



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE**



**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO DA AMAZÔNIA
AMAPAENSE E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE**

ELISA MARIA DE OLIVEIRA

MACAPÁ

2020

ELISA MARIA DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO DA AMAZÔNIA
AMAPAENSE E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTE**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amapá, como requisito final para a obtenção do Título de Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Marcolino de Souza
Co-Orientador: Dr. Wardsson Lustrino Borges
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Silva Andrade

MACAPÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Oliveira, Elisa Maria de.

Prospecção de bactérias do solo da Amazônia amapaense e
otimização da produção de biossurfactante / Elisa Maria de Oliveira;
Orientador, Tiago Marcolino de Souza; Coorientador, Wardsson
Lustrino Borges. – Macapá, 2020.

147 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Amapá,
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia.

1. Bactérias - Identificação. 2. Solo - Análise. 3. Biossurfactante.
I. Souza, Tiago Marcolino de, orientador. II. Borges, Wardsson
Lustrino, coorientador. III. Andrade, Marcelo Silva, coorientador. IV.
Fundação Universidade Federal do Amapá. V. Título.

631.46 O48p
CDD. 22 ed.

ELISA MARIA DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DO SOLO DA AMAZÔNIA
AMAPAENSE E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do
programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e
Biotecnologia da Amazônia Legal da Rede
BIONORTE, na Universidade Federal do Amapá,
como requisito final para a obtenção do Título de
Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Tiago Marcolino de Souza

Dr. Tiago Marcolino de Souza – Presidente
Universidade do Estado do Amapá
Orientador-BIONORTE/UNIFAP

Vanessa Bordin Viera

Dra. Vanessa Bordin Viera
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora externa

RS

Dr. Ricardo Adalme da Silva
Embrapa Amapá/BIONORTE
Examinador interno

Irlon Maciel Ferreira

Dr. Irlon Maciel Ferreira
Universidade Federal do Amapá/BIONORTE
Examinador interno

Raquel Silva Araújo

Dra. Raquel Silva Araújo
Universidade Federal do Amapá
Examinadora externa

Resultado: APROVADA

Aos meus pais, José Eustáquio de Oliveira e Fátima Maria de Oliveira, pelo amor, dedicação, educação e apoio incondicional em todos os momentos – eles são a minha fortaleza.

À meu esposo Victor Hugo Gomes Sales pelo carinho, amor, apoio e paciência nos muitos momentos difíceis.

Às minhas filhas, Maria Clara de Oliveira Gomes Sales e Mariana de Oliveira Gomes Sales pelo apoio e paciência durante o período do doutorado.

Aos meus irmãos, Isabel e Eder pelo incentivo, compreensão e apoio sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por tudo...

Ao meu orientador professor Dr. Tiago Marcolino de Souza pela orientação, apoio, incentivo e pela a oportunidade de poder cursar o doutorado;

Aos meus co-orientadores professor Dr. Marcelo Silva Andrade e Wardsson Lustrino Borges pelos ensinamentos, orientações e execução de atividades durante a realização do experimento do doutorado;

A Universidade do Estado do Amapá (UEAP), a Embrapa Amapá, a Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amapá (IFAP) por terem disponibilizado a infraestrutura de seus laboratórios para a execução das atividades do Doutorado;

A Embrapa Agrobiologia na pessoa do pesquisador Dr. Jerri Adriano Zilli por ter disponibilizado a infraestrutura para a extração e sequenciamento genético das bactérias isoladas nesse estudo o que enriqueceu bastante os dados doo projeto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE), pela oportunidade;

Ao meu esposo, Victor Hugo Gomes Sales pela a ajuda, conselhos, apoio e ensinamentos durante todo o experimento do doutorado;

Aos membros da banca examinadora pela inestimável contribuição no enriquecimento deste trabalho.

OLIVEIRA, Elisa Maria de. Prospecção de bactérias do solo da Amazônia Amapaense e otimização da produção de biossurfactante. 2020. 147 f. Tese (Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE) - Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2020. Orientador: Dr. Tiago Marcolino de Souza.

RESUMO

O objetivo do projeto foi prospectar potenciais bactérias produtoras de biossurfactante, bem como otimizar os fatores ambientais e nutricionais no processo de produção usando diferentes planejamentos experimentais. Além disso, nanoemulsões foram produzidas para verificar a eficiência dos biossurfactantes produzidos. Amostras de solo foram coletadas em ecossistemas de Terra Firme e Várzea, nos municípios de Porto Grande, Ferreira Gomes e Mazagão. A partir das amostras, técnicas de cultivo em superfície em meio Agar nutriente e PIA (*Pseudomans Isolation Agar*) foram utilizadas para o isolamento de bactérias. Screenings das potenciais bactérias não patogênicas produtoras de biossurfactante foi realizado com os isolados morfolologicamente diferentes, por fermentação submersa em meio caldo nutriente e azeite de oliva como indutor. Os meios de cultivo foram otimizados variando-se fontes de carbono, nitrogênio, pH, temperatura e tempo de fermentação. Testes qualitativos (colapso da gota e dispersão do óleo) e quantitativos (índice de emulsificação e tensão superficial) foram realizados para selecionar as bactérias mais eficientes na produção de biossurfactante. Um total de 318 isolados de bactérias foram isoladas das amostras de solo e 43 extratos de bactérias foram selecionadas no primeiro screenig a partir da alta capacidade de emulsificação ($E_{24} > 50\%$). Os isolados foram sequenciados e três gêneros foram identificados: *Serratia*, *Paenibacillus* e *Citrobacter*. No segundo screening, 15 foram selecionados em função da sua capacidade em reduzir a tensão superficial do meio de cultivo a partir dos extratos livres de células. Os gêneros *Serratia* sp. e *Paenibacillus* sp. apresentaram os melhores resultados e por isso estratégias para aumentar a produção de biossurfactante foram realizadas. Para avaliar os efeitos dos parâmetros nutricionais e ambientais o método de uma variável de cada vez foi empregado. Já para determinar as condições ideais de produção de biossurfactante e tensão superficial o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) foi utilizado. Para a bactéria *Paenibacillus* sp. o querosene foi a fonte de carbono que apresentou menor redução da tensão superficial. O delineamento em fatorial completo apresentou os fatores tempo e temperatura como significativos no processo de produção de biossurfactante. O modelo matemático foi considerado adequado para descrever a produção de biossurfactante apresentando $R^2 = 0,7268$, com tensão superficial do meio de 34,6 mN/m nas condições de 30 °C e 24h. Nos sistemas óleo

de milho/ureia e glicerol/ureia foi verificada a produção de biossurfactante através da redução da tensão superficial do meio de 69,7 mN/m para 35,70 mN/m (redução de 48,78%) e 68,9 mN/m para 37,10 mN/m (redução 46,15%), respectivamente. A capacidade emulsionante dos biossurfactantes presentes nos meios foi testada pela síntese de nanoemulsões (NE) por baixo aporte de energia. Além disso, a estabilidade das NE foi avaliada após estocagem a temperatura ambiente por 14 dias. Análises do tamanho médio da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões foram determinados através do espalhamento dinâmico da luz. As formulações contendo 0,1% de óleo de soja e extratos brutos sem células, geradas com suplementação com óleo de milho/uréia e glicerol/uréia, atingiram tamanhos médios de partículas de 453,1 nm e 667,3 nm, respectivamente. Os resultados demonstraram que as otimizações por modelos matemáticos foram adequadas para identificar as melhores condições de produção de biossurfactante produzido por bactérias do gênero *Serratia* sp. e *Paenibacillus* sp. Além disso, os biossurfactantes mostraram-se efetivos para a produção de nanoemulsões.

Palavras-chave: Terra firme; Várzea; *Serratia* sp.; *Citrobacter* sp.; *Paenibacillus* sp.; Surfactantes naturais; Nanoemulsão.

OLIVEIRA, Elisa Maria de. Prospection of soil bacteria from the Amapaense Amazon and optimization of biosurfactant production. 2020. 147 f. Thesis (Biodiversity and Biotechnology of the Legal Amazon - BIONORTE) - Federal University of Amapá, Macapá, 2020. Advisor: Dr. Tiago Marcolino de Souza.

ABSTRACT

The objective of the project was to prospect potential biosurfactant-producing bacteria, as well as to optimize environmental and nutritional factors in the production process using different experimental designs. In addition, nanoemulsions were produced to verify the efficiency of the produced biosurfactants. Soil samples were collected in Upland and Floodplain ecosystems, in the municipalities of Porto Grande, Ferreira Gomes, and Mazagão. From the samples, surface cultivation techniques in nutrient Agar and PIA (Pseudomonas Isolation Agar) were used to isolate bacteria. Screenings of potential non-pathogenic bacteria producing biosurfactant were carried out with the morphologically different isolates, by submerged fermentation in nutrient broth and olive oil as an inducer. The culture media were optimized by varying sources of carbon, nitrogen, pH, temperature, and fermentation time. Qualitative (drop collapse and oil dispersion) and quantitative (emulsification index and surface tension) tests were performed to select the most efficient bacteria in the production of biosurfactants. A total of 318 bacterial isolates were isolated from soil samples and 43 bacterial extracts were selected on the first screening from the high emulsification capacity ($E_{24} > 50\%$). The isolates were sequenced and three genera were identified: *Serratia*, *Paenibacillus*, and *Citrobacter*. In the second screening, 15 were selected due to their ability to reduce the surface tension of the culture medium from cell-free extracts. The genera *Serratia* sp. and *Paenibacillus* sp. presented the best results and therefore strategies to increase the production of biosurfactants were carried out. To assess the effects of nutritional and environmental parameters, the method of one variable at a time was used. To determine the ideal conditions for the production of biosurfactant and surface tension, the Central Rotational Composite Design (DCCR) was used. For the bacterium, *Paenibacillus* sp. kerosene was the carbon source that showed the least reduction in surface tension. The complete factorial design presented the time and temperature factors as significant in the production process of biosturtant. The mathematical model was considered adequate to describe the production of biosurfactant with $R^2 = 0.7268$, with a medium surface tension of 34.6 mN/m at 30 °C and 24 h. In the corn oil/urea and glycerol/urea systems, the production of biosurfactant was verified by reducing the surface tension of the medium from 69.7 mN/m to 35.70 mN/m (reduction of 48.78%) and 68,9 mN/m to 37.10 mN / m (46.15% reduction), respectively. The

emulsifying capacity of the biosurfactants present in the media was tested by the synthesis of nanoemulsions (NE) with low energy input. In addition, the stability of the NE was evaluated after storage at room temperature for 14 days. Analyze of the average particle size, polydispersity index and zeta potential of the nanoemulsions were determined by dynamic light scattering. Formulations containing 0.1% soy oil and crude extracts without cells, generated with supplementation with corn oil/urea and glycerol/urea, reached average particle sizes of 453.1 nm and 667.3 nm, respectively. The results showed that the optimizations by mathematical models were adequate to identify the best conditions for the production of biosurfactants produced by bacteria of the genus *Serratia* sp. and *Paenibacillus* sp. In addition, biosurfactants have been shown to be effective for the production of nanoemulsions.

Keywords: Upland; Floodplain; *Serratia* sp.; *Citrobacter* sp .; *Paenibacillus* sp .; Natural surfactants; nanoemulsions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.

Capítulo 1

Figura 1-1 Exemplos de surfactantes sintéticos utilizados na indústria. Estrutura do: A) Dodecil sulfato de sódio (surfactante aniônico); B) Cloreto de dodecilamônio (Surfactante catiônico) e C) n-dodecil-n, n - dimetilbetaína (Surfactante anfótero).	25
Figura 1-2 Tensão superficial entre as interfaces em um sistema bifásico.	26
Figura 1-3 Ação do surfactante e formação de micelas (Concentração Micelar Crítica).	26
Figura 1-4 Estruturas básicas formadas por biossurfactantes	27
Figura 1-5 Estrutura de biossurfactantes: a) Monorramnolípídeo; b) Dirramnolípídeo.	30
Figura 1-6 Rotas metabólicas para produção de ramnolípídeos pela <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	31
Figura 1-7 A Interseção entre as áreas do conhecimento promoveu o surgimento da Nanobiotecnologia.	40
Figura 1-8 Tipos de emulsões. A) Emulsão do tipo A/O; B) Emulsão do tipo O/A; C) Emulsão do tipo O/A/O; e D) Emulsão do tipo A/O/A.	41
Figura 1-9 Representação esquemática do sistema mecânico homogeneizador com válvula de alta pressão para produção de nanoemulsão.	43
Figura 1-10 Representação esquemática do mecanismo sistema microfluidizador para produção de nanoemulsão.	44
Figura 1-11 Representação esquemática do sistema, homogeneizador ultrassônico para produção de nanoemulsão.	44
Figura 1-12 Representação esquemática do método ponto de inversão de fase da emulsão (Etapas I, II, III e IV).	46
Figura 1-13 Formação de nanoemulsões utilizando o método temperatura de inversão de fases. Onde, FA é fase aquosa; FO é fase oleosa e T é tensoativo.	47
Figura 1-14 Principais fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade das nanoemulsões.	48

Capítulo 2

Figure 2-1 Sites of soil collection in Terra Firme (TF) and Várzea (V) ecosystems at three cities: (i) Ferreira Gomes (FGTF and FGV); (ii); Porto Grande (PGTF and PGV) and (iii) Mazagão (MZTF and MZV). Yellow colored circles indicated collecting sites.	68
--	----

Figure 2-2 Schematic representation of the qualitative tests used to evaluate the microorganism's capacity to produce biosurfactants: a) drop collapse test, where 1Q, 2Q, 3Q, and 4Q represent the first, second, third and fourth quadrants; and b) oil dispersion test. 71

Figure 2-3 PC1-PC2 scores plot for the biosurfactant-producing isolates based on the surface tension (σ) and emulsification indexes (E24 with and without cells) results. G1, G2, G3, G4, and G5 indicate formed groups. 80

Capítulo 3

Figure 3-1 Effect of carbon sources on the emulsification index and surface tension. C1: sucrose; C2: fructose; C3: glycerol; C4: soy oil; C5: corn oil; C6: olive oil; and C7: residual soy oil. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance. 93

Figure 3-2 Effect of nitrogen sources on the emulsification index and surface tension when the fermentation medium is supplemented with corn oil (a) and glycerol (b). N1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; N2: peptone; N3: yeast extract; and N4: Urea. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance. 94

Figure 3-3 Effect of pH on the emulsification index and surface tension for the biosurfactant production using (a) corn oil and urea, and (b) glycerol and urea. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance. 96

Figure 3-4 Effect of temperature on the emulsification index and surface tension for the biosurfactant production using (a) corn oil and urea at pH 8, and (b) glycerol and urea at pH 7. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance. 98

Figure 3-5 Effect of fermentation time on the emulsification index and surface tension for the biosurfactant production using (a) corn oil and urea at pH 8 and 25°C, and (b) glycerol and urea at pH 7 and 30°C. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance. 99

Figure 3-6 Three-dimensional surface and contour maps of the effect of carbon and nitrogen sources concentrations on surface tension. (a-b) corn oil/urea system; (c-d) Glycerol/urea system. Points marked in white in the contour plot indicated the runs of experimental design 104

Figure 3-7 Particle size, polydispersity index, and Zeta potential as a function of time for the nanoemulsions containing the biosurfactant crude extracts produced with (a) corn oil and urea

(CO-01). and (b) glycerol and urea (GL-01). Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance. 107

Capítulo 4

Figura 4-1 Índice de emulsificação após 24h e Tensão superficial observados para o sobrenadante livre de células, do cultivo de *Paenibacillus* sp. MK156435 122

Figura 4-2 Gráficos tridimensionais de superfície e de contorno dos efeitos dos fatores na tensão superficial. (a-b) teor da fonte de carbono e pH; (c-d) teor da fonte de carbono e temperatura; (e-f) teor da fonte de carbono e tempo de cultivo; (g-h) pH e temperatura; (i-j) pH e tempo e (k-l) temperatura e tempo. 126

Figura 4-3 Superfície de resposta que mostra as influências mútuas dos níveis da temperatura e tempo na tensão superficial do meio a partir da produção de biossurfactante por *Paenibacillus* sp. MK156435. Os pontos marcados em branco no gráfico de contorno indicaram as execuções do desenho experimental. 131

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1-1 Concentração Micelar Crítica (CMC) e número de agregação (N) para surfactantes de uso comum.	27
Tabela 1-2 Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.	29
Tabela 1-3 Propriedades e vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes convencionais.	32
Tabela 1-4 Aplicações dos biossurfactantes para uso comercial.	34
Tabela 1-5 Síntese dos diferentes campos de atuação da nanobiotecnologia.	39

Capítulo 2

Table 2-1 Chemical and physical characteristics of soil samples from the different studied ecosystems.	69
Table 2-2 The total number of isolates and the number of biosurfactant-producing isolates selected after the first and second screening stages.	74
Table 2-3 Drop collapse, oil dispersion, and emulsification (with and without cells) results for microorganisms selected in the first screening.	74
Table 2-4 Identification of the isolates selected in the first screening.	77
Table 2-5 Surface tension and emulsification index results for the microorganism selected in the second screening.	79

Capítulo 3

Table 3-1 Central composite rotatable design (CCRD) matrix of independent variables for the fermentation process using the best hydrophobic and hydrophilic carbon source.	91
Table 3-2 Experimental and predicted surface tension values of the cell-free supernatant obtained in the fermentation process using corn oil and glycerol as carbon sources and urea as the nitrogen one.	101
Table 3-3 ANOVA of the quadratic model for surface tension.	102
Table 3-4 Steepest descent experiment design and response values.	103
Table 3-5 Droplet size, polydispersity index, and Zeta potential of the nanoemulsions formulations.	106

Capítulo 4

Tabela 4-1 Planejamento fatorial 2^4 para verificar a influência dos fatores na tensão superficial.	119
Tabela 4-2 Variáveis codificadas e normais para a otimização por DCCR (Temperatura e tempo).	121
Tabela 4-3 Valores observados e preditos da tensão superficial do sobrenadante livre de células obtidos no processo de fermentação usando querosene como fonte de carbono e pH, temperatura e tempo com parâmetros operacionais.	123
Tabela 4-4 Análise de variância (ANOVA) para a variável dependente Tensão Superficial no processo de seleção dos principais fatores usando fatorial completo.	124
Tabela 4-5 Variáveis codificadas e normais para a otimização por DCCR (Temperatura e tempo) e Tensão superficial do extrato livre de células produzido pela <i>Paenibacillus</i> sp. MK156435.	129
Tabela 4-6 Análise de variância (ANOVA) da variável dependente Tensão Superficial na otimização do processo de produção.	130

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CMC	Concentração Micelar Crítica
GRAS	Generally Recognized as Safe
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
O/A	Emulsão binária do tipo Óleo Água
A/O	Emulsão binária do tipo Água Óleo
O/A/O	Emulsão ternária do tipo Água Óleo Água
A/O/A	Emulsão ternária do tipo Óleo Água Óleo
pH	Potencial hidrogeniônico
N	Número de agregação
mmolL ⁻¹	miliMol por litro
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOS	Octil Sulfato de Sódio
CTAC	Cloreto de hexadecil-trimetil-amônio
DTAB	Brometo de Dodecil-Trimetil-Amônio
SB-12	n-dodecilsulfato
TritonX-100	Poliexietileno-1-octifenol
sp.	Espécie
Rt	Rhamnositransferase
dTDP-L-ramnose	Desoxitimindina-difosfato-L-ramnose
AgNPs	Nanopartículas de prata
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
γ	Tensão interfacial
r	Raio das gotículas
PIT	Phase Inversion Temperature
EIP	Emulsion Inversion Point
BHL	Balanço Hidrofílico Lipolítico
ON	Oligonucleotídios
rDNA	DNA Recombinante
E _{24h}	Índice de Emulsificação por 24h

E _{48h}	Índice de Emulsificação por 48h
E _{72h}	Índice de Emulsificação por 72h
mN/m	miliNewton por metro
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
TF	Terra Firme
V	Várzea
FG	Ferreira Gomes
PG	Porto Grande
MZ	Mazagão
FGTF	Ferreira Gomes Terra Firme
FGV	Ferreira Gomes Várzea
PGTF	Porto Grande Terra Firme
PGV	Porto Grande Várzea
MZTF	Mazagão Terra Firme
MZV	Mazagão Várzea
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
K ⁺	Potássio
Ca ⁺	Cálcio
Mg ²⁺	Magnésio bivalente
Ca ²⁺	Cálcio bivalente
Al	Alumínio
H ⁺	Hidrogênio
Al ³⁺	Alumínio trivalente
BSSC	Brazilian System of Soil Classification
BS	Base Saturation
CEC	Cation Exchange Capacity
NaCl	Cloreto de Sódio
w/v	Weight by volume
rpm	Rotação por minuto
min	Minuto
h	Horas
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius

μL	Microlitro
g	Gramas
g/L	Gramas por litro
PIA	<i>Pseudomonas Isolation Agar</i>
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CFU/mL	Colony forming units per milliliter
v/v	Volume por volume
SISGEN	National Genetic Heritage Management System
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
ANOVA	Análise de variância
PCA	Principal Component Analysis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Polymerase Chain Reaction
Tris-HCl	Tris- hydrochloride
mM	milliMolar
KCl	Potassium Chloride
MgCl ₂	Magnesium Chloride
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
μM	MicroMolar
NCBI	National Center Biotechnology Information
CRB-JD	Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner
σ	Surface Tension
SD	Standart deviation
G1	Group 1
G2	Group 2
G3	Group 3
G4	Group 4
G5	Group 5
PC1	Principal Component 1
PC2	Principal Component 2
NE	Nanoemulsões

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
Capítulo 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1 SURFACTANTES DE ORIGEM MICROBIANA PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS	23
1.1 Introdução	23
1.2 Surfactantes	24
1.3 Biossurfactantes	28
1.4 Microrganismos produtores de biossurfactantes	28
1.5 Propriedades dos Biossurfactantes	32
1.6 Aplicações industriais dos biossurfactantes	33
1.7 Considerações finais	35
2 SÍNTESE E ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES	36
2.1 Introdução	36
2.2 Nanotecnologia	37
2.3 Nanobiotecnologia	38
2.4 Nanoemulsões	41
2.5 Síntese de nanoemulsões	42
2.6 Estabilidade das nanoemulsões	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
Capítulo 2 - SELECTION OF EFFICIENT BIOSURFACTANT-PRODUCING BACTERIA FROM EASTERN AMAZON SOIL	65
1 INTRODUCTION	65
2 MATERIAL AND METHODS	67
2.1 Collection site	67
2.2 Chemical and physical characterization of soil samples	68
2.3 Isolation of biosurfactant-producing bacteria	69

2.4 Biosurfactant production	70
2.4.1 First screening of the Biosurfactant-Producing Bacteria	70
2.4.2 Second screening of the Biosurfactant-Producing Bacteria	72
2.5 Surface Tension Analysis	72
2.6 16S rDNA Gene Sequencing	72
3 RESULTS AND DISCUSSION	73
4 CONCLUSIONS	81
5 REFERENCES	81
Capítulo 3 - BIOSURFACTANT BY <i>Serratia</i> sp. MK156427: PRODUCTION OPTIMIZATION AND NANOEMULSION FORMATION	87
1 INTRODUCTION	87
2 MATERIAL AND METHODS	88
2.1 Chemicals	88
2.2 Bacteria strain	89
2.2 Inoculum preparation	89
2.3 Biosurfactant production	89
2.4 Effects of carbon and nitrogen sources	89
2.5 Effects of pH, temperature and time of reaction	90
2.6 Emulsification and surface tension tests	90
2.7 Biosurfactant production optimization	90
2.8 Nanoemulsions preparation and characterization	92
2.9 Statistical analysis	92
3 RESULTS AND DISCUSSION	92
3.1 Selection of carbon and nitrogen sources	92
3.2 Selection of pH, temperature and reaction time	96
3.3 Optimization of carbon and nitrogen sources concentrations	100
3.4 Effect of biosurfactant crude extracts in nanoemulsions	106

4 CONCLUSIONS	109
5 REFERENCES	110
Capítulo 4 – USO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DE UM ISOLADO DE <i>Paenibacillus</i> sp. MK156435	116
1 INTRODUÇÃO	116
2 MATERIAL E METODOS	118
2.1 Microrganismo	118
2.2 Preparo do inóculo	118
2.3 Estratégias para aumentar a produção do biossurfactante	118
2.3.1 Efeito das fontes de carbono sobre a produção de biossurfactante	119
2.3.2 Seleção da melhor condição operacional no processo de produção do biossurfactante	119
2.3.3 Otimização da produção de biossurfactante por <i>Paenibacillus</i> sp. MK156435	120
2.4 Avaliação da emulsificação e da tensão superficial	121
2.5 Análise estatística	121
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
3.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono	122
3.2 Avaliação do teor da fonte de carbono e de parâmetros operacionais	123
3.3 Otimização dos parâmetros operacionais (temperatura e tempo de cultivo)	129
4 CONCLUSÕES	133
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	138
ANEXO 1 COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO CAPÍTULO DE LIVRO	139

INTRODUÇÃO

A biodiversidade da Amazônia é formada por distintos ecossistemas, representados por florestas densas de terra firme, florestas estacionais, florestas de igapó, campos alagados, várzeas, savanas, refúgios montanhosos e formações pioneira, sendo considerada uma das mais diversas do planeta (PEREIRA, 2017). Nesses ecossistemas, a riqueza da biodiversidade é refletida em sua flora e fauna exuberantes, abrangendo milhares de diferentes espécies (STEEGETER et al., 2013). Os microrganismos também ocorrem de forma considerável nesses ecossistemas, destacando-se a presença desses em toda a cobertura vegetal natural do solo, colonizando esse e outros *microhabitats*, tais como a água e os animais.

A prospecção de substâncias úteis, metabolizadas por microrganismos isolados a partir da floresta Amazônica, apresenta-se de grande relevância para a aplicação industrial. Fundamentado nisso, há uma urgência em se promover investigações acadêmicas focada no isolamento e identificação de novas espécies (PEREIRA, 2017), disponibilizando para o mercado produtos com baixa toxicidade e biodegradabilidade (JOSHI et al., 2015), por exemplo o isolamento de microrganismos produtores de surfactantes naturais com aplicabilidade em diferentes setores industriais (JOSHI et al., 2015; MOUAFI et al., 2016).

Os surfactantes são substâncias que possuem propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e que podem ser produzidas pela rota química ou biológica. Eles possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial de misturas com fases e polaridades diferentes a partir da formação de agregados moleculares ou micelas (MAHJOUBI et al., 2013). Essas substâncias podem servir como agentes solubilizantes de compostos orgânicos hidrofóbicos em processo de biorremediação aprimorada (SUN et al., 2019). A grande maioria dos surfactantes disponíveis no mercado atualmente são obtidos a partir de derivados do petróleo e por esse motivo, bem como as atuais legislações de controle ambiental, tem levado à procura de surfactantes naturais, que sejam biodegradáveis e que causem menor impacto ambiental, que é justificado pela crescente necessidade de se desenvolver processos ecológicos envolvendo o uso de microrganismos para aplicação industrial (ELDIN; KAMEL; HOSSAM, 2019; PRASAD et al., 2018; SUN et al., 2019).

Os biosurfactantes são compostos biológicos, metabólitos extracelulares ou intracelulares de leveduras, fungos e bactérias (THAVASI; JAYALAKSHMI; BANAT, 2011). Suas moléculas, tais como os surfactantes, possuem frações hidrofílicas e hidrofóbicas e a ampla variabilidade das estruturas, classifica os biosurfactantes em diferentes grupos estruturais e funcionais (CAPPELLO et al., 2012), os quais atuam em substâncias com

diferentes polaridades, reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre sólidos, líquidos e gases (SATPUTE et al., 2010). Segundo Ibrahim (2013), uma das características mais importantes do biossurfactante é sua capacidade de emulsificar hidrocarbonetos em solução polar, produzindo agentes tensoativos que podem causar a dispersão desses nas emulsões aquosas em micropartículas ou micelas.

O interesse global na produção de biossurfactantes está relacionado a ampla aplicação dessas moléculas em diferentes setores industriais, tais como: farmacêutico, de cosméticos, de limpeza, de higiene pessoal, médico-hospitalar, alimentício, de tintas e têxtil (EL-SHESHTAWY et al., 2015), bem como no processo de biorremediação ambiental e na agricultura (BANAT et al., 2010; RUFINO et al., 2011).

As nanoemulsões tem sido bastante estudada por apresentarem possibilidades de expansão entre as necessidades das indústrias em busca de alternativas tecnológicas, como a melhora da biodisponibilidade e solubilidade de diferentes compostos, fornecendo propriedades físico-químicas, sensoriais ou atributos biológicos aos produtos comerciais (ADJONU et al., 2014; MCCLEMENTS, 2012). Em muitas aplicações industriais, é desejável fazer a síntese biológica de nanopartículas, usando ingredientes naturais, envolvendo o uso de microrganismos, processos denominados “química verde”, de modo a desenvolver produtos com rótulos aceitáveis (DAE; INGLE; RAI, 2013; GHOLAMI-SHABANI et al., 2014).

A produção de biossurfactante é influenciada por vários fatores, dentre eles: a seleção do microrganismo, fatores nutricionais do meio (fontes de carbono, nitrogênio e salinidade) e os fatores ambientais (pH, temperatura, tempo de cultivo e agitação), que influenciam a quantidade e o tipo de biossurfactante produzido. Diferentes fontes de carbono (diesel, gasolina, glicose, sacarose, glicerol) e fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de amônio e ureia) estão sendo estudados como bons substratos para a produção de biossurfactante (HE et al., 2016; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015).

Ainda que, inúmeras vantagens e aplicações dos biossurfactantes sejam apresentadas, um dos problemas existentes está relacionado ao alto custo e baixo rendimento durante a produção. Para a viabilização econômica do processo é necessário que, seja realizado estudo de otimização do sistema de produção, com o desenvolvimento de processos mais baratos, com substratos de baixo custo e microrganismos adaptados a condições extremas de cultivo, bem como, o desenvolvimento de sistemas mais eficientes de recuperação de produto, visando torná-los mais atrativos ao mercado (MUKHERJEE et al., 2008). Assim, o uso de abordagens estatísticas tem sido os mais eficazes para a otimização desses processos, na seleção de fatores com efeitos significativos (Plackett-Burman design), e no estudo dos efeitos e das suas

interações durante o processo de produção usando metodologia de superfície de resposta e planejamentos fatoriais (SIVAPATHASEKARAN et al., 2010).

O objetivo do trabalho foi o de prospectar potenciais microrganismos produtores de biossurfactante em amostra de solo de diferentes ecossistemas do Amapá (Amazônia oriental), bem como otimizar os fatores ambientais e nutricionais no processo de produção de biossurfactante usando diferentes planejamentos experimentais para síntese de nanoemulsões.

Capítulo 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 SURFACTANTES DE ORIGEM MICROBIANA PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

*(Capítulo publicado no Livro Tópicos Especiais em Biotecnologia e Biodiversidade, vol. 02
Editora CRV:Curitiba, 2018 – Anexo 1)*

1.1 Introdução

De acordo com Banat (2000) os compostos tensoativos ou surfactantes foram introduzidos na civilização pelos fenícios e, inicialmente eram produzidos a partir de gordura animal e óleo vegetal, sendo posteriormente sintetizados quimicamente. Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que agem nas interfaces de líquidos e em superfícies sólidas modificando a tensão superficial e interfacial. A porção apolar do surfactante é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não iônica ou anfotérica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Esses compostos constituem uma importante classe de produtos químicos largamente utilizados na indústria moderna, com aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, petroquímica e alimentícia, uma vez que atuam como dispersantes e/ou solubilizantes de compostos orgânicos que apresentam baixa solubilidade em água, devida a capacidade desses reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases, permitindo a mistura ou dispersão imediatamente como emulsões em água (BANAT, 2000). Além dessas características, esses compostos podem apresentar outras propriedades, tais como: detergência, umectabilidade, poder espumante e atividade antimicrobiana (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998).

A eficácia dos surfactantes segundo Mulligan (2005) é determinada através da capacidade do surfactante reduzir a tensão interfacial (energia livre entre as fases) e superficial (energia livre da superfície por unidade de área, ou seja, energia necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície). Essa eficácia pode ser medida através da Concentração Micelar Crítica (CMC), que é definida como concentração mínima de surfactante que permitirá a formação de micelas e conferirá as propriedades de detergência e solubilização ao composto tratado.

A grande maioria dos surfactantes em uso atualmente são da base petroquímica. Entretanto, com os avanços na área de biotecnologia e também com o aumento da preocupação com meio ambiente, pesquisas com biossurfactantes vem sendo impulsionadas, pois esses metabólitos apresentam alta diversidade química e de propriedades, baixa toxicidade, maior seletividade, biodegradabilidade com melhor compatibilidade ambiental, boa atividade em condições extremas de pH e salinidade, além de serem sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (DESAI; BANAT, 1997). Quando comparados com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes são ecologicamente mais aceitos, devido a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade na natureza, sendo tão eficientes quanto os surfactantes sintéticos (PEIXOTO, 2008).

De acordo com Barbosa, Gondin e Paz (2007) os biossurfactantes são metabólitos sintetizados por uma variedade de microrganismos, apresentando diferentes estruturas químicas e propriedades surfactantes, ou seja, apresentam diferentes funções naturais com diferentes aplicações industriais. De acordo com Banat (2000), Maier e Soberón-Chavez (2000) e, Desai e Banat (1997) há diversas aplicações industriais promissoras. No segmento alimentício, por exemplo, os biossurfactantes são utilizados no desenvolvimento de diferentes produtos que atendem os pré-requisitos funcionais para serem novos aditivos alimentares (BLOOMBERG, 1999).

