	pH = 3	pH = 7	pH = 9
Controle	46,13 ± 0,02 c,d	48,13 ± 0,20 b,c,d	56,65 ± 1,18 a
0,5 CMC	44,73 ± 0,29 d	46,72 ± 1,53 b,c,d	54,40 ± 0,50 a,b
1 CMC	48,11 ± 0,09 b,c,d	47,42 ± 3,42 b,c,d	47,31 ± 0,54 b,c,d
5 CMC	54,18 ± 1,13 a,b,c	61,36 ± 2,63 a	47,01 ± 1,21 b,c,d

Dessorção de 2,4-D (%)			
Tratamento	pH = 3	pH = 7	pH = 9
Controle	2,64 ± 0,00 e,f	2,78 ± 0,01 e,f	2,70 ± 0,03 e,f
0,5 CMC	2,30 ± 0,02 f	3,36 ± 0,04 c,d	3,69 ± 0,16 c
1 CMC	2,79 ± 0,06 e,f	2,94 ± 0,03 d,e	3,35 ± 0,17 c, d
5 CMC	5,30 ± 0,2 b	5,62 ± 0,15 b	6,30 ± 0,04 a

* Grupos que não possuem a mesma letra são estatisticamente diferentes.

De acordo com a ANOVA, tanto a concentração de biossurfactantes quanto o pH e a interação entre esses dois fatores mostrou diferença estatisticamente significativa na dessorção de atrazina no solo (p -valor < 0,05). O teste de Tukey (Tabela 3) indicou que as dessorções realizadas em pH alcalino diferiram daquelas realizadas em pH neutro e ácido, sendo os dois últimos estatisticamente iguais. Ao utilizar solução de biossurfactante, as melhores eficiências de dessorção de atrazina ocorreram em pH neutro e ácido, enquanto em pH alcalino, o uso do ramnolípídeo prejudicou o processo de sorção, apresentando eficiências inferiores às obtidas pelo controle nas mesmas condições. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que, quanto mais ácido o meio, maior a concentração de atrazina na forma catiônica; por outro lado, o solo com pH baixo tem sua CTC reduzida, portanto, menor capacidade de retenção desses cátions, o que facilita o processo de dessorção do herbicida (Christoffoleti et al., 2008). Os ramnolípídeos, por sua vez, em meio ácido tendem a protonar seus carboxilatos, comportando-se, neste caso, como um tensoativo não iônico (Abbasi et al., 2013).

Ao comparar a dessorção da atrazina com a solução controle (somente água), para as condições a 0,5 CMC e 1 CMC, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de pH 3 e 7 pelo teste de Tukey (Tabela 4); ou seja, lavando o solo com água ou soluções biossurfactante 0,5 CMC e 1 CMC, o resultado de sorção obtido foi o mesmo nessas condições. É aceito que os monômeros de surfactantes presentes no solo em concentrações abaixo da CMC sejam responsáveis pela maior interação surfactante-solo, podendo até aumentar sua capacidade de sorver poluentes orgânicos. As soluções de surfactantes do solo

só serão capazes de solubilizar os poluentes sorvidos quando a fase micelar atingir o equilíbrio de sorção com o solo (Chin et al., 1996). Mata-sandoval et al. (2002) obtiveram resultados semelhantes em estudo que avaliou o efeito de uma mistura de ramnolipídeos de *P. aeruginosa* UG2 na dessorção de atrazina, que não apresentou boa resposta na dessorção do herbicida no solo em concentrações de ramnolipídeos abaixo da CMC.

Ao utilizar solução de biossurfactante a 5 CMC (900 mg/L ramnolipídio) em pH ácido e neutro, as eficiências de dessorção obtidas foram estatisticamente significativas e superiores quando comparadas ao controle nesses valores de pH (+17,4% e +27,5%, respectivamente); porém, em pH alcalino, foi inferior ao obtido pelo controle (-17,0%). Quanto aos valores de pH (3, 7 e 9), estes diferiram entre si pelo teste de Tukey quando aplicado à lavagem do solo.

Com relação ao 2,4-D, todos os fatores avaliados também foram relevantes no processo de dessorção no latossolo. Tanto a concentração do biossurfactante quanto o pH e a interação entre eles foram significativos (p -valor $< 0,05$), ou seja, interferiram na dessorção do herbicida no solo. Os ramnolipídeos são fortemente dependentes do pH, pois sua morfologia e agregação são governadas pelo pH (Baccile et al, 2012). Este fato foi evidenciado neste estudo, que mostrou eficiências de dessorção significativamente diferentes nos diferentes valores de pH avaliados (Tabela 4). Analisando-se a eficiência de dessorção do tratamento que utilizou ramnolipídeo a 5 CMC (900 mg/L), em pH 9, o valor obtido foi 32% superior ao obtido para pH 3. Em pH ácido, no tratamento do solo com 2,4 -D utilizando solução de biossurfactante 0,5 CMC, houve ainda perda na eficiência de dessorção, obtendo-se uma eficiência 12,8% inferior à obtida com o controle nas mesmas condições.

Embora os ramnolipídeos, em geral, tenham sua atividade tensoativa afetada por valores extremos de pH ($pH < 4$ e $pH > 8$) (Raza et al., 2010), neste estudo, as melhores recuperações de 2,4-D do solo ocorreram em pH alcalino, com ganhos em relação ao controle de 133,5% para 900 mg/L ramnolipídios, 24,12% para 180 mg/L ramnolipídios e 36,8% para 90 mg/L ramnolipídeos. Wu et al., (2020) avaliaram o efeito do pH na dessorção de fenantreno e chumbo (Pb) do solo e obtiveram resultados semelhantes. A dessorção de compostos foi maximizada para 66,1% e 17,4%, respectivamente, quando o pH foi aumentado de 4 para 6.

Tal comportamento pode ser explicado pelo fato de que, em pH alcalino, a CTC do solo aumenta (Christoffoleti et al., 2008), levando a uma maior formação de cargas aniônicas e consequente repulsão do 2,4-D, que é encontrado principalmente na forma de ácido aniônico quando pH do solo $> pka$ 2,4-D ($pka \sim 2,6$), apresentando maiores chances de dessorção e transporte. Por outro lado, o solo carregado negativamente tende a absorver minimamente os

ramnolipídeos, que são encontrados principalmente na forma aniônica nessa faixa de pH (Abbasi et al., 2013). Grupos de ramnolipídeos tornam-se mais carregados negativamente com o aumento do pH, e um tamanho de cabeça maior é formado devido ao aumento da repulsão de carga, o que facilita a mudança na morfologia de lamelas para micelas (Baccile et al., 2012). Tratando-se das concentrações de ramnolipídeos utilizados na dessorção do 2,4-D (0,5 CMC; 1 CMC e 5 CMC), igualmente à atrazina, as melhores dessorções ocorreram com o tratamento de 5 CMC, enquanto o desempenho da dessorção com o uso das soluções de 0,5 CMC e 1 CMC foram estatisticamente iguais, de acordo com o teste de Tukey. Semelhante a este estudo, outros autores obtiveram resultados os quais demonstraram que a quantidade dessorvida de contaminantes do solo (orgânicos persistentes, hidrocarbonetos, etc.) aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração dos ramnolipídeos (An et al., 2011; Chul-Hwan Kim et al., 2019; Wu et al., 2020); no entanto, essa concentração deve ser avaliada com base na finalidade do processo, eficiência e requisitos econômicos.