Os biossurfactantes podem também ser aplicados em formulações de fármacos e cosméticos, produtos alimentícios, agrícolas, em processos especiais de recuperação de petróleo, recuperação e proteção ao meio ambiente (SAEKI et al., 2009; THANOMSUB et al., 2006), bem como, na remoção de íons metálicos tóxicos em processo de tratamento de efluente por flotação (ZOUBOULIS et al., 2003). Os biossurfactantes são produzidos por microrganismos para que esses cresçam em substratos hidrofóbicos, disponibilizando os nutrientes ali presentes para o seu metabolismo. De acordo com Barbosa (2011) e Strelec (2006) a produção desses metabólitos está ligada a fatores de virulência e a formação de biofilme. Devido à vasta aplicabilidade dos biossurfactantes, diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de gerar novas tecnologias para melhorar as linhagens de microrganismos, bem como, os processos de produção (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

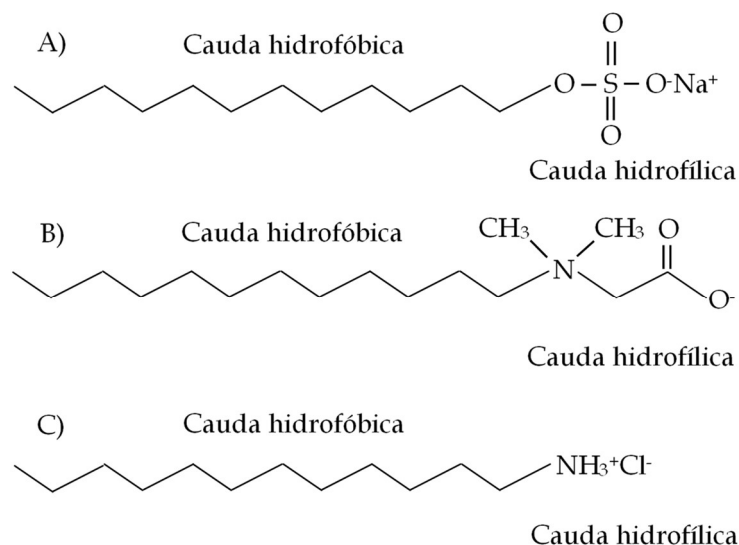
1.2 Surfactantes

O termo surfactante segundo Barros et al. (2007) vem da contração da expressão *Surface active agent*, que significa agente de atividade superficial. Esses compostos de acordo com

Silva et al. (2009) possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial em fluidos imiscíveis. A tensão superficial está relacionada com as forças de atração e repulsão entre as moléculas de um fluido. Para manter as moléculas coesas na superfície líquida, estas exercem uma força de atração intermolecular forte sobre as moléculas mais próximas da superfície, denominada tensão superficial (VERA, 2017).

Dentro de uma importante classe química, os surfactantes são amplamente utilizados em diversos setores industriais. Os surfactantes apresentam duas porções distintas, uma porção hidrofóbica (apolar) e uma porção hidrofílica (polar). A porção apolar é constituída geralmente por uma cadeia hidrocarbonada (ex. cadeias alifáticas, grupos policíclicos ou aromáticos). A porção polar, pode ser iônica, não-iônica ou anfotérica (ex. ésteres sulfatados ou sulfatos de ácido graxos e sais de amônio quaternário (PEIXOTO, 2008; LIMA, 2007; NITSCHKE; PASTORE, 2002). A Figura 1-1 apresenta a estrutura de alguns surfactantes.

Figura 1-1 Exemplos de surfactantes sintéticos utilizados na indústria. Estrutura do: A) Dodecil Sulfato de Sódio (surfactante aniônico); B) Cloreto de dodecilamônio (Surfactante catiônico) e C) N-dodecil-N, N dimetilbetaína (Surfactante anfôtero).



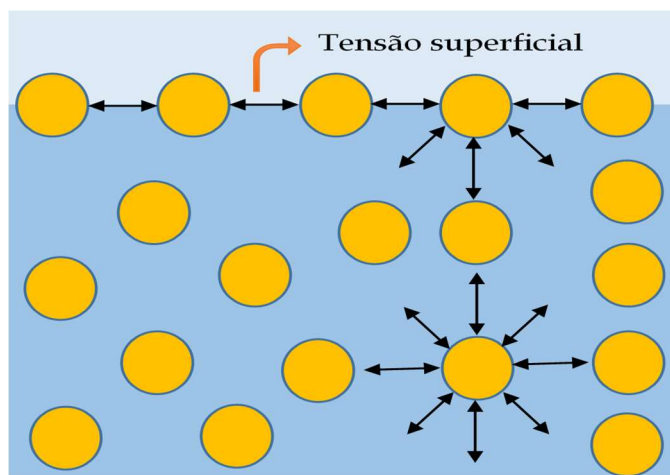
Fonte: Adaptado de Barbosa (2004).

Os surfactantes por apresentarem em sua estrutura química grupos polares (grupo hidrofílico) e apolares (grupo hidrofóbico) tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A redução da tensão superficial e interfacial se deve a formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, o que caracteriza a esses compostos propriedades únicas. Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo:

detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A maior utilização dos surfactantes se concentra na indústria de produtos de limpeza (sabões e detergentes), na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ, 2010; BARROS et al., 2007).

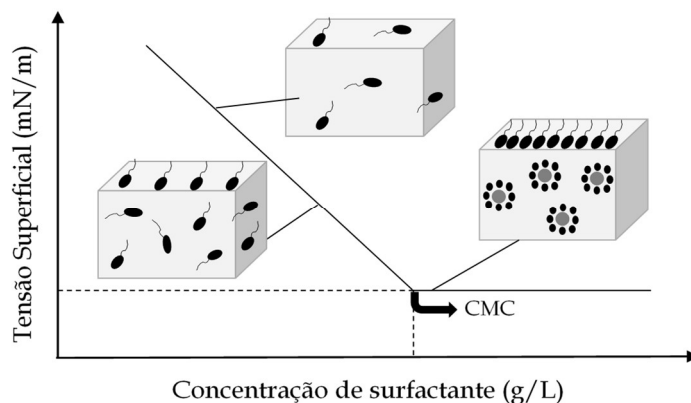
A tensão superficial entre as interfaces dos sistemas (ar/água, óleo/água), conforme exemplo na Figura 1-2, podem ser medidas facilmente utilizando um tensiômetro (DESAI; BANAT,1997). Van Hamme e Urban (2009) afirmam que, quando um surfactante é adicionado a esses sistemas em concentrações crescentes, observa-se uma redução da tensão superficial até um valor crítico. Essa quantidade de surfactante é conhecida com Concentração Micelar Crítica (CMC), e é usada para medir a eficiência do surfactante. A partir da CMC, a adição de surfactante não afeta significativamente a tensão superficial do sistema (Figura 1-3).

Figura 1-2 Tensão superficial entre as interfaces em um sistema bifásico.



Fonte: Adaptado de Piróllo (2006).

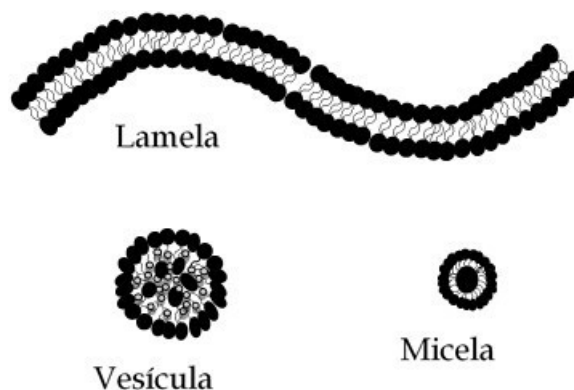
Figura 1-3 Ação do surfactante e formação de micelas (Concentração Micelar Crítica).



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016).

Uma vez que a Concentração Micelar Crítica do surfactante adicionado ao sistema tenha sido atingida (Figura 1-3), as moléculas se associam formando micelas, vesículas esféricas ou irregulares e lamelas (bicamadas contínuas), conforme pode ser observado na Figura 1-4.

Figura 1-4 Estruturas básicas formadas por biossurfactantes



Fonte: Adaptado de Champion et al. (1995)

Com a adição do surfactante em meio aquoso, a porção hidrofóbica do mesmo se agrupa sobre a superfície do líquido, a fim de minimizar as interações energéticas das moléculas polares da água. Esse processo ocorrerá até a superfície líquida saturar, a partir de então, as pontes de hidrogênio que promovem a alta tensão superficial do líquido são rompidas, e a tensão superficial (líquido-ar) ou interfacial (líquido-líquido) tendem a baixar (SOBERÓN-CHÁVEZ; MAIER,2011; VANHAMME; URBAN,2009; MULLIGAN,2009). Na Tabela 1-1 é apresentada a relação de alguns surfactantes de uso comum e sua concentração micelar crítica.

Tabela 1-1 Concentração Micelar Crítica (CMC) e número de agregação (N) para surfactantes de uso comum.

Surfactante (Abreviação)	CMC (mmol/L)	N
Aniônico		
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	8,1	62
Octil sulfato de sódio (SOS)	1,36	20
Catiônico		
Cloreto de hexadecil-trimetil-amônio (CTAC)	1,3	78
Brometo de dodecil-trimetil-amônio (DTAB)	15	50
Anfotérico		
n-dodecil sultaína (SB-12)	1,2	-
Não iônico		
Poliexietileno-1-octifenol (Triton X-100)	0,2	143

Fonte: Adaptado de Tavares (1997).

Apesar dos primeiros surfactantes terem sido obtidos a partir de gorduras animais e óleos vegetais (fontes renováveis), atualmente a grande maioria é de origem sintética (BUENO; SILVA; GARCIA-CRUZ,2010). Contudo, com a atual preocupação com o meio ambiente, vem crescendo a necessidade de buscar novas fontes de surfactantes de origem microbiana. Os

surfactantes de origem microbiana (biossurfactantes) possuem baixo impacto ao meio ambiente, devido a sua natureza biodegradável (LIMA,2007; NITSCHKE; PASTORE,2002).

1.3 Biossurfactantes

Nos últimos anos houve um aumento no interesse em isolar microrganismos produtores de biossurfactante com baixa CMC, baixa toxicidade e alta atividade emulsificante (CAMPOS et al., 2013). De acordo com Silva et al. (2014), diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos, são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares e atividade superficial. Os biossurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana, as principais classes incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados.

O mercado mundial de biossurfactantes em 2017 foi de US \$ 4,20 bilhões e deverá atingir US \$ 5,52 bilhões até 2022, ou seja, uma expectativa de crescimento de 5,6% de 2017 a 2022. Esse crescimento está relacionado com a crescente conscientização dos consumidores, fomentada pelas organizações reguladoras internacionais. Existe uma crescente demanda por parte de diversos segmentos industriais, para o desenvolvimento de soluções verdes, em busca de produtos de uso final (100% de biodegradáveis), com baixo custo. No entanto, quando comparado aos surfactantes químicos convencionais, os biossurfactantes ainda apresentam um custo maior, principalmente devido o processo de produção. Esse fator tem causado uma grande restrição no uso desses no mercado global (BUSINES WIRE, 2018).

1.4 Microrganismos produtores de biossurfactantes

Os biossurfactantes foram primeiramente isolados de espécies de *Pseudomonas aeruginosa*, descritos por Jarvis e Johnson (1949). Atualmente sabe-se que os biossurfactantes podem ser sintetizados por bactérias e fungos a partir de vários substratos, incluindo açúcares, glicerol, óleos, hidrocarbonetos e resíduos agrícolas (KHOPADE et al., 2012).

Os metabólitos mais amplamente estudados são os ramnolipídeos. Na literatura é descrito que os melhores produtores de biossurfactante são do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*, como exemplo *B. subtilis* (AL-WAHAIBI et al., 2014; GUDIÑA et al. 2015), *B. licheniformis* (EL-SHESHTAWY et al., 2015) e *P. aeruginosa* (MENDES et al., 2015). Contudo, atualmente várias leveduras são descritas como produtora de biossurfactante, principalmente as do gênero

Candida, como a *C. ingens* (AMÉZCUA-VEGA et al., 2007), *C. bombicola* (FELSE et al., 2007; DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2011), *C. rugosa* (CHANDRAN; DAS, 2011), *C. phaeirica* (LUNA et al., 2012) e *Candida lipolytica* (SARUBBO et al., 2001; MENDES et al., 2015). Outros exemplos são citados por Santos et al. (2016): *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, que apresentam bons resultados na produção de biossurfactante além de possuírem o status de GRAS (Generally Recognized as Safe), ou seja, geralmente reconhecidas como seguras. Na Tabela 1-2 é apresentada uma lista com as classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos na sua produção.

Alguns microrganismos sintetizam biossurfactante a partir de substrato solúveis e insolúveis, como o *Paenibacillus alvei* ARN63 (NAJAFI et al., 2011), *Candida sphaerica* (LUNA et al., 2012), *Trichosporon montevidense* (MONTEIRO et al., 2011) e *Pseudomona aeruginosa* UCP0992 (SILVA et al., 2010), além de fungos como *Aspergillus ustus* MSF3 (KIRAN et al., 2009).

Tabela 1-2 Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos.

Tipo de biossurfactante	Microrganismo	Tipo de biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos		Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídeos	
Ramnilipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>	Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp.	Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas		Surfactantes poliméricos	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>		
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>		

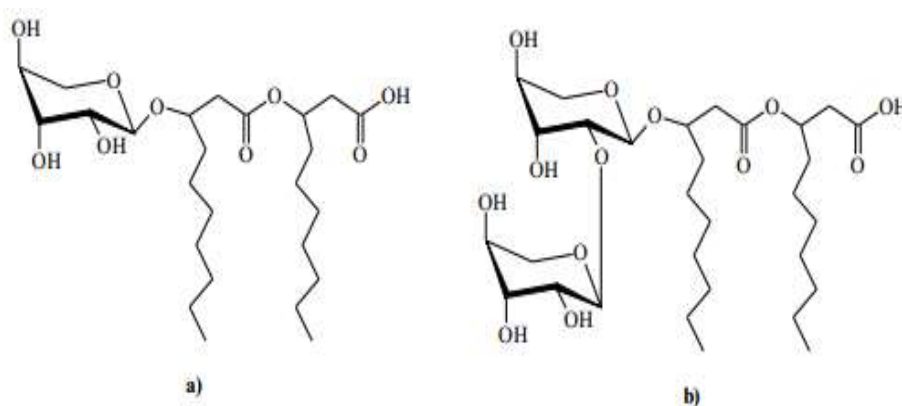
Fonte: Adaptado de Nitschke & Pastore (2002).

Segundo Muller e Hausman (2001) os ramnilipídeos são biossurfactantes glicolipídeos, produzidos por várias espécies de bactérias que apresentam em sua estrutura ramnose e ácido β -hidroxidecanóico. Sua descrição foi realizada parcialmente pela primeira vez por Bergstrom et al. (1946), que denominou o glicolipídeo oleoso produzido por *Pseudomonas pyocyanea* (reclassificada posteriormente em *Pseudomonas aeruginosa*) como ácido piolipídico, e identificou suas unidades estruturais como sendo a ramnose e o ácido β -hidroxidecanóico. Três

anos depois Jarvis e Johnson (1949) determinaram a real proporção dessas unidades estruturais no ácido piolipídico, demonstrando que através de uma ligação glicosídica, dois ácidos β -hidroxidecanoico encontram-se ligados a duas moléculas de ramnose.

Segundo Abdel-Mawgoud et al. (2010), os principais ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* são o ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (monorramnolipídeo) e o ramnosil-ramonosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (dirramnolipídeo). As estruturas moleculares desses ramnolipídeos são apresentadas na Figura 1-5.

Figura 1-5 Estrutura de biossurfactantes: a) Monorramnolipídeo; b) Dirramnolipídeo.

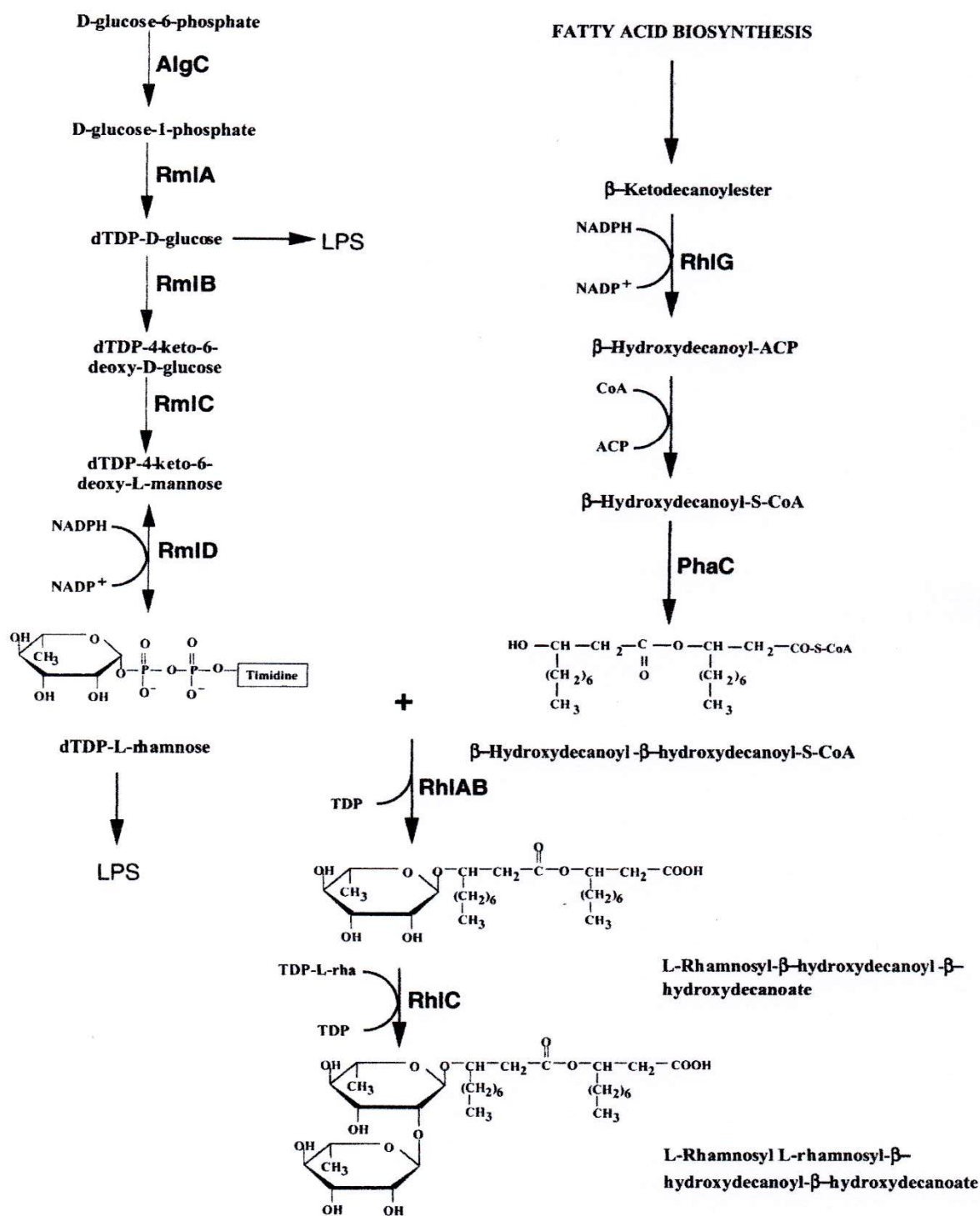


Fonte: Silva (2008)

A biossíntese destas moléculas tensoativas de ramnolipídeos ocorre por meio duas reações sequenciais de transferência de rhamnosil. Cada uma dessas reações é catalisada por uma rhamnositransferase específica (Rt 1 e Rt 2, respectivamente), com a ação de desoxi-timidina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-Rhamnose) como o doador de rhamnosil e β -Hydroxydecanoil- β -hidroxidecanoato ou monorhamnolipídeo atuando como os respectivos recipientes Maier e Soberón-Chaves (2000 apud BURGUER et al. 1963, 1966), conforme pode ser observado na Figura 1-6.

Figura 1-6 Rotas metabólicas para produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

***Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosynthetic pathway**



Fonte: Maier e Soberón-Chaves (2000).

1.5 Propriedades dos Biossurfactantes

A exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não foi totalmente elucidada. Entretanto algumas funções vêm sendo atribuídas a essas moléculas, tais como: a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água; transporte de hidrocarbonetos; aderência-liberação de células a superfícies e atividade antibiótica (NITSCHKE; PASTORE,2002).

De acordo com Desai e Banat (1997) e, Nitschke e Pastore (2002) embora os biossurfactantes apresentem composição química e propriedades diversas, algumas características são comuns. Essas características tornam os biossurfactantes comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (VAN DYKE; LEE; TREVORS,1991). Os biossurfactantes apresentam ainda a vantagem de serem sintetizados a partir de substratos renováveis. De acordo com Nitschke e Pastore (2002) modificações da estrutura química e das propriedades físicas dos biossurfactantes podem ser realizadas por meio de manipulações genéticas, biológicas ou químicas que permitiria o desenvolvimento de produtos para necessidades específicas.

Bognolo (1999) afirma que são muitas as características dos biossurfactantes que tornam essas moléculas vantajosas em relação aos surfactantes. Na Tabela 1-3 são discriminadas as características e as vantagens dos biossurfactantes quando comparados aos surfactantes.

Tabela 1-3 Propriedades e vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes convencionais.

Propriedade	Vantagens
Atividade superficial e interfacial	São mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais, pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações.
Tolerância a altas variações de temperatura e pH	Alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e alterações de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. Exemplo: O lipopeptídeo de <i>B. licheniformis</i> JF-2 é estável a temperaturas em torno de 75°C por até 140 h e em pH entre 5 e 12.
Tolerância a altas concentrações de sal	Suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes.
Biodegradáveis	São facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos
Baixa toxicidade	Sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos

Fonte: Adaptado de Nitschke e Pastore (2002)

A surfactina, da classe dos lipopeptídeos, é um exemplo de biossurfactante que vem sendo muito estudado na última década (BARROS et al., 2007). Esse biossurfactante possui baixa CMC, ou seja, elevado poder de reduzir a tensão superficial, além de apresentar diversas funções biológicas, tais como: ação bactericida e fungicida; função antiviral; agente antitumoral; Inibidor da formação de coágulos fibrinosos; antimicoplasmático; e veículo para a administração de drogas via pulmonar.

1.6 Aplicações industriais dos biossurfactantes

O interesse global na produção de biossurfactantes está relacionado a ampla aplicação dessas moléculas em diferentes setores industriais, como: farmacêutico, de cosméticos, de limpeza, de higiene pessoal, médico-hospitalar, alimentício, de tintas e têxtil (EL-SHESHTAWY et al., 2015), de proteção ao meio ambiente e de agricultura (BANAT et al., 2010; RUFINO et al., 2011). Outras aplicações incluem ainda a biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo.

A grande diversidade de aplicações dos biossurfactantes está relacionada há algumas propriedades, tais como: detergência, lubrificação, capacidade espumante, solubilização, dispersão de fases, adesividade bacteriana e antibiótica, que são imprescindíveis para aplicação desses nos segmentos industriais citados anteriormente (BANAT et al., 2010; RUFINO et al. 2011).

Na área médica foi evidenciada a importância do uso dos biossurfactantes por apresentarem atividade antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (PRIYA; USHARANI, 2009; CHEN et al., 2011; GEIN et al., 2011; ARAUJO et al., 2016; KATZ et al., 2018). Alguns trabalhos reportam a inibição na adesão de algumas bactérias patogênicas a partir do uso de moléculas tensoativas (Raminolípídeos e Surfactina), tais como: *Listeria monocytogenes* (ARAUJO et al., 2016), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* (GOMES; NITSCHKE, 2012) e inibição na formação de biofilme de *Pseudomonas putida* (KATZ et al., 2018). Magalhães e Nitschke (2013) também demonstraram a atividade antimicrobiana de rhamnolípídeos contra *Listeria monocytogenes* e sua interação sinérgica com a nisina.

Na área agrícola a exploração do uso de biossurfactantes pode ser útil na melhoria da qualidade e produtividade. Segundo Nitschke e Pastore (2002) os biossurfactantes são usados

na agricultura especialmente em formulações de herbicidas, pesticidas e no controle biológico de fitopatógenos.

Os biossurfactantes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. De acordo com Nitschke e Pastore (2002) e Bezza, Evans e Chirwa (2016) o uso de biossurfactantes demonstraram o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis, tais como os compostos policíclicos (HPA), fenantreno e naftaleno, resultando em um aumento nas taxas de mineralização e solubilização, bem como a degradação de pesticidas organoclorados como DDT (diclorodifeniltricloroetano) e ciclodienos.

Os biossurfactantes podem ser ainda utilizados na limpeza de tanques de óleos, em substituição aos surfactantes convencionais. Segundo Banat et al. (1997) a utilização de biossurfactantes promoveu a recuperação de 90% dos hidrocarbonetos presentes em resíduos. A Tabela 1-4 é apresentado um resumo das funções e aplicações industriais dos biossurfactantes.

Tabela 1-4 Aplicações dos biossurfactantes para uso comercial.

(Continua)		
Indústria	Aplicação	Função dos biossurfactantes
Meio ambiente	Biorremediação; Operação de	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, dispersão de óleos, solubilização de óleos, molhamento, espalhamento, detergência, formação de espuma, inibição de corrosão em óleos e equipamentos, lavagem do solo.
	limpeza de derramamento de óleo; Descontaminação de solo.	
Petróleo	Recuperação melhorada; Desemulsificação.	Emulsificação de óleos, redução da tensão interfacial, desemulsificação de emulsões de óleo, solubilização de óleos, redução de viscosidade, dispersão de óleos, molhamento de superfícies sólidas, espalhamento, detergência, formação de espuma, inibição de corrosão em óleos combustíveis e equipamentos.
Mineração	Remoção de metais pesados; Remediação de solos; Flotação.	Molhabilidade e agente espumante, remoção de íons metálicos de soluções aquosas, solo e sedimentos, sequestrantes de metais pesados e inibição de corrosão em óleos
Alimentícia	Emulsificação e desemulsificação; Ingrediente funcional	Solubilização de óleos aromatizados, controle de consistência, emulsão, agente molhante, espalhamento, detergência, espuma, espessante.

Tabela 1-4. Aplicações dos biossurfactantes para uso comercial.

(Conclusão)		
Indústria	Aplicação	Função dos biossurfactantes
Medicina	Microbiológica; Farmacêutica e terapêutica.	Agentes antiaderentes, agentes antifúngicos, agentes antibacterianos, agentes antivirais, vacinas, terapia genética, moléculas imunomoduladoras.
Agricultura	Biocontrole; Fertilizantes.	Molhagem, dispersão, suspensão de pesticidas em pó e fertilizantes, emulsão de soluções de pesticidas, facilitação de mecanismos de biocontrole de micróbios, eliminação de patógenos de plantas e aumento da biodisponibilidade de nutrientes para micróbios benéficos associados a plantas.
Cosméticos	Produtos de beleza e saúde	Emulsificação, agentes espumantes, solubilização, agentes molhantes, produtos de limpeza, agentes antimicrobianos, mediadores da ação enzimática.
Higienização	Detergentes para lavagem	Detergentes e desinfetantes para lavagem, molhagem, espalhamento, inibição de corrosão.
Têxteis	Preparação de fibras;	Molhamento, penetração, solubilização, emulsão, detergência e dispersão, molhagem e emulsificação em formulações de acabamento, amaciamento.
	Tingimento e impressão;	
	Acabamento de têxteis	
Nanotecnologia	Síntese de nanopartículas	Emulsificação, estabilização

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2016).

1.7 Considerações finais

Os biossurfactantes apresentam muitas vantagens quando comparados com os surfactantes derivados de petróleo, além de apresentarem potencial para aplicações em diversas áreas industriais, tais como: de meio ambiente, de petróleo, alimentícia, de mineração, em processos de higienização, na área médica, na nanotecnologia entre outras. Contudo, tem sua utilização limitada devido ao alto custo de produção, que pode ser significativamente reduzido através da bioprospecção de novas cepas produtoras, da otimização de processos industriais e do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo.

2 SÍNTESE E ESTABILIDADE DE NANOEMULSÕES

2.1 Introdução

A maior parte dos surfactantes utilizados nas indústrias é derivada do petróleo. Contudo, nos últimos anos houve um aumento na demanda por produtos menos agressivos ao meio ambiente e, conseqüentemente, observou-se um aumento no interesse por surfactantes de origem microbiana, denominados de biossurfactantes (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Esses compostos apresentam diversas vantagens sobre os surfactantes convencionais, tais como: baixa toxicidade, tolerância à altas temperaturas, tolerância a oscilações de pH, além de serem biodegradáveis na água e no solo (LIN, 1996). Nas últimas décadas a prospecção de biossurfactantes produzidos por diversos microrganismos tem sido amplamente estudada, e essas apresentaram resultados relevantes para diversas aplicações (DONIO et al. 2013; DUBEY et al., 2012; MARTI et al., 2014).

De acordo com Dar, Ingle e Rai (2013) e Gholami-Shabani et al. (2014), nos últimos anos também houve uma crescente necessidade de desenvolver processos, denominados “química verde”, como por exemplo a síntese biológica de nanopartículas envolvendo o uso de microrganismos.

O uso de microrganismos para a biossíntese de nanomateriais apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos e tem despertado grande interesse do setor industrial, principalmente por causa do potencial de torna-se uma fonte inesgotável de nanopartículas para diversas aplicações (SYED et al., 2013; GADE et al., 2008). Nanopartículas metálicas, por exemplo apresentam novas propriedades magnéticas, eletrônicas e óticas, que variam de acordo com o tamanho, forma e composição, e por isso, vem sendo amplamente estudadas por meio da biossíntese (MONTAZER; PAKDEL; MOGHADAM, 2010). Entre esses materiais, merece destaque as nanopartículas de prata (AgNPs), que são aglomerados de átomos de 1 a 100 nm (CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010), e são as mais estudadas.

Segundo Jiang et al. (2006) uma das características atraentes das nanopartículas de prata durante a sua manipulação está relacionada a sua condutividade elétrica. Khatoon, Ahmad e Sardar (2015) destacam que além dessa característica, as nanopartículas de prata também apresentam estabilidade química e catalítica e, ação antimicrobiana. A atividade antimicrobiana das nanopartículas de prata é distinta de outros materiais por apresentar baixa toxicidade em células humanas em baixas concentrações e, por isso estão sendo utilizadas há muito tempo como agente de purificação de água e como agente antisséptico (KUMAR et al., 2014).

Atualmente, a nanop prata é provavelmente o nanomaterial mais comercializado no mundo para diversas aplicações, tais como: antimicrobianos, na indústria têxtil (DASTJERDI; MONTAZER, 2010) em sistemas de purificação de água, cosmético, dispositivos médicos e eletrodomésticos (SINTUBIN; VERSTRAETE; BOON, 2012), e em imagiologia biológica (JAIN et al., 2008).

Segundo Quester, Avalos-Borja e Castro-Longoria (2013), no caso da biossíntese de nanopartículas de prata, algumas características que são consideradas gargalos no seu processo de produção, tais como: controle do crescimento do microrganismo, controle do tamanho da partícula e ampliação de escala. Apesar disso, a implementação desses processos ditos sustentáveis é uma tendência na produção de nanopartículas (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009).

Vários métodos são descritos na literatura como eficientes na produção de nanopartículas, incluindo processos físicos e químicos, como a atomização ou moagem (DURASAMY; HONG; CHOI, 2013), síntese em fase líquida (HARADA et al., 2013), síntese em alta temperatura, condensação em fase de vapor, fotorredução e microemulsões de água-em-óleo (MONTAZER et al., 2012; SINTUBIN; VERSTRAETE; BOON, 2012) e síntese fotoquímica (HARADA et al., 2009). Outros métodos químicos também podem ser utilizados, contudo, devido ao alto custo com reagentes, alto consumo de água, instabilidade das nanopartículas e geração de efluentes tóxicos ao meio ambiente, vem sendo menos utilizados ou até mesmo abolidos (ZHANG et al., 2011; SINTUBIN; VERSTRAETE; BOON, 2012).

A busca por processos de “produção verde” denominados “ecoeficientes” é uma necessidade nos dias atuais, devendo ser priorizada o uso de tecnologias que proporcionem a redução no impacto ambiental, bem como, a redução de custos e a obtenção de produtos ecologicamente corretos. De forma geral, a nanobiotecnologia vem concentrando sua atuação na biossíntese de nanopartículas a partir de sistemas biológicos.

2.2 Nanotecnologia

O primeiro cientista a sugerir o desenvolvimento de dispositivos e materiais em escala atômica foi Richard Feynman em 1959, introduzindo o conceito de nanotecnologia na comunidade acadêmica. No mesmo ano Feynman descreveu com grande propriedade na conferência “There is plenty of room at the bottom” (Há bastante espaço no fundo) a possibilidade de manipular átomos em escala jamais explorada. De acordo com Moraes et al. (2014) foi a partir desse evento, que nasceu o conceito prévio de nanotecnologia como a ciência

e engenharia envolvidas na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos cuja menor organização funcional em pelo menos uma dimensão está na escala nanométrica.

Apesar de Feynman sugerir o desenvolvimento de dispositivos e materiais em escala nanométrica em 1959, somente em 1974 o termo nanotecnologia foi usado pela primeira vez por Norio Taniguchi, quando descrevia as tecnologias usadas na construção de materiais na escala nanométrica. A visão de Taniguchi, aponta para a manipulação de átomo a átomo para a produção de novos materiais, até mesmo de máquinas nanométricas (*nanodevices*), como nanorrobôs e regeneradores de tecido (DREXLER, 1987). De acordo com Sahoo et al. (2007), a nanotecnologia está focada na caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica. Contudo, o campo tem se expandido de modo bastante mal definido e tende a incluir todas as estruturas muito pequenas cujo estudo ou manipulação era impossível ou impraticável até recentemente.

Uma definição mais ampla da nanotecnologia foi proposta por Bawa et al. (2005) que definiu a nanotecnologia como o “design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas pela manipulação controlada do tamanho e forma na escala nanométrica (1-100 nm) que produz estruturas, dispositivos e sistemas com pelo menos uma característica ou propriedade nova ou superior”. Clark e Pazdernik (2016) afirmam que em nanoescala aparecem alguns efeitos quânticos, que fazem os materiais se comportarem diferentemente, quando comparados com as suas propriedades originais.

A nanotecnologia tem avançado rapidamente nos últimos anos, sendo um campo da ciência multidisciplinar, atuando em diversos setores, tais como: setor de energia, de eletrônica, de cosméticos, medicina, indústria têxtil (DASTJERDI; MONTAZER 2010), em processos de purificação de água, em eletrodomésticos (SINTUBIN, VERSTRAETE; BOON 2012), e em sistema de geração de imagens biológicas (JAIN et al. 2008). Outras áreas destacadas por Nanowerk (2018), como: química, commodities, construção, meio ambiente, alimentos, informática e tecnologia da informação, engenharia de precisão e de transportes.

2.3 Nanobiotecnologia

A nanobiotecnologia é um dos ramos da nanotecnologia que funde a ciência dos materiais com as ciências biológicas, gerando conhecimento e produtos nas áreas biotecnológicas, farmacêuticas, médicas, de diagnóstico (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). Clark e Pazdernik (2016) destacam que os componentes internos das células biológicas

estão na escala nanométrica e, como consequência, as pesquisas têm voltado às atenções para a biologia molecular com o objetivo de obter estruturas, processos e informações úteis. Segundo Fortina et al. (2005), o termo nanobiotecnologia é recente e, trata-se da convergência entre duas vertentes científicas já existentes: a nanotecnologia e a biologia molecular.

Os principais objetivos da nanobiotecnologia estão relacionados com a utilização de componentes biológicos para realizar tarefas em nanoescala. Essas tarefas podem estar relacionadas com a aplicação não-biológica nas áreas de eletrônica e computação, e outras aplicáveis à biologia e a medicina (CLARK; PAZDERNIK, 2016). Koopmans e Anggeli (2010) acreditam que a nanobiotecnologia ainda é considerada por alguns como um paradigma, que está prestes a sofrer mudanças visando fornecer para a sociedade condição de vida com alta qualidade e sustentabilidade. Entre as diversas áreas de atuação da nanotecnologia destaca-se a manipulação de componentes biológicos, tais como: o uso de biochips agregados a células humanas, marcadores de células tumorais (JAIN, 2005), a utilização de nanopartículas para liberação de fármacos, uso de biossurfactantes oriundos de microrganismos para o tratamento de efluentes e, o uso de nanopartículas metálicas com propriedades antimicrobianas (ROCO et al., 2006; HULKOTI; TARANATH, 2014). Na Tabela 1-5 é apresentada uma síntese dos diversos campos de atuação da nanobiotecnologia.

Tabela 1-5 Síntese dos diferentes campos de atuação da nanobiotecnologia.

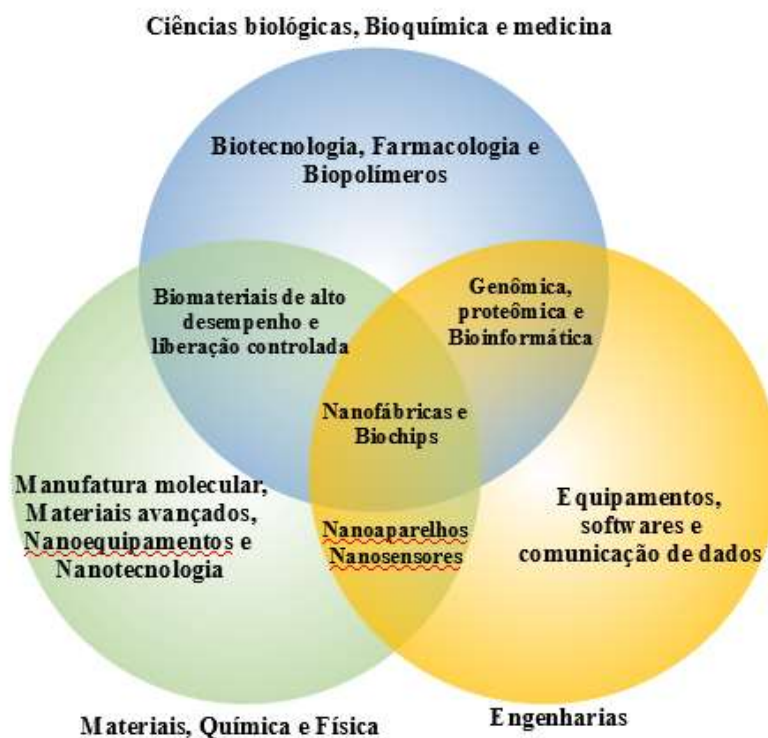
Relação de alguns campos da nanobiotecnologia	
Nanopartículas metálicas	Nanocanais
Pontos quânticos	Nanoporos
Nanocristais	Nanoflúidos
Lipopartículas	Nanoestruturados de silício
Nanopartículas magnéticas	Manipulação em nanoescala
Nanopartículas poliméricas	Microscopia de força atômica
Nanofibras	Microscopia de varredura por sonda
Nanofibras de carbono	Ressonância de Plasma de superfície
Dendrímeros	Sistema laser em femtossegundo
Nanocompósitos	Nanolipossomos
Nanovesículas	Nanotubos

Fonte: Adaptado de Jan (2011).

Na Figura 1-7 pode ser observada a interação das grandes áreas do conhecimento e como elas se comunicam para o desenvolvimento de novas tecnologias. A intersecção entre as áreas de ciência dos materiais, biológicas e engenharias com seus conteúdos e métodos voltados para

nanotecnologia, proporcionou a zona de convergência que representa o surgimento de ferramentas e produtos próprios da nanobiotecnologia.

Figura 1-7 A Interseção entre as áreas do conhecimento promoveu o surgimento da Nanobiotecnologia.



Fonte: Adaptado de Faria-Tischer e Tischer (2012).

Segundo Faria-Tischer e Tischer (2012) a principal diferença entre a nanobiotecnologia e a química de biomoléculas está na possibilidade de entender e visualizar os fenômenos na sua unidade básica, permitindo assim interferir ou mimetizar as ações da natureza. Goodsell (2004) afirma que identificar, caracterizar e demonstrar esses fenômenos, bem como desenvolver maneiras de produzir nanocompostos e reproduzir seu modo de operação é atribuição da nanobiotecnologia.

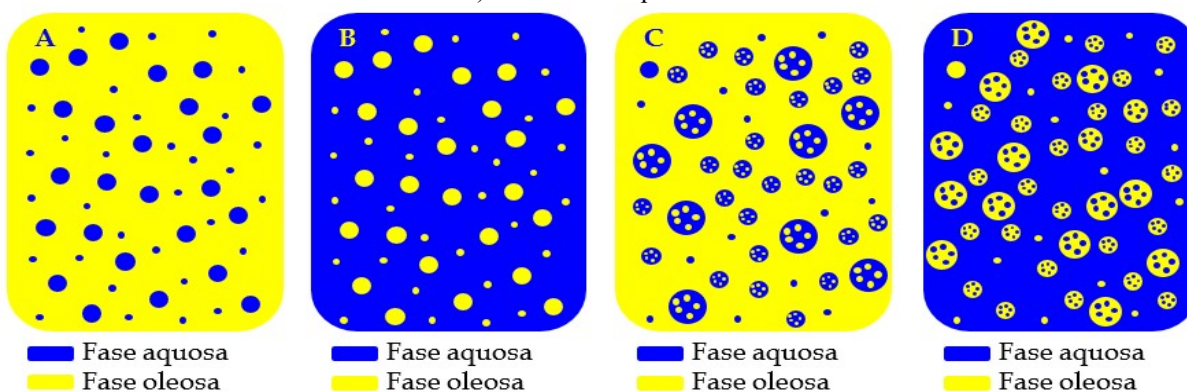
A nanobiotecnologia poderá suprir a demanda de produtos em diferentes áreas, tais como: a criação de sistemas de transporte de fármacos, sistema de detecção por meio de biomarcadores, nanossensores, biochips e copolímeros para auxiliar a restauração de lesões (THOMPSON, 2011). Por isso, acredita-se que a nanobiotecnologia proporcionará avanços significativos na medicina terapêutica e preventiva.

2.4 Nanoemulsões

Segundo McClements (2012) as nanoemulsões são sistemas coloidais que podem encapsular, proteger e liberar componentes bioativos lipofílicos. Esses sistemas são caracterizados por apresentarem duas fases, uma fase dispersa e outra fase contínua (COSGROVE, 2005). Normalmente são obtidas a partir de dois líquidos imiscíveis, onde um desses líquidos é disperso em nanogotículas. A principal diferença entre emulsões e nanoemulsões segundo Tenjarla (1999) está relacionada ao tamanho e formato das partículas dispersas na fase contínua: as partículas ou gotas presentes nas nanoemulsões são muito menores (5-200 nm) que das emulsões convencionais (1-20 μm). Visto que o tamanho das gotas em nanoemulsões são menores que 25% do comprimento de onda da luz visível, as nanoemulsões são transparentes.

As nanoemulsões, assim como as emulsões convencionais, podem se apresentar como sistema binários do tipo A/O e O/A (Figura 1-8A e 1-8B) ou ternários do tipo O/A/O e A/O/A (Figura 1-8C e 1-8D). Esses sistemas são termodinamicamente instáveis, e, portanto, não podem ser formados espontaneamente, sendo necessário fornecer energia ao sistema para que o processo ocorra. Tal energia pode ser proveniente de dispositivos mecânicos, como no caso dos métodos de alta energia e baixa energia, como por exemplo, emulsificação espontânea ou métodos por inversão de fase (MCCLEMENTS, 2012; SOLANS et al., 2005). As nanoemulsões estão sendo utilizadas na indústria farmacêutica, alimentícia e agroquímica.

Figura 1-8 Tipos de emulsões. A) Emulsão do tipo A/O; B) Emulsão do tipo O/A; C) Emulsão do tipo O/A/O; e D) Emulsão do tipo A/O/A.



Fonte: Adaptado de McCLEMENTS (2005)

Na indústria de alimentos as nanoemulsões estão sendo aplicadas para a encapsulação, proteção e liberação de ingredientes funcionais lipofílicos, tais como: lipídios biologicamente ativos, vitaminas lipofílicas, agentes conservantes, carotenoides e flavonoides,

nanoencapsulação de vitamina E (MAYER; WEISS; MCCLEMENTS, 2013), quercetina (KARADAG et al., 2013), curcumina (SUN et al., 2012) e β -caroteno (SALVIA-TRUJILLO et al., 2013).

Na agricultura, pesticidas, e reguladores de crescimento, formulados com nanoemulsões com esferas de 100 nm melhoram as características do espalhamento por spray do produto no implemento agrícola. Esse tipo de produto encontra incentivo para pesquisa e é listado como ponto estratégico para a bioindústria (FÓRUM DE COMPETITIVIDADE DE BIOTECNOLOGIA, 2006).

2.5 Síntese de nanoemulsões

Os métodos para formação de nanoemulsões são classificados de acordo com o consumo de energia no processo de emulsificação. Dessa forma, os métodos de baixa energia, fazem uso da energia química armazenada no sistema, enquanto os métodos de alta energia, usam energia mecânica para a formação das nanoemulsões (CONTENTE, 2016).

Métodos de alta energia na produção de nanoemulsões

Os processos de alta energia utilizam dispositivos mecânicos para gerar forças de cisalhamento para quebrar as estruturas da ordem de micrômetros em partículas nanométricas (SANTANA et al., 2013). Esses métodos utilizam aparelhos como agitadores de alta velocidade, homogeneizadores de alta pressão, geradores de ultrassom e microfluidizadores (LIU et al., 2006).

Nos processos de nanoemulsificação de alta energia ocorre inicialmente a mistura das fases, resultando em uma emulsão do tipo grosseira (gotículas grandes). Posteriormente, esta emulsão grosseira é forçada a passar por um sistema onde é submetida a forças de cisalhamento, que reduzirão o tamanho médio das gotículas (McCLEMENTS; RAO, 2011).

A utilização de alta energia é necessária porque a força de cisalhamento para quebrar as gotas grandes em gotículas menores deve ser superior à força de equilíbrio destas no sistema, ou seja, a força que mantêm as gotas na forma esférica. Tais forças de equilíbrio dão origem à denominada pressão de Laplace acima, que é representada pela Equação (1):

$$\Delta P = \frac{\gamma}{2r}$$

Equação 1

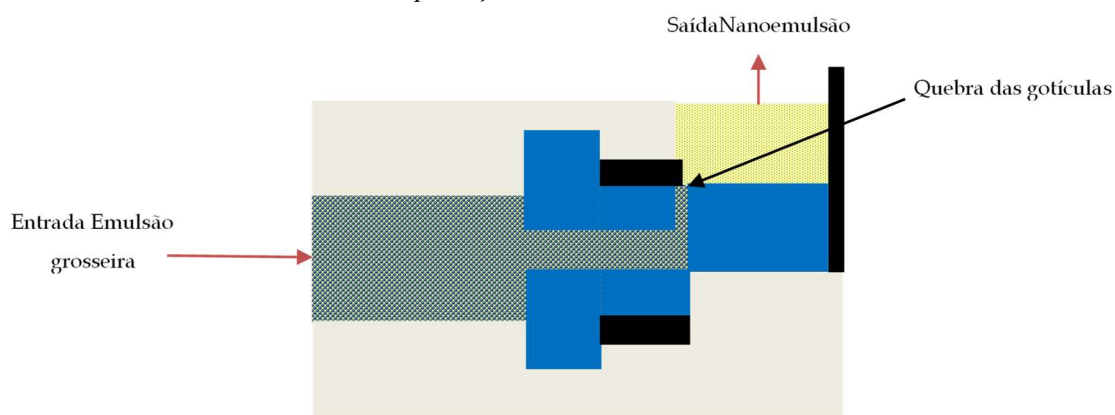
Onde: γ é a tensão interfacial entre a fase oleosa e aquosa e r é o raio das gotículas.

A equação 1 demonstra que a pressão de Laplace aumenta com a diminuição do raio das gotículas ou com o aumento da tensão interfacial entre as fases. De forma geral, quanto menor o for o raio, maior será a dificuldade para se continuar quebrando as gotículas no sistema (McCLEMENTS; RAO, 2011; SCHUBERT; BEHREND, 2003). Outros fatores também podem afetar a formação de pequenas gotículas sendo eles: a intensidade da força aplicada no processo de síntese, o fluxo de injeção da amostra, a intensidade de energia do equipamento, a temperatura do sistema, a composição da amostra injeta, o tipo e a concentração do agente tensoativo utilizado, bem como a tensão interfacial e viscosidade entre as fases do sistema (WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008; McCLEMENT; RAO, 2011).

a) Homogeinizadores de alta pressão

Neste processo, as gotas são quebradas ao serem forçadas a passar pela válvula de um homogeneizador (Figura 1-9). Os homogeneizadores a alta pressão reduzem o tamanho de gotículas pré-existent (emulsões grosseiras) por meio de forças intensas de cisalhamento.

Figura 1-9 Representação esquemática do sistema mecânico homogeneizador com válvula de alta pressão para produção de nanoemulsão.



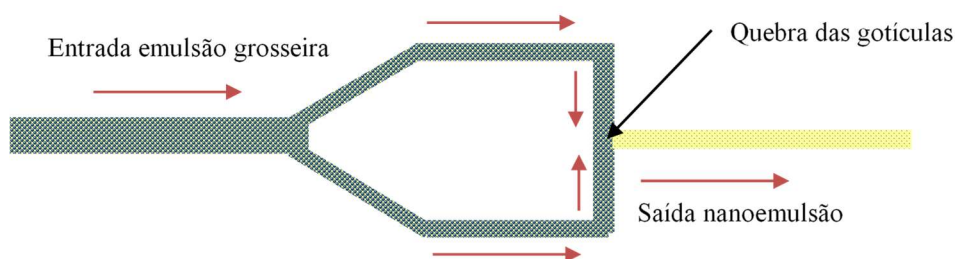
Fonte: Adaptado de McClements & Rao (2011)

A emulsão pode ser submetida ao processo de homogeneização diversas vezes. E normalmente, quanto maior o número de passagens pela válvula, ou ainda, quanto maior a pressão exercida, menores são as gotículas formadas (McCLEMENTS; RAO, 2011; SCHUBERT; BEHREND, 2003; SCHUBERT; ENGEL, 2004).

b) Microfluidizadores

Nos microfluidizadores a emulsão grosseira é forçada, por uma pressão elevada a escoar por dois orifícios, formando duas correntes que são direcionadas para uma câmara de interação, onde ocorre a colisão desses fluxos e forças de cisalhamento são geradas, levando à desestabilização das gotas e transformando-as em gotículas menores (Figura 1-10) (McCLEMENTS; RAO, 2011; HATANAKA et al., 2010; WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008).

Figura 1-10 Representação esquemática do mecanismo sistema microfluidizador para produção de nanoemulsão.

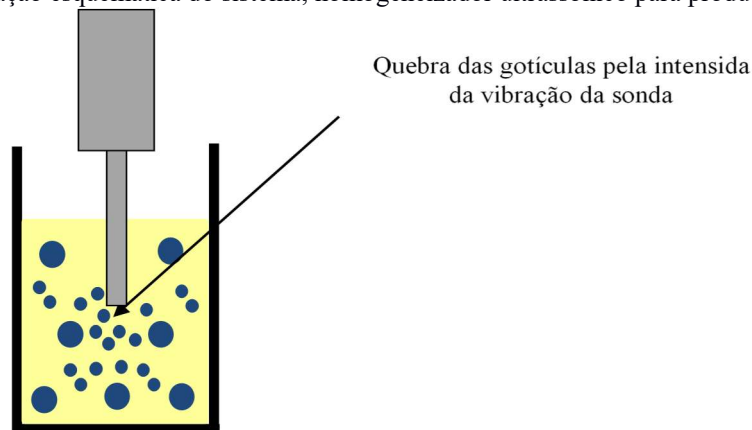


Fonte: Adaptado de McClements e Rao (2011)

c) Homogeneizadores ultrassônicos

Os homogeneizadores ultrassônicos utilizam alta intensidade de ondas ultrassônicas para gerar a força de cisalhamento necessária para quebrar a emulsão em pequenas gotículas (LEONG et al., 2009). Tais ondas são geradas por uma sonda colocada dentro dos líquidos a serem homogeneizados (Figura 1-11). Esta sonda gera vibrações que possibilitam a quebra das gotículas grosseiras em gotículas menores (LEONG et al., 2009; McCLEMENTS; RAO, 2011).

Figura 1-11 Representação esquemática do sistema, homogeneizador ultrassônico para produção de nanoemulsão.



Fonte: Adaptado de McClements & Rao (2011)

Métodos de baixa energia na produção de nanoemulsões

Os processos de baixa energia baseiam-se na formação espontânea de gotículas de óleo nos sistemas óleo-água-tensoativo, quando a solução ou as condições ambientais são alteradas, utilizando a energia química do próprio sistema. Os dois principais processos de baixa energia são, o de inversão de fase e o de emulsificação espontânea (ANTON; VANDAMME, 2009; SOLANS; SOLÉ, 2012).

Há uma crescente demanda na utilização desses métodos de baixo consumo de energia para produção de nanoemulsões para diversas aplicações industriais. De forma geral, esses métodos necessitam de equipamentos mais simples e apresentam menor custo de implantação (YANG et al., 2012). Além disso, possibilitam a produção de gotículas de diâmetros muito reduzidos (podendo chegar a 20 nm), o que favorece a encapsulação, proteção e liberação controlada de bioativos, tornando-os, portanto, mais eficazes que os métodos de alta energia quando a finalidade é essa aplicação específica.

Uma das possíveis desvantagens do método de baixa energia é a alteração das características dos produtos, tais como, modificações de textura e sabor (OSTERTAG; WEISS; McCLEMENTS, 2012; YANG et al., 2012). Adicionalmente, a utilização de grandes quantidades de tensoativo podem tornar os produtos impróprios para o consumo, o que limita o emprego desses métodos para diversas aplicações alimentícias (McCLEMENTS; RAO, 2011).

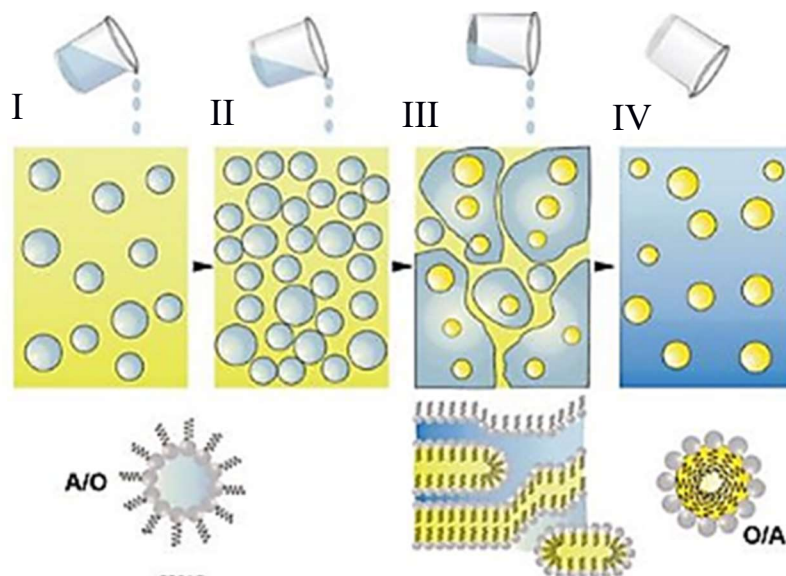
A produção de nanoemulsões por inversão de fases consiste na conversão de uma emulsão de óleo em água (O/A) para uma emulsão água em óleo (A/O) ou vice-versa. Dentre os principais métodos de inversão de fases, destacam-se o método da temperatura de inversão de fase (*Phase Inversion Temperature* - PIT) e do ponto de inversão da emulsão (*Emulsion Inversion Point* - EIP) (MAYER; WEISS; McCLEMENTS 2013; McCLEMENTS; RAO, 2011).

Esses métodos baseiam-se nas inversões de fase catastrófica ou transicional. A inversão catastrófica ocorre quando uma emulsão muda de O/A para A/O ou vice-versa devido a adição excessiva da fase interna. Podendo acontecer de forma rápida ou passar por uma evolução contínua (TYRODE et al., 2003; ZAMBRANO et al., 2003). A inversão de fase transicional ocorre devido a mudanças na temperatura, salinidade da fase aquosa, no balanço hidrofílico lipolítico (BHL), polaridade da fase orgânica que afetam a distribuição do tensoativo entre as ocorrendo assim a inversão (VAESSEN; STEIN, 1995).

a) Método de inversão catastrófica (Ponto de Inversão da Emulsão)

O método do ponto de inversão da emulsão ocorre por meio da inversão de fase catastrófica, onde a razão das fases oleosa/aquosa é alterada, enquanto as propriedades do tensoativo permanecem constantes. A representação esquemática do mecanismo de produção de nanoemulsões pelo método é apresentada na Figura 1-12.

Figura 1-12 Representação esquemática do método ponto de inversão de fase da emulsão (Etapas I, II, III e IV).



Fonte: (adaptado de McCLEMENTS; RAO, 2011).

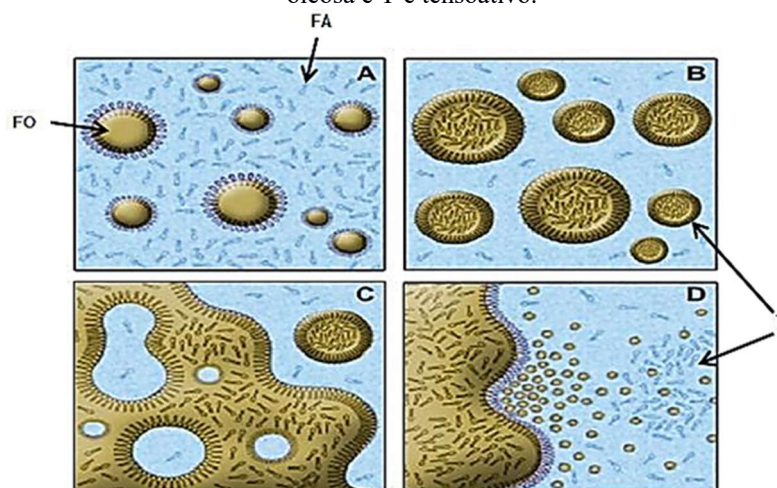
Na etapa inicial (Etapa I), ocorre a adição da fase aquosa em uma fase orgânica contendo óleo e um tensoativo hidrofílico (Figura 1-12). Para a adição de pequenas quantidades de adição da fase aquosa, gotas de água são formadas dentro da fase oleosa (emulsão A/O) (Etapa II). Uma vez que um teor de água crítico é excedido, a taxa de coalescência das gotículas de água excede a taxa de coalescência das gotículas de óleo, o equilíbrio entre a coalescência e a quebra das gotículas não pode mais ser mantido, ocorrendo a formação de emulsões múltiplas (Etapa III). Finalmente as fases se invertem e o sistema passa de uma emulsão A/O para O/A (Etapa IV) (SAJJADI; JAHANZAD; YIANNESKIS, 2004).

b) Método de inversão transacional (Temperatura de inversão de fase)

A emulsificação por temperatura de inversão de fase é um método de baixa energia, onde a temperatura do sistema é aumentada para alterar o padrão de solubilização do tensoativo de hidrofílico para lipofílico, formando microemulsões bicontínuas seguido pela inversão da

emulsão. Esse processo envolve quatro etapas segundo Anton e Vandamme (2009), conforme observado na Figura 1-13.

Figura 1-13 Formação de nanoemulsões utilizando o método temperatura de inversão de fases. Onde, FA é fase aquosa; FO é fase oleosa e T é tensoativo.



Fonte: Contente (2016)

- A) A temperatura está abaixo da temperatura de inversão de fase, o sistema se apresenta como uma macroemulsão e os surfactantes não iônicos estão com capacidade tensoativa hidrofílica.
- B) A temperatura é aumentada, assim, os tensoativos tornam-se gradualmente lipofílico e são solubilizados pela fase de óleo.
- C) São formadas microemulsões;
- D) O sistema é arrefecido rapidamente (choque térmico) e ocorre a formação das nanoemulsões.

Quando é realizado um rápido resfriamento ou aquecimento das emulsões formadas em uma temperatura adequada, podem formar emulsões cineticamente estáveis e com baixo índice de polidispersividade (SOLANS et al., 2005; EE et al., 2008).

Emulsificação espontânea

A preparação de nanoemulsões catiônicas contendo Oligonucleotídios (ON) através do procedimento de emulsificação espontânea e, o interesse desse procedimento reside, entre outros, na sua adequação para preparação de pequenos lotes de formulação, a temperaturas moderadas, em estudos de bancada e na possibilidade de funcionalização da interface das nanoemulsões, através da nanodeposição de polímeros pré-formados (TRIMAILLE et al., 2001;

TRIMAILLE et al., 2003; SILVA et al., 2006). A fase interna deve ser previamente solublizada em solvente orgânico, em seguida da retirada do solvente por destilação sob pressão reduzida ocorrendo a formação da nanoemulsão espontaneamente (BOUCHEMAL et al., 2004).

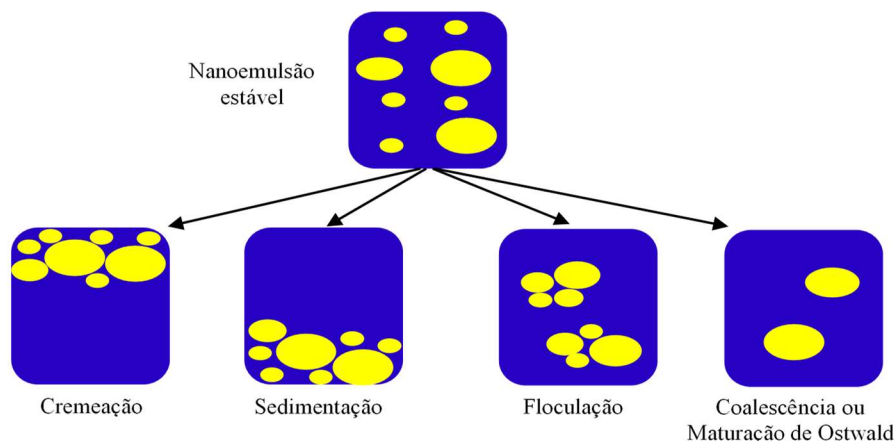
2.6 Estabilidade das nanoemulsões

Quando comparada com as emulsões convencionais, as nanoemulsões possuem maior estabilidade cinética. Entretanto, como consequência da maior área interfacial apresentam instabilidade termodinâmica. De forma geral a literatura ainda apresenta poucos estudos aprofundados sobre os fatores que regulam a estabilidade de nanoemulsões e os respectivos mecanismos de atuação. Contudo, sabe-se que a variação da energia livre da interface entre a fase óleo e a fase aquosa, determina a estabilidade da nanoemulsão (McCLEMENTS, 2005).

Devido ao fato da entropia envolvida na formação de microemulsões superarem a energia livre interfacial, as microemulsões são termodinamicamente estáveis (CAPEK, 2004). A estabilidade cinética das nanoemulsões só pode ser compreendida levando em conta sua natureza dinâmica das nanoemulsões e as interações entre gotículas. As gotículas permanecem em um estado contínuo de movimento e frequentemente colidem umas com as outras, o que ocorre devido ao movimento browniano ou pela ação de forças externas (McCLEMENTS, 2005).

Os principais fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade cinética das nanoemulsões são: i) cremação; ii) sedimentação; iii) floculação e, iv) coalescência ou maturação de Ostwald (Figura 1-14).

Figura 1-14 Principais fenômenos físico-químicos que afetam a estabilidade das nanoemulsões.



Fonte: Adaptado de McCLEMENTS (2005)

A cremeação e a sedimentação ocorrem pela ação da força gravitacional sobre as gotículas, resultante da diferença de densidade entre as fases dispersa e contínua. Se as gotículas possuem uma densidade menor que a da fase contínua, elas tendem a se deslocar para cima, fenômeno conhecido como cremeação. Porém, se as gotículas possuem densidade maior que a fase contínua tende a se deslocar para baixo, denominado de sedimentação. Como a densidade da maioria dos óleos comestíveis é menor que da água, a ocorrência da cremeação é mais frequente que a sedimentação (McCLEMENTS, 2005).

O processo de floculação ocorre quando duas ou mais gotículas se associam, mantendo a integridade individual de cada uma. A associação das partículas promove um aumento na viscosidade da emulsão formada e pode favorecer à formação de um gel, que será benéfica ou não de acordo com a característica final desejada para a nanoemulsão (TAN, 2004).

A coalescência é o fenômeno que ocorre quando duas ou mais gotículas se fundem e formam uma gotícula maior. Essa fusão entre as gotículas diminui a área de contato entre as fases contínuas e dispersas, propiciando a cremeação ou sedimentação e, posteriormente, a separação das fases. Walstra (2003) relata que esse processo só ocorre quando as gotículas estão próximas e a interface que as separa é rompida. Em geral, a coalescência é determinada pelo contato físico entre as gotículas e a atuação de forças.

A maturação de Ostwald é o processo de crescimento de gotículas à custa de gotículas menores, que são absorvidas por difusão. Esse fenômeno pode até reduzir todas as gotículas numa única, promovendo a separação das fases (McCLEMENTS; RAO, 2011; WOOSTER; GOLDING; SANGUANSRI, 2008).

Por apresentarem tamanho de gotículas inferior à das emulsões convencionais (emulsões e microemulsões), as nanoemulsões estão mais propensas à desestabilização pela maturação de Ostwald. Contudo, ocorre a diminuição dos fenômenos de agregação dessas gotículas (floculação e coalescência) e da separação gravitacional, fazendo com que as mesmas sejam mais estáveis cineticamente (McCLEMENTS; RAO, 2011; McCLEMENTS, 2005). Assim, quanto menor o tamanho das gotículas, maiores os benefícios para à estabilidade cinética. E, é justamente a maior estabilidade cinética das nanoemulsões a característica mais promissora para sua aplicação em processos industriais (OSTERTAG; WEISS; McCLEMENTS, 2012; McCLEMENTS; RAO, 2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology**, v. 86, p. 1323-1336, 2010.
- AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 1, n. 114, p. 324-30, 2014.
- ADJONU, R.; DORAN, G.; TORLEY, P.; AGBOOLA, S. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, v. 122, p. 15-27, 2014.
- AMÉZCUA-VEJA, C.; POGGI-VARALDO, H.M.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RÍOS-LEAL, E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ R. Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 237-240, 2007.
- ANTON, N.; VANDAMME T. F. The University of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 142-147, 2009.
- ARAÚJO, L.V. de. Rhamnolipid and surfactin: Antiadhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171-178, 2016.
- ARAÚJO, L.V.; ABREU, F.; LINS, U.; SANTA-ANNA, L.M.M.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D.M.G.; Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 481-488, 2011.
- BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**, v. 200, n. 198, p. 44-47, 2000.
- BANAT, I. N.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARBOSA, A.P.A.; GONDIM, A.L.N.; PAZ, M.C.F. Remoção do Corante Preto Pirazol por *Pseudomonas aeruginosa*. **Anais... II CONEPI - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, 2007.

BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. Introdução à Química Orgânica. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

BARBOSA, S. A. Desenvolvimento de biodetergentes utilizando biossurfactantes como matéria-prima. 126f, 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) da rede RENORBIO - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, São Cristovão, Sergipe.

BARROS; F. F. C.; QUADROS, C. P. de; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina, Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BERGSTROM, S.; THEORELL, H., DAVIDE, H. On a metabolic product of *P. pyocyanea*, pyolipidic acid, active against *Myobacter tuberculosis*. **Ark Kem Mineral Geo**, v. 23, p. 1-12, 1946.