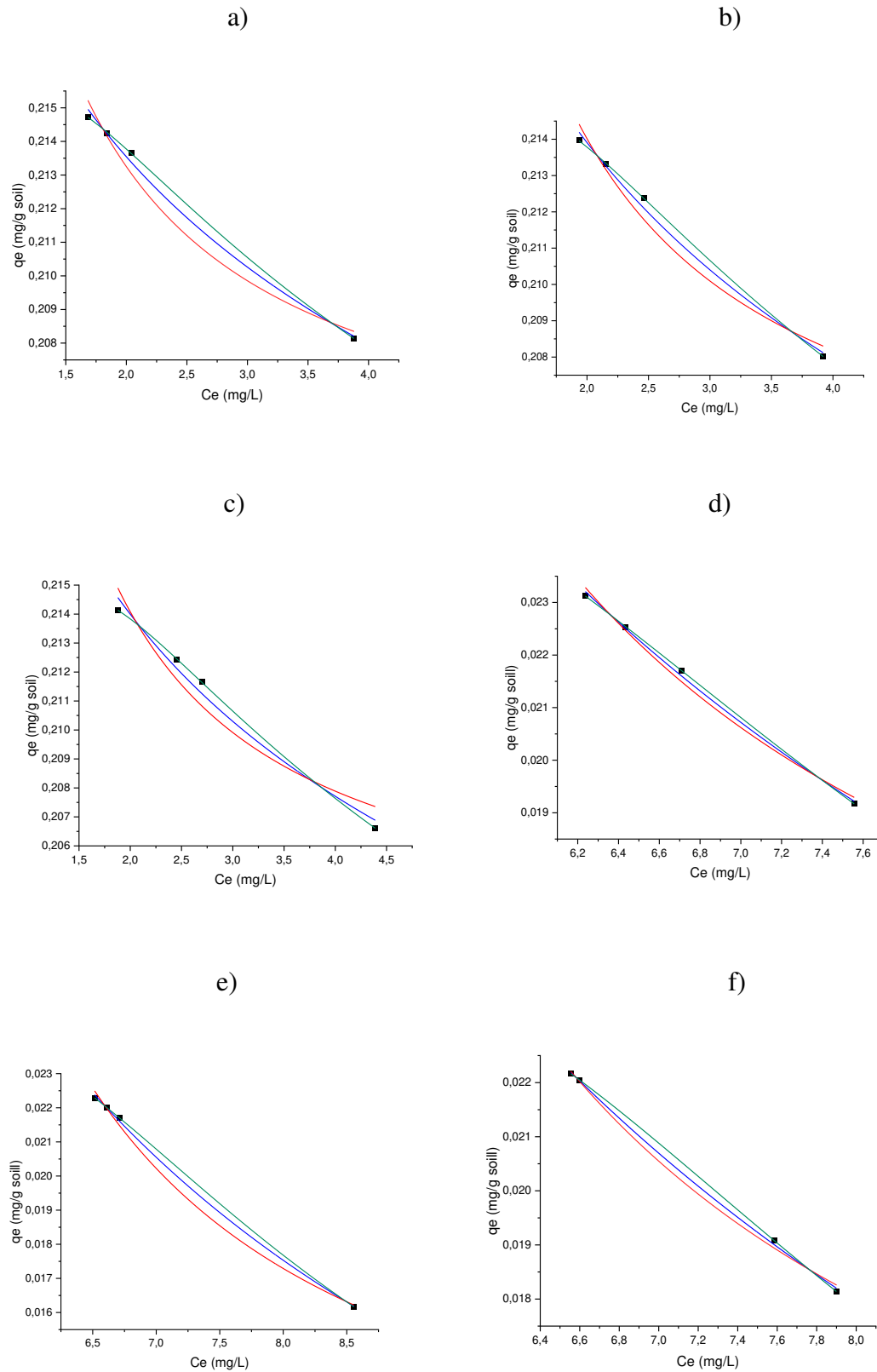
5.10.4 Isotermas de sorção

A tabela 12 e figura 21 apresentam os dados experimentais e dados ajustados aos modelos de Freundlich, Langmuir e Gunary para a dessorção dos herbicidas 2,4-D e atrazina no latossolo vermelho-amarelo.

Tabela 12- Parâmetros para as isotermas de sorção de 2,4-D e atrazina em latossolo vermelho-amarelo segundo modelos de Freundlich, Langmuir e Gunary.

2,4-D				Atrazina			
Freundlich	pH 3	pH 7	pH 9	Freundlich	pH 3	pH 7	pH 9
Kf	0,2193	0,2200	0,2204	Kf	0,1403	0,2082	0,1635
1/n	-0,0382	-0,0407	-0,0430	N	-0,9830	-1,1901	-1,0623
R²	0,9952	0,9932	0,9832	R²	0,9976	0,9993	0,9992
Langmuir				Langmuir			
Kl	-10,790	-9,4268	-8,8961	Kl	-0,2955	-0,2480	-0,2726
q máx	0,2037	0,2026	0,2020	q máx	0,01065	0,00858	0,0097
R²	0,9764	0,9694	0,9265	R²	0,9899	0,9962	0,9971
Gunary				Gunary			
k_{1g}	1,1894	1,4882	1,6696	k_{1g}	2089,9072	2930,9673	3066,7198
k_{2g}	5,5541	5,6631	5,7431	k_{2g}	445,1744	570,7659	583,6954
k_{3g}	-2,0803	-2,4460	-2,6890	k_{3g}	-1840,6050	-2490,6409	-2576,7234
R²	0,9999	0,9999	0,9999	R²	0,9999	0,9999	0,9999

Figura 21- Isotermas de sorção para 2,4-D e atrazina obtidas experimentalmente (■) e segundo modelos de Freundlich (---), Langmuir (---) e Gunary (---). a) 2,4-D em pH 3; b) 2,4-D em pH 7; c) 2,4-D em pH 9; d) atrazina em pH 3; e) atrazina em pH 7; f) atrazina em pH 9.



Fonte: Do autor, 2023.

As isotermas de sorção ajudam a determinar informações relevantes sobre o processo, como a natureza da sorção e a capacidade máxima. Os resultados obtidos para o processo de dessorção do 2,4-D mostram que os melhores ajustes foram obtidos com o modelo de Gunary, que apresentou valores de coeficiente de correlação maiores que 0,9999, e o modelo de Freundlich (R^2 médio de 0,9914), enquanto para o modelo de Lagmuir, o R^2 médio foi de 0,9627, indicando que multicamadas do herbicida são dessorvidas na superfície do solo, conforme proposto nos modelos de Gunary e Freundlich (Hernández-Flores et al., 2018; Martinez-Iglesias et al, 2015), e não monocamadas com sorção homogênea, hipótese sugerida pelo modelo de Langmuir (Martinez-Iglesias et al, 2015). O mesmo comportamento é observado para a dessorção da atrazina, ajustando-se mais aos modelos de Gunary e Freundlich.

Os valores de $1/n$ obtidos pelo modelo de Freundlich ($0 < 1/n < 1$) (Tabela 11) indicam que o processo de dessorção foi favorável para o 2,4-D em todos os valores de pH analisados, enquanto para atrazina, em pH básico, o processo foi desfavorável ($1/n > 1$). Com relação aos valores de Q_{max} obtidos pelo modelo de Langmuir, observa-se que o modelo subestimou a dessorção, pois os valores experimentais de q_e foram maiores.

Capítulo 6

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Os resultados mostraram que a utilização de um substrato renovável à base de melaço como única fonte de carbono foi bem-sucedida para a produção de ramnoliódeos por *P. aeruginosa* ATCC 9027, sendo este substrato de baixo custo e alto valor nutricional;
- Não foi verificada produção de ramnolipídeos por *P. fluorescens* no substrato à base de melaço. Possivelmente outro biossurfactante foi produzido, haja vista a redução da tensão superficial e atividade emulsificante, no entanto, não da classe dos ramnolipídeos;
- A maior produção de biossurfactantes foi atingida com melaço 7% e 120h de fermentação para *P. aeruginosa* ($758,04 \pm 37,4$ mg/L) promovendo redução da tensão superficial para $34,01 \pm 8$ mN/m. Já a produção máxima de biossurfactantes com *P. fluorescens* foi alcançada com melaço 3% em 30h de fermentação, que promoveu a redução da tensão superficial para 46,53 mN/m;
- As análises cromatográficas confirmaram a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em meio à base de melaço, identificando-se os 2 principais homólogos produzidos pela espécie, de acordo com a literatura, mono-ramnolipídeos (62,3%) e di-ramnolipídeos (37,6%);
- O ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* ATCC9027 apresentou boa estabilidade frente a condições adversas de temperatura (tensão superficial do meio permaneceu em 35 mN/m), sais e pH (aumento da tensão superficial do meio de 35 mN/m para 46 mN/m);
- A produtividade de biomassa e ramnolipídeos foi de $Q_X = 0,016$ g/L.h e $Q_P = 0,006$ g/L.h, respectivamente, valores próximos aos encontrados na literatura para produção de biossurfactantes com fontes de carbono hidrofílicas;

- Boa atividade emulsificante do ramnolípídeo foi verificada, especialmente no óleo de soja ($IE_{24h} = 57,5 \pm 2\%$) e no óleo de motor queimado ($IE_{24h} = 84,9 \pm 3\%$). Tais características indicam seu potencial para uso na indústria e na biorremediação;
- Boa recuperação de óleo em areia sob ação do caldo livre de células contendo o ramnolípídeo produzido ($58,51 \% \pm 0,93$ de óleo motor queimado e $70,09 \% \pm 1,31$ de óleo de soja pós-fritura);
- A recuperação de herbicidas do solo está intimamente ligada ao tipo de solo em que o composto foi sorvido, às características do solo e do contaminante, bem como ao seu pH;
- Os ramnolípídeos e herbicidas avaliados neste estudo são fortemente dependentes do pH. Os melhores resultados de dessorção dos herbicidas atrazina e 2,4-D em latossolo vermelho-amarelo foram obtidos com a concentração de 5 CMC (900 mg/L) do biossurfactante em pH neutro e alcalino, respectivamente, que dessorveram 25,67 mg de atrazina /kg_{solo} e 13,17 mg de 2,4-D/kg_{solo}.
- O melhor ajuste dos dados de sorção para ambos os herbicidas foi obtido com o Modelo de Gunary, o qual apresentou coeficiente de ajuste de $R^2 = 0,9999$;
- Os resultados obtidos na dessorção indicam o potencial dos ramnolípídeos para aplicação em Processos de Remediação com Surfactantes (SER- *Surfactant Enhanced Remediation*), podendo ter sua eficiência otimizada pelo ajuste de pH e concentração do biossurfactante.