BEZZA, F.A.; EVANS, M.; CHIRWA, N. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. **Chemosphere**, v. 144, p. 635-644, 2016.

BLOOMBERG, G. Designing proteins and emulsifiers. **Lebensmittel technologies**, v. 24, p. 130-131, 1999.

BODOUR, A.A.; MILLER-MAIER, R.M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 273-280, 1998.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n. 1-2, p. 41-52, 1999.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, 2004, p. 241–251. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.05.016.

BUENO, S. M.; SILVA A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572-1577, 2010.

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

BURGUER, M. M.; GLASER, L. BURTON, R.M. The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 2595-2602, 1963.

BUSINES WIRE. Global Biosurfactants Market 2017-2022: Focus on Glycolipids (Sphorolipids, Rhamnolipids), Lipopeptides, Phospholipids & Polymeric Biosurfactants - Research and Markets. Disponível em: <<https://www.businesswire.com/news/home/20180102005421/en/Global-Biosurfactants-Market-2017-2022-Focus-Glycolipids-Sophorolipids>>. Acesso em: 15 jan 2018.

CAMPOS, J.M.; STAMFORD, T.L.; SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M. de; RUFINO, R.D.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 1097-1108, 2013.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CAPPELLO, S. et al. Characterisation of oil-degrading bacteria isolated from bilge water. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 6, p. 3219–3226, 2012.

CHALOUKKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 580–588, 2010.

CHAMPION, J.T.; GILKEY, J.C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MAIER, R.M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, n. 2, p. 569-574, 1995.

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of sphorolipid biosurfactant produced by yeast species grown on diesel oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, n. 1, p. 63-71, 2011.

CHEN, M.; DONG, C.; PENFOLD, J.; THOMAS, R.K.; SMYTH, T.J.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; STEVENSON, P.; PARRY, A.; TUCKER, I.; CAMPBELL, R.A. Adsorption of sphorolipid biosurfactants on their own and mixed with sodium dodecyl benzene sulfonate, at the air/water interface. **Langmuir**, v. 27, p. 8854-8866, 2011.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Nanobiotechnology. *Biotechnology*, p. 219-248, 2016.

CONTENTE, D. M. L. Obtenção e caracterização de nanoemulsão óleo em água a partir de óleo de açaí (*Euterpe oleracea* M.). 2016. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, Belém-PA.

COSGROVE, T. Colloid Science: principles, methods and applications. Bristol: Department of Chemistry University of Bristol, 2005.

DAR, M. A.; INGLE, A.; RAI, M. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine**, v. 9, n. 1, p. 105–110, 2013.

DASTJERDI, R.; MONTAZER, M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 5-18, 2010.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Pretreatment of synthetic dairy wastewater using the sophorolipidproducing yeast *Candida bombicola*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 720-728, 2011.

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

DONIO, M.B. S.; RONICA, S. F. A.; VIJI, V. T.; VELMURUGAN, S.; JENIFER, J. A.; MICHAELBABU, M.; CITARASU, T. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 876-883, 2013.

DREXLER, K. E. Engines of Creaton 2.0: The Coming Era of Nanotechnology, New York: Anchor Books. 1987, 646 p.

DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAM, S. U.; SHENDRE, L. P.; DUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanensis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 368-374, 2012.

DURASAMY, N.; HONG, S. J.; CHOI, K. H. Deposition and characterization of silver nanowires embedded PEDOT: PSS thin films via electrohydrodynamic atomization. **Chemical Engineering Journal**, v. 225, p. 887–894, 2013.

EE, S.L.; DUAN, X.; LIEW, J.; NGUYEN, D. Droplet size and stability of nano-emulsion produced by the temperature phase inversion method. **Chemical Engineering Journal**, v. 140, p. 626–631, 2008.

EL-SHESHTAWY, A. I. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, p. 155–162, 2015.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32–53, 2012.

FELSE, P.A.; SHAH, V.; CHAN, J.; RAO, K.J.; GROSS, R.A. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 316–323, 2007.

FORTINA, P.; KRICKA, L. J.; SURREY, S.; GRODZINSKI, P. Nanobiotechnology: The promise and reality of new approaches to molecular recognition. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 168–173, 2005.

GADE, A. K.; BONDE, P.; INGLE, A. P.; MARCATO, P. D.; DURÁN, N.; RAI, M. K. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 3, p. 243–247, 2008.

GEIN, S.V.; KUYUKINA, M.S.; IVSHINA, I.B.; BAEVA, T.A.; CHERESHNEV, V.A. In vitro cytokine stimulation assay for glycolipid biosurfactant from *Rhodococcus ruber*: role of monocyte adhesion. **Cytotechnology**, v. 63, n. 6, p. 559–566, 2011.

GHOLAMI-SHABANI, M.; AKBARZADEH, A.; NOROUZIAN, D.; AMINI, A.; GHOLAMI-SHABANI, Z.; IMANI, A.; CHIANI, M.; RIAZI, G.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 4084–4098, 2014.

GOMES, M.Z.V.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. **Food Control**, v. 25, p. 441–447, 2012.

GOODSELL, D.S. Bionanotechnology: Lessons from Nature, New Jersey, USA. Wiley-Liss, Hoboken, 2004.

GUDIÑA, E.J.; RODRIGUES, A.I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M.R.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Bioconversion of agro-industrial by products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87-93, 2015.

HARADA, M.; KIMURA, Y.; SAIJO, K.; OGAWA, T.; ISODA, S. Photochemical synthesis of silver particles in Tween 20/water/ionic liquid microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, n. 2, p. 373–381, 2009.

HARADA, M.; YAMADA, M.; KIMURA, Y.; SAIJO, K. Influence of the organization of water-in-ionic liquid microemulsions on the size of silver particles during photoreduction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 406, p. 94–104, 2013.

HATANAKA, J.; CHIKAMORI, H.; SATO, H.; UCHIDA, S.; DEBARI, K.; ONOUE, S.; YAMADA, S. Physicochemical and pharmacological characterization of alpha-tocopherol-inaded nanoemulsion system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 396, n. 1, p. 188-193, 2010.

HE, Z. et al. High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 107–116, 2016.

HULKOTI, N. I.; TARANATH, T. C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes. **A review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 474–483, 2014.

IBRAHIM, M. L. et al. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 28–34, 2013.

JAIN, P. K.; HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Noble metals on the nanoscale: Optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 12, p. 1578–1586, 2008.

JAN, J-S.; CHUANG, T-H.; CHEN, P-J.; TENG, H. Layer-by-Layer Polypeptide Macromolecular Assemblies Mediated Synthesis of Mesoporous Silica and Gold Nanoparticle/Mesoporous Silica Tubular Nanostructures. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2834-2843, 2011.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

JIANG, H.; MOON, K. S.; LI, Y.; WONG, C. P. Surface functionalized silver nanoparticles for ultrahigh conductive polymer composites. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 13, p. 2969–2973, 2006.

JOSHI, S. J.; GEETHA, S. J.; DESAI, A. J. Characterization and Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* R2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 2, p. 346–361, 2015.

KARADAG, A.; YANG, X.; OZCELIK, B.; HUANG, Q. Optimization of preparation conditions for quercetin nanoemulsions using response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 2130-2139, 2013.

KATZ, H.; FARBER, R.; CHANIEL, G.; ANKAR, Y.; COHEN, H.; CAHAN, R. Rhamnolipid-enhanced *Pseudomonas putida* biofilm formation on hydrophilic surfaces with toluene as the bacterium's sole carbon source. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 127, p. 87-94, 2018.

KHATOON, N.; AHMAD, R.; SARDAR, M. Robust and fluorescent silver nanoparticles using *Artemisia annua*: Biosynthesis, characterization and antibacterial activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 91-97, 2015.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces species* B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, p. 311–318, 2012.

KIRAN, G.S.; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T.A.; RAJEETHA RAVJI, T.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from sponge associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250-256, 2009.

KOOPMANS, R. J.; AGGELI, A. Nanobiotechnology - quo vadis? **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 327-334, 2010

KUMAR, S.; SINGH, M.; HALDER, D.; MITRA, A. Mechanistic study of antibacterial activity of biologically synthesized silver nanocolloids. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 449, n. 1, p. 82–86, 2014.

LEONG, T.; WOOSTER, T.J.; KENTISH, S.E.; ASHOKKUMAR, M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 6, p. 721-727, 2009.

LIMA, C.J.B. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. 2007. 190f. Tese (Doutorado) Pós-Graduação em Engenharia Química- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

LIN, S.C. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J.; Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.303, 2006.

LUNA, J.; RUFINO, R.; CAMPOS-TAKAKI, G.; SARUBBO, L. Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, p. 67-72, 2012.

MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. **Food Control**, v. 29, p. 138-142, 2013.

MAIER, R.M.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, n. 5, p. 625-633, 2000.

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

MAYER, S.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. Vitamin-E enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: factors influencing droplet size and stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 402, p. 122-130, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Food emulsions: principles, practices and techniques. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences and similarities. **Soft Matter**, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285-330, 2011.

- MENDES, A.N.; FILGUEIRAS, L.A.; PINTO, J.C.; NELE, M. Physico chemical properties of rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to applications in micro emulsions. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, p. 64-79, 2015.
- MONTAZER, M.; ALIMOHAMMADI, F.; SHAMEI, A.; RAHIMI, M. K. In situ synthesis of nano silver on cotton using Tollens' reagent. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1706–1712, 2012.
- MONTAZER, M.; PAKDEL, E.; MOGHADAM, M. B. Nano titanium dioxide on wool keratin as UV absorber stabilized by butane tetra carboxylic acid (BTCA): A statistical prospect. **Fibers and Polymers**, v. 11, n. 7, p. 967–975, 2010.
- MONTEIRO, A.S.; MIRANDA, T.T. de; LULA, I.S.; DENADAI, A.M.L.; SINISTERRA, R.D.; SANTORO, M.M.; SANTOS, SANTOS, V.L. Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfacesv by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 467-476, 2011.
- MOUAFI, F. E.; ABO ELSOUD, M. M.; MOHARAM, M. E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnology Reports**, v. 9, p. 31–37, 2016.
- MUKHERJEE, S. et al. Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 254–260, 2008.
- MULLER, M.M.; HAUSMANN, R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological roduction. **Applied of Microbiology**, v. 91, p. 251-264, 2001.
- MULLIGAN, C. N. Enviromental applications for biosurfactants. **Environmental pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.
- MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 14, p. 372–378, 2009
- NAJAFI, A.R.; RAHIMPOUR, M.R.; JAHANMIRI, A.H.; ROOSTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; GHOBADI, Z. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 163, p. 188-194, 2011.

NANOWERK, Nanotechnology information and Nanomaterial Database™. Nanotechnology Products database. Disponível em: <<http://www.nanowerk.com/products/products.php>>. Acesso em: 02 mai. 2018.

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

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, p. 95-102, 2012.

PEIXOTO, R.M. Bioprosperação de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biossurfactantes. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado) do Instituto de Ciencias Biomédicas-Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

PEREIRA, J. O. et al. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon Jose. In: DE AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Eds.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. [S.l.] Springer, 2017. p. 1-439.

PIRÔLO, M.P.S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. 73f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) do Instituto de Biociência do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro-SP.

PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International**, v. 2, n. 4, p. 284-287, 2009.

QUESTER, K.; AVALOS-BORJA, M.; CASTRO-LONGORIA, E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. **Micron**, v. 54-55, p. 1-27, 2013.

ROCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S.; PRESSMAN, B.; ZUCKER, L. G.; DARBY, M. R.; DE LA CRUZ, F.; GADD, G. M.; DORDICK, J. S.; LEE, K. H.; CHAN, W. C. W.; FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H.; WHITESIDES, G. M.; ON, S. Nanobiotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 172-179, 2006.

ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: Da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant

Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5, 2011.

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

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M. Catastrophic phase inversion of abnormal emulsions in the vicinity of the locus of transitional enversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 240, p. 149-155, 2004.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source - Their production, modeling and properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 100–111, 2015.

SALVIA-TRUJILLO, L.; QIAN, C.; MARTÍN-BELLOSO, O.; McCLEMENTS, D. J. Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in dible nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 139, p. 878-884, 2013.

SANTANA, R. C.; PERRECHIL, F. A.; CUNHA, R. L. High and low energy emulsifications for food applications: a focus on process parameters. **Food Engineering**, Troy, v. 5, n. 2, p. 107-122, 2013.

SANTOS, D.K.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifuncional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401-432, 2016.

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

SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.

SCHUBERT, H.; AX, K.; BENHREND, O. Product engineering of dispersed systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 9-16, 2003.

SCHUBERT, H.; ENGEL, R. Product and formulation engineering of emulsions. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 82, n. A9, p. 1137-1143, 2004.

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

SILVA, A.L.S.; ARAÚJO, H.W.C.; Tambourgi, E.B.; Silva, C.A.A.; Campos-Takaki, G. M. Potencial tecnológico de uma nova Linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biosurfactante utilizando petróleo como substrato. **Exacta**, v. 7, n. 1, p. 31-37, 2009.

SILVA, C.; MARTINI, E.; TAVARES, G.; SILVEIRA, T.; OLIVEIRA, M.C. de; TEIXEIRA, H. Caracterização Físico-química de Nanoemulsões Catiônicas como Sistemas de Liberação de Oligonucleotídeos, **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 17-21, 2006.

SILVA, N.M.P.R.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 132-139, 2014.

SILVA, P.A.C. Influência dos Parâmetros Físico-Químicos nas Propriedades e na Produção de Biosurfactantes Isolados do Gênero *Candida*. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado) Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco.

SILVA, S.N.; FARIAS, C.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174-183, 2010.

SINTUBIN, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Biologically produced nanosilver: Current state and future perspectives. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 10, p. 2422–2436, 2012.

SIVAPATHASEKARAN, C. et al. Artificial neural network modeling and genetic algorithm based medium optimization for the improved production of marine biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2884–2887, 2010.

SOBERÓN-CHAVÉZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: A general overview. Cap 1. In: SOBERÓNCHÁVEZ, G. Biosurfactants: From genes to applications, 2011. 216p.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nanoemulsions. Current opinion in Colloid e Interface Science, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: formation by low energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, p. 246-254, 2012.

STRELEC, T. Isolamento de bactérias produtoras de biossurfactantes ramnolipídios polihidroxicanoatos e avaliação da relação metabólica no processo de síntese. 2006. 123f. Dissertação (Mestrado) do Instituto Butantan da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

SUN, M.; SU, X.; DING, B.; HE, X.; LIU, X.; YU, A.; LOU, H.; ZHAI, G. Advances in Nanotechnology- based delivery systems of curcumin. **Nanomedicine**, v. 7, p. 1085-1100, 2012.

SYED, A.; SARASWATI, S.; KUNDU, G. C.; AHMAD, A. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola* sp. and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, p. 144–147, 2013.

TAN, C. T. Beverage emulsions in food emulsions. 4nd ed. New York: Friberg, S. E. & Larsson, K., 2004.

TAVARES, M.F.T. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TENJARLA, S.N. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, p. 461–521, 1999

TER STEEGE, H. et al. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. **Science**, v. 342, n. 6156, 2013.

THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2457-2461, 2006.

THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366–3372, 2011.

THOMPSON, J. A., Microbead-based biosensing in microfluidic devices. 24 f. Tese de doutorado (Mechanical Engineering and Applied Mechanics) da University of Pennsylvania. Disponível em < <https://repository.upenn.edu/dissertations/AAI3463092>>. Acesso em: 04 mai. 2018.

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Interfacial deposition of functionalized copolymers onto nanoemulsions produced by the solvent displacement method. **Colloid & Polymer Science**, v. 279, n. 8, 784–792, 2001. doi:10.1007/s003960100493

TRIMAILLE, T.; CHAIX, C.; PICHOT, C.; DELAIR, T. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 258, n. 1, p. 135–145, 2003. doi:10.1016/s0021-9797(02)00069-3

TYRODE, E.; MIRA, I.; ZAMBRANO, N.; MÁRQUEZ, L.; RONDÓN-GONZALEZ, M.; SALAGER, J.-L. Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 3. Conditions for Triggering the Dynamic Inversion and Application to Industrial Processes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 4311-4318, 2003.

VAESSEN, G. E. J.; STEIN, H. N. The Applicability of Catastrophe Theory to Emulsion Phase Inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 178, p. 378-387, 1995.

VAN DYKE, M.I.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Applications of microbial surfactants. *Biotechnology advances*, v. 9, n. 2, p. 241-252, 1991

VAN HAMME, J.D.; URBAN, J. Biosurfactants in bioremediation. In: SINGH, A.; KUHAD, R.C.; WARD, O.P. Cap 4. Advances in applied bioremediation. Springer: New York, 2009. 378p

VERA, E.C.S. Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades. 2017. 132f. Tese (doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP.

WALSTRA, P. Physical Chemistry of Foods. New York: Marcel Dekker, 2003.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Langmuir**, v. 24, n. 22, p. 12758-12765, 2008.

YANG, Y. MARSHALL-BRETON, C.; LESER, M. E.; SHER, A. A.; McCLEMENTS, D. J. Fabrication of ultrafine edible emulsions: comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 398- 406, 2012.

ZAMBRANO, N.; TYRODE, E.; MIRA, I.; MÁRQUEZ, L.; RODRÍGUEZ, M-P.; SALAGER, J.-L. Emulsion Catastrophic Inversion from Abnormal to Normal Morphology. 1. Effect of the

Water-to-Oil Ratio Rate of Change on the Dynamic Inversion Frontier. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 42, p. 57-61, 2003.

ZHANG, X.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 489-494, 2011.

ZOUBOULIS, A.I.; MATIS, K.A.; LAZARIDIS, N.K.; GOLYSHIN, P.N. The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. **Minerals Engineering**, v. 16, p. 1231-1236, 2003.

Capítulo 2 - SELECTION OF EFFICIENT BIOSURFACTANT-PRODUCING BACTERIA FROM EASTERN AMAZON SOIL

ABSTRACT

Biosurfactant usage increased in various industrial sectors due to the growing demand for environmental compatibility, biodegradability, reduced toxicity, higher selectivity, and activity in extreme conditions. Concerning this aspect, biosurfactant-producing bacteria from floodplain (Várzea) and upland (Terra Firme) soils' samples of three cities (Ferreira Gomes, Porto Grande, and Mazagão) of the eastern Amazon (Amapá) were isolated and identified. The isolates were cultured in nutrient broth with olive oil and their extracts evaluated according to drop collapse, oil dispersion, emulsification, and surface tension tests to select efficient biosurfactant-producing bacteria. From three hundred and eighteen isolates, the forty-three most promising bacteria were selected and identified by 16S rDNA gene sequencing. Most of these isolates showed high emulsification capacity ($E_{24} > 50\%$) and belonged to three different genera, *Serratia*, *Paenibacillus*, and *Citrobacter*. The extracellular biosurfactant-production of the identified microorganisms pointed out the fifteen most promising bacteria that presented high emulsification capacity ($E_{24} > 48\%$), emulsification stability (less than 10% of drop after 72h) and great potential to reduce the surface tension of growth medium (varying from 49.40 to 34.50 mN/m). Cluster analysis classified genetically related isolates in different groups, which can be associated with structural differences among biosurfactants. In summary, high potential microorganisms were isolated from Amapá's soils. As no previous work about biosurfactant-producing bacteria from Amapá's soils was found in literature, the present study can also be considered as a contribution to the knowledge of microbial diversity of this region.

Keywords: Upland, Floodplain, *Serratia*, *Citrobacter*, *Paenibacillus*.

1 INTRODUCTION

Surfactants available commercially are produced often using petroleum derivatives and non-renewable energy. However, the growing demand for green or environmentally sustainable materials, as well as the current environmental control legislation, have been stimulating research and development of natural and biodegradable surfactants to reduce environmental impacts (ELDIN; KAMEL; HOSSAM, 2019; PRASAD et al., 2018; SUN et al., 2019).

The global interest in biosurfactant production is related to the wide range of possible applications in different industrial sectors, such as pharmaceutical, cosmetic, cleaning, personal

hygiene, hospital, food, paint, textile, bioremediation, and agriculture (EL-SHESHTAWY et al., 2015; RUFINO et al., 2011). Katz et al. (KATZ et al., 2018) highlighted the importance of biosurfactants due to their antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory activities. The lipopeptide-derived surfactin, for example, was successfully applied to remove make-up and dead cells promoting antimicrobial action and low side effects such as skin irritation (KANLAYAVATTANAKUL; LOURITH, 2010).

In the food sector, biosurfactants are used to modify rheological properties of the wheat flour and other starch-containing products by the formation of complexes, improving the consistency and texture of fat-based products and solubilizing aromas. This sort of molecules can be applied in herbicide and pesticide formulations for biological control of phytopathogens, improving product quality and productivity (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Biosurfactants can assist the remediation of contaminated soils, increasing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), and enhancing degradation (BEZZA; NKHALAMBAYAUSI CHIRWA, 2016). Microemulsions containing these molecules can also degrade large particles of heavy oils and decrease its viscosity, favoring the cleaning of tanks, reservoirs, and substrates (BHARALI et al., 2014). Therefore, many interesting properties make biosurfactants very attractive for biotechnological applications (RUFINO et al., 2011).

Microorganisms, especially fungi and bacteria, usually present a high surface area, a relatively small volume, and are usually found attached to surfaces or at interfaces (RON; ROSENBERG, 2001). Their living environment and physical characteristics elucidate why microorganisms need to produce surface-active compounds (that contain both hydrophobic and hydrophilic groups) to lower interfacial and superficial tensions aiming to attach or detach them from surfaces.

Microbial surfactants or biosurfactants are intracellular or extracellular metabolites of fungi, and bacteria (THAVASI; JAYALAKSHMI; BANAT, 2011) classified into different structural and functional groups: lipopeptides, glycolipids, polysaccharide-protein complexes, phospholipids, neutral lipids and fatty acids (CAPPELLO et al., 2012). These molecules can present different natural roles in growth and producing microorganisms (RON; ROSENBERG, 2001). Matsuyama and Nakagawa (MATSUYAMA; NAKAGAWA, 1996) observed that *Serratia marcescens* formed a giant colony when inoculated at agar medium (at 30°C for one week), whereas a single round colony was verified for a mutant bacteria, defective in wetting agents' production. The authors evidenced that serrawettins played a critical role in *S. marcescens* colony growth on solid-air interfaces. For *Bacillus subtilis*, the surfactin production and flagellar biosynthesis were found to be essential in swarming motility (KEARNS; LOSICK,

2003). Luo et al. (LUO et al., 2015) also reported that surfactin and bacillomycin L play important roles in the antagonistic activity and swarming motility of *B. subtilis* 916 against *R. solani* through biofilm formation and colonization. The rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* exhibited anti-microbial activity against several bacterial and fungal species (HABA et al., 2003), act as protective agents of biofilms causing necrotic death of polymorphonuclear leukocytes, enhance cell virulence and reduces phagocytosis susceptibility (VAN GENNIP et al., 2009). For *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids could be considered as a multifunctional component of a mechanism that controls fundamental elements of microbial life (CHRZANOWSKI; ŁAWNICZAK; CZACZYK, 2012; RAMOS et al., 2020).

Biosurfactants were first isolated from *Pseudomonas aeruginosa* (JARVIS; JOHNSON, 1949), but nowadays can be obtained from distinct bacteria and fungi using different substrates, like sugars, glycerol, oils, other commercial hydrocarbons and different sources of agricultural residues (KHOPADE et al., 2012). Among biosurfactant-producing microorganism, we can mention: (i) bacteria like *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Paenibacillus alvei* (CLEMENTS et al., 2019; EL-SHESHTAWY et al., 2015); (ii) fungi like *Candida sphaerica*, *Trichosporon montevidense*, *Candida bombicola*, *Candida rugosa*, *Candida lipolytica*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus ustus* (LUNA et al., 2012; MENDES et al., 2015; SANTOS et al., 2016).

The Amazon region shows high biodiversity, and it is composed of a variety of animal, plant, and microorganism species. Despite the intensive efforts to study this biome and the current greater knowledge about their fauna and flora, microbial diversity remains unexplored. Microorganisms play unique and vital functions in ecosystems and biosphere maintenance, for example, in food chains and biogeochemical cycles (MYERS, 1996). Therefore, Amazon presents an excellent potential to provide microorganisms for the development of several substances of biotechnological interest (RAMOS et al., 2020; HOLANDA et al., 2020).

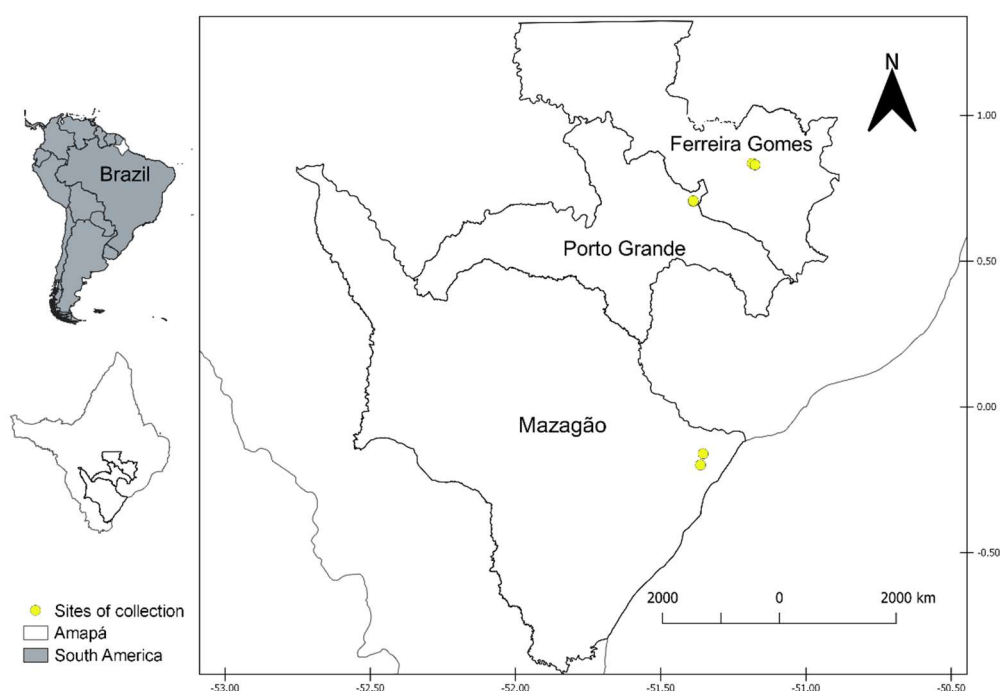
Concerning these aspects, this study aimed to prospect and select the most promising biosurfactant-producing bacteria from different soil ecosystems of the eastern Amazon. The prospecting studies considered the floodplain (Várzea) and upland (Terra Firme) soils of the Amapaense Amazon, Brazil.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Collection site

Amazonian soil samples of two different ecosystems [Terra Firme (TF) and Várzea (V)], both under equatorial forest formation, were collected in three cities of the Amapá State, Brazil [Ferreira Gomes (FG), Porto Grande (PG), and Mazagão (MZ)], according to geographic coordinates FGTF (N 00°50'07,7" / W 051°11'05,2"), FGV (N 00°49'49,6" / W 051°10'29,6"), PGTF (N 00°42'16,5" / W 051°23'15,2"), PGV (N 00°42'24,1" / W 051°23'18,3"), MZTF (S 00°09'39,0" / W 051°21'14,5") and MZV (S 00°11'57,8" / W 051°21'47,6"). Figure 2-1 indicates the collection sites and the chosen ecosystems. For each collection site, the ground surface was cleaned to remove plants and decomposing organic material. The soil was collected in three distinct points (in a circle of 500 cm of diameter and 20 cm of depth), homogenized to obtain a sample of approximately 500 g, and transported to the laboratory under aseptic and refrigerated conditions.

Figure 2-1 Sites of soil collection in Terra Firme (TF) and Várzea (V) ecosystems at three cities: (i) Ferreira Gomes (FGTF and FGV); (ii) Porto Grande (PGTF and PGV) and (iii) Mazagão (MZTF and MZV). Yellow colored circles indicated collecting sites.



Source: Authors (2020).

2.2 Chemical and physical characterization of soil samples

The chemical analysis of the soils was performed in the Laboratory of Soil and Plant Physiology at Embrapa-Amapá, according to procedures proposed by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Table 2-1) (EMBRAPA, 2006).

Table 2-1 Chemical and physical characteristics of soil samples from the different studied ecosystems.

Characteristics of the soil samples	Ecosystems codes					
	FGTF*	FGV*	PGTF*	PGV*	MZTF*	MZV*
pH	4.6	5.5	4.9	5.1	4.3	4.2
Organic matter (g/kg)	35.51	104.82	25.00	45.51	64.48	46.20
Phosphorus (mg/dm ³)	3	4	5	6	2	2
K ⁺ (cmol _c /dm ³)	0.05	0.05	0.06	0.07	0.06	0.06
Ca ²⁺ + Mg ²⁺ (cmol _c /dm ³)	0.8	1.4	0.7	0.9	0.5	0.4
Ca ²⁺ (cmol _c /dm ³)	-	0.6	-	-	-	-
Al (cmol _c /dm ³)	1.6	0.7	1.1	1.5	2.2	3.6
H ⁺ + Al ³⁺ (cmol _c /dm ³)	8.6	12.3	6.0	10.3	11.9	12.9
SB* (cmol _c /dm ³)	0.9	1.4	0.8	1.0	0.6	0.5
CEC* (cmol _c /dm ³)	9.5	13.7	6.8	11.3	12.5	13.4
Base saturation (%)	9	10	12	9	5	4
Al ³⁺ saturation (%)	64	33	58	60	79	88
Clay (%)	10.1	34.9	19.8	17.4	35.9	25.3
Coarse sand (%)	62.5	0	48.0	37.5	10.5	24.5
Fine sand (%)	16.5	0	24.0	17.0	9.5	14.0
Silt (%)	10.9	65.1	8.2	28.1	44.1	36.2
BSSC*	Sandy loam	Silty clay loam	Sandy loam	Sandy loam	Clay loam	Sandy

Source: Authors (2020).

*Brazilian System of Soil Classification;

*SB= Ca²⁺ + Mg²⁺ + K⁺; CEC= SB + H⁺ + Al³⁺.

2.3 Isolation of biosurfactant-producing bacteria

In order to promote bacterial growth, 10 g of each homogenized soil sample was suspended in 90 mL of a peptone saline solution [0.85% NaCl; 0.1% peptone; (w/v)]. The suspension was incubated at 30°C for one hour using an orbital shaker (150 rpm) and then allowed to stand for 30 min (RUFINO et al., 2011). Subsequently, supernatant aliquots of 1 mL were added to 99 mL of the Nutrient Broth (1.0 g of meat extract, 2.0 g of yeast extract, 5.0 g of bacteriological peptone, 5.0 g of sodium chloride and 4.0 mL of nystatin anti-fungal agent per liter of distilled water; pH= 6.8 ± 0.2) and incubated with orbital shaking (150 rpm) at 30°C for 72 h.

The incubated suspensions were serially diluted from 10⁻¹ up to 10⁻⁸, according to the methodology described by Baltaci et al. (BALTACI; ADIGUZEL, 2016). Then, an aliquot of 100 µL of each dilution was inoculated in Agar Nutrient (1.0 g of meat extract, 2.0 g of yeast

extract, 5.0 g of bacteriological peptone, 5.0 g of sodium chloride, 15.0 g of bacterial agar and 4.0 mL of nystatin anti-fungal agent per liter of distilled water; pH= 6.8 ± 0.2) and PIA (*Pseudomonas Isolation Agar*®) mediums (20.0 g of bacteriological peptone, 1.4 g of magnesium chloride, 10.0 g of potassium sulfate, 0.025 g of Irgasan [Ciba-Geigy] and 13.6 g of agar per liter of distilled water; pH 7.0 ± 0.20) aiming to evaluate the *Pseudomonas* genus occurrence (KUYUKINA et al., 2001). The plates were incubated in a BOD chamber for 48 h at 30°C. Microorganisms counting was carried out in triplicate for the 10^{-6} , 10^{-7} , and 10^{-8} dilutions, and the results expressed in terms of colony-forming units (CFU/mL).

Bacteria isolation considered phenotypic traits like size, color, shape, border type, and colony relief. Isolates were preserved under freezing (-12°C) in a solution (v/v) of 50% of nutrient broth and 50% of sterilized glycerol at 20%.

2.4 Biosurfactant production

Isolates were cultured in nutrient broth with 1% (v/v) of olive oil for 72 hours at 30°C. After incubation, extracts were evaluated by drop collapse, oil dispersion, and emulsification tests to identify isolates capable of producing biosurfactants. Isolates were registered under the code A49223C on the National Genetic Heritage Management System (SISGEN), as recommended by the Brazilian Biodiversity Law (n° 13.123/2015) and deposited at the Johanna Döbereiner Biological Resource Center (Embrapa Agrobiologia).

2.4.1 First screening of the Biosurfactant-Producing Bacteria

The following selection criteria were adopted in the first screening: (i) at least the best two isolates from each ecosystem; and, (ii) all isolates with $E_{24} \geq 50\%$. These criteria were chosen in order to investigate microorganisms from all studied ecosystems.

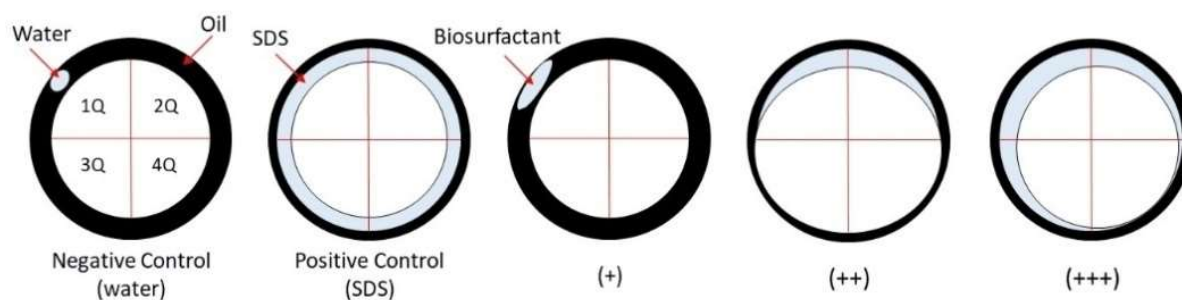
Drop Collapse and Oil Dispersion Tests

The drop collapse and oil dispersion tests were performed using the cell culture of isolates. For drop collapse, 10 µL of a burned lubricating oil was added to each well of a 96-well plate lid and allowed to stand for 24 hours at room temperature. Then, aliquots of 10 µL of the culture were added to the oil's surface. After one minute of incubation, the drop shape was observed on the oil's surface. For oil dispersion, petri dishes were filled with 35 mL of

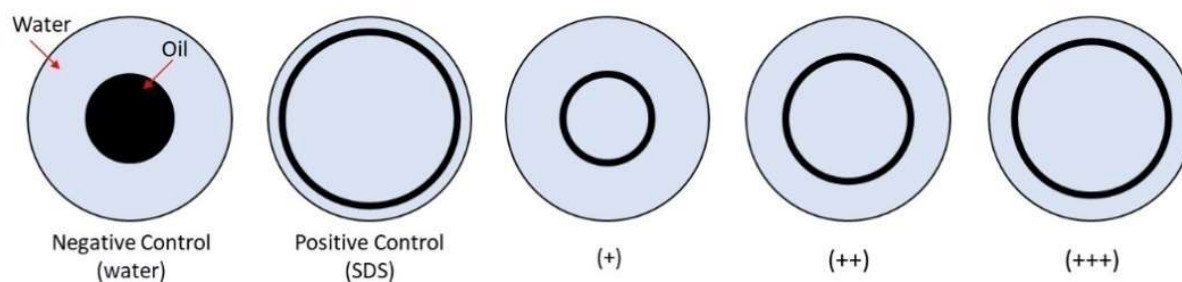
distilled water, and 100 μL of burned lubricating oil was added to the water surface. Subsequently, 10 μL of the cell culture was added to the center of the oils' surface (ARIECH; GUECHI, 2015; JAIN et al., 1991). In both cases, the positive and negative control was realized with a 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and distilled water, respectively. The result was considered positive when a total or partial scattering of the drop occurred and negative when it remained unchanged (ARIECH; GUECHI, 2015; JAIN et al., 1991; YOUSSEF et al., 2004). The activity of the produced biosurfactant was classified as weak (+), moderate (++), and strong (+++), as indicated in Figure 2-2.

Figure 2-2 Schematic representation of the qualitative tests used to evaluate the microorganism's capacity to produce biosurfactants: a) drop collapse test, where 1Q, 2Q, 3Q, and 4Q represent the first, second, third and fourth quadrants; and b) oil dispersion test.

a) Drop collapse test



b) Oil dispersion test



Source: Authors (2020).

Emulsification Test

Emulsification capacity was evaluated by the addition of 2.0 mL of commercial kerosene in a screw cap test tube containing 2.0 mL of cell culture, followed by vigorously mixing in a vortex 3000 rpm for 2 min (RODRIGUES et al., 2006). Measurements were performed after 24, 48, and 72 h at room temperature. The emulsification index E_{24h} was calculated by the ratio between emulsion column height after 24 h and total column height. The

stability was determined by the same way considering the column emulsion height after 48h and 72h (E_{48h} and E_{72h}), respectively.

2.4.2 Second screening of the Biosurfactant-Producing Bacteria

In this screening was evaluated the extracellular biosurfactant production of the selected microorganisms. Cell culture was carried out as previously described and extracts centrifuged at 6000 rpm for 10 min at 4 °C to obtain the cell-free supernatant (CHEN; BAKER; DARTON, 2007). The supernatant emulsification was measured after 24, 48, and 72 h, as described before.

The following selection criteria were adopted in this second screening: (i) at least the best isolate from each ecosystem; and, (ii) all isolates that show emulsification index $E_{24} \geq 48\%$ and emulsification stability (did not show more than 10% of drop after 48 and 72h). These criteria were established to select microorganisms with high potential for different biotechnological processes.

2.5 Surface Tension Analysis

Considering the extracellular selection and aiming to confirm the isolate's potential to produce biosurfactants, the isolates were cultured again, and the cell-free supernatant used to determine E_{24} and surface tension. Surface tension was measured using a KRUSS (Easydyne) tensiometer, according to the methodology described by Kuyukina et al. (2001). Before each test, the DU NUOY ring was sterilized using a Bunsen burner and calibrated with distilled water ($\sim 70.4 \pm 0.1$ mN/m), as proposed by Du Noüy (1925). The analyses were realized in triplicate.

Obtained data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and means compared by the Tukey test at 5% of significance. Principal component analysis (PCA) based on Euclidean distance and complete linkage method was performed using the Minitab® 19 software and the methodology described by Vidueira et al. (VIDUEIRA FERREIRA et al., 2012).

2.6 16S rDNA Gene Sequencing

The genomic DNA extraction was carried out using the Wizard® Genomic DNA kit (Promega, Madison, WI, USA), following the manufacturer's recommendations. DNA concentration was measured by spectrophotometry at 260 nm (NanoDrop, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA), and their integrity verified on agarose gel at 1% (w/v; 60V; 1h).

The 16S rDNA gene was amplified with the primers 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' and 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. The PCR reaction was realized on a thermal cycler (Applied Biosystems™ SimpliAmp) under the following conditions: 1.5 U Taq DNA polymerase, 1x PCR buffer (10 mM of Tris-HCl pH 8 and 50 mM of KCl), 1.75 mM of MgCl₂, 0.25 mM of each dNTP, 0.2 μM of each primer and 1 μL of the DNA template, with a total volume of 50 μL. Amplification was performed using initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 29 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min, extension at 72°C for 2 min and, a final extension at 72 °C for 7 min.

Sequencing reactions were carried out using a DYEnamic™ ET Dye Terminator kit (MegaBACE™) and an automatic MegaBACE 1000 sequencer (GE Healthcare Life Sciences). The obtained sequences were deposited at the NCBI GenBank, with accessions number MK156425-MK156460 and MT252662-MT252668. We compared the obtained sequences with the National Center Biotechnology Information database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST tool (ALTSCHUL et al., 1997) and calculated their similarity with the type strain of described species belonging the most closely related genus using sequence identity matrix in the BioEdit software.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Collected soil samples showed a significant number of colony-forming units (CFU). The number of counted microorganisms per milliliter (CFU/mL) was 3.96×10^9 , 2.25×10^9 , 1.67×10^9 , 1.69×10^9 , 2.41×10^9 and 4.95×10^9 for the FGTF, FGV, PGTF, PGV, MZTF and MZV ecosystems, respectively. A total of 318 microorganisms were morphologically isolated (Table 2-2). Terra Firme ecosystems (FGTF, PGTF, and MZTF) showed greater bacterial populational density when compared to Varzea ones (FGV, PGV, and MZV), 227 and 91 isolates, respectively. The FGTF alone presented 138 isolates, which corresponds to 43,4% of the total isolated microorganisms.

Table 2-2 The total number of isolates and the number of biosurfactant-producing isolates selected after the first and second screening stages.

	FGTF	FGV	PGTF	PGV	MZTF	MZV
Total number of isolates	138	30	47	59	42	2
First screening	17	13	3	6	2	2
Second screening	7	4	1	1	1	1

Source: Authors (2020)

For the drop collapse test, 237, 73, and 8 isolates presented weak (+), moderate (++), and strong (+++) activity, respectively whereas in the oil dispersion tests, 204, 113, and 1 isolate demonstrated weak (+), moderate (++), and strong (+++) activity, respectively. Qualitative tests (drop collapse and oil dispersion) showed positive results and were useful to identify biosurfactant-producing bacteria. On the other hand, the emulsification index (quantitative) permitted the detection of biosurfactant-producing bacteria and provided a more consistent rating of the isolated microorganisms. According to the emulsification results, forty-three isolates were selected (Table 2-3).

Table 2-3 Drop collapse, oil dispersion, and emulsification (with and without cells) results for microorganisms selected in the first screening.

Codes of the isolated microorganisms	(Continue)							
	First Screening					Second Screening		
	Drop collapse	Oil dispersion	Emulsification index (%) (with cells)			Emulsification index (%) (cell-free)		
			24h	48h	72h	24h	48h	72h
FGTF02	+	+	62.2	11.4	6.7	4.4	4.4	4.4
FGTF12	+	+	64.4	53.5	51.2	15.9	6.8	6.7
FGTF14	+++	++	58.1	55.8	55.8	50.0	50.0	47.7
FGTF82	++	++	63.6	59.1	56.8	55.6	53.3	53.3
FGTF83	+	+	51.1	51.2	48.8	15.6	15.6	15.6
FGTF86	+	+	51.2	45.5	45.5	47.7	45.5	45.5
FGTF92	+	+	52.3	17.8	11.4	48.9	48.9	48.9
FGTF94	+	+	50.0	40.9	38.6	28.9	26.7	26.7
FGTF100	+	+	53.3	44.4	44.4	53.3	53.3	53.3
FGTF101	+++	+++	52.3	45.5	45.5	60.9	60.9	60.9
FGTF104	+	+	50.0	46.7	46.7	48.9	48.9	48.9
FGTF107	+	+	65.1	50.0	51.2	45.7	32.6	32.6
FGTF109	+	+	68.2	66.7	65.9	28.9	28.9	22.2

Table 2-3 Drop collapse, oil dispersion, and emulsification (with and without cells) results for microorganisms selected in the first screening.

Codes of the isolated microorganisms	(Conclusion)							
	First Screening			Second Screening				
	Drop collapse	Oil dispersion	Emulsification index (%) (with cells)			Emulsification index (%) (cell-free)		
			24h	48h	72h	24h	48h	72h
FGTF113	+	+	50.0	37.8	26.7	35.6	35.6	22.2
FGTF121	+	+	50.0	48.9	48.9	51.1	51.1	51.1
FGTF125	+	+	52.3	50.0	50.0	33.3	33.3	31.1
FGTF132	+	+	63.6	50.0	50.0	6.7	6.7	6.7
FGV05	+	+	51.1	46.7	46.7	44.4	42.2	42.2
FGV07	+	+	52.3	52.3	50.0	50.0	2.0	2.0
FGV09	+	++	55.6	51.1	51.1	37.0	32.6	32.6
FGV12	+	+	53.3	51.1	51.1	50.0	4.3	2.2
FGV13	+++	++	50.0	36.4	31.8	15.6	15.6	13.3
FGV15	++	++	58.7	56.5	50.0	60.0	60.0	60.0
FGV17	+	+	56.5	47.8	45.7	54.3	54.3	54.3
FGV19	+	+	60.9	58.7	58.7	58.7	56.5	56.5
FGV20	+	+	50.0	50.0	50.0	55.6	55.6	55.6
FGV24	+	+	56.8	56.8	54.5	46.7	46.7	44.4
FGV25	+	+	62.2	51.1	60.0	44.4	42.2	42.2
FGV26	+	+	56.5	52.2	50.0	17.8	6.7	6.7
FGV30	+	+	55.6	53.3	53.3	23.3	16.3	14.0
PGTF05	++	++	58.7	52.2	52.2	28.9	28.9	22.2
PGTF12	++	++	62.8	16.3	2.3	57.8	57.8	55.6
PGTF25	+	+	56.5	54.3	54.3	20.0	13.3	11.1
PGV03	+	++	54.3	52.2	52.2	9.3	9.3	7.0
PGV04	+	+	60.0	57.8	55.6	6.7	6.7	6.7
PGV05	++	+	57.8	57.8	55.6	8.9	8.9	6.7
PGV34	++	++	51.2	51.2	46.5	40.9	40.9	40.9
PGV35	++	+	54.3	52.2	52.2	31.8	29.5	29.5
PGV46	+	+	52.3	52.3	52.3	13.3	13.3	13.3
MZTF14	+	+	52.3	52.3	52.3	4.4	4.4	2.2
MZTF32	+++	++	63.0	63.0	63.0	40.0	40.0	37.8
MZV01	+	+	23.9	23.9	19.6	0	0	0
MZV02	++	+	21.3	12.8	12.8	44.4	44.4	44.4

Source: Authors (2020)

Table 2-3 presents the results attained for microorganisms chosen in the first screening. FGTF101 and FGV17 isolates presented high emulsification indexes but showed strong and weak activity in qualitative tests, respectively. This comparison illustrates that drop collapse and oil dispersion tests, as used in this work, favored the identification of biosurfactant-producing isolates but did not allow a consistent rating of the isolates' potential. A total of fifteen isolates were selected in the second screening (Table 2-2). Concerning the production of biosurfactant with and without cells, emulsification results for MZTF32 and MZV02 presented significant differences, highlighting that extracellular evaluation is fundamental (Table 2-3).

Some studies report the importance of applying different screening methods to prospect biosurfactant-producing microorganisms (ARIECH; GUECHI, 2015; ELDIN; KAMEL; HOSSAM, 2019). In the present work, it was used two qualitative methods (drop collapse and oil dispersion) and a quantitative one (emulsification). Jain et al. (JAIN et al., 1991) affirmed that the qualitative drop collapse test has a high correlation with surface tension, due to the biosurfactant ability to destabilize the liquid droplets on the oily surface. Ariech and Guechi reported several microorganisms isolated that presented high, moderate, and weak capacity to collapse oily surface (ARIECH; GUECHI, 2015). Regarding the qualitative oil dispersion test, the diameter of the central clear zone generated by the oil displacement indicates biosurfactant effectiveness and has a linear relationship with the amount of biosurfactant produced (ELDIN; KAMEL; HOSSAM, 2019; RODRIGUES et al., 2006). Literature suggests that both qualitative methods are reliable techniques for prospecting biosurfactant-producing microorganisms (ARIECH; GUECHI, 2015; YOUSSEF et al., 2004).

The emulsification test is a straightforward quantitative method to prospect biosurfactant-producing microorganisms (ARIECH; GUECHI, 2015). When compared to other hydrophobic compounds used in various screening processes, kerosene is the most widely used one (CHEN; BAKER; DARTON, 2007; IQBAL; KHALID; MALIK, 1995). Emulsification index after 24 hours (E_{24}) higher than 50% has been used as a criterion to select biosurfactant-producing isolates (ARIECH; GUECHI, 2015; CAPPELLO et al., 2012; ELDIN; KAMEL; HOSSAM, 2019; WILLUMSEN; KARLSON, 1997).

The 16S rDNA gene sequencing analysis indicated that bacteria selected in the first screening belong to three genera: thirty-six from *Serratia* Bizio, 1823, one from *Paenibacillus* Ash et al., 1994 and six from *Citrobacter* Werkman & Gillen, 1932 (Table 2-4).

Table 2-4 Identification of the isolates selected in the first screening.

(Continue)				
Codes of the isolated microorganisms	GenBank codes (NCBI)	Codes in the Johanna Döbereiner collection (CRB-JD)	Nearest correspondent/NCBI Accession number	Percent sequence identity (%)
FGTF02	MK156440	BR13847		95.10
FGTF12	MK156441	BR13848		95.40
FGTF14	MK156429	BR13821		95.40
FGTF82	MK156425	BR13814		95.40
FGTF83	MK156442	BR13849		95.00
FGTF86	MT252662	BR13850		96.30
FGTF92	MK156430	BR13822		94.20
FGTF94	MK156443	BR13851		95.30
FGTF100	MK156426	BR13815		94.80
FGTF101	MK156431	BR13830		94.90
FGTF104	MK156432	BR13831		94.20
FGTF113	MK156445	BR13855		95.40
FGTF121	MK156433	BR13832		94.70
FGTF125	MK156446	BR13856		95.30
FGTF132	MT252664	BR13857		96.50
FGV07	MT252665	BR13863		95.00
FGV09	MK156448	BR13897		94.30
FGV12	MK156449	BR13898	<i>Serratia marcescens</i> AB594756	94.60
FGV13	MK156450	BR13899		94.10
FGV15	MK156434	BR13833		94.10
FGV17	MK156427	BR13816		95.00
FGV24	MK156451	BR13900		94.40
FGV26	MK156452	BR13901		93.10
PGTF05	MK156453	BR13903		94.40
PGTF12	MK156438	BR13842		95.60
PGTF25	MT252666	BR13905		96.80
PGV03	MT252667	BR13906		94.40
PGV04	MK156454	BR13907		94.10
PGV05	MK156455	BR13908		92.10
PGV34	MK156439	BR13843		94.20
PGV35	MK156456	BR13909		92.90
PGV46	MK156457	BR13910		93.30
MZTF14	MK156458	BR13911		93.90
MZTF32	MK156428	BR13817		95.02
MZV01	MT252668	BR13920		95.50
MZV02	MK156436	BR13835		95.50

Table 2-4 Identification of the isolates selected in the first screening.

				(Conclusion)
FGV20	MK156435	BR13834	<i>Paenibacillus</i> <i>cellulositrophicus</i> <i>FJ178001</i>	94.60
FGV05	MK156447	BR13858		96.3
FGTF107	MK156444	BR13853		95.0
FGTF109	MT252663	BR13854	<i>Citrobacter werkmanii</i>	94.3
FGV19	MK156437	BR13841	<i>AB682285</i>	94.7
FGV25	MK156459	BR13912		94.0
FGV30	MK156460	BR13913		96.6

Source: Authors (2020)

Serratia genus belongs to the *Enterobacteriaceae* family and *Gammaproteobacteria* class (BRENNER; FARMER, 2015) and currently has 23 described species (www.bacterio.net). *Serratia* is a facultative anaerobic gram-negative bacterium. Isolates belonging to this genus showed production lipase (*Serratia* sp. W3), prodigiosin (*Serratia marcescens* FZSF02) (EDDEHECH et al., 2019; LIN et al., 2019), biosurfactant (NALINI; PARTHASARATHI, 2018), and ability to promote plant growth by solubilizing phosphates (LUDUEÑA et al., 2018).

Citrobacter and *Paenibacillus* genera currently have 14 and 240 cataloged species, respectively (www.bacterio.net). *Citrobacter* genus also belongs to *Enterobacteriaceae* family and *Gammaproteobacteria* class and can be classified as a facultative anaerobic non-lactose-fermenting gram-negative bacteria (FREDERIKSEN, 2015). According to Priest (2015), *Paenibacillus* colonies are smooth and translucent, with colors ranging from light brown to white, facultative anaerobic gram-positive or strict aerobic. Some studies also report biosurfactant production by *Paenibacillus salvei* (NAJAFI et al., 2015), *Paenibacillus* sp. (MESBAIAH et al., 2016), *Citrobacter murlinae* (ANAUKWU et al., 2016), and *Citrobacter freundii* (GOMAA; EL-MEIHY, 2019).

The fifteen bacteria selected in the second screening were cultured again, and cell-free supernatant used to determine the emulsification index (E_{24}) and surface tension (σ). The variables showed significant differences ($p\text{-value} \leq 0.05$) and were compared using the Tukey test (Table 2-5). Eleven isolates presented $E_{24} > 48\%$, whereas the surface tension ranged from 34.50 to 49.4 mN/m.

Table 2-5 Surface tension and emulsification index results for the microorganism selected in the second screening.

Codes of the isolated microorganisms	Mean $\pm$ SD*	
	Surface Tension σ (mN/m)	Emulsification index E24h (%)
FGTF14	34.93 ^k $\pm$ 0.06	51.17 ^f $\pm$ 0.71
FGTF82	36.40 ^{hi} $\pm$ 0.00	54.67 ^{de} $\pm$ 0.58
FGTF92	37.37 ^c $\pm$ 0.06	48.27 ^g $\pm$ 0.47
FGTF100	37.20 ^{ef} $\pm$ 0.00	52.60 ^{ef} $\pm$ 0.70
FGTF101	37.27 ^{ef} $\pm$ 0.06	60.27 ^a $\pm$ 0.81
FGTF104	35.87 ^j $\pm$ 0.06	47.80 ^g $\pm$ 0.59
FGTF121	36.73 ^{gh} $\pm$ 0.06	51.43 ^f $\pm$ 1.37
FGV15	36.13 ^{ij} $\pm$ 0.06	59.73 ^{ab} $\pm$ 0.76
FGV17	36.93 ^{fg} $\pm$ 0.06	54.03 ^{de} $\pm$ 0.25
FGV 19	49.40 ^a $\pm$ 0.20	57.73 ^{bc} $\pm$ 1.15
FGV20	48.63 ^b $\pm$ 0.15	55.60 ^{cd} $\pm$ 1.01
PGTF12	38.13 ^d $\pm$ 0.06	57.27 ^c $\pm$ 0.73
PGV34	44.60 ^c $\pm$ 0.46	41.03 ⁱ $\pm$ 0.30
MZTF32	38.50 ^d $\pm$ 0.00	39.33 ⁱ $\pm$ 0.85
MZV02	34.50 ^l $\pm$ 0.00	43.60 ^h $\pm$ 0.15
Mean	38.84	51.64
Coefficient of variation	0.22	1.37

Source: Authors (2020)

*SD – Standard deviation

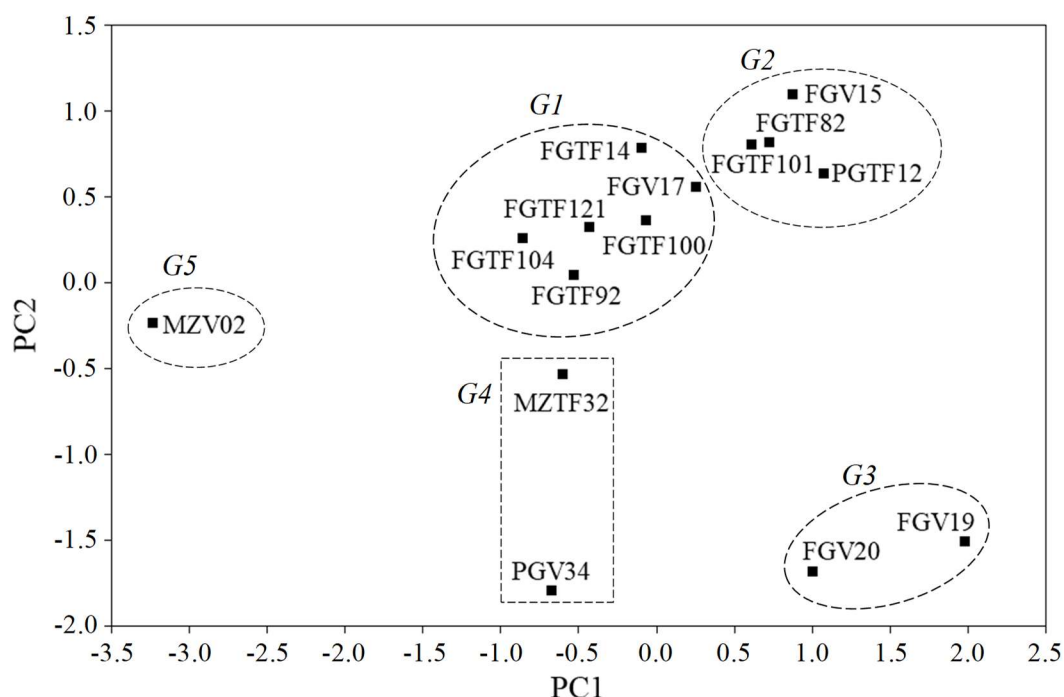
Means followed by the same case letters in the same column do not differ from each other by the Tukey test at 5% significance.

Determination of the surface tension reduction by bacterial cultivation medium has been recommended to confirm the ability of isolates to produce biosurfactants (DHAIL, 2012; PŁAZA et al., 2011). Willumsen and Karlson (WILLUMSEN; KARLSON, 1997) considered as promising biosurfactant producer microorganisms able to reduce the surface tension of the growth medium at least by 20 mN/m when compared with distilled water. All the fifteen analyzed strains decreased the broth surface tension by a value superior to the minimum established. The higher and lower surface tension reduction corresponded to 35,9 mN/m (for MZV02) and 21,0 mN/m (for FGV19), respectively (Table 2-5).

Principal component analysis (PCA) based on Euclidean distance and complete linkage method was applied to evaluate similarity among analyzed strains using surface tension (σ) and emulsification indexes (E₂₄, E₄₈, and E₇₂ with and without cells) as descriptors. After the first PCA run, essential descriptors to describe the variance were maintained and correlated ones excluded. Surface tension (σ) and emulsification indexes (E₂₄ with and without cells) were the

selected descriptors. The score plot of the first and second components showed a perfect separation of five distinct groups of isolates, *G1*, *G2*, *G3*, *G4*, and *G5* (Figure 2-3).

Figure 2-3 PC1-PC2 scores plot for the biosurfactant-producing isolates based on the surface tension (σ) and emulsification indexes (E24 with and without cells) results. *G1*, *G2*, *G3*, *G4*, and *G5* indicate formed groups.



Source: Authors (2020).

The first two principal components (PC1 and PC2) explained 78.9% of the total variance. In the PC1 axis, emulsification indexes (E₂₄ with and without cells) showed load coefficients slightly higher than surface tension one, but the three descriptors contributed positively to groups' separation. Concerning PC2, σ presented a negative and comparatively higher load and was the most crucial variable to separate the isolates in the graph vertically. PCA analysis did not show outliers, proving that data are within the acceptable region. *G1* represents isolates that produce biosurfactants with high emulsification capacity, which can reduce the surface tension of the cultivation medium significantly. Bacteria from *G2* are very similar to *G1*, but with slightly lower emulsification capacity. *G3* group represents microorganisms that promoted the lowest surface tension reduction and do not belong to the *Serratia* genus. Finally, isolates from *G4* e *G5* groups generated biosurfactants with low emulsification capacity but able to produce a medium and high surface tension drop, respectively. PCA results suggested significant differences between the surface-active

compounds produced by each group of bacteria, indicating that further characterizations may be useful to understand the observed pattern.

4 CONCLUSIONS

Three hundred and eighteen microorganisms were isolated from the Amapaense Amazon soil, from which forty-three promising biosurfactant-producing bacteria were identified. These isolates produced biosurfactants with good emulsification capacity, stability during the time, and a high potential to reduce the surface tension of growth medium, indicating an excreted metabolite of good quality. The 16S rDNA gene sequencing revealed that these bacteria belong to three different genera, *Serratia*, *Paenibacillus*, and *Citrobacter*. Qualitative methods used in the first screening stage (drop collapse and oil dispersion tests) were useful to identify biosurfactant-producing bacteria but did not allow ranking the most promising ones. For this purpose, emulsification indexes (with and without cells) and surface tension proved to be adequate. In summary, fifteen high potential microorganisms were isolated from the Amapa's soils. PCA analysis classified these selected bacteria into five different groups, indicating that similar isolates may produce different biosurfactants. As no previous research about biosurfactant-producing bacteria from Amapa's soils was found in literature, the present study can be considered as a contribution to the knowledge of the microbial diversity of this region.

Acknowledgments

The authors are grateful to the postgraduate program in Biodiversity and Biotechnology (Rede Bionorte), the State University of Amapá (UEAP), and the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Amapá and Embrapa Agrobiologia) for the analysis and facilities.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

5 REFERENCES

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database

search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

ANAUKWU, C. G. et al. Effect of biosurfactant produced by *Citrobacter murlinae* AF025369 and a synthetic surfactant on degradation of crude oil. v. 2, p. 1–6, 2016.

ARIECH, M.; GUECHI, A. Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 21, p. 1764–1772, 2015.

BALTACI, M. O.; ADIGUZEL, A. Isolation, identification and molecular characterization of cellulolytic bacteria from rumen samples collected from Erzurum slaughter house, Turkey. **Research Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 32–38, 2016.

BEZZA, F. A.; NKHALAMBAYAU SI CHIRWA, E. M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. **Chemosphere**, v. 144, p. 635–644, 2016.

BHARALI, P. et al. Biodiesel derived waste glycerol as an economic substrate for biosurfactant production using indigenous *Pseudomonas aeruginosa*. **RSC Advances**, v. 4, n. 73, p. 38698–38706, 2014.

BRENNER, D. J.; FARMER, J. J. Enterobacteriaceae. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–24.

CAPPELLO, S. et al. Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS2003) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: A microcosm study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 12, p. 2820–2828, 2012.

CHEN, C. Y.; BAKER, S. C.; DARTON, R. C. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, n. 3, p. 503–510, 2007.

CHRZANOWSKI, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 401–419, 2012.

CLEMENTS, T. et al. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 589–602, 2019.

DHAIL, S. Isolation of potent biosurfactant producing bacteria from oil spilled marine water and marine sediments. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 103, p. 16751-16757–16757, 2012.

DU NOÛY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v. vi, p. 625–632, 1925.

EDDEHECH, A. et al. Production, purification and biochemical characterization of a thermoactive, alkaline lipase from a newly isolated *Serratia* sp. W3 Tunisian strain. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 792–800, 2019.

EL-SHESHTAWY, H. S. et al. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, n. 2, p. 155–162, 2015.

ELDIN, A. M.; KAMEL, Z.; HOSSAM, N. Isolation and genetic identification of yeast producing biosurfactants, evaluated by different screening methods. **Microchemical Journal**, v. 146, n. 2018, p. 309–314, 2019.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2006.

FREDERIKSEN, W. *Citrobacter*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l: s.n.]. p. 1–23.

GOMAA, E. Z.; EL-MEIHY, R. M. Bacterial biosurfactant from *Citrobacter freundii* MG812314.1 as a bioremoval tool of heavy metals from wastewater. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019.

HABA, E. et al. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 316–322, 2003.

HOLANDA, F.H. e; BIROLI, W.G.; MORAIS, E. dos S.; SENA, I.S.; FERREIRA, A.M.; FAUSTINO, S.M.; SOLON, L.G. da S.; PORTO, A.L.M.; FERREIRA, I.M. Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 20, 101200, 2019.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–179, 1995.

- JAIN, D. K. et al. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 4, p. 271–279, 1991.
- JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124–4126, 1949.
- KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Lipopeptides in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, n. 1, p. 1–8, 2010.
- KATZ, H. et al. Rhamnolipid-enhanced *Pseudomonas putida* biofilm formation on hydrophilic surfaces with toluene as the bacterium's sole carbon source. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 127, n. July 2017, p. 87–94, 2018.
- KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 581–590, 2003.
- KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311–318, 2012.
- KUYUKINA, M. S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p. 149–156, 2001.
- LIN, C. et al. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* FZSF02 in the form of pigment pellets. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 40, n. xxxx, p. 58–64, 2019.
- LUDUEÑA, L. M. et al. Strain *Serratia* sp. S119: A potential biofertilizer for peanut and maize and a model bacterium to study phosphate solubilization mechanisms. **Applied Soil Ecology**, v. 126, n. August 2017, p. 107–112, 2018.
- LUNA, J. M. et al. Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida sphaerica* Cultivated in Low-Cost Substrates. **Chemical Engineering Transactions**, v. 27, n. April 2016, p. 67–72, 2012.
- LUO, C. et al. Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 1897–1910, 2015.
- MATSUYAMA, T.; NAKAGAWA, Y. Bacterial wetting agents working in colonization of bacteria on surface environments. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 7, n. 5–6, p. 207–214, 1996.

- MENDES, A. N. et al. Physicochemical Properties of Rhamnolipid Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to Applications in Microemulsions. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 06, n. 01, p. 64–79, 2015.
- MESBAIAH, F. Z. et al. Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus* sp. under thermophilic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 14221–14230, 2016.
- MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 2764–2769, 1996.
- NAJAFI, A. R. et al. Comparison and modification of models in production of biosurfactant for *Paenibacillus alvei* and *Bacillus mycoides* and its effect on MEOR efficiency. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 128, p. 177–183, 2015.
- NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium wilt* of eggplant. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 2, p. 108–115, 2018.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- PŁAZA, G. A. et al. Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of bacillus strains and production of biosurfactant. **Environment Protection Engineering**, 2011.
- PRASAD, R. et al. Fungal nanobionics: Principles and applications. In: **Fungal Nanobionics: Principles and Applications**. [s.l.] Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018, 2018. p. 1–316.
- PRIEST, F. G. *Paenibacillus*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. [s.l.: s.n.]. p. 1–40.
- RAMOS, M.M.; MORAIS, E. dos S.; SENA, I. da S.; LIMA, A.L.; OLIVEIRA, F.R. de; FREITAS, C.M. de; FERNANDES, C.P.; CARVALHO, J.C.T. de; FERREIRA, I.M. Silver nanoparticle from whole cells of the fungi *Trichoderma* spp isolated from Brazilian Amazon. *Biotechnology Letters* (online), v. 1, p. 1-11, 2020.
- RODRIGUES, L. et al. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 109–116, 2006.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Minireview Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.

- RUFINO, R. D. et al. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 1–5, 2011.
- SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.
- SUN, S. et al. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Bioresource Technology**, p. 421–428, 2019.
- THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BANAT, I. M. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3366–3372, 2011.
- VAN GENNIP, M. et al. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. **Apmis**, v. 117, n. 7, p. 537–546, 2009.
- VIDUEIRA FERREIRA, J. E. et al. Chemometric Study on Molecules with Anticancer Properties. **Chemometrics in Practical Applications**, 2012.
- WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers Pia A. Willumsen & Ulrich Karlson. p. 415–423, 1997.
- YOUSSEF, N. H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 339–347, 2004.

Capítulo 3 - BIOSURFACTANT BY *Serratia* sp. MK156427: PRODUCTION OPTIMIZATION AND NANOEMULSION FORMATION

ABSTRACT

The main objective of this paper is to optimize biosurfactant production by the bacterial isolate from Amazonian soil *Serratia* sp. MK156427 and, to evaluate nanoemulsion formation. Biosurfactant production was carried with different carbon and nitrogen sources. The two best nutritional systems based on corn oil/urea and glycerol/urea were selected using a central composite rotatable design (CCRD). Mathematical models and the variation of the pH, temperature, and cultivation time were investigated, aiming to enhance biosurfactant production. For the corn oil/urea system, pre-selected factors were pH 8, 25°C and 48h, whereas for the glycerol/urea were pH 7, 30°C and 96h. The mathematical models using the response surface methodology showed adequate adjustment. The best run of the experimental design for corn oil/urea (6.00 %/ 0.60 %) and glycerol/urea (3.00%/1.40%) systems presented surface tension values of 35.70 mN/m and 37.10 mN/m, respectively. The nanoemulsions were produced by a low-energy method and obtained average sizes by dynamic light scattering varying from 453.1 nm to 667.3 nm when 0.1% of oil was employed. Therefore, *Serratia* sp. MK156427 showed promising biosurfactant-producing potential for future industrial applications.