Capítulo 7

SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em melaço 7% por mais de 120h de fermentação;
- Avaliação da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* em substrato de melaço 7% acrescido de uma fonte de carbono hidrofóbica, como óleo de soja residual, por exemplo, a fim de alcançar um melhor rendimento de substrato em produto;
- Estudo da dessorção de 2,4-D e atrazina em solo sob ação do biossurfactante, avaliando-se a influência da concentração de matéria orgânica no processo;
- Estudo da dessorção de outras classes de herbicidas e outros tipos de solos sob ação de ramnolipídeos;

REFERÊNCIAS

- Abbasi, H., et al. Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 211 – 219, 2012.
- Abbasi, H., Noghabi, K.A., Hamed, M.M., Zahiri, H.S., Moosavi-Movahedi, A.A., Amanlou, M., Teruel, J.A., & Ortiz, A. (2013). Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 101, 256–265.
- Abdel-mawgoud, M. A.; Lépine, F.; Déziel, E (2010). Rhamnolipids Diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl Environ Microbiol** 86:1323-1326.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, 223(1-3), 143-151.
- Abu Elella, M. H., ElHafeez, E. A., Goda, E. S., Lee, S., & Yoon, K. R. (2019). Smart bactericidal filter containing biodegradable polymers for crystal violet dye adsorption. **Cellulose**, 26, 9179-9206.
- Amani H, Muller MM, Sylatk CX, Hausmann R (2013) Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. **Appl Biochem Biotechnol** 170:1080–1093
- Amarante Jr.O.P. de. **Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas**: determinação do 2,4-D e do seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos. São Luís, 2002. p. 12. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Maranhão.
- An, C. J., Huang, G. H., Wei, J., & Yu, H. (2011). Effect of short-chain organic acids on the enhanced desorption of phenanthrene by rhamnolipid biosurfactant in soil–water environment. **Water Research**, 45(17), 5501-5510.
- Anaukwu, C. G., Ogbukagu, C. M., & Ekwealor, I. A. (2020). Optimized biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain CGA1 using agro-industrial waste as sole carbon source. **Adv. Appl. Microbiol.**, 10(10), 543-562. (<https://doi.org/10.4236/aim.2020.1010040>).
- Andrade, J. C., Cantarella, H., & Quaggio, J. A. (2001). Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais.
- Aşçi, Y.; Nurbas, M.; Açikel, Y.S. Sorption of Cd(II) onto kaolin as a soil component and desorption of Cd(II) from kaolin using rhamnolipid biosurfactant. **Journal of Hazardous Materials**, online, v. B139, p. 50–56, 2007.
- Baccile, N., Babonneau, F., Jestin, J., Pehau-Arnaudet, G., and Van Bogaert, I., 2012. Unusual, pH-induced, self-assembly of sophorolipid biosurfactants. **ACS Nano**, 6 (6): 4763-4776.
- Banat, I. M. (1995). Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal–State of the Art. **Acta Biotechnologica**, 15(3), 251-267.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Front in Microbiol**, 5:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>

- Barros, F.F.C.; Quadros, C.P.; Pastore, G. M (2008). Propriedades Emulsificantes E Estabilidade Do Biossurfactante Produzido Por *Bacillus Subtilis* Em Manipueira. **Ciê n e Tecnol de Aliment** 24:979-985.
- Bazsefidpar, S., Mokhtarani, B., Panahi, R., & Hajfarajollah, H. (2019). Overproduction of rhamnolipid by fed-batch cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* in a lab-scale fermenter under tight DO control. *Biodegradation*, 30, 59-69.
- Behring, J. L., Lucas, M., Machado, C., & Barcellos, I. O. (2004). Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. *Química nova*, 27, 492-495.
- Bélanger, J., & Pilling, D. (2019). The state of the world's biodiversity for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Ben-Hur, M., Letey, J., Farmer, W. J., Williams, C. F., & Nelson, S. D. (2003). Soluble and solid organic matter effects on atrazine adsorption in cultivated soils. *Soil science society of America journal*, 67(4), 1140-1146.
- Berselli, S. et al. Development and Assessment of an Innovative Soil- Washing Process Based on the Use of Cholic Acid-Derivatives as Pollutant- Mobilizing Agents. **Biotechnology and Bioengineering**, online, v. 93, p. 761-770, 2006.
- Bharadwaj, A. (2018). Bioremediation of xenobiotics: an eco-friendly cleanup approach. In *Green Chemistry in Environmental Sustainability and Chemical Education: Proceedings of ICGC 2016*, New Delhi (pp. 1-13). Springer Singapore.
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1-3), 229-246.
- Braz, L. M., Salazar-Bryam, A. M., Andrade, G. S. S., & Tambourgi, E. B. (2023). Optimization and characterization of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 using molasses as a substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 39 (2), 51.
- Bueno, Silvia Messias; Silva, Adriana Navarro Da; Garcia-Cruz, Crispin Humberto (2010). Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Quím Nova**, 33:1572-1577. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000700026>.
- BUSINES WIRE. Global Biosurfactants Market 2017-2022: Focus on Glycolipids (Sophorolipids, Rhamnolipids), Lipopeptides, Phospholipids & Polymeric Biosurfactants - Research and Markets.
- Cairns, W. L., Gray, N. C., & Kosaric, N. (Eds.). (2017). **Biosurfactants and Biotechnology**. Routledge.
- Caceres-Jensen L, Rodríguez-Becerra J, Sierra-Rosales P, et al (2019) Electrochemical method to study the environmental behavior of Glyphosate on volcanic soils: Proposal of adsorption-desorption and transport mechanisms. *J Hazard Mater* 379:1–13. doi: 10.1016/j.jhazmat.2019.120746
- Câmara, Jéssica Maria D.A.; Sousa, Magna Angélica S.B.; Barros Neto, Eduardo L (2019). Optimization and Characterization of Biosurfactant Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an Artificially Contaminated Soil. *J of Surfactants and Detergents*, 22:711-719. <http://dx.doi.org/10.1002/jsde.12287>.

Cameotra, S.S.; Makkar, R (1998). Synthesis of Biosurfactant in Extreme Conditions. **Appl Microbiol and Biotechnol**, 50,520-529.

Chen, Chunyan; Sun, Ni; Li, Dongsheng; Long, Sihua; Tang, Xiaoyu; Xiao, Guoqing; Wang, Linyuan. Optimization And Characterization Of Biosurfactant Production From Kitchen Waste Oil Using *Pseudomonas Aeruginosa*. **Environ Sci And Pollut Res**, 25:14934-14943.
<http://Dx.Doi.Org/10.1007/S11356-018-1691-1>.

Chen, W., Qu, Y., Xu, Z., He, F., Chen, Z., Huang, S., and Li, Y., 2017. Heavy metal (Cu, Cd, Pb, Cr) washing from river sediment using biosurfactant rhamnolipid. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (19): 16344-16350.

Chin, Y. P.; Kimble, K. D.; Swank, C. R. J. *Contam. Hydrol.* 1996, 22, 83-94.

Christoffoleti, P. J., López-Ovejero, R. F., Damin, V., Carvalho, S. D., & Nicolai, M. (2009). Comportamento dos herbicidas aplicados ao solo na cultura da cana-de-açúcar. *Piracicaba: CP*, 2, 72.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Série Histórica das Safras. Brasília: 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>.
contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

Cooper D.G.; Goldenberg, B.G (1987). Surface-Active Agents From Two *Bacillus* Species. **Appl And Environ Microbiol**, Washington, 53:224-229.

Costa, W. A., Padilha, C. E. A., Oliveira Júnior, S. D., Silva, F. L. H., Silva, J., A., M. A., Ferrari, M. & S., E. S. (2020). Oil-Lipids, Carotenoids And Fatty Acids Simultaneous Production By *Rhodotorula Mucilaginosa* Cct3892 Using Sugarcane Molasses As Carbon Source. **Braz J Of Food Technol**, 23, E2019064. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.06419>

Goswami, D., Borah, S. N., Lahkar, J., Handique, P. J., & Deka, S. (2015). Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*. **Journal of basic microbiology**, 55(11), 1265-1274.