Keywords: Natural surfactant, Bacteria, Surface Tension, Response surface methodology, Nanosystems.

1 INTRODUCTION

Biosurfactants are metabolites, produced under specific conditions by a wide variety of microorganisms. Such molecules present great structural diversity and are classified into glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, phospholipids, fatty acids, polymeric and particulate biosurfactants (CAMEOTRA et al., 2010). Due to the structural diversity, biosurfactants of different types play distinct functions and might be suitable for applications in petrochemical, environmental, pharmaceutical, food, and agricultural sectors (JOSHI; GEETHA; DESAI, 2015). The main function of biosurfactants is to reduce surface and interfacial tension of immiscible fluids as oil-water systems, allowing the miscibility among components.

They present the following advantages over synthetic surfactants as a low toxicity, greater degradability, greater resistance to environmental conditions, can be produced from

renewable sources, and others (JAIN et al., 2013; REIS et al., 2018). Biosurfactants can favor the formation of emulsions and nanoemulsions, providing different physicochemical, sensory, or biological attributes desirable to products, such as appearance, texture, and stability (BAI; MCCLEMENTS, 2016). Thus, emulsions and nanoemulsions containing these types of molecules can be widely used in commercial products of food, beverage, and cosmetics industries (BAI; MCCLEMENTS, 2016; MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007).

Despite the numerous advantages of the biosurfactants, production costs are still a limitation for its industrial usage (JAIN et al., 2013; JOICE; PARTHASARATHI, 2014). According to Reis et al. (2018), two strategies may be adopted to reduce costs: (i) identification and use of microorganisms with enhanced production capacity, and (ii) optimization of the growth medium conditions. Several environmental factors influence the biosurfactant yield and quality, particularly the source of carbon and nitrogen, pH, aeration, inoculum quantity, and incubation period (RAHMAN et al., 2010). Optimization of these factors may increase biosurfactant production by microorganisms (NAJAFI et al., 2010). One variable at a time (OVAT) method is a widely used approach to optimize factors affecting metabolite production by microorganisms. Nonetheless, this methodology fails in assessing interactions among the factors (HARSHVARDHAN; MISHRA; JHA, 2013).

In order to overcome this limitation, several statistical methods can be jointly employed to OVAT technique to improve the biosurfactant production, such as the response surface methodology (SHAJAHAN et al., 2017; SREENA; SEBASTIAN, 2018), multivariable linear regression (stepwise) (CHEN et al., 2013; VILLA-VÉLEZ; VÁQUIRO; TELIS-ROMERO, 2015), as well as mathematical modeling and prediction by artificial neural networks (ANN) (VATS; NEGI, 2013; VILLA-VÉLEZ; VÁQUIRO; TELIS-ROMERO, 2015). The present study aimed to optimize nutritional and environmental factors for biosurfactant production by *Serratia* sp. MK156427, making possible the usage of low cost and easily available hydrophilic or hydrophobic carbon sources, and to evaluate the biosurfactant crude extract effects efficiency on nanoemulsion formation.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Chemicals

Chemicals used in the study were of analytical grade and purity > 99%, were obtained from Sigma-Aldrich® (St. Louis, Mo, U.S.A.), Synth® and Dinâmica® (Diadema, SP, Brazil), and KASVI® (São José dos Pinhais, PR, Brazil).

2.2 Bacteria strain

We used a *Serratia* sp. bacteria isolated from the Várzea ecosystem at Ferreira Gomes city, Amapá. The strain (BR13816 code) was deposited at the Johanna Döbereiner Biological Resource Center (Embrapa Agrobiologia) and the gene sequence at the NCBI GenBank (MK156427 code). The isolate was also registered under the code A49223C on the National Genetic Heritage Management System (SISGEN), as recommended by the Brazilian Biodiversity Law (n° 13.123/2015).

2.2 Inoculum preparation

The microorganism was inoculated in Agar nutrient plates and incubated at 30 °C for 24h. The colonies were transferred to tubes, using a platinum loop, containing nutrient broth and incubated at 30 °C for 72 hours. The fermentation tests were used 1 mL of the inoculum, with approximately 10⁸ CFU/mL.

2.3 Biosurfactant production

The biosurfactant production was conducted using a mineral salt medium (MSM) adapted from Fadhile Almansoori et al. (2017). The medium contained 1.2 g/L KH₂PO₄, 1.8 g/L K₂HPO₄, 4.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.1 g/L NaCl and 1 mL of trace elements. Trace elements' composition comprised 0.1 g/L MnSO₄·H₂O, 0.025 g/L CuCl₂, 0.025 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.025 g/L Co(NO₃)₂, 0.025 g/L ZnCl and 0.01 g/L (NH₄)₂SO₄. The pH of the medium was adjusted using 1 mol/L sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid (HCl). The tests were performed using a 125 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of the culture medium and a stationary regime (SHARMA; PANDEY, 2020).

2.4 Effects of carbon and nitrogen sources

The carbon sources used for biosurfactant production were sucrose (C1), fructose (C2), glycerol (C3), soy oil (C4), corn oil (C5), olive oil (C6), and residual soy oil (C7). The mineral medium was supplemented with 5.0% of the carbon source. After the selection of the best two carbon sources, four nitrogen sources were also explored by 0.5% adding: (NH₄)₂SO₄ (N1),

peptone (N2), yeast extract (N3), and Urea (N4) to the mineral medium. For all experiments, pH was adjusted to 7.0, and the cultures incubated at 30 °C for 96 hours.

2.5 Effects of pH, temperature and time of reaction

The effect of operational parameters was investigated for mineral mediums supplemented with 0.5% (w/v) of the best nitrogen source and 5.0% of one of the two best carbon sources. Initially, different pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, and 9.0) were tested for biosurfactant production at 30 °C for 96h. Temperature variation (25, 30, 35, and 40 °C) was analyzed considering the selected pH and reaction time of 96h. Finally, different times (48, 96, 144, and 192h) were evaluated for fermentation reaction at pH and temperature previously selected.

2.6 Emulsification and surface tension tests

The culture media obtained from optimized conditions were centrifuged at 6000 rpm/10 min at 4°C in order to obtain a cell-free supernatant to determine the emulsification capacity and surface tension. The emulsification test was performed by the addition of 2.0 ml of commercial kerosene in a screw cap test tube containing 2.0 ml of cell-free supernatant, followed by vigorously mixing in a vortex for 2 min (RODRIGUES et al., 2006). Measurements were carried out at room temperature, and the emulsification index was (E24h) calculated by the ratio between emulsion column height after 24 h and total column height. To evaluate the surface tension, we used a KRUSS (Easydyne) tensiometer, according to the methodology described by Kuyukina et al. (2001). Before each test, the DU NUOY ring was sterilized using a Bunsen burner and calibrated with distilled water ($\sim 70.4 \pm 0.1$ mN/m), as proposed by (DU NOÛY, 1925). The analyses were realized at room temperature and in triplicate.

2.7 Biosurfactant production optimization

After the preliminary analysis of the nutritional and operational parameters, central composite rotatable designs (CCRD) coupled with response surface methodology (RSM) were used to optimize biosurfactant production using the best hydrophilic and hydrophobic carbon source (Table 3-1). Each experimental design comprised two independent factors (carbon and nitrogen source concentrations), varying at five levels (-1.41, -1.0, 0, 1, 1.41), and four

replicates of the central point, totalizing 12 runs. For the system containing the hydrophobic carbon source, one experimental design using the selected carbon (5.58, 6.0, 7.0, 8.0, and 8.41) and nitrogen (0.35, 0.40, 0.50, 0.60, and 0.64) concentrations (%) were evaluated. For the system containing the hydrophilic carbon source, a first design considering higher carbon levels (1.46, 2.5, 5.0, 7.5, 8.53) and lower nitrogen ones (0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 0.85) were realized. Once this design did not provide a good mathematical model ($R^2 < 0.7$), the variables were adjusted using a steepest descent optimization. The experiment was moved along the path in which the carbon source concentrations were decreased until the response not reduce any more. After this evaluation, new concentrations for the variables were chosen as the central point to optimize the medium using a second CCRD design (DEEPIKA et al., 2016). Therefore, the following carbon concentrations (0.58, 1.0, 2.0, 3.0, and 3.41) and nitrogen ones (0.43, 0.6, 1.00, 1.40, and 1.56) were used in the second design of the hydrophilic carbon source containing medium. For all designs, the surface tension was adopted as the dependent variable, once it is closely related to the biosurfactant yield. Experiments were conducted at pH, time, and temperature previously selected. All experimental designs were analyzed using the Minitab® 19 software. Experimental data were adjusted and represented by a second-order polynomial equation.

Table 3-1 Central composite rotatable design (CCRD) matrix of independent variables for the fermentation process using the best hydrophobic and hydrophilic carbon source.

(Continue)

Run	Coded Variables		System containing hydrophobic carbon-source		System containing hydrophilic carbon source			
					Fist design		Second design	
	Carbon source concentration	Nitrogen source concentration	Carbon (g/L)	Nitrogen (g/L)	Carbon (g/L)	Nitrogen (g/L)	Carbon (g/L)	Nitrogen (g/L)
1	-1	-1	6.00	0.40	2.50	0.25	1.00	0.60
2	+1	-1	8.00	0.40	7.50	0.25	3.00	0.60
3	-1	+1	6.00	0.60	2.50	0.75	1.00	1.40
4	+1	+1	8.00	0.60	7.50	0.75	3.00	1.40
5	-1.41	0	5.58	0.50	1.46	0.50	0.58	1.00
6	+1.41	0	8.41	0.50	8.53	0.50	3.41	1.00
7	0	-1.41	7.00	0.35	5.00	0.15	2.00	0.43
8	0	+1.41	7.00	0.64	5.00	0.85	2.00	1.56
9	0	0	7.00	0.50	5.00	0.50	2.00	1.00

Table 3-1 Central composite rotatable design (CCRD) matrix of independent variables for the fermentation process using the best hydrophobic and hydrophilic carbon source.

(Conclusion)								
Run	Coded Variables		System containing hydrophobic carbon-source		System containing hydrophilic carbon source			
	Carbon source concentration	Nitrogen source concentration	Carbon (%)	Nitrogen (%)	First design		Second design	
					Carbon (%)	Nitrogen (%)	Carbon (%)	Nitrogen (%)
10	0	0	7.00	0.50	5.00	0.50	2.00	1.00
11	0	0	7.00	0.50	5.00	0.50	2.00	1.00
12	0	0	7.00	0.50	5.00	0.50	2.00	1.00

2.8 Nanoemulsions preparation and characterization

Nanoemulsions (NE) were prepared using a low-energy method (SOLANS; SOLÉ, 2012). The 5 mL of the aqueous phase, composed by the biosurfactant crude extract, was added dropwise to the oily phase (soy oil) under continuous homogenization using a vortex mixer (Kasvi®, model K40-10208). The oil concentration tested were 0.1, 0.5, and 1% to produce NE with biosurfactant crude extracts obtained from corn oil (CO-NE) and glycerol (GL-NE) carbon sources. NE characterization was carried out by dynamic light scattering (DLS) analysis using the Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments®, United Kingdom) equipped with a 10 mW ‘red’ laser ($\lambda = 632.8$ nm). Samples were previously diluted with deionized water (1:25). The average particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential were measured in triplicate, at room temperature, and the results expressed as mean $\pm$ standard deviation. The best NE were stored at room temperature, and the stability evaluated after 7 and 14 days.

2.9 Statistical analysis

All obtained data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) and means compared by the Tukey test at 5% of significance using the Minitab® 19 software.

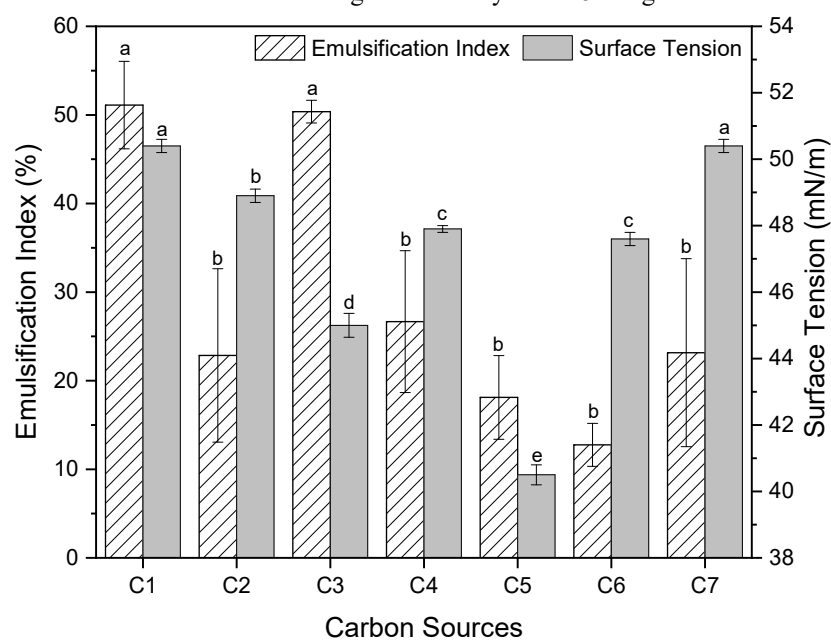
3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Selection of carbon and nitrogen sources

Biosurfactant production is affected by different parameters such as microorganism strain, carbon sources, nitrogen sources, salt concentration, temperature, pH, agitation, and

aeration (CLEMENTS et al., 2019). Carbon supplementation is fundamental to enhance the quantity and quality of the biosurfactant produced in the fermentative process. As shown in Figure 3-1, the *Serratia* isolate was able to grow in all tested carbon sources. Glycerol and sucrose resulted in higher emulsification index values (50.4 ± 1.3 % and 51.1 ± 4.9 %, respectively), but corn oil was the most effective in reducing the surface tension (40.5 ± 0.3 mN/m).

Figure 3-1 Effect of carbon sources on the emulsification index and surface tension. C1: sucrose; C2: fructose; C3: glycerol; C4: soy oil; C5: corn oil; C6: olive oil; and C7: residual soy oil. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance.



Source: Authors (2020).

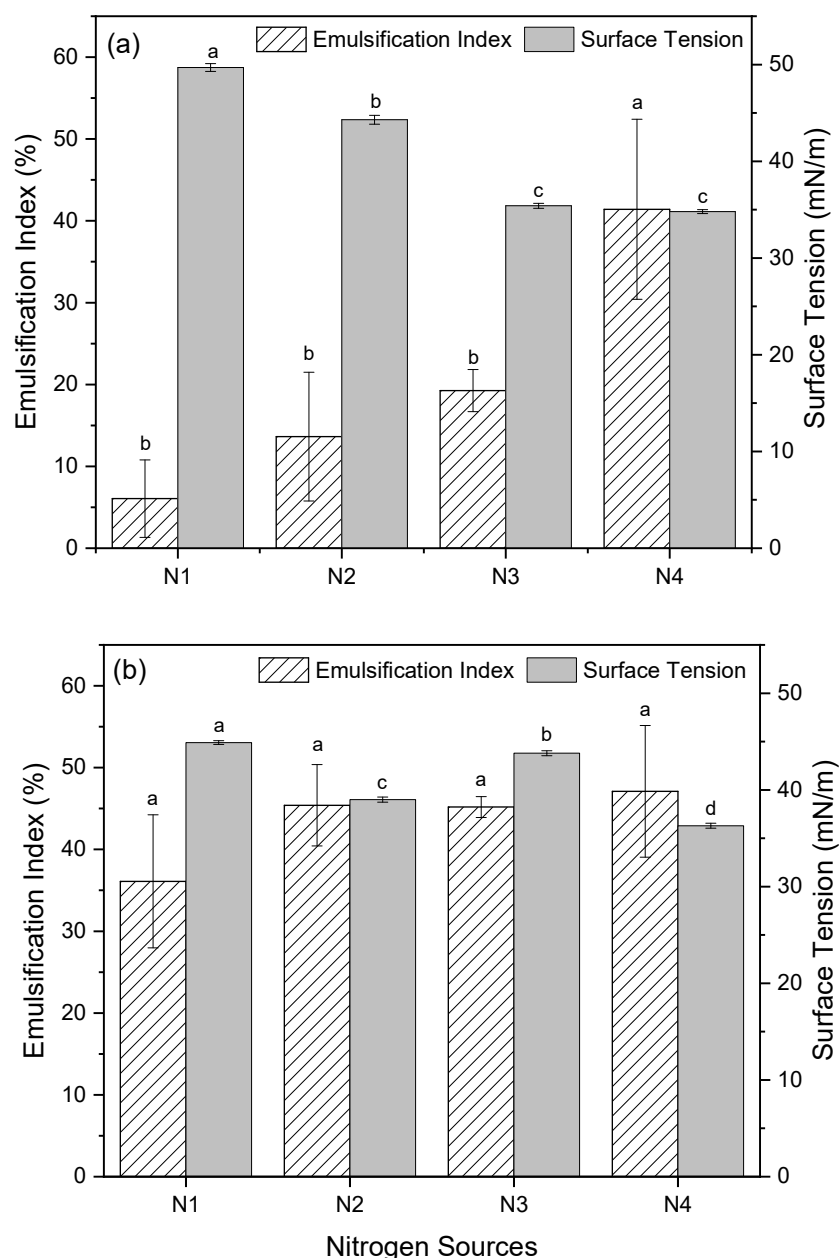
Substrates rich in hydrophobic compounds, such as soybean, coconut fat, castor, corn, olive, and sunflower vegetable oils, have also been reported as suitable carbon sources for the production of biosurfactants by *Serratia* species (FERRAZ; DE ARAÚJO; PASTORE, 2002). For the production of prodigiosin-like pigment by *Serratia marcescens* SMΔR, the addition of vegetable oils (2–6% [v/v]) enhanced the fermentation broth markedly (WEI; CHEN, 2005). Ferraz et al. (2002) reported that sunflower oil contains about 60% of linoleic acid, which decreased the surface tension significantly, indicating that this fatty acid stimulated the production of biosurfactant by *Serratia marcescens* LB006. A bacteria of this specie degraded the *Cymbopogon martini* (palmarosa) green oil efficiently by using its carboxyl group as the carbon source (MOHANAN et al., 2007). Different hydrocarbons such as n-hexadecane, canola, sunflower, diesel, and engine oils also proved to induce high production of biosurfactant

by *Paenibacillus* sp. D9 (JIMOH; LIN, 2019a). Corn oil was the most promising hydrophobic carbon source tested in the present study and, thus, it was selected for further investigation.

Hydrophilic carbon sources, such as glycerol, glucose, fructose, and sucrose, have been used for biosurfactant production by *Serratia* species (FADHILE ALMANSOORY et al., 2017). The use of 2% (w/v) sucrose as a carbon source for cultivation of *Serratia* MTCC86 favored the biosurfactant production with an outstanding emulsification activity and good surface properties (PRUTHI; CAMEOTRA, 1997). Glycerol has also been indicated as a suitable substrate for the optimized biosurfactant production by *Serratia marcescens* (BIDLAN et al., 2007). Sucrose and glycerol, used as sole carbon sources, also proved to improve biosurfactant production by different *Bacillus* strains (PEREIRA et al., 2013; SOUSA et al., 2012). Fadhile Almansoory et al. (2017) evaluated submerge fermentation by a *Serratia marcescens* strain using these two substrates (glycerol and sucrose) and indicated that glycerol resulted in higher biosurfactant production and greater reduction of surface tension. Figure 3-1 shows that sucrose and glycerol presented similar emulsification capacity, but the latter carbon source reduced the medium's surface tension more significantly.

As can be seen in Figure 3-2, urea was the best nitrogen source for biosurfactant production by the *Serratia* strain independent of the carbon source (Figure 3-2). For corn oil supplemented medium, yeast extract and urea resulted in a similar reduction in surface tension (35.4 ± 0.3 mN/m and 34.8 ± 0.3 mN/m, respectively), but urea produced a higher emulsification index. For the culture medium supplemented with glycerol, all tested nitrogen sources presented emulsification capacity statistically equivalent, but urea addition generated the lowest surface tension value (36.3 ± 0.3 mN/m).

Figure 3-2 Effect of nitrogen sources on the emulsification index and surface tension when the fermentation medium is supplemented with corn oil (a) and glycerol (b). N1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; N2: peptone; N3: yeast extract; and N4: Urea. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance.



Source: Authors (2020).

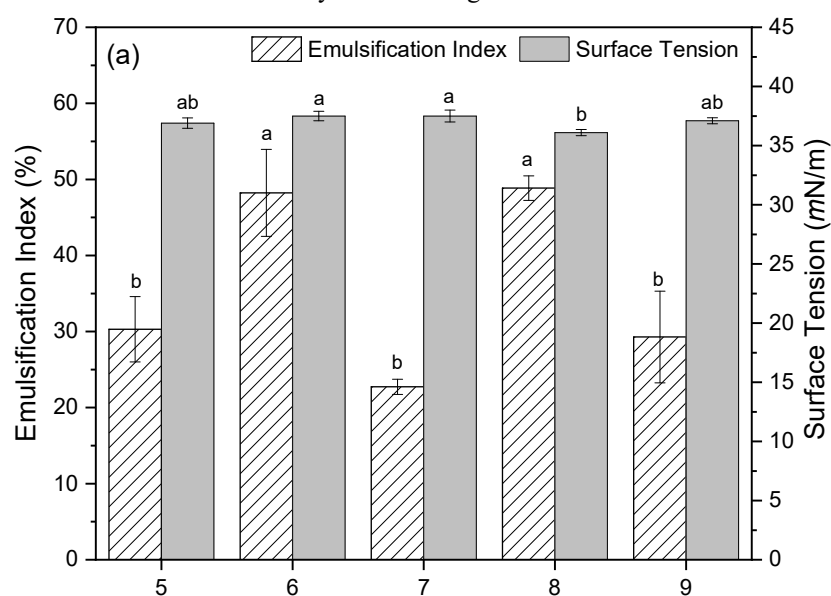
Nitrogen is the second most essential supplement for biosurfactant production by microorganisms. A significant number of nitrogen sources have already been reported in fermentative processes by *Serratia* species, such as peptone, yeast extract, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium chloride, as well as some mixtures between these compounds (CLEMENTS et al., 2019; FADHILE ALMANSOORY et al., 2017). For *Pseudomonas aeruginosa* MR01, yeast extract, urea, and peptone presented comparable influence on the biosurfactant production (LOTFABAD et al., 2009). *Serratia ureilytica* sp. nov. was able to hydrolyze urea to ammonia to use it as a sole nitrogen source for its growth (BHADRA; ROY; CHAKRABORTY, 2005). For a *Serratia nematodiphila* strain, a 20 % increase in biosurfactant levels was attained when urea was used as the nitrogen source (PANJIAR et al., 2020). An

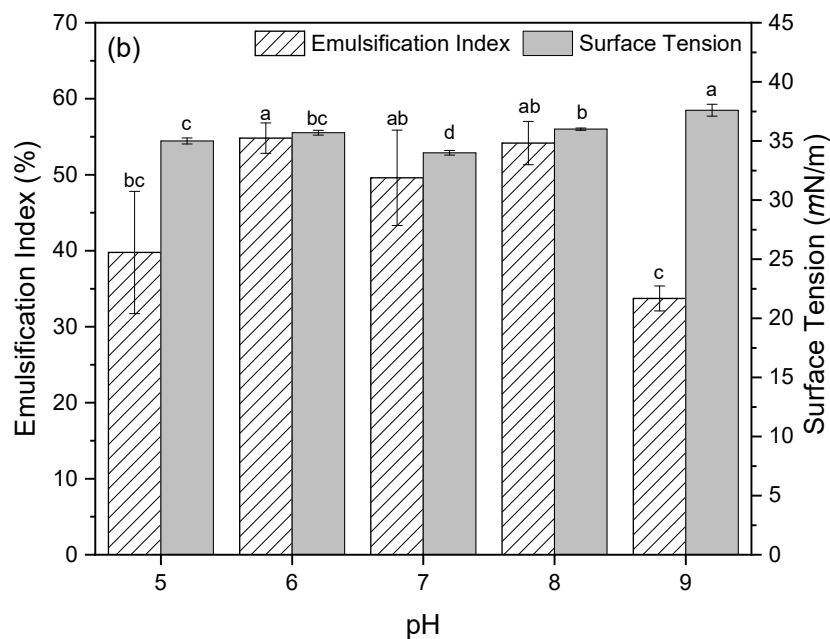
excellent biosurfactant yield and surface tension reduction were also attained by *Serratia marcescens* ZCF2 when olive oil was used as the carbon source and urea as the nitrogen one (HUANG et al., 2020). Therefore, as urea presented a superior behavior when compared to the other tested nitrogen sources, it was chosen for additional evaluations using the selected carbon sources (corn oil and glycerol).

3.2 Selection of pH, temperature and reaction time

Physicochemical conditions can play an essential role in the biosurfactant production output by microorganisms. The *Serratia* strain grew and produced biosurfactant at a wide range of pH, from 5.0 to 9.0 (Figure 3-3). When the growth medium was supplemented with corn oil/urea (Figure 3-3a), a high emulsification index (48.9 ± 1.6 %) and the lowest mean value of surface tension (36.1 ± 0.3 mN/m) occurred at pH 8.0. Surface tension results for experiments conducted at pH 5.0 and 9.0 were similar to the one attained at pH 8.0, according to the Tukey test. Nonetheless, the emulsification capacity was impaired at pH 5, 7, and 9. For fermentation processes using glycerol/urea (Figure 3-3b), the emulsification index obtained from pH 6.0 to 8.0 was around 55 %, but neutral pH resulted in the lowest surface tension (34.0 ± 0.2 mN/m).

Figure 3-3 Effect of pH on the emulsification index and surface tension for the biosurfactant production using (a) corn oil and urea, and (b) glycerol and urea. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance.





Source: Authors (2020)

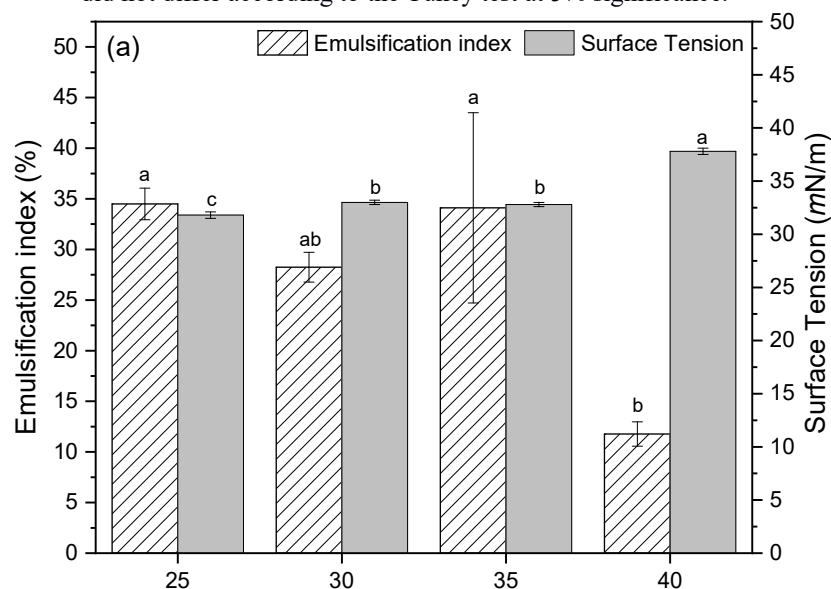
Different strains of *Serratia marcescens* have been found to produce biosurfactants at pH ranging from 4 to 9 (BIDLAN et al., 2007; FADHILE ALMANSOORY et al., 2017). Jeon, Jung, and Park (2011) found that *Serratia* sp. SK090424 cultivated in a mineral-based soybean oil medium showed significantly higher biosurfactant production at pH 8 than pH 7. According to these authors, the biosurfactant increased activity at pH 8 might be a consequence of the greater emulsification of soybean oil at alkaline conditions, as bacterial cells may better absorb and metabolize the emulsified oil. For mineral medium supplemented with glycerol or other hydrophilic carbon sources, pH 7.0 or pH 7.2 is broadly cited as an optimal condition for biosurfactant production (CLEMENTS et al., 2019). Once the biosurfactant production generally occurs by several enzymatic reactions inside the cells (BURGER; GLASER; BURTON, 1963), pH may impair their activities (MARCELINO et al., 2020) and, consequently, the microorganism's metabolism. Considering these aspects, pH 8.0 and pH 7.0 were selected for biosurfactant production using corn oil/urea and glycerol/urea containing systems, respectively.

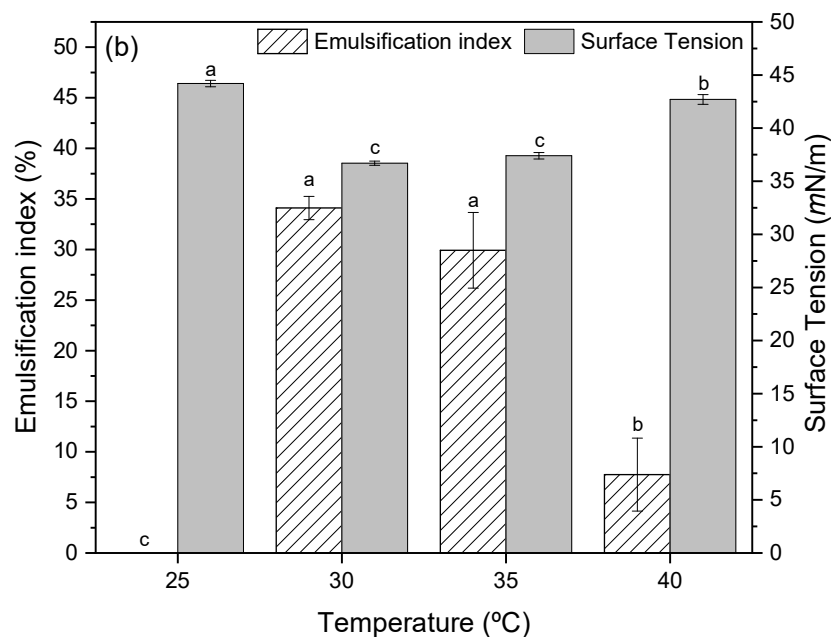
The influence of temperature on fermentation processes using corn oil/urea at pH 8.0 and glycerol/urea at pH 7.0 can be seen in Figure 3-4. For the first one, the lowest surface tension (31.8 ± 0.3 mN/m) was verified after incubation at 25 °C. The emulsification index did not show significant differences in the range of 25 °C to 35 °C but dropped markedly at 40 °C. When the medium was supplemented with glycerol/urea at pH 7.0 (Figure 3-4b), the emulsification was inhibited at 25 °C, and a comparatively low value was also obtained at 40

°C. Fermentation processes conducted at 30 °C and 35 °C demonstrated statistically equivalent results and similar surface tension mean values (around 37 mN/m).

The selection of ideal incubation temperature is essential in fermentation processes as it may also affect enzymatic reactions involved in the microorganisms' metabolism (MARCELINO et al., 2020). For *Serratia marcescens* DT-1P, the temperature of 26.6°C was reported as optimum (BIDLAN et al., 2007). In another work, the temperature of 30 °C was the best condition for biosurfactant production by *Serratia* strains when glycerol and olive oil-enriched mediums were employed (FADHILE ALMANSOORY et al., 2017; HUANG et al., 2020). *Serratia marcescens* 274 showed temperature-dependent activity, as the red pigment prodigiosin and the biosurfactant serrawettin were produced at 30 °C but not at 37 °C (TANAKA et al., 2004). Here, the temperatures of 25 °C and 30 °C were chosen for the fermentation using corn oil/urea and glycerol/urea containing systems, respectively, which are in accordance with the literature.

Figure 3-4 Effect of temperature on the emulsification index and surface tension for the biosurfactant production using (a) corn oil and urea at pH 8, and (b) glycerol and urea at pH 7. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance.