Da Rosa, C. F. C., Michelon, M., de Medeiros Burkert, J., Kalil, S. J., & Burkert, C. A. V. (2010). Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. **Afr. J. Biotechnol**, 9(53), 9012-9017.

Das, N.; Basak, L.V.G.; Salam, J.S.; Abigail, M. E. A. Application of biofilms on remediation of pollutants – An overview. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, v. 2, n 5, p. 783-790, 2012.

Edwards, D. A.; Adeel, Z.; Luthy, R. G. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 1550-1560
Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* em Manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 979-985, 2008.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. 2018. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. SANTOS, H. G. (Org.). 5. ed., rev. e ampl. – Brasília, DF: EMBRAPA. 531p.

Fardami, A. Y., Kawo, A. H., Yahaya, S., Lawal, I., Abubakar, A. S., & Maiyadi, K. A. (2022). A review on biosurfactant properties, production and producing microorganisms. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 10(1), 5-12.

Freundlich, H.M., 1906. Over the adsorption in solution. *J. Phys. Chem. A* 57, 385–471

Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, 11(12), 1711.

Gouveia, E.R. (2003). Bactérias Produtoras De Biossurfactantes. **Rev Biotechnol Ciênc E Desenvol**, Brasília, 30:39-45.

Gavrilescu M (2005) Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng Life Sci* 5:497–526. doi: 10.1002/elsc.200520098

Germer, A., Tiso, T., Müller, C., Behrens, B., Vosse, C., Scholz, K., ... & Blank, L. M. (2020). Exploiting the natural diversity of RhlA acyltransferases for the synthesis of the rhamnolipid precursor 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, 86(6), e02317-19.

Grey, T. L., Walker, R. H., Hancock, H. G. (1997). Sulfentrazone adsorption and mobility as affected by soil and pH. *Weed science*, 45(5), 733-738.

Gudiña, E. J., Rodrigues, A. I., De Freitas, V., Azevedo, Z., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Valorization Of Agro-Industrial Wastes Toward The Production Of Rhamnolipids. **Bioresour Technol.**, 212:144-150.

Guedes, C.L.B. et al. Tratamento de Solo Contaminado com Petróleo Utilizando Tensoativos e Peróxido de Hidrogênio. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 87-100, 2010.

Gunary, D. 1970. A new adsorption isotherm for Phosphate in soils. *J. Soil Sci.*, 21: 72-77

Guo, Y. P., Hu, Y. Y., Lin, H., & Ou, X. L. (2018). Sorption and desorption of 17 α -ethinylestradiol onto sediments affected by rhamnolipidic biosurfactants. **Journal of hazardous materials**, 344, 707-715.

Haba, E.; Espuny, M.J.; Busquets, M.; Manresa, A. (2000). Screening And Production Of Rhamnolipids By *Pseudomonas Aeruginosa* 47t2 Ncib 40044 From Waste Frying Oils. **J Appl Microbiol** 88: 379–387

Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante, M. R., & Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and bioengineering**, 81(3), 316-322.

Hahladakis, J. N., Latsos, A., & Gidarakos, E. (2016). Performance of electroremediation in real contaminated sediments using a big cell, periodic voltage and innovative surfactants. **Journal of hazardous materials**, 320, 376-385.

Hamza, Rania Ahmed; Iorhemen, Oliver Terna; Tay, Joo Hwa (2016). Occurrence, Impacts And Removal Of Emerging Substances Of Concern From Wastewater. **Environ Technol & Innov.** Alberta, 1:161-175.

Henkel, M. et al. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, online, v. 47, p. 1207–1219, 2012.

Hernández-Flores, Homero; Pariona, Nicolaza; Herrera-Trejo, Martín; Hdz-García, Hector M.; Mtz-Enriquez, Arturo I. Concrete/maghemite nanocomposites as novel adsorbents for arsenic removal. **Journal Of Molecular Structure**, [S.L.], v. 1171, p. 9-16, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.05.078>.

Hrůzová, K., Patel, A., Masák, J., Mat'átková, O., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2020). A novel approach for the production of green biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* using renewable forest biomass. **Science of The Total Environment**, 711, 135099.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (2020). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588#resultado>.

Iturbe, R.; Lopez, J.; Torres, L.G. Microbiological and physicochemical changes occurring in a contaminated soil after surfactant-enhanced soil washing. **Environmental Geosciences**, online, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2008.

Ji, F., Li, L., Ma, S., Wang, J., & Bao, Y. (2016). Production of rhamnolipids with a high specificity by *Pseudomonas aeruginosa* M408 isolated from petroleum-contaminated soil using olive oil as sole carbon source. **Annals of Microbiology**, 66(3), 1145-1156.

Jimenez, A. P., Requiso, P. J., Maloles, J. S., Alcantara, E. P., & Alcantara, V. A. (2020). Biosurfactant Production by *Streptomyces* sp. CGS B11 Using Molasses and Spent Yeast Medium. **Philipp J. Sci**, 149(4), 1227-1241.

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresour. Technol**, 99(1), 195-199. Doi:10.1016/j.biortech.2006.12.010

Kah, M., & Brown, C. D. (2006). Adsorption of ionisable pesticides in soils. Reviews of environmental contamination and toxicology: Continuation of residue reviews, 149-217.

Kanna, R. (2017) Biological Surfactant Production By *Pseudomonas Aeruginosa* Atcc 9027 And Probable Application In Microbial Enhanced Oil Recovery (Meor). **Int J Of Civ Eng And Technol**, Chennai, 8: P. 619-626.

Karlapudi, A.P.; Venkateswarulu, T.C.; Tammineedi, J.; Kanumuri, L.; Ravuru, B.K.; Dirisala, V.R.; Kodali, V. P. (2018) Role Of Biosurfactants In Bioremediation Of Oil Pollution-A Review. **Petrol**, 3: 241-249.

Kaskatepe, B.; Yildiz, S.; Gumustas, M.; Ozkan, S. A. (2015) Biosurfactant Production By *Pseudomonas Aeruginosa* In Kefir And Fish Meal. **Braz J Of Microbiol**, 46: 855-859.
[Http://Dx.Doi.Org/10.1590/S1517-838246320140727](http://Dx.Doi.Org/10.1590/S1517-838246320140727).

Kim, Dong-Ju, S Chung, S Lee, J Choi (2012). Relation Of Microbial Biomass to Counting Units For *Pseudomonas Aeruginosa*. **Afr J Of Microbiol Res**, 6:4620-4622.

Kleinschmitt, A. R. B., Dick, D. P., Selbach, P. A., & Santos, M. D. (2006). Dessorção do herbicida atrazina e atividade microbiana em duas classes de solos do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, 36, 1794-1798.

Kronemberger, F.A. **Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. 2007. 153p. Tese (Programa de Pós-Graduação de Engenharia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2007.

Kumar, A., Trefault, N., & Olaniran, A. O. (2016). Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. **Critical Reviews in Microbiology**, 42(2), 194-208.

Kumar, Arthala Praveen; Janardhan, Avilala; Radha, Seela; Viswanath, Buddolla; Narasimha, Golla.(2014) Statistical Approach To Optimize Production Of Biosurfactant By *Pseudomonas*

Aeruginosa 2297. **3 Biotech**, 5:71-79, Springer Sci And Bus Media Llc.

<http://dx.doi.org/10.1007/S13205-014-0203-3>.

Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource technology*, 254, 174-179.

Lai, C. C., Huang, Y. C., Wei, Y. H., & Chang, J. S. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 167(1-3), 609-614.

Lang, S., & Wagner, F. (2017). Structure and properties of biosurfactants. In *Biosurfactants and biotechnology* (pp. 21-45). Routledge;

Langmuir, I., 1918. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361–1403. <http://dx.doi.org/10.1021/ja02242a004>.

Lewis, S. E., Silburn, D. M., Kookana, R. S., & Shaw, M. (2016). Pesticide behavior, fate, and effects in the tropics: an overview of the current state of knowledge. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(20), 3917-3924.

Li, K., Xing, B., Torello, W. A. (2005). Effect of organic fertilizers derived dissolved organic matter on pesticide sorption and leaching. *Environmental pollution*, 134(2), 187-194

Li, S., Pi, Y., Bao, M., Zhang, C., Zhao, D., Li, Y., ... & Lu, J. (2015). Effect of rhamnolipid biosurfactant on solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 219-225.

Lima, R. A., da Silva Andrade, R. F., Santos, L. Q., & Takaki, G. M. C. (2010). Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. **Exacta**, 8(2), 201-210.

Lima, T. M. S. et al. Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 585-592, 2011.

Lin, Y., Chen, H., Lin, K., Chen, B., & Chiou, C. (2011). Application of magnetic particles modified with amino groups to adsorb copper ions in aqueous solution. *Journal of environmental sciences*, 23(1), 44-50.

Lovaglio, R. B. Produção de Rhamnolipídeos por Mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2011. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

Luna, J.M., Rufino, R.D., Albuquerque, C.D.C., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M., 2011. Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* UCP0995 and application in the removal of hydrophobic contaminant from sand. **Int. J. Mol. Sci.** 12, 2463- 2476. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12042463>

Ma, K. Y., Sun, M. Y., Dong, W., He, C. Q., Chen, F. L., & Ma, Y. L. (2016). Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, 6, 144-151.

Machado, C. S., Fregonesi, B. M., Alves, R. I., Tonani, K. A., Sierra, J., Martinis, B. S., ... & Segura-Muñoz, S. (2017). Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 24, 20160-20172.

- Magnoli, K., Carranza, C. S., Aluffi, M. E., Magnoli, C. E., & Barberis, C. L. (2020). Herbicides based on 2, 4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. **Environmental Science and Pollution Research**, 27, 38501-38512.
- Mäki, M., Renkonen, R., Biosynthesis of 6-deoxyhexose glycans in bacteria. **Glycobiology**, V. 14, n° 3, p. 1R-15R, 2004.
- Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. An update on the use of unconventional substrates for the Biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, online, v. 58, p. 428-434, 2002.
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., and Yu, J., 2015. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, 285: 419-435.
- Martinez-Iglesias, A., Niasar, H. S., Xu, C., & Ray, M. B. (2015). Adsorption of model naphthenic acids in water with granular activated carbon. **Adsorption Science & Technology**, 33(10), 881-894.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (1999). High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **Journal of Chromatography A**, 864(2), 211-220.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2002). Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. **Environmental Science & Technology**, 36(21), 4669-4675.
- Mata-Sandoval, J. C.; Karns, J.; Torrents, A. Effects of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. **Environ Sci Technol**, vol. 34, n. 23, p. 4923-4930, 2000.
- Mendes, K. F., Sousa, R. N. D., Dias, R. D. C., & Reis, M. R. D. (2019). Efeito residual de herbicidas em solos agricultáveis. **Contaminantes orgânicos: da análise à biorremediação**.
- Mironyuk, I., Tatarchuk, T., Naushad, M., Vasylyeva, H., & Mykytyn, I. (2019). Highly efficient adsorption of strontium ions by carbonated mesoporous TiO₂. **Journal of Molecular Liquids**, 285, 742-753.
- MORDOR INTELLIGENCE (Índia). Mercado de biossurfactantes - Crescimento, tendências, impacto do covid-19 e previsões (2022 - 2027). 2022. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/pt/industry-reports/biosurfactants-market>. Acesso em: 10 out. 2022.
- Moya Ramírez, I., Altmajer Vaz, D., Banat, I.M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M., 2016. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresour. Technol.** 205, 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.016>.
- Müller, M. M., Hörmann, B., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010). *Pseudomonas Aeruginosa* Pao1 As A Model For Rhamnolipid Production In Bioreactor Systems. **Appl Microbiol And Biotechnol**, 87(1), 167-174.
- Müller, M. M., Hörmann, B., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model for rhamnolipid production in bioreactor systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 87, 167-174.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., & Gibbs, B. F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering geology**, 60(1-4), 371-380.

Mulligan, C.N.; Wang, S. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. **Engineering Geology**, online, v. 85, p. 75-81, 2006.

Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. On The Use of Biosurfactants for The Removal of Heavy Metals from Oil-Contaminated Soil. **Process Safety Progress**, online, v. 18, n. 1, p. 50-54, 1999 (b).

Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. Removal of heavy metals from contaminated soil and sediments using the biosurfactant surfactin. **Soil and Sediment Contamination**, online, v. 8, p. 231–254, 1999 (a).

Mulligan, C.N.; Young, R.N.; Gibbs, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **J Hazard Mater**, vol. 85, n. 1-2, p. 111-125, 2001.

Neto, M. D. D. C., Souza, M. D. F., Silva, D. V., Faria, A. T., da Silva, A. A., Pereira, G. A. M., & de Freitas, M. A. M. (2017). Leaching of imidazolinones in soils under a clearfield system. **Archives of Agronomy and Soil Science**, 63(7), 897-906.

Nitschke, M.; Costa, S. G. V. A.; Contiero, J. (2005) Rhamnolipid Surfactants: An Update On The General Aspects Of These Remarkable Biomolecules. **Biotechnol Prog**, 21: 1595 – 1600.

Nitschke, M.; Ferraz, C ; Pastore, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35: 81-85, 2004.

Nitschke, M.; Pastore, G.M (2002). Biosurfactantes: Propriedades E Aplicações. **Quím Nova**, São Paulo, V. 25: 772-776.

Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 772-776, 2002.

Nödler, K., Licha, T., & Voutsas, D. (2013). Twenty years later–atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. **Marine pollution bulletin**, 70(1-2), 112-118.

Oliveira, A. C. S. M.; Bezerra, M. S.; Padilha, C. E. A.; Melchuna, A. M.; Macedo, G. R.; Santos, E. S. (2013) Recovery Of Rhamnolipids Produced Bypseudomonas Aeruginosausing Acidic Precipitation, Extraction, And Adsorption On Activated Carbon. **Sep Sci And Technol**, 48 (18): 2852-2859. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/01496395.2013.809107>.

Ordaz-Guillén, Y., Galíndez-Mayer, C. J., Ruiz-Ordaz, N., Juárez-Ramírez, C., Santoyo-Tepole, F., & Ramos-Monroy, O. (2014). Evaluating the degradation of the herbicides picloram and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 8765-8773.

Pacheco, G. J., Reis, R. S., Fernandes, A. C. L. B., Da Rocha, S. L. G., Pereira, M. D., Perales, J., & Freire, D. M. G. (2012) Rhamnolipid Production: Effect Of Oxidative Stress On Virulence Factors And Proteome Of Pseudomonas Aeruginosa Pa1. **Appl Microbiol And Biotechnol**, 95:1519–1529. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4258-Y>.

Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Aplicações ambientais de biossurfactantes: avanços recentes. **Int J Mol Sci** 12(1):633–654

Palmonari, A.; Cavallini, D.; Sniffen, C.J.; Fernandes, L.; Holder, P.; Fagioli, L.; Fusaro, I.; Biagi, G.; Formigoni, A.; Mammi, L. (2020) Short Communication: Characterization Of Molasses Chemical Composition. **J Of Dairy Sci**, 103 (7): 6244-6249. <http://Dx.Doi.Org/10.3168/Jds.2019-17644>.

Passos, A. B. R., Souza, M. F., Saraiva, D. T., da Silva, A. A., Queiroz, M. E. L., Carvalho, F. P., & Silva, D. V. (2019). Effects of liming and *Urochloa brizantha* management on leaching potential of picloram. **Water, Air, & Soil Pollution**, 230, 1-8.

Patel, R.M; Desai, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses, Lett. **Appl. Microbiol.** 25 (1997) 91–94.

Penteado, J. C. P.; El Seoud, O. A.; Carvalho, L. R. F. Linear alkylbenzene sulfonates: chemistry, environmental impact and analysis. **Quím. Nova**, v. 29, n. 5, p. 1038-1046, 2006.

Pérez-Armendáriz, B., Cal-y-Mayor-Luna, C., El-Kassis, E. G., & Ortega-Martínez, L. D. (2019). Use of waste canola oil as a low-cost substrate for rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa*. **AMB Express**, 9(1), 1-9.

Phulpoto, Irfan Ali; Wang, Yanfen; Qazi, Muneer Ahmed; Hu, Bowen; Ndayisenga, Fabrice; Yu, Zhisheng. (2021) Bioprospecting Of Rhamnolipids Production And Optimization By An Oil-Degrading *Pseudomonas* Sp. S2 We Isolated From Freshwater Lake. **Bioresour Technol**, 323: p124601. <http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Biortech.2020.124601>.

Pierangeli, M. A. P., Guilherme, L. R. G., Curi, N., Silva, M. L. N., Lima, J. M. D., & Costa, E. T. D. S. (2005). Efeito do pH na adsorção e dessorção de cádmio em Latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 29, 523-532.

Portal, T. P., Pedlowski, M. A., de Almeida, C. M., & Canela, M. C. (2019). An integrated assessment of water quality in a land reform settlement in northern Rio de Janeiro state, Brazil. **Heliyon**, 5(3), e01295.