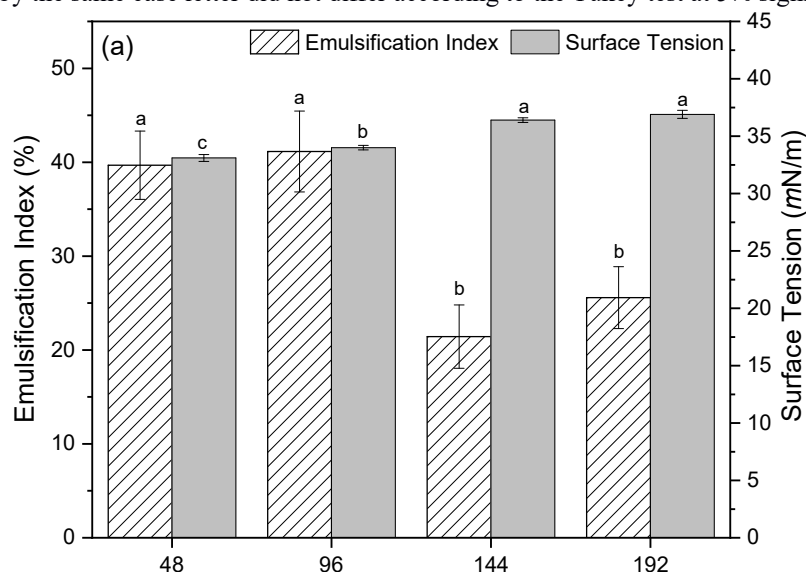


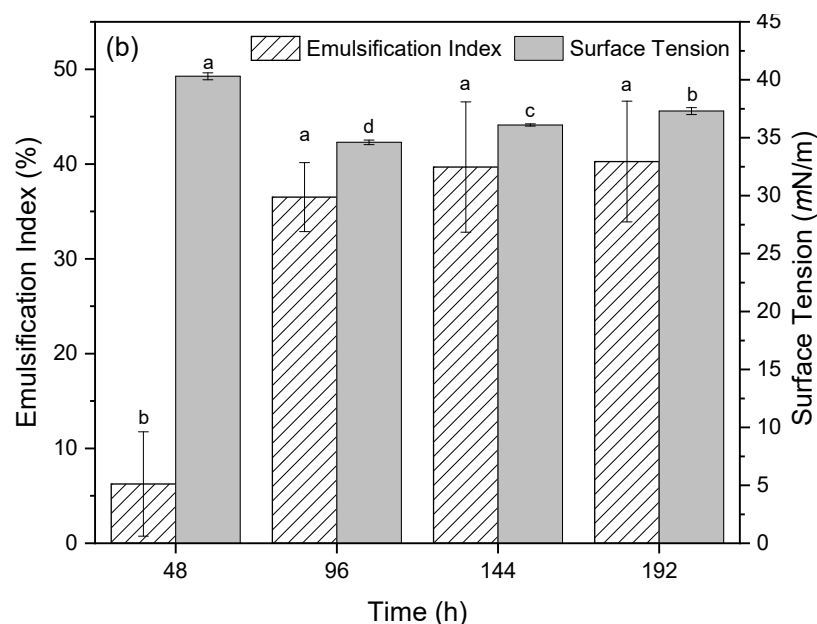


Source: Authors (2020).

The fermentation time from 48 to 192 h was also evaluated to optimize biosurfactants production (Figure 3-5). It can be seen the highest emulsification index and lowest surface tension until 96 h when fermentation was conducted at pH 8 and 25°C using the corn oil/urea supplemented medium (Figure 3-5a). After 96 h, these parameters decreased significantly. For corn glycerol/urea supplemented medium culture at pH 7 and 30 °C, the highest emulsification index and the lowest surface tension was observed after 96 h (34.6 ± 0.2 mN/m).

Figure 3-5 Effect of fermentation time on the emulsification index and surface tension for the biosurfactant production using (a) corn oil and urea at pH 8 and 25°C, and (b) glycerol and urea at pH 7 and 30°C. Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance.





Source: Authors (2020).

Production of surface-active compounds in culture broth is a time-dependent process (SHARMA; SINGH; VERMA, 2020). After the critical micellar concentration, biosurfactant production begins to increase at significantly lower rates, and no further reduction in surface tension is observed (FERRAZ; DE ARAÚJO; PASTORE, 2002). For *Serratia marcescens* MTCC, maximum surface tension reduction coincided with maximum biosurfactant production and was observed after 24h (PRUTHI; CAMEOTRA, 1997). Similar behavior was also reported by Almansoori et al. (2017) for a *Serratia marcescens* strain but after 120h. Optimal cultivation time for *Serratia* species is strongly dependent on strain, growth medium, growth conditions, and can vary from 24h to 168h (CLEMENTS et al., 2019). Based on previous aspects, the incubation times of 48h and 96h, which is in agreement with the literature, were selected for the fermentation processes using the corn oil/urea (at pH 8 and 25°C) and the glycerol/urea (at pH 7 and 30°C) enriched-mediums, respectively.

3.3 Optimization of carbon and nitrogen sources concentrations

Central composite rotatable designs were used to investigate optimal carbon and nitrogen concentrations for biosurfactant production, based on surface tension measurements. Experimental designs were previously presented in the methodology section (Table 3-1), whereas responses can be seen in Table 3-2. Fermentation processes were conducted using optimized operation parameters for corn oil/urea (pH 8, 25°C, and 48h) and glycerol/urea supplemented mediums (pH 7, 30°C, and 96h). Table 3-2 shows the summary of observed and

predicted surface tension values for the three experimental designs performed. For the corn oil/urea system, the third run (6.00 % of corn oil and 0.60 % of urea) resulted in the lowest surface tension (35.7 ± 0.41 mN/m). For the glycerol/urea enriched medium, the fifth run (1.46 % and 0.50 %) pointed out the lowest surface tension (37.00 ± 0.39 mN/m). Regression models were built in order to fit surface tension results of both experimental designs; however, the first experimental design of the glycerol/urea system did not present a good agreement between observed and predicted surface tension values (Table 3-2).

Table 3-2 Experimental and predicted surface tension values of the cell-free supernatant obtained in the fermentation process using corn oil and glycerol as carbon sources and urea as the nitrogen one.

Run	Surface Tension (mN/m)					
	Corn oil/urea system		Glycerol/urea system			
	Observed	Predicted	First design		Second design	
			Observed	Predicted	Observed	Predicted
1	43.4 ± 0.1	44.4	37.3 ± 0.5	37.5	39.0 ± 0.4	39.2
2	48.0 ± 0.5	45.0	38.1 ± 0.3	38.7	38.5 ± 0.3	38.2
3	35.7 ± 0.4	38.4	37.1 ± 0.4	37.5	39.8 ± 0.5	40.3
4	50.5 ± 0.5	49.2	39.5 ± 0.4	40.4	37.1 ± 0.3	37.2
5	43.5 ± 0.3	40.8	37.0 ± 0.4	36.8	40.8 ± 0.4	40.4
6	45.8 ± 0.4	48.8	40.6 ± 0.5	39.7	37.3 ± 0.3	37.5
7	42.9 ± 0.4	44.3	38.5 ± 0.4	38.2	38.4 ± 0.4	38.5
8	44.0 ± 0.5	43.0	40.1 ± 0.5	38.4	38.9 ± 0.5	38.5
9	39.1 ± 0.5	38.8	39.4 ± 0.4	38.5	38.3 ± 0.4	38.4
10	38.5 ± 0.6	38.8	38.7 ± 0.4	38.5	38.4 ± 0.5	38.4
11	38.9 ± 0.4	38.8	38.4 ± 0.5	38.5	38.1 ± 0.4	38.4
12	38.7 ± 0.4	38.8	37.3 ± 0.3	38.5	38.6 ± 0.4	38.4

ANOVA results for the experimental design of the corn oil/urea enriched medium and for the first design of the glycerol/urea system are presented in Table 3-3. The model for corn oil/urea was significant (p-value: 0.033) and predictable (F-value: 5.32), whereas the one for glycerol/urea system did not show significance at 5% level and did not provide a good mathematical adjustment ($R^2 < 0.7$). In order to achieve an adequate model for the glycerol/urea system, variables were adjusted using a steepest descent optimization (DEEPIKA et al., 2016). Five runs of the first experimental design were select, as indicated in Table 3-4. After evaluation, a second experimental design to optimize this medium was performed, using for the central point 2% of glycerol and 1% of urea (Table 3-2). In this second experimental design for

glycerol-urea enriched medium, the fourth run (3.00 % of glycerol and 1.40 % of urea) was more effective in reducing surface tension (37.1 ± 0.3 mN/m). The regression model also achieved a good agreement between the observed and predicted surface tension values, and ANOVA results show significance (p-value: 0.003 and F-value: 14.17) at a 5% level (Table 3-3).

Table 3-3 ANOVA of the quadratic model for surface tension.

(Continue)						
Source	DF	PC	Adj. SS	Adj. MS	F-value	P-value
<i>Design of the corn oil/urea system</i>						
Model	5	81.59%	171.735	34.3470	5.32	0.033
Linear	2	31.26%	65.803	32.9016	5.10	0.051
C (Corn oil)	1	30.48%	64.143	64.1431	9.93	0.020
U (Glycerol)	1	0.79%	1.660	1.6602	0.26	0.630
Square	2	37.97%	79.922	39.9608	6.19	0.035
C*C	1	20.27%	58.081	58.0810	9.00	0.024
U*U	1	17.70%	37.249	37.2490	5.77	0.053
2-Way Interaction	1	12.36%	26.010	26.0100	4.03	0.092
C*U	1	12.36%	26.010	26.0100	4.03	0.092
Error	6	18.41%	38.742	6.4570		
Lack-of-Fit	3	18.31%	38.542	12.8473	192.71	0.001
Pure Error	3	0.10%	0.200	0.0667		
Total	11	100.00%				
<i>First design of the glycerol/urea system</i>						
Model	5	68.39%	9.58132	1.91626	2.49	0.149
Linear	2	62.76%	9.13465	4.56733	5.94	0.038
Glycerol (G)	1	53.44%	6.64514	6.64514	8.64	0.026
<i>Design of the corn oil/urea system</i>						
Urea (U)	1	9.32%	2.48951	2.48951	3.24	0.122
Square	2	1.65%	0.35667	0.17833	0.23	0.800
G*G	1	0.60%	0.00400	0.00400	0.01	0.945
U*U	1	1.05%	0.32400	0.32400	0.42	0.540
2-Way Interaction	1	3.98%	0.09000	0.09000	0.12	0.744
GL*UR	1	3.98%	0.09000	0.09000	0.12	0.744
Error	6	31.61%	4.61535	0.76922		
Lack-of-Fit	3	17.37%	2.32535	0.77512	1.02	0.495
Pure Error	3	14.24%	2.29000	0.76333		
Total	11	100.00%				
<i>Second design of the glycerol/urea system</i>						
Model	5	92.19%	10.0487	2.00975	14.17	0.003
Linear	2	76.18%	8.3037	4.15187	29.26	0.001
Glycerol (G)	1	76.17%	8.3023	8.30230	58.52	0.000
Urea (U)	1	0.01%	0.0014	0.00143	0.01	0.923
Square	2	4.91%	0.5350	0.26750	1.89	0.232

Table 3-3 ANOVA of the quadratic model for surface tension.

Source	DF	PC	Adj. SS	Adj. MS	(Conclusion)	
					F-value	P-value
G*G	1	4.46%	0.5290	0.52900	3.73	0.102
U*U	1	0.45%	0.0490	0.04900	0.35	0.578
2-Way Interaction	1	11.10%	1.2100	1.21000	8.53	0.027
GL*UR	1	11.10%	1.2100	1.21000	8.53	0.027
Error	6	7.81%	0.8513	0.14188		
Lack-of-Fit	3	6.62%	0.7213	0.24042	5.55	0.097
Pure Error	3	1.19%	0.1300	0.04333	-	-
Total	11	100.00%	10.9000	-	-	-

Source: Authors (2020).

DF: Degree of freedom; PC: percentage contribution; SS: Sum of squares; MS: Mean square.

Table 3-4 Steepest descent experiment design and response values.

Trial (first design)	Glycerol	Urea	Surface tension (mN/m)
1	8.53	0.50	40.6
2	7.50	0.75	39.5
3	5.00	0.85	40.1
4	2.50	0.75	37.1
5	1.46	0.50	37.0

The mathematical model obtained to represent the surface tension (ST) as a function of the carbon and nitrogen concentrations (%) for the corn oil/urea system and the glycerol/urea one (the second experimental design) with their respective coefficients are given by Equations (1) and (2), respectively:

$$ST = 318.4 - 52.1C - 424U + 3.01C^2 + 241U^2 + 25.5C*U \text{ Eq. (1)}$$

$$ST = 39.30 - 0.794 G + 1.69 U + 0.287 G^2 + 0.547 U^2 - 1.375 G*U \text{ Eq. (2)}$$

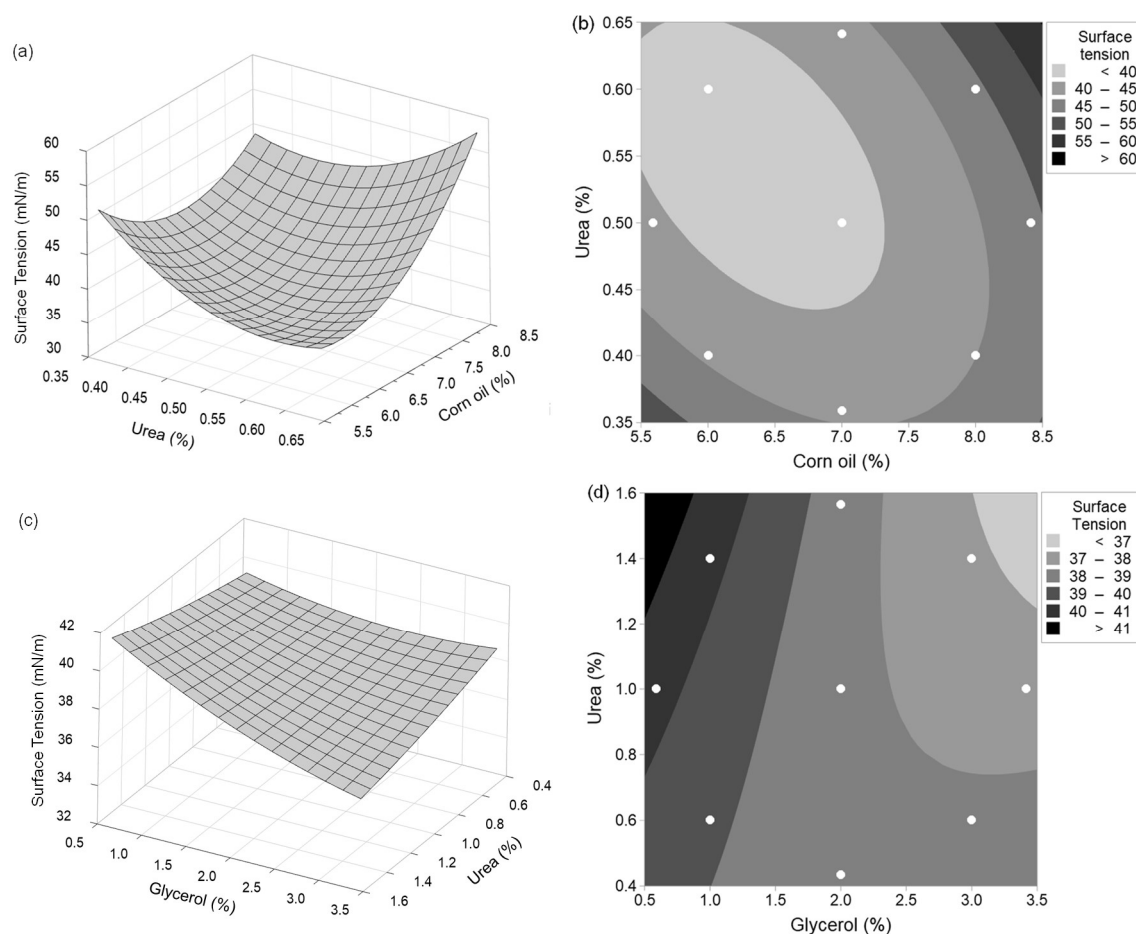
Where: C, G, and U are the corn oil, glycerol, and urea concentration, respectively. The coefficient of determination (R^2) was 81.50% and 92.19% for the corn oil/urea and glycerol/urea mediums, respectively.

Therefore, the regression model significantly explained the variation in response values. The most significant parameter in multiple regression analyses was the one with the lowest p-value and the largest t-value (YETILMEZSOY; SARAL, 2007). For the corn oil/urea system, the major contribution for the surface tension response was originated by the C term (p-value: 0.020; t-value: 3.15), followed by C^2 (p-value: 0.024; t-value: 3.00), and U^2 (p-value: 0.053; t-

value: 2.40), indicating the highest contribution of second-order terms. In the case of the glycerol/urea medium (second design), the G term dominated the surface tension response, mainly due to its first-order contribution (p-value: 0.000; t-value: -7.65), but the interaction factor G*U also play a significant role (p-value: 0.027; t-value: -2.92). These results suggested that studied variables (corn oil, glycerol, and urea concentrations) affected the surface tension in fermentation processes considerably.

The optimization goal was to obtain the minimum surface tension value for the *Serratia* cultivation using the hydrophobic and hydrophilic mediums, adjusting carbon and nitrogen concentrations in the studied range. 3D response surface and contour maps for the mathematical models are presented in Figure 3-6. For the corn oil/urea system, the surface plot appears moderately concave (Figure 3-6a). The increase of corn oil or urea concentrations initially reduced surface tension but then raised it, showing a distorted parabolic trend for both parameters. The contour map exhibited regions of different surface tension ranges separated by concentric ellipses (Figure 3-6b). The third run of the experimental design (6.00 % of corn oil and 0.60 % of urea) dropped within the elliptic region that presents surface tension lower than 40 mN/m. The response surface optimization indicated that 6.33% of corn oil and 0.54% of urea would further reduce surface tension. For the glycerol urea supplemented medium, a 3D plot showed a slightly deformed plane, in which the increase of urea and glycerol concentrations (in the studied range) caused a surface tension drop (Figure 3-6c). The contour plot revealed a lower surface tension area (< 37mN/m), which may be part of an elliptic region at the bottom of a concave 3D surface (Figure 3-6d). The fourth run (3.00 % of glycerol and 1.40 % of urea) of the experimental design fell very close to this area, but the optimized response (according to the regression model) would be attained using 3.41% of glycerol and 1.57% of urea.

Figure 3-6 Three-dimensional surface and contour maps of the effect of carbon and nitrogen sources concentrations on surface tension. (a-b) corn oil/urea system; (c-d) Glycerol/urea system. Points marked in white in the contour plot indicated the runs of experimental design



Source: Authors (2020).

Mathlom, Hayder, and Mahmood (2018) tested different C: N ratios (6:1, 10:1, 13.3:1, 16:1, 20:1, and 30:1) in the mineral salt medium and indicated 20:1 as the optimal ratio condition for biosurfactant production by a *Serratia* strain. A Box-Behnken design used to evaluate the nutrient ratios' role on biosurfactant production by *Serratia marcescens* indicated that C/N = 5, C/Fe = 26,000, and C/Mg = 30 was the optimal condition to reduce the surface tension (ROLDÁN-CARRILLO et al., 2011). When used in the wastewater purification process, *Serratia marcescens* W5 showed efficient ammonium removal abilities in a wide range of C/N ratios at pH 7 (WANG et al., 2016). The carbon to nitrogen ratio is of utmost importance on biosurfactant production, but it tightly depends on the supplement source and producer strain (CLEMENTS et al., 2019; JAHAN et al., 2020). A promising biosurfactant producing microorganism must be able to decrease the growth medium's surface tension at least by 20 mN/m when compared with distilled water (WILLUMSEN; KARLSON, 1997). The third run of the experimental design for corn oil/urea system and fourth run of the glycerol one (second design) resulted in surface tension values 48.8% (from 69.7 to 35.7) and 46.2% (from 68.9 to 37.1) lower than the used aqueous medium, respectively (Table 3-2). Pruthi and Cameotra

(1997) optimized biosurfactant production by *Serratia marcescens* MTCC 86 and found a maximum surface tension reduction (68 mN/m to 27 mN/m) corresponding to 60.3% whereas Roldán-Carrillo et al. (2011) attained 50% of drop (66 mN/m to 33 mN/m) for a different *Serratia* strain. Other works also suggested surface tension reduction of approximately 40% and 70% (DUSANE et al., 2011; PRUTHI; CAMEOTRA, 2000). Therefore, surface tension drop obtained for corn oil/urea and glycerol/urea supplemented mediums suggested a suitable optimization.

Surface tension values seen after optimization of carbon and nitrogen sources concentrations are slightly greater than some values observed in the previous section. Such results did not indicate incoherent surface tension values or problems in the optimization procedure but were a consequence of the methodology adopted for inoculum preparation. The fermentation tests were conducted using 1 mL of the inoculum, with approximately 10^8 CFU/mL. Probably, the inoculum volume used for the optimization experiment presented a higher bacteria concentration, resulting in a competition for the carbon source and its immediate consumption at the beginning of the fermentation process. Such a phenomenon would prevent the production of larger biosurfactant amounts and, consequently, surface tension reduction. Therefore, greater surface tension reduction might be achieved by adjusting microorganism concentration in the inoculum for the optimized conditions.

3.4 Effect of biosurfactant crude extracts in nanoemulsions

The droplet size distribution and zeta potential of the nanoemulsions produced with the cell-free crude extracts obtained from corn oil/urea and glycerol/urea enriched-mediums containing the biosurfactant are presented in Table 3-5.

Table 3-5 Particle size, polydispersity index and Zeta potential of the nanoemulsions formulations.

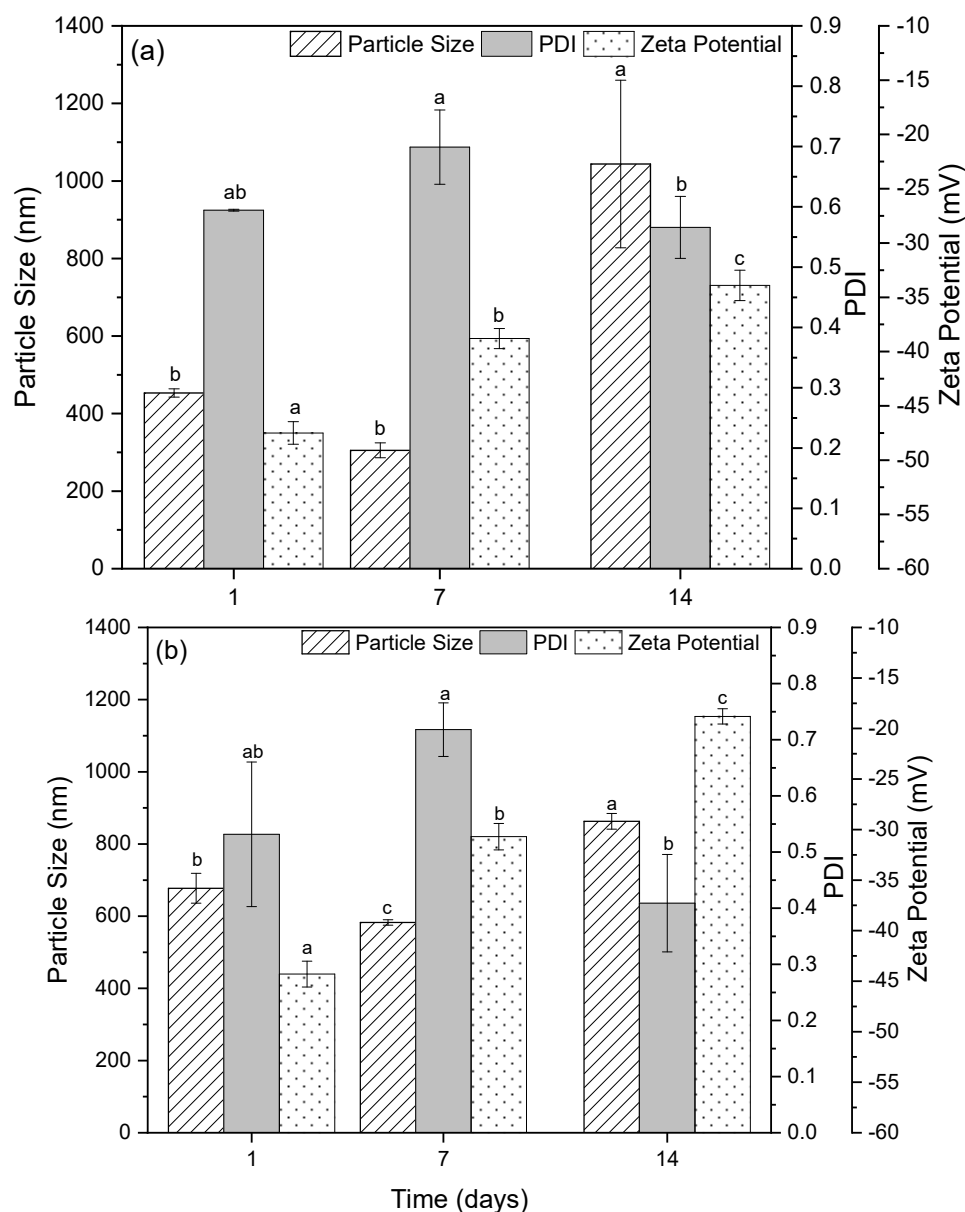
Nanoemulsions	Average Particle Size $\pm$ SD* (nm)	Polidispersity Index $\pm$ SD*	Zeta Potential $\pm$ SD* (mV)
CO-01	453.10 ^b $\pm$ 10.69	0.594 ^b $\pm$ 0.002	-47.5 ^a $\pm$ 1.0
CO-05	1004.47 ^a $\pm$ 174.61	0.765 ^a $\pm$ 0.033	-47.5 ^a $\pm$ 0.8
CO-1	791.90 ^a $\pm$ 153.99	0.745 ^a $\pm$ 0.032	-47.0 ^a $\pm$ 0.8
GL-01	667.43 ^b $\pm$ 41.52	0.532 ^a $\pm$ 0.123	-44.3 ^a $\pm$ 1.3
GL-05	930.90 ^a $\pm$ 49.80	0.628 ^a $\pm$ 0.057	-45.7 ^a $\pm$ 1.2
GL-1	926.97 ^a $\pm$ 93.70	0.660 ^a $\pm$ 0.084	-45.4 ^a $\pm$ 0.8

*SD: Standard deviation. Means followed by the same case letters in the same column did not differ from each other by the Tukey test at 5% significance

All formulations showed fine and translucent aspects and bluish reflect, according to the literature (SOLANS; SOLÉ, 2012). There was a significant difference among the hydrodynamic diameters ($p > 0.05$) of CO-NE and GL-NE produced with 0.1 and 0.5% of oil, indicating that the size was affected by the increase of oil. At higher concentrations of oil, the sizes were larger and no difference was seen between 0.5 and 1% of oil. The broad droplet size distribution observed can be attributed to a high concentration of non-dispersed emulsion droplets. However, it can be observed that NE produced with 0.1% of oil obtained the lowest mean droplet sizes demonstrating that biosurfactants presented in both media had a limit of oil dispersion ($p < 0.05$). CO-NE produced with 0.1% of oil presented the lowest mean size (453.1 nm) followed by GL-NE (667.3 nm), indicating that the biosurfactants presented in CO were more efficient than those presented in GL. This is in accordance with the lowest surface tension values obtained above for corn oil/urea extract (35.70 mN/m). The PDI above 0.3 for all NE indicates polydisperse systems, and differences between CO-NE produced with 0.1 and 0.5% of oily phase were seen ($p < 0.05$). All NE had negative surface charges, ranging from -44 to -47 mV. Values above 30mV (in modulus) provide electrostatic repulsion between NE that contributes to stability (TRAN et al., 2014).

As CO-NE and GL-NE produced with 0.1% of oil presented the best physicochemical characteristics, they were selected for stability evaluation during storage at room temperature up to the 14 days (Figure 3-7).

Figure 3-7 Particle size, polydispersity index, and Zeta potential as a function of time for the nanoemulsions containing the biosurfactant crude extracts produced with (a) corn oil and urea (CO-01), and (b) glycerol and urea (GL-01). Means classified by the same case letter did not differ according to the Tukey test at 5% significance.



Source: Authors (2020).

The parameters determined at different time points were the size, polydispersity index, and zeta potential (Figure 3-7). Both NE presented size distribution stability until 7 days of storage. However, it can be noted a significant increase in size distribution parameters evaluated after 14 days in comparison with the first day. The polydispersity indices remained above 0.3, indicating a polydispersed character. Zeta potential values decreased for both formulations but remained above 30mV (in modulus).

Ostertag (2012) demonstrated NE sizes of 930 nm and 140 nm when produced with the synthetic surfactants Tween 20 and Tween 80, respectively, by a low-energy method. They used 10% of oil (medium-chain triglycerides) and 25% of surfactant, values higher than described in this work. Despite there are no reports about NE production with biosurfactants

using low energy methods in the literature, few works reported their production by high energy ones. Doost et al. (2019) produced a thymol nanoemulsion by high energy method employing 4% of thymol and 1% of the biosurfactant Quillaja Saponin. They obtained NE with mean droplet diameter varying from 245 to 166 nm and PDI from 0.48 to 0.30.

NE produced here presented size distribution larger than those obtained in work with biosurfactants cited above. However, contrary to the reported works, here we employed the whole extract containing diverse substances, among them the biosurfactants. The presence of bacteria metabolites could have hindered the oil droplets formation and/or the DLS measurement. Also, the yield of biosurfactant production by *Serratia* strains or other microorganisms can be lower 0.1 % (w/v) even in optimized conditions (CLEMENTS et al., 2019; JIMOH; LIN, 2019b). Therefore, NE sizes above 300 nm and the physical instability of CO-NE and GL-NE during storage may be attributed to the low biosurfactant concentration in the media when compared to the minimum of 1% of isolated biosurfactant employed in the literature. In addition, it is reported in the literature that the surfactant type and surfactant-to-oil ratio play an important role in NE size reduction and stability (Ostertag 2012). These results indicate that the biosurfactant produced by *Serratia* sp. bacteria isolated from Amazonian soil were able to produce nanoemulsions by a low-energy method that is easy to handle, with no organic solvent, and low energetic cost. Some parameters of the biosurfactant and NE process production could be modified in order to obtain smaller-sized and more stable NE. Therefore, we contributed to the first report of NE based on biosurfactant produced by Amazonian isolated bacteria.

4 CONCLUSIONS

The present study successfully selected carbon and nitrogen sources as well as other growth parameters for biosurfactant production by *Serratia* sp. MK156427. The response surface methodology allowed optimization of carbon and nitrogen concentrations, generating mathematical models with suitable adjustment. Nanoemulsions produced with the cell-free crude extracts were prepared with success by a low-energy method. The formulations containing 0.1% of oil generated the smallest particle size. Overall, our results demonstrated the potential of cell-free crude extracts obtained by *Serratia* sp. MK156427 isolated from Amazonian soil as an effective source of natural surfactants.

5 REFERENCES

- BAI, L.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71–79, 2016.
- BHADRA, B.; ROY, P.; CHAKRABORTY, R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2155–2158, 2005.
- BIDLAN, R. et al. Optimised Production of Biosurfactant by *Serratia marcescens* DT-1P. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 705–716, 2007.
- BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, R. M. The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glycolipid By Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of biological chemistry**, v. 238, n. 8, p. 2595–2602, 1963.
- CAMEOTRA, S. S. et al. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 261–280, 2010.
- CHEN, Y. et al. Ensemble and enhanced PM10 concentration forecast model based on stepwise regression and wavelet analysis. **Atmospheric Environment**, v. 74, p. 346–359, 2013.
- CLEMENTS, T. et al. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 589–602, 2019.
- DEEPIKA, K. V. et al. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 38–47, 2016.
- DOOST, A. S., VAN CAMP, J., DEWETTINCK, K., VAN DER MEEREN, P. Production of thymol nanoemulsions stabilized using Quillaja Saponin as a biosurfactant: Antioxidant activity enhancement. **Food chemistry**, 293, 134–143, 2019.
- DU NOÛY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v. vi, p. 625–632, 1925.
- DUSANE, D. H. et al. Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. **Biofouling**, v. 27, n. 6, p. 645–654, 2011.
- FADHILE ALMANSOORY, A. et al. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading

- bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 272–280, 2017.
- FERRAZ, C.; DE ARAÚJO, Á. A.; PASTORE, G. M. The Influence of Vegetable Oils on Biosurfactant Production by *Serratia marcescens*. **Biochemistry**, v. 98–10, n. 1, p. 841–847, 2002.
- HAMZAH, A.; SABTURANI, N.; RADIMAN, S. Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. **Sains Malaysiana**, v. 42, n. 5, p. 615–623, 2013.
- HARSHVARDHAN, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Purification and characterization of cellulase from a marine *Bacillus* sp. H1666: A potential agent for single step saccharification of seaweed biomass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2013.
- HUANG, Y. et al. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Serratia marcescens* ZCF25 from oil sludge and application to bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, 2020.
- JAHAN, R. et al. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 102061, 2020.
- JAIN, R. M. et al. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 199–204, 2013.
- JEON, B. YOUNG; JUNG, I. L.; PARK, D. H. Mineralization of Petroleum Contaminated Wastewater by Co-Culture of Petroleum-Degrading Bacterial Community and Biosurfactant-Producing Bacterium. **Journal of Environmental Protection**, v. 02, n. 07, p. 895–902, 2011.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Enhancement of *Paenibacillus* sp. D9 Lipopeptide Biosurfactant Production Through the Optimization of Medium Composition and Its Application for Biodegradation of Hydrophobic Pollutants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 3, p. 724–743, 2019a.
- JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, n. June, p. 109607, 2019b.
- JOICE, P. A.; PARTHASARATHI, R. Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1. **International Journal of current microbiology and**

applied sciences, v. 3, n. 9, p. 140–151, 2014.

JOSHI, S. J.; GEETHA, S. J.; DESAI, A. J. Characterization and Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* R2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 2, p. 346–361, 2015.

KUYUKINA, M. S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p. 149–156, 2001.

LOTFABAD, T. B. et al. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, n. 2, p. 183–193, 2009.

MARCELINO, P. R. F. et al. Sustainable Production of Biosurfactants and Their Applications. In: **Lignocellulosic Biorefining Technologies**. [s.l: s.n.]. p. 159–183.

MASON, T. G. et al. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 18, n. 41, 2006.

MATHLOM, G. S.; HAYDER, N. H.; MAHMOOD, M. S. Synergistic effect of biosurfactant and prodigiosin produced by *Serratia marcescens* as antimicrobial agent. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 1601–1615, 2018.

MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. 109–124, 2007.

MOHANAN, S. et al. Biodegradation of palmarosa oil (green oil) by *Serratia marcescens*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 279–283, 2007.

NAJAFI, A. R. et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 163, n. 3, p. 188–194, 2010.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 619–622, 2013.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 231–238, 2014.

OSTERTAG, F., WEISS, J., & MCCLEMENTS, D. J.. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *Journal of colloid and interface science*, 388(1), 95-102, 2012.

PANJIAR, N. et al. Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. **Science of the Total Environment**, v. 729, p. 138933, 2020.