Qurratu, A., & Reehan, A. (2016). A review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) derivatives: 2,4-D dimethylamine salt and 2,4-D butyl ester. **International Journal of Applied Engineering Research**, 11(19), 9946-9955.

Radzuan, Mohd Nazren; Banat, Ibrahim M.; Winterburn, James. (2017) Production And Characterization Of Rhamnolipid Using Palm Oil Agricultural Refinery Waste. **Bioresour Technol**, 225: 99-105. <http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Biortech.2016.11.052>.

Rahman, K.S.M.; Rahman, T.J.; Mcclean, S.; Marchant, R.; Banat, I.M. (2002) Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnol. Prog.**, 18: 1277–1281.

Ramnani, P.; Kumar, S.S.; Gupta, R. (2005) Concomitant Production And Downstream Processing Of Alkaline Protease And Biosurfactant From *Bacillus Licheniformis* Rg1: Bioformulation As Detergent Additive. **Process Biochem.** 40: 3352–3359.

Rangarajan, V., & Narayanan, M. (2018). Biosurfactants in soil bioremediation. *Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects: Volume 1: Soil-Microbe Interaction*, 193-204.

Ray, M., Kumar, V., Banerjee, C., Gupta, P., Singh, S., & Singh, A. (2021). Investigation of biosurfactants produced by three indigenous bacterial strains, their growth kinetics and their anthracene and fluorene tolerance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 208, 111621.

Raza, Z.A., Khalid, Z.M., Khan, M.S., Banat, I.M., Rehman, A., Naeem, A., & Saddique, M.T. (2010). Surface properties and subsurface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. **Biotechnology Letters**, 32, 811-816.

- Raza, Z.A., Khan, M. S., Khalid, Z.M. (2007) Evaluation Of Distant Carbon Sources In Biosurfactant Production By A Gamma Ray-Induced *Pseudomonas Putida* Mutant. **Process Biochem**, 42: 686–692, b.
- Raza, Z.A., Khan, M. S., Khalid, Z.M. (2007) Physicochemical And Surface-Active Properties Of Biosurfactant Produced Using Molasses By A *Pseudomonas Aeruginosa* Mutant. **J Of Environ Sci And Health Part A**. 42:73-80, a.
- Reis, F. C., VICTÓRIA, R., Andrade, M. T., & Barroso, A. A. M. (2019). Use of herbicides in sugarcane in the São Paulo state. **Planta Daninha**, 37.
- Rienzo, M.A. Díaz De; Kamalanathan, I.D.; Martin, P.J. (2016) Comparative Study Of The Production Of Rhamnolipid Biosurfactants By *B. Thailandensis* E264 And *P. Aeruginosa* Atcc 9027 Using Foam Fractionation. **Process Biochem**, 51(7): 820-827. <http://Dx.Doi.Org/10.1016/J.Procbio.2016.04.007>.
- Rivero-Huguet, M., and Marshall, W. D., 2011. Scaling up a treatment to simultaneously remove persistent organic pollutants and heavy metals from contaminated soils. **Chemosphere**, 83 (5): 668-673.
- Robinson, K. G.; Ghosh, M. M.; Shi, Z. Mineralization enhancement of non-aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactant. **Water Sci Technol**, vol. 34, n. 7-8, p. 303-309, 1996.
- Rocha, P. R. R., Faria, A. T., Borges, L. G. F. C., Silva, L. O. C., Silva, A. A., & Ferreira, E. A. (2013). Sorção e dessorção do diuron em quatro latossolos brasileiros. **Planta Daninha**, 31, 231-238.
- Rocha, V. A., de Castilho, L. V., de Castro, R. P., Teixeira, D. B., Magalhães, A. V., Gomez, J. G., & Freire, D. M. (2020). Comparison of mono-rhamnolipids and di-rhamnolipids on microbial enhanced oil recovery (MEOR) applications. **Biotechnol. Prog**, 36(4), e2981.
- Sadegh-Zadeh, F., Abd Wahid, S., & Jalili, B. (2017). Sorption, degradation and leaching of pesticides in soils amended with organic matter: A review. **Advances in Environmental Technology**, 3(2), 119-132.
- Sana, S., Datta, S., Biswas, D., & Bhattacharya, M. (2017) Production Kinetics Of Rhamnolipid Using Fish Fat: A Step Toward Environmental Hazard Control Of Sewage. **Environ Technol & Innov**, 8:299–308. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.07.004>
- Santisteban, A. M. G. **Caracterização do ácido húmico extraído de vermicomposto e estudo de adsorção/ dessorção deste e outras matrizes com o herbicida atrazina**. São Carlos, 1999. p. 13. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade de São Paulo.
- Santos, H. G., Jacomine, P., Anjos, L., Oliveira, V., Lumberras, J., Coelho, M., ... & Cunha, T. (2018). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos, 5^a.
- Schenk, T., Schuphan, I., & Schmidt, B. (1995). High-Performance Liquid Chromatographic Determination Of The Rhamnolipids Produced By *Pseudomonas Aeruginosa*. **J Of Chromatogr A**, 693(1), 7-13.
- Schmidt, Vanessa Kristine De Oliveira; Carvalho, Jackelyne De Souza; Oliveira, Débora De; Andrade, Cristiano José De. (2021) Biosurfactant Inducers For Enhanced Production Of Surfactin And Rhamnolipids: An Overview. **World J Of Microbiol And Biotechnol**, 37(2):1-15. <http://Dx.Doi.Org/10.1007/S11274-020-02970-8>.
- Schmidt, Vanessa Kristine De Oliveira; Carvalho, Jackelyne De Souza; Oliveira, Débora De; Andrade, Cristiano José De. (2021) Biosurfactant Inducers For Enhanced Production Of Surfactin And

Rhamnolipids: An Overview. **World J Of Microbiol And Biotechnol**, 37(2):1-15.

<http://dx.doi.org/10.1007/s11274-020-02970-8>.

Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. 1993. Sorption of neutral organic chemicals to soils and sediments. In *Environmental Organic Chemistry*. John Wiley, New York, NY, USA, pp 265–284.

Seibert, D., Zorzo, C. F., Borba, F. H., de Souza, R. M., Quesada, H. B., Bergamasco, R., ... & Inticher, J. J. (2020). Occurrence, statutory guideline values and removal of contaminants of emerging concern by Electrochemical Advanced Oxidation Processes: A review. *Science of the Total Environment*, 748, 141527.

Sharma, G., Naushad, M., Ala'a, H., Kumar, A., Khan, M. R., Kalia, S., ... & Sharma, A. (2017). Fabrication and characterization of chitosan-crosslinked-poly (alginate acid) nanohydrogel for adsorptive removal of Cr (VI) metal ion from aqueous medium. *International journal of biological macromolecules*, 95, 484-493.

Sharma, Rajni; Singh, Jagdish; Verma, Neelam. (2017) Optimization Of Rhamnolipid Production From *Pseudomonas Aeruginosa* Pbs Toward Application For Microbial Enhanced Oil Recovery. **3 Biotech**, 8 (1):1-15. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-017-1022-0>.

Shavandia, M. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. TA6 strain. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p.477–482, 2011.

Shavandia, M. et al. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p. 2320– 2326, 2012.

Silva, R. C. F. S.; Almeida, D. G.; Meira, H. M.; Silva, E. J.; Farias, C. B.B.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Sarubbo, L. A. (2017) Production And Characterization Of A New Biosurfactant From *Pseudomonas Cepacia* Grown In Low-Cost Fermentative Medium And Its Application In The Oil Industry. **Biocatal And Agric Biotechnol**. 12: 206-215.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.09.004>.

Silva, R.C.F.S. Rufino, R.D., Luna, J.M., Farias, C.B.B., Santos, V.A., Filho, H.J.B.L., Sarubbo, L.A. (2013) Enhancing Biosurfactant Production from *Pseudomonas Cepacia* Cct6659 By Optimizing Nutritional Parameters Using A Response Surface Methodology. **Tenside Surfactant Deterg**, 50(2):137-142.

Soloneski, S., Nikoloff, N., & Larramendy, M. L. (2016). Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 797, 46-52.

Souza, R. M., Seibert, D., Quesada, H. B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M. R., & Bergamasco, R. (2020). Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. *Process Safety and Environmental Protection*, 135, 22-37.

Thio, C. W., Lim, W. H., Md. Shah, U. K., & Phang, L. Y. (2022). Palm kernel fatty acid distillate as substrate for rhamnolipids production using *Pseudomonas* sp. LM19. **Green Chem Lett Rev**, 15(1), 83-92.

Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Core flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo-and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource technology**, 220, 175-182.

- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource technology**, 232, 389-397.
- Vieira, E. M., Prado, A. G. S. D., Landgraf, M. D., & Rezende, M. O. D. O. (1999). Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2, 4d) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, 22, 305-308.
- Vinhal-Freitas, I. C., Maldonado, A. C. D., Alvarenga, C. B., Camargo, R., & Wendling, B. (2010). Adsorção e dessorção de metais no solo e coeficientes de isotermas de Freundlich e Langmuir. **Agropecuária técnica**, 31(2), 153-163.
- Wang, C., Shi, H., Adams, C. D., Gamagedara, S., Stayton, I., Timmons, T., & Ma, Y. (2011). Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water research**, 45(4), 1818-1828.
- Wu, L., Song, D., Yan, L., Liang, S., Yang, Y., Peng, C., ... & Dong, X. (2020). Simultaneous desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals from contaminated soils by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Ocean University of China**, 19, 874-882.
- Xie, C., Gao, S., Guo, Q., & Xu, K. (2010). Electrochemical sensor for 2,4-dichlorophenoxy acetic acid using molecularly imprinted polypyrrole membrane as recognition element. **Microchimica Acta**, 169, 145-152.
- Yu, H., Huang, G. H., An, C. J., & Wei, J. (2011). Combined effects of DOM extracted from site soil/compost and biosurfactant on the sorption and desorption of PAHs in a soil–water system. **Journal of Hazardous Materials**, 190(1-3), 883-890.
- Yu, H., Huang, G. H., Xiao, H., Wang, L., & Chen, W. (2014). Combined effects of DOM and biosurfactant enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil–water systems. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 10536-10549.
- Yuan, S., Wu, X., Wan, J., Long, H., Lu, X., Wu, X., and Chen, J., 2010. Enhanced washing of HCB and Zn from aged sediments by TX-100 and EDTA mixed solutions. **Geoderma**, 156 (3-4): 119-125.
- Zachara, J. M., Smith, S. C., Resch, C. T., & Cowan, C. E. (1992). Cadmium sorption to soil separates containing layer silicates and iron and aluminum oxides. **Soil Science Society of America Journal**, 56(4), 1074-1084.
- Zhang, J.E. Pemberton, R.M. Maier (2014). Effect Of Fatty Acid Substrate Chain Length On *Pseudomonas Aeruginosa* ATCC 9027 Monorhamnolipid Yield And Congener Distribution. **Process Biochem.**, 49:989-995.
- Zhao, B., Che, H., Wang, H., and Xu, J., 2016. Column flushing of phenanthrene and copper (II) cocontaminants from sandy soil using Tween 80 and citric acid. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, 25 (1): 50-63.
- Zhao, F., Han, S., & Zhang, Y. (2020). Comparative studies on the structural composition, surface/interface activity and application potential of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* using hydrophobic or hydrophilic substrates. **Bioresour Technol**, 295, 122269.
- Zhao, F., Jiang, H., Sun, H., Liu, C., Han, S., & Zhang, Y. (2019). Production of rhamnolipids with different proportions of mono-rhamnolipids using crude glycerol and a comparison of their application potential for oil recovery from oily sludge. **RSC advances**, 9(6), 2885-2891.

APÊNDICE A

ARTIGO 1

Artigo publicado na **World Journal of Microbiology and Biotechnology** (2023) 39:51

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03494-z>

Fator de Impacto: 4.253

Braz, L. M., Salazar-Bryam, A. M., Andrade, G. S. S., & Tambourgi, E. B. (2023). Optimization and characterization of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 using molasses as a substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 39(2), 51.

OPTIMIZATION AND CHARACTERIZATION OF RHAMNOLIPIDS PRODUCED BY *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 USING MOLASSES AS A SUBSTRATE

^{1*} Letícia Martini Braz, ²Ana María Salazar-Bryam, ³Grazielle Santos Silva Andrade, ¹ Elias Basille Tambourgi

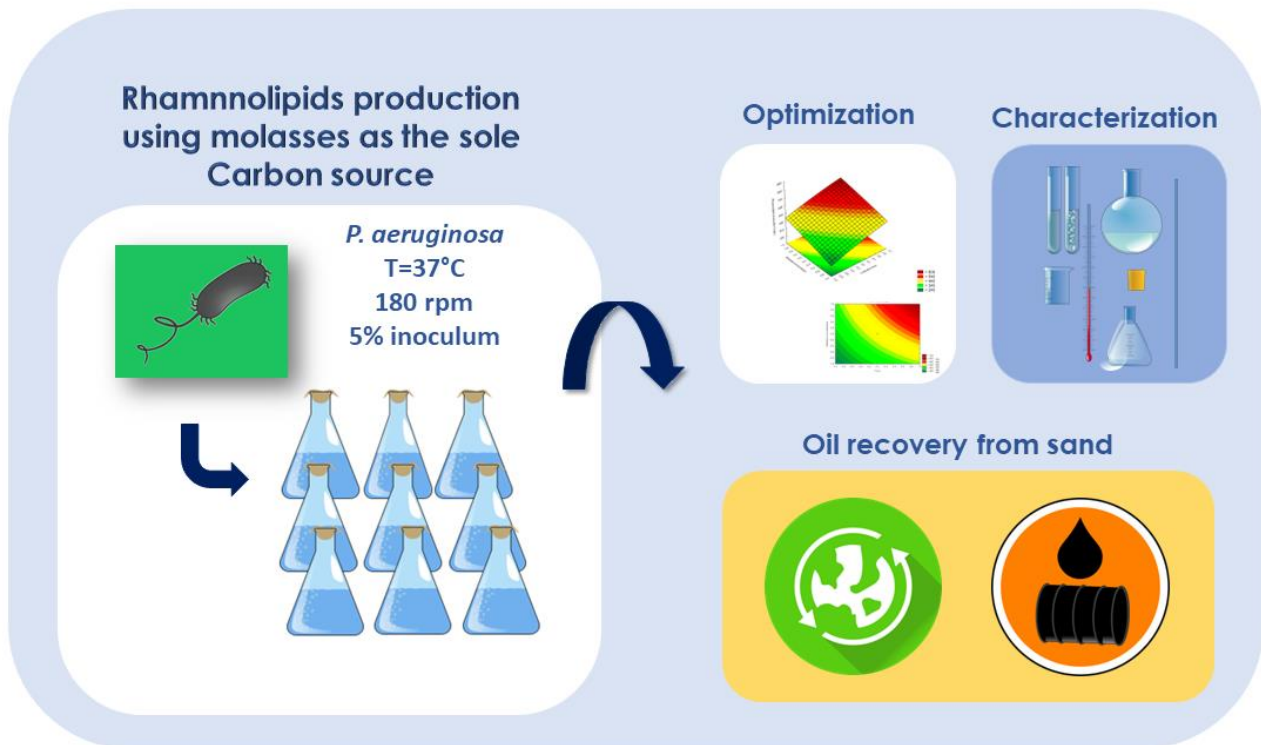
¹ State University of Campinas, Av. Albert Einstein, 500, Cidade Universitária Zeferino Vaz - Campinas- SP. CEP: 13083-852. Phone: (19) 3521-3910.

²São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, *Rio Claro* SP, CEP: 13506-900. Phone: (19) 3526-4175.

³ Federal University of Alfenas. Rodovia José Aurélio Vilela, 11999 (BR 267 km 533) · Cidade Universitária - *Poços de Caldas* - MG. CEP: 37715-400. Phone: (35) 3697-4602.

***Corresponding author:** leticia.martini.braz@gmail.com

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

The present study aims to evaluate the growth potential of the *P. aeruginosa* ATCC9027 strain with molasses as the sole carbon source to produce rhamnolipids. The influence of the cultivation time and substrate concentration on biosurfactant production was investigated by using a complete 3-level factorial design, with the rhamnolipid concentration as the variable response. The strain was able to produce the biosurfactant in all design conditions tested, producing 758.04 mg/L rhamnolipids with 7% v/v substrate concentration in a cultivation time of 120 h. The substrate concentration used in the cultivation step directly influenced the biosurfactant production, and, even with the decrease in biomass growth, the biosurfactant production continued to increase. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) revealed the presence of 62.3% mono- (RL1) and 37.6% di-rhamnolipids (RL3). The stability tests showed that the biosurfactant has good performance in extreme conditions of temperature, pH and saline concentration. The emulsification index was also evaluated for several oils and hydrocarbons, obtaining emulsification rates of up to 84.9% for the burnt motor oil. In addition, rhamnolipid showed a good ability to remove spilled oil from the sand, removing 58.51% of burnt motor oil and 70.09% of post-frying soybean oil. The results indicate that molasses, an agro-industrial residue abundant in Brazil, can be used as the only carbon source for quality rhamnolipid production when under optimized conditions, therefore presenting itself as a management option for this residue and, at the same time, providing the production product with high added value.