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

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia marcescens*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 133–135, 1997.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Novel sucrose lipid produced by *Serratia marcescens* and its application in enhanced oil recovery. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 3, n. 4, p. 533–537, 2000.

RAHMAN, P. K. S. M. et al. Production of rhamnolipid biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* DS10-129 in a microfluidic bioreactor . **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 45–52, 2010.

REIS, C. B. L. DOS et al. First report of the production of a potent biosurfactant with α,β -trehalose by *Fusarium fujikuroi* under optimized conditions of submerged fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 185–192, 2018.

RODRIGUES, L. et al. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 109–116, 2006.

ROLDÁN-CARRILLO, T. et al. Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 2, p. 384–389, 2011.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Applications , Current. v. 2011, p. 1–42, 2011.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.

- SHAJAHAN, S. et al. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University - Science**, v. 29, n. 3, p. 302–310, 1 jul. 2017.
- SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus subtilis* BR-15. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, n. September 2019, p. 101575, 2020.
- SHARMA, S.; PANDEY, L. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. **Bioresource Technology**, v. 307, n. March, p. 123261, 2020.
- SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.
- SOUSA, M. et al. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 897–906, 2012.
- SREENA, C. P.; SEBASTIAN, D. Augmented cellulase production by *Bacillus subtilis* strain MU S1 using different statistical experimental designs. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 4 jan. 2018.
- TANAKA, Y. et al. Temperature-Dependent Bacteriostatic Activity of *Serratia marcescens*. **Microbes and Environments**, v. 19, n. 3, p. 236–240, 2004.
- TRAN, T. H. et al. Quercetin-containing self-nanoemulsifying drug delivery system for improving oral bioavailability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 103, n. 3, p. 840–852, 2014.
- VATS, S.; NEGI, S. Use of artificial neural network (ANN) for the development of bioprocess using *Pinus roxburghii* fallen foliages for the release of polyphenols and reducing sugars. **Bioresource Technology**, 2013.
- VILLA-VÉLEZ, H. A.; VÁQUIRO, H. A.; TELIS-ROMERO, J. The effect of power-ultrasound on the pretreatment of acidified aqueous solutions of banana flower-stalk: Structural, chemical and statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 52–61, 2015.
- WANG, T. et al. Heterotrophic nitrogen removal by a newly-isolated alkalitolerant microorganism, *Serratia marcescens* W5. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 618–627, 2016.

WEI, Y. H.; CHEN, W. C. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 6, p. 616–622, 2005.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers Pia A. Willumsen & Ulrich Karlson. p. 415–423, 1997.

YETILMEZSOY, K.; SARAL, A. Stochastic modeling approaches based on neural network and linear-nonlinear regression techniques for the determination of single droplet collection efficiency of countercurrent spray towers. **Environmental Modeling and Assessment**, v. 12, n. 1, p. 13–26, 2007.

Capítulo 4 – USO DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DE UM ISOLADO DE *Paenibacillus* sp. MK156435

RESUMO

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por diversos microrganismos, e nos últimos anos estão atraindo um interesse na comunidade científica devido suas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos. O presente estudo teve como objetivo incrementar a produção de biossurfactante por um isolado *Paenibacillus* sp. MK156435, variando os fatores nutricionais e ambientais. Foram avaliadas diferentes fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas, e em seguida os efeitos da melhor fonte de carbono, do pH, da Temperatura e do Tempo, foram avaliados usando um planejamento fatorial completo com dois níveis. A partir dos fatores pré-selecionados de temperatura e tempo um delineamento central composto rotacional (DCCR) foi usado para otimizar o processo de produção de biossurfactante pelo isolado. O modelo matemático do planejamento fatorial foi considerado adequado para descrever a produção de biossurfactante em relação à tensão superficial ($R^2 = 0,9999$), sendo o menor valor para tensão superficial observado nas condições de 5% de querosene, pH 6,0, 25 °C e 24h. Não houve uma redução adicional na otimização das condições operacionais do processo por DCCR, apresentando modelo matemático que não ficou bem ajustado ($R^2 = 0,7268$), o modelo apresentou falta de ajuste significativo indicando que as condições operacionais podem ser melhoradas para a redução da tensão superficial, com menor valor para tensão superficial de 34,6 mN/m a 30°C/24h. A falta de ajuste foi significativa e pode estar associada ao pH do meio. O microrganismo nas condições de estudo conseguiu reduzir consideravelmente a tensão superficial do meio a partir da produção de biossurfactante extracelular em 24 h de cultivo, demonstrando ser potencial para diversas aplicações industriais.

Palavras-chave: Design experimental, Fatorial completo, DCCR, Otimização

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que agem entre fluidos com diferentes polaridades, aumentam a área de contato com compostos insolúveis, reduzem a tensão superficial e interfacial propiciam melhor mobilidade, biodisponibilidade e biodegradação (BEZERRA et al., 2018; JOY et al., 2017). Suas propriedades permitem ampla aplicação em

diversas áreas, entre elas nas indústrias alimentícias (produção de emulsificantes alimentares), farmacêutica e cosmética (formulação de cremes, medicamentos e agentes antimicrobianos), petroquímica, agrícola (produção de fertilizantes), bem como engenharia civil (tratamento de resíduos e esgoto) e em outros segmentos industriais (AL-WAHAIBI et al., 2014; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015; SANTOS et al., 2016).

Uma eficiente produção de biossurfactante a nível industrial, requer vários fatores que acabam influenciando na quantidade e tipo de biossurfactante produzido. O uso de diversos fatores (fatores nutricionais e ambientais) utilizando métodos estatísticos, além da utilização de matérias-primas baratas, com o objetivo de reduzir o custo no processo de produção vem sendo utilizado (DEEPIKA; NAGARAJU; BRAMHACHARI, 2017). O processo de produção ocorre por fermentação de diversos substratos e microrganismos, ocorrendo assim a síntese de diversos metabólitos para aplicações industriais (SATPUTE; PŁAZA; BANPURKAR, 2017). A síntese desses metabólitos pode ser espontânea ou induzida (presença de indutores), sob variações de condições ambientais (pH, temperatura, arejamento, agitação, tempo) e nutricionais (diferentes fontes de carbono e nitrogênio), ou quando são mantidas em condições de stress no crescimento celular, como uma baixa concentração de nitrogênio (BHARDWAJ; CAMEOTRA; CHOPRA, 2013; HE et al., 2016; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015; SANTOS et al., 2016).

A identificação e otimização das condições que afetam a produção de biossurfactantes é importante para o desenvolvimento de um processo competitivo em termos de custos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; SEGHAL KIRAN et al., 2010). A metodologia de superfície de resposta é um dos métodos comumente utilizados no processo de otimização de processos. Essa metodologia utiliza um conjunto de técnicas estatísticas para projetar experimentos, construir modelos e simultaneamente avaliar os efeitos dos fatores, estabelecendo assim as condições ótimas para obtenção do produto de interesse (ALMEIDA et al., 2017). Outras técnicas como o fatorial fracionado, delineamento central composto rotacional são frequentemente utilizados para otimizar os parâmetros nos processos da produção de metabólitos antimicrobianos, biossurfactantes e enzimas (DEEPAK et al., 2008; WANG et al., 2010; ZARUR COELHO et al., 2010). No fatorial fracionado, apenas uma fração dos experimentos é executada, reduzindo, assim, a quantidade de experimentos quando comparado ao planejamento fatorial completo (MONTGOMERY, 2017). O delineamento composto central rotacional (DCCR) permite avaliar os efeitos combinados e as interações entre as variáveis que influenciam na obtenção do produto de interesse (MOTTA DOS SANTOS et al., 2016).

A composição do meio, como fontes de carbono, fontes de nitrogênio, salinidade e outros fatores de crescimento, influenciam fortemente o crescimento celular e o acúmulo de

produtos metabólicos, portanto, a otimização desses parâmetros pode melhorar a eficiência bacteriana (NAJAFI et al., 2011). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi otimizar a produção de biossurfactante pela bactéria *Paenibacillus* sp. MK156435, variando os fatores nutricionais e ambientais no processo de cultivo em diferentes planejamentos experimentais.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Microrganismo

Nós utilizamos o isolado *Paenibacillus* sp (FGV 20) proveniente da amostra de solo coletada em ambiente de Várzea na cidade de Ferreira Gomes, Amapá. O isolado foi depositado no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (Embrapa Agrobiologia) e a sequência do gene 16S rDNA depositada no GenBankNCBI com código de acesso MK156435. O acesso ao patrimônio genético foi registrado, sob o código A49223C, no Sistema Nacional de Gerenciamento do Patrimônio Genético (SISGEN), conforme legislação vigente (nº 13.123/2015).

2.2 Preparo do inóculo

O isolado foi repicado em placas contendo meio Agar Nutriente (1,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona, 5,0 g de cloreto de sódio, 15,0 g de agar bacteriológico e 4,0 mL de agente antifúngico Nistatina por litro de água destilada, pH= 6.8 ± 0.2) e incubado a 30 °C por 24 h. Colônias foram transferidas para tubos contendo caldo nutriente e incubadas a 30 °C por 72 horas sem agitação. Para a avaliação da produção de biossurfactante utilizou-se 1 mL do inóculo, com aproximadamente 10^8 UFC / mL.

2.3 Estratégias para aumentar a produção do biossurfactante

Diferentes estratégias foram utilizadas com o objetivo de aumentar a produção do biossurfactante produzido pela *Paenibacillus* sp. MK156435. Inicialmente houve o estudo do efeito de algumas fontes de carbono e em seguida a seleção das melhores condições operacionais para a produção do biossurfactante. Após essa etapa, foi realizada a otimização do processo usando Delineamento Central Composto Rotacional.

A produção do biossurfactante foi realizada em meio caldo nutriente (1,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona bacteriológica, 5,0 g de cloreto de sódio e 4,0 mL antifúngico Nistatina por litro de água destilada, pH= $6,8 \pm 0,2$). O pH do meio foi ajustado usando 1 mol / L de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl).

Após os ensaios, o extrato obtido foi centrifugado a 6000 rpm e 10 min a 4°C para obtenção do sobrenadante livre de células e utilizado para avaliar a produção do biossurfactante por meio do teste de emulsificação e redução da tensão superficial do meio.

2.3.1 Efeito das fontes de carbono sobre a produção de biossurfactante

As fontes de carbono utilizadas foram glicose (C1), lactose (C2), glicerol (C3), azeite de oliva (C4), óleo de soja (C5) e querosene (C6). O caldo nutriente foi suplementado com 5,0% de cada fonte de carbono. Os testes de produção de biossurfactante foram conduzidos utilizando um balão Erlenmeyer de 125 mL contendo 100 mL de meio e as culturas foram incubadas a 30 °C por 96 horas sem agitação.

2.3.2 Seleção da melhor condição operacional no processo de produção do biossurfactante

Após avaliação das fontes de carbono foram avaliadas a concentração da fonte de carbono (1,0% e 5,0%), tempo de cultivo (24h e 96h), temperatura de incubação (25 °C e 40 °C) e pH do meio de cultivo (6,0 e 9,0) sobre a produção de biossurfactante. Utilizou-se para isso um experimento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2^4 , totalizando 16 corridas, a variável resposta Tensão superficial em triplicata (Tabela 4-1).

Tabela 4-1 Planejamento fatorial 2^4 para verificar a influência dos fatores na tensão superficial.

(Continua)

Corridas	Fatores (Variáveis codificadas)				Fatores (Variáveis normais)			
	Fonte de Carbono	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Fonte de Carbono	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	-1	1,0	6,0	25,0	24,0
2	+1	-1	-1	-1	5,0	6,0	25,0	24,0
3	-1	+1	-1	-1	1,0	9,0	25,0	24,0
4	+1	+1	-1	-1	5,0	9,0	25,0	24,0
5	-1	-1	+1	-1	1,0	6,0	40,0	24,0

Tabela 4-1 Planejamento fatorial 2⁴ para verificar a influência dos fatores na tensão superficial.

Corridas	Fatores (Variáveis codificadas)				Fatores (Variáveis normais)				(Conclusão)
	Fonte de	pH	Temperatura	Tempo (h)	Fonte de	pH	Temperatura	Tempo (h)	
	Carbono		(°C)		Carbono		(°C)		
6	+1	-1	+1	-1	5,0	6,0	40,0	24,0	
7	-1	+1	+1	-1	1,0	9,0	40,0	24,0	
8	+1	+1	+1	-1	5,0	9,0	40,0	24,0	
9	-1	-1	-1	+1	1,0	6,0	25,0	96,0	
10	+1	-1	-1	+1	5,0	6,0	25,0	96,0	
11	-1	+1	-1	+1	1,0	9,0	25,0	96,0	
12	+1	+1	-1	+1	5,0	9,0	25,0	96,0	
13	-1	-1	+1	+1	1,0	6,0	40,0	96,0	
14	+1	-1	+1	+1	5,0	6,0	40,0	96,0	
15	-1	+1	+1	+1	1,0	9,0	40,0	96,0	
16	+1	+1	+1	+1	5,0	9,0	40,0	96,0	

Fonte: Autores (2020)

2.3.3 Otimização da produção de biossurfactante por *Paenibacillus* sp. MK156435

Após selecionar a melhor fonte de carbono e selecionar os melhores parâmetros obtidos do arranjo fatorial, um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), aliado com a Metodologia da Superfície de Resposta (MSR), foram utilizados para otimizar a produção de biossurfactante usando os fatores temperatura e tempo de incubação (Tabela 4-2). O DCCR foi realizado em cinco níveis (-1,41, -1,0, 0,0, 1,0 e 1,41), totalizando 13 corridas com 5 pontos centrais para estimar o erro experimental. Os parâmetros utilizados foram: temperatura 22,9 °C; 25 °C; 30 °C; 35 °C e 37,1 °C e tempo 18,3h, 20h, 24h, 28h e 29,7h sem agitação. A tensão superficial foi utilizada como variável resposta para a produção de biossurfactante. A produção do biossurfactante foi conduzida em meio caldo nutritivo, pH ajustado para 7 e suplementado com a fonte de carbono selecionada (5%) como agente indutor na produção.

Tabela 4-2 Variáveis codificadas e normais para a otimização por DCCR (Temperatura e tempo).

Corridas	Variáveis codificadas		Variáveis normais	
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
1	-1	-1	25,0	20,0
2	-1	+1	25,0	28,0
3	+1	-1	35,0	20,0
4	+1	+1	35,0	28,0
5	-1,41	0	22,9	24,0
6	+1,41	0	37,1	24,0
7	0	-1,41	30,0	18,3
8	0	+1,41	30,0	29,7
9 (C)	0	0	30,0	24,0
10 (C)	0	0	30,0	24,0
11 (C)	0	0	30,0	24,0
12 (C)	0	0	30,0	24,0
13 (C)	0	0	30,0	24,0

Fonte: Autores (2020).

2.4 Avaliação da emulsificação e da tensão superficial

O teste de emulsificação foi realizado através da adição de 2,0 ml de querosene comercial em um tubo de ensaio contendo 2,0 ml do sobrenadante livre de células. A mistura foi vigorosamente agitada em vórtex por 2 min (RODRIGUES et al., 2006). As avaliações foram realizadas a temperatura ambiente e o índice de emulsificação (E24h) calculado pela razão entre a altura da coluna de emulsão após 24 h e a altura total da coluna.

Para avaliar a tensão superficial, utilizou-se um tensiômetro KRUSS (Easydyne), conforme metodologia descrita por Kuyukina et al. (2001) utilizando o anel de Du Noüy (DU NOÜY, 1925). Antes de cada teste, o anel DU NUOY foi esterilizado usando um queimador de Bunsen e calibrado com água destilada ($\sim 70,4 \pm 0,1$ mN / m).

2.5 Análise estatística

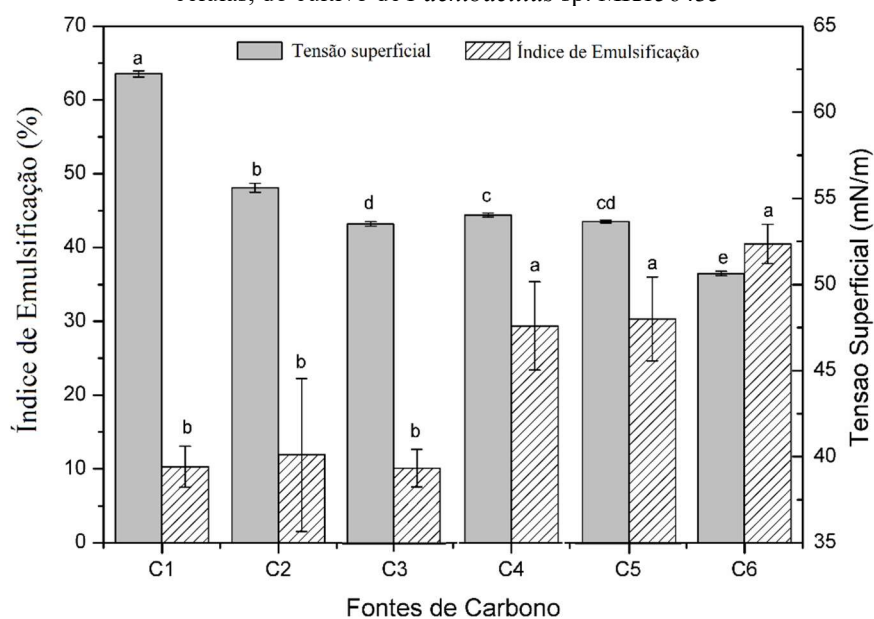
Todos os obtidos foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão e as análises de variância (ANOVA) dos modelos matemáticos do planejamento fatorial e do delineamento central composto rotacional foram realizados usando o software Minitab® 19.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação de diferentes fontes de carbono

Diversos fatores que afetam a produção de biossurfactante têm sido estudados nos últimos anos (NAJAFI et al., 2011). Em termos de valor nutricional, a escolha dos substratos é fundamental no processo de crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, no aumento da produção de biossurfactante (SATPUTE et al. 2017). Em nosso trabalho o isolado *Paenibacillus* sp. foi capaz de produzir biossurfactante utilizando-se fontes de carbono hidrofílicas e hidrofóbicas (C1 – Glicose, C2 – Lactose, C3 – Glicerol, C4 – Azeite de Oliva, C5 – Óleo de soja, C6 – Querosene). Os valores para o índice de emulsificação e para a tensão superficial são apresentados na Figura 4-1. O crescimento da bactéria utilizando querosene (C6) resultou no maior valor de índice de emulsificação e redução mais expressiva da tensão superficial, $40,49 \pm 2,70\%$ e $36,5 \text{ mN/m} \pm 0,3$, respectivamente.

Figura 4-1 Índice de emulsificação após 24h e Tensão superficial observados para o sobrenadante livre de células, do cultivo de *Paenibacillus* sp. MK156435



Fonte: Autores (2020).

Substratos hidrofóbicos são reportados por alguns autores como excelentes fontes de carbono no processo de produção de biossurfactante. Num trabalho utilizando *Paenibacillus lautus* e *Paenibacillus polymyxa*, Omotayo et al. (2013) relatou a capacidade de síntese de biossurfactante desses microrganismos a partir de petróleo bruto, diesel, querosene, hexadecano e xileno. Jimoh e Lin (2019) também reportaram que o n-hexadecano, óleo diesel, n-dodecano

e n-tetradecano são bons indutores na produção de biossurfactante por *Paenibacillus* sp. D9, sendo que os seguintes valores de tensão superficial de 28,6 mN/m, 29,4 mN/m, 29,5 mN/m e 29,7 mN/m, respectivamente, foram observados a partir do sobrenadante da cultura.

Substratos hidrofílicos e resíduos agroindustriais foram reportados na literatura por alguns autores como indutores no processo de produção de biossurfactante. Najafi et al. (2011) relatou valores de tensão superficial inferiores a 40 mN/m a partir da indução com glicose para o *Paenibacillus alvei* ARN63. Liang et al. (2014) utilizou resíduos da indústria de processamento de lulas e camarão como fontes de C/N no processo de produção de biossurfactante por *Paenibacillus macerans* TKU029 e observou redução de tensão superficial para 39,51 e 45,89 mN/m, respectivamente. O querosene foi a fonte de carbono hidrofóbica que promoveu a maior redução da tensão superficial no meio e, portanto, foi selecionada para a otimização do processo de produção do biossurfactante por *Paenibacillus* sp MK156435, o que corrobora com o observado em outros trabalhos com microrganismos do mesmo gênero.

3.2 Avaliação do teor da fonte de carbono e de parâmetros operacionais

Após a avaliação prévia da melhor fonte de carbono, um delineamento fatorial completo (2⁴) foi utilizado para verificar os efeitos do teor da fonte de carbono (querosene), e os parâmetros operacionais (pH, temperatura e tempo) conforme apresentado na seção de metodologia (Tabela 4-1) e as respostas encontradas estão apresentadas na Tabela 4-3. A corrida 2 (5,0% querosene, pH 6,0, Temperatura 25°C e Tempo de 24h) resultou na menor tensão superficial (31,8±0,4 mN/m).

Tabela 4-3 Valores observados e preditos da tensão superficial do sobrenadante livre de células obtidos no processo de fermentação usando querosene como fonte de carbono e pH, temperatura e tempo com parâmetros operacionais. (Continua)

Corridas	Tensão Superficial (mN/m)	
	Valores observados	Valores preditos
1	36,0 ± 0,3	36,0
2	31,8 ± 0,4	31,9
3	35,1 ± 0,4	35,2
4	34,8 ± 0,5	34,8
5	45,7 ± 0,3	45,8
6	43,7 ± 0,3	43,7
7	43,0 ± 0,2	43,0

Tabela 4-3 Valores observados e preditos da tensão superficial do sobrenadante livre de células obtidos no processo de fermentação usando querosene como fonte de carbono e pH, temperatura e tempo com parâmetros operacionais.

Corridas	Tensão Superficial (mN/m)		(Conclusão)
	Valores observados	Valores preditos	
8	42,0 ± 0,4	42,1	
9	36,6 ± 0,3	36,7	
10	32,60 ± 0,4	32,6	
11	35,00 ± 0,1	35,0	
12	32,90 ± 0,2	33,0	
13	46,30 ± 0,4	46,3	
14	47,00 ± 0,4	47,1	
15	48,30 ± 0,5	48,4	
16	48,80 ± 0,3	48,8	

Fonte: Autores (2020).

Os resultados da ANOVA do planejamento fatorial está apresentada na Tabela 4-4. O modelo de regressão foi significativo (valor p: 0,025) e previsível (valor F: 1018,16), proporcionando um bom ajuste matemático ($R^2 = 0,9999$; $R^2_{Adj} = 0,9989$; $R^2_{pred} = 0,9820$).

Tabela 4-4 Análise de variância (ANOVA) para a variável dependente Tensão Superficial no processo de seleção dos principais fatores usando fatorial completo.

Fonte	GL	CP	SQ _{Adj.}	QM _{Adj.}	F-value	(Continua)
						p-value
Modelo	14	99,99%	570,170	40,726	1018,16	0,025
Linear	4	93,07%	530,685	132,671	3316,78	0,013
Fonte de carbono (A)	1	1,69%	9,610	9,610	240,24	0,041
pH (B)	1	0,00%	0,003	0,003	0,06	0,844
Temperatura (C)	1	88,78%	506,250	506,250	12656,25	0,006
Tempo (D)	1	2,60%	14,822	14,822	370,56	0,033
Interação dupla	6	4,69%	26,770	4,462	111,54	0,072
A*B	1	0,48%	2,722	2,722	68,06	0,077
A*C	1	0,85%	4,84	4,840	121,00	0,058
A*D	1	0,07%	0,423	0,423	10,56	0,190
B*C	1	0,02%	0,123	0,123	3,06	0,330

Tabela 4-4 Análise de variância (ANOVA) para a variável dependente Tensão Superficial no processo de seleção dos principais fatores usando fatorial completo.

Fonte	GL	CP	SQ _{Adj.}	QM _{Adj.}	(Conclusão)	
					<i>F-value</i>	<i>p-value</i>
B*D	1	0,25%	1,440	1,440	36,00	0,105
C*D	1	3,02%	17,222	17,222	430,56	0,031
Interação tripla	4	2,23%	12,715	3,179	79,47	0,084
A*B*C	1	0,27%	1,562	1,562	39,06	0,101
A*C*D	1	0,37%	2,103	2,103	52,56	0,087
B*C*D	1	1,47	8,410	8,410	210,25	0,044
Error	1	0,040	0,040	0,040	-	-
Total	15	100,00%	-	-	-	-

Fonte: Autores (2020).

O modelo matemático obtido para representar a tensão superficial (TS) em função dos fatores fonte de carbono, pH, temperatura e tempo com seus respectivos coeficientes são apresentados na Equação (1):

$$\begin{aligned}
 TS = & 12,82 - 5,656*A + 1,319*B + 1,0817*C + 0,3135*D + 0,7000A*B \\
 & + 0,1006*A*C - 0,00567*A*D - 0,0735*B*C - 0,04707*B*D \\
 & - 0,011597*C*D - 0,01389*A*B*C - 0,001852*A*B*D \\
 & + 0,000671*A*C*D + 0,001790*B*C*D
 \end{aligned}$$

Eq. (1)

Onde: A é a concentração da fonte de carbono (%); B é o pH do meio; C é a temperatura (°C) e D é o tempo de cultivo (h).

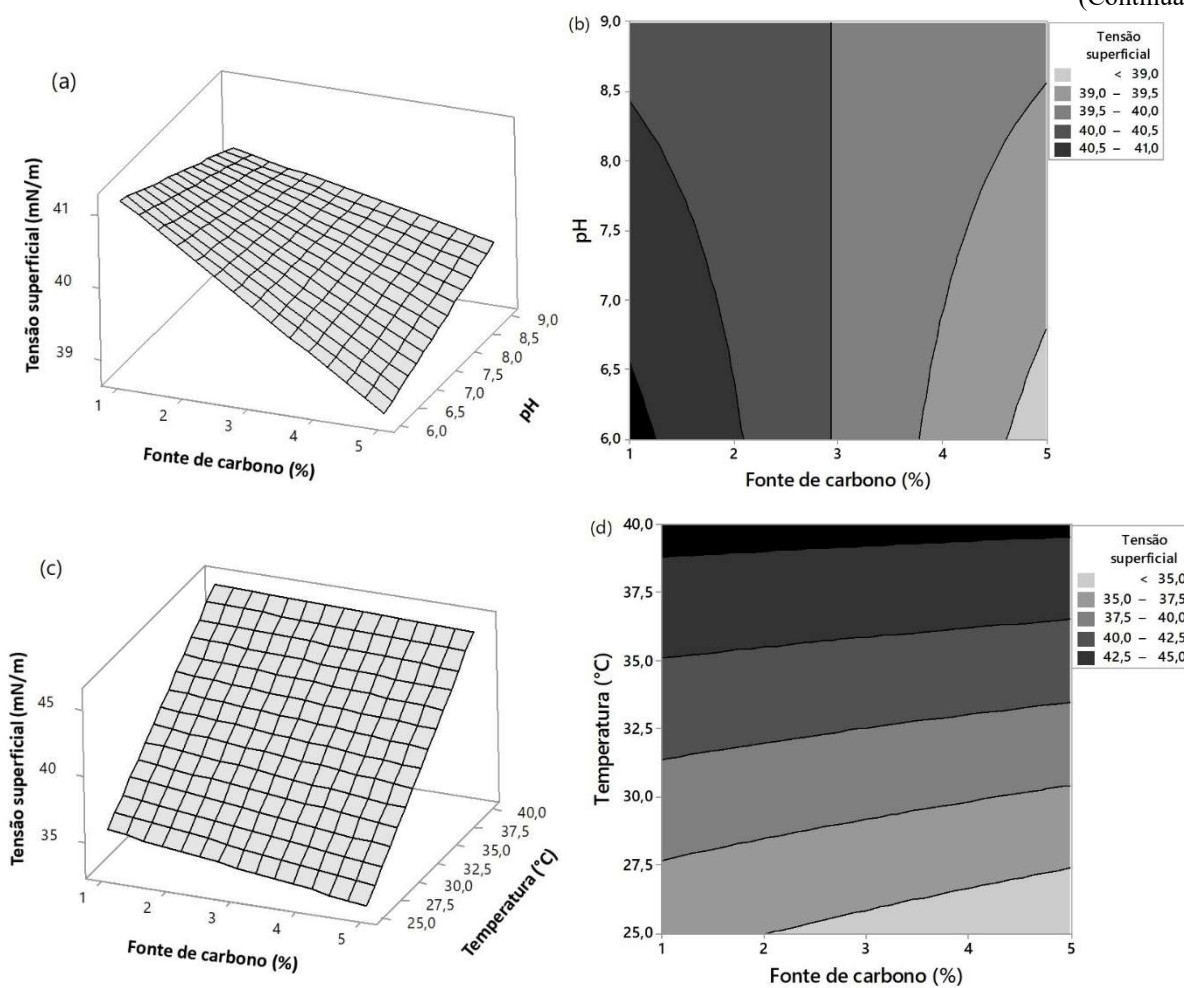
Na análise de regressão múltipla o parâmetro mais significativo é aquele que apresenta o menor *p-value* e o maior *t-value* (YETILMEZSOY; SARAL, 2007), no nosso planejamento a principal contribuição para a resposta à tensão superficial foi originada pela temperatura (*p-value*: 0,006; *t-value*: 112,50), seguida da interação temperatura/tempo (*p-value*: 0,031; *t-value*: 20,75), do tempo (*p-value*: 0,033; *t-value*: 19,25), a concentração da fonte de carbono (*p-value*: 0,041; *t-value*: -15,50) e da interação tripla pH/temperatura/tempo (*p-value*: 0,044; *t-value*: 14,50). Esses resultados sugeriram que as variáveis estudadas (concentração da fonte de

carbono, pH, temperatura e tempo) afetaram significativamente a tensão superficial no processo de produção de biossurfactante.

Os gráficos de superfície de resposta e de contorno para o modelo matemático estão apresentados na Figura 4-2.

Figura 4-2 Gráficos tridimensionais de superfície e de contorno dos efeitos dos fatores na tensão superficial. (a-b) teor da fonte de carbono e pH; (c-d) teor da fonte de carbono e temperatura; (e-f) teor da fonte de carbono e tempo de cultivo; (g-h) pH e temperatura; (i-j) pH e tempo e (k-l) temperatura e tempo.

(Continua)



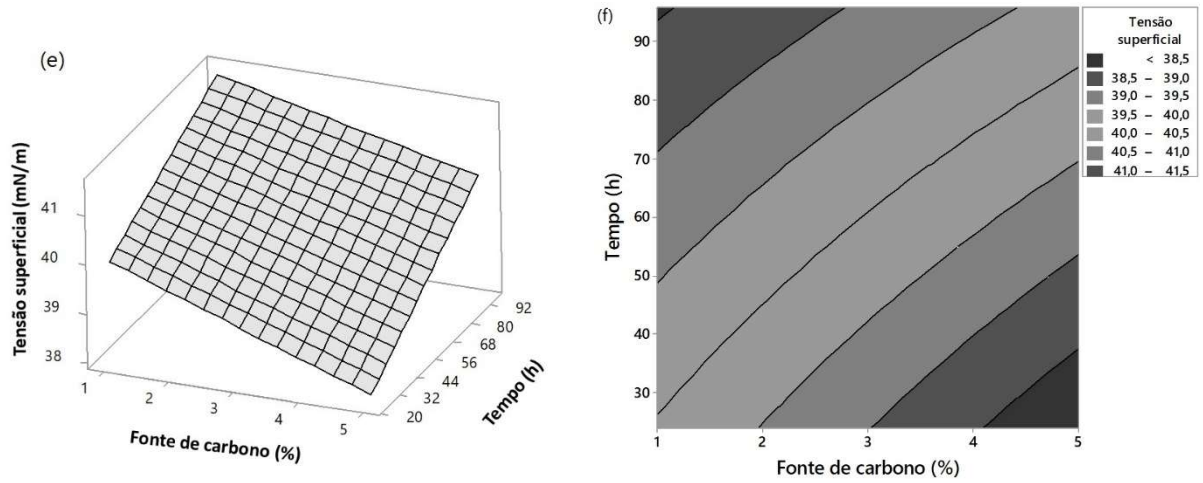
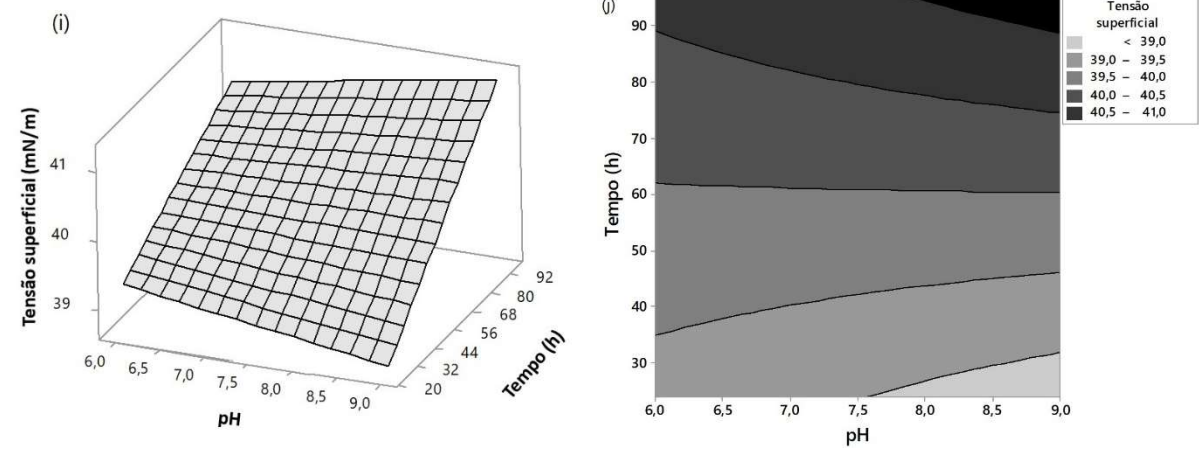