Keywords: Agro-industrial subproduct. Biosurfactant. Molasses. *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipids

APÊNDICE B

ARTIGO 2

Artigo submetido na **Journal of Polymers and the Environment**

Fator de Impacto: **4.705**

RHAMNOLIPIDS EVALUATION IN ATRAZINE AND 2,4-D DESORPTION IN SOIL

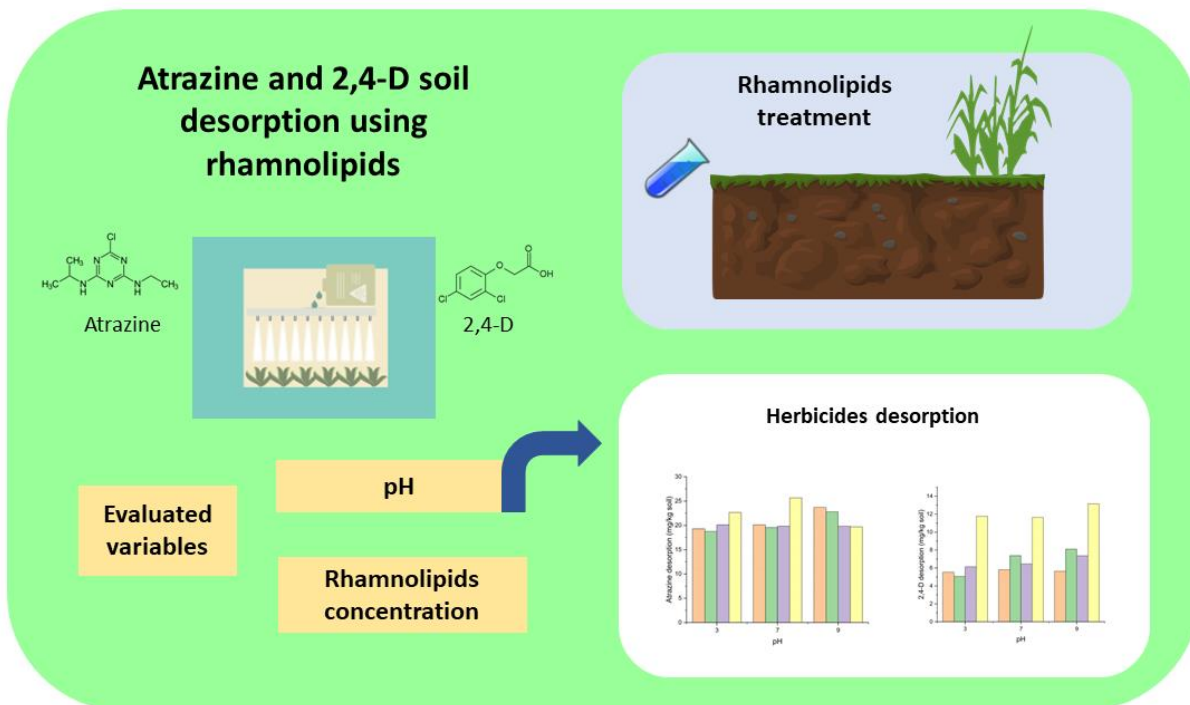
¹ Letícia Martini Braz, ² Ricardo Tadashi Goda, ³ Jéssica Teixeira, ³ Ridien Gonçalves de Alencar, ³ Gian Freschi, ³ Gunther Brucha, ³ Grazielle Santos Silva Andrade, ¹ Elias Basille
Tambourgi

¹ State University of Campinas, Av. Albert Einstein, 500, Cidade Universitária Zeferino Vaz - *Campinas* - SP. CEP: 13083-852. Fone: (19) 3521-3910.

² Federal University of São Carlos, Rod. Washington Luiz, s/n - Monjolinho, São Carlos - SP, CEP: 13565-905, (16) 3351-8111.

³ Federal University of Alfenas. Rodovia José Aurélio Vilela, 11999 (BR 267 km 533) · Cidade Universitária - *Poços de Caldas* - MG. CEP: 37715-400. Fone:(35) 3697-4602.

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

The present work investigate the performance of the rhamnolipid biosurfactant in the removal of the pesticides atrazine and 2,4 D from an artificially contaminated tropical soil. The rhamnolipid was produced by *Pseudomonas aeruginosa* using molasses 7 % m/v as carbon source. A red–yellow latosol, a tropical soil, was characterized as chemical and physical properties and then was artificially contaminated with the herbicides. The K_d value of 19.82 mL/g indicated high affinity to 2,4 D to the latosol, contrary to atrazine with $K_d = 0.83$ mL/g. The desorption tests in contaminated soil indicated that the presence of the biosurfactant enhance pesticides removal, and was strongly influenced by the pH and biosurfactant concentrations. Both pesticides attained higher values of desorption at higher biosurfactant concentration 5 CMC (900 mg/L), but at different pHs. From atrazine, higher value of desorption 25.66 mg/kg soil was attained in pH 7.0 while desorption of 2,4 D was 13.17 mg/kg at pH 9.0. The Gunary model was the best model fitted to the experimental data for both pesticides, indicating a multilayer desorption. The results indicate that rhamnolipids are a promising alternative for use in Surfactant Enhanced Remediation (SER) contributing to the recovery of pesticide-contaminated soils.

Keywords: Atrazine; 2,4-D; Desorption; Biosurfactant; Rhamnolipids.

APÊNDICE C

ARTIGO 3

Artigo publicado na revista **Concilium**

Estrato A4- Qualis 2017-2020

DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-607-683>

Braz, L. M., Tambourgi, E. B., & Andrade, G. S. S. (2022). Avaliação da produção de biossurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* em substrato de melaço como fonte única de Carbono. **Concilium**, 22(6), 688-698.

Avaliação da produção de biossurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* em substrato de melaço como fonte única de Carbono

Evaluation of biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* in molasses substrate as the sole carbon source

^{1*} Letícia Martini Braz, ¹ Elias Basille Tambourgi, ² Grazielle Santos Silva Andrade,

¹ State University of Campinas, Av. Albert Einstein, 500, Cidade Universitária Zeferino Vaz - Campinas- SP. CEP: 13083-852. Phone: (19) 3521-3910.

² Federal University of Alfenas. Rodovia José Aurélio Vilela, 11999 (BR 267 km 533) · Cidade Universitária - Poços de Caldas - MG. CEP: 37715-400. Phone: (35) 3697-4602.

***Corresponding author:** leticia.martini.braz@gmail.com

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, utilizando-se como única fonte de Carbono um resíduo da indústria canavieira, o melaço. Diferentes concentrações de melaço e tempos de fermentação foram avaliados. A produção de biossurfactantes foi monitorada por meio da tensão superficial, concentração de ramnose e índice de emulsificação (IE_{24h}). Os resultados mostraram a produção máxima de biossurfactantes ocorreu em 30h de fermentação, obtendo-se redução da tensão superficial do meio para $46,54 \pm 1,1$ mN/m e concentração de ramnose ($243,95 \pm 38,3$ mg/L) com substrato a 3% de melaço. A análise positiva de ramnose sugere que o biossurfcante produzido pode ser do tipo Ramnolipídeo, um glicolipídeo comumente produzido pelo gênero *Pseudomonas*. Os índices de emulsificação em óleo de soja mostraram que, mesmo em baixas concentrações de biossurfcante, uma boa atividade emulsificante pôde ser notada (IE_{24h} de até 56%).

Palavras-chave: Biossurfactantes; *Pseudomonas fluorescens*; Melaço; Resíduos agroindustriais.

ABSTRACT

The present study aimed to produce biosurfactants by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, using molasses as the sole carbon source. Different molasses concentrations and fermentation times were evaluated. The biosurfactants production was monitored by means of the surface tension, rhamnose concentration and emulsification index (IE_{24h}). The results demonstred that the maximum biosurfactants production occurred in 30h of fermentation, resulting in a reduction in the surface tension of the medium to 46.54 ± 1.1 mN/m and rhamnose concentration (243.95 ± 38.3 mg/L), obtained with substrate at 3% molasses. The positive analysis of rhamnose suggests that the biosurfactant produced may be of the Rhamnolipid type, a glycolipid commonly produced by the genus *Pseudomonas*. The emulsification in soybean oil showed that, even at low concentrations of biosurfactant, a good emulsifying activity could be noticed (IE_{24h} up to 56%).

Keywords: Biosurfactants; *Pseudomonas fluorescens*; Molasses; Agro-industrial byproduct.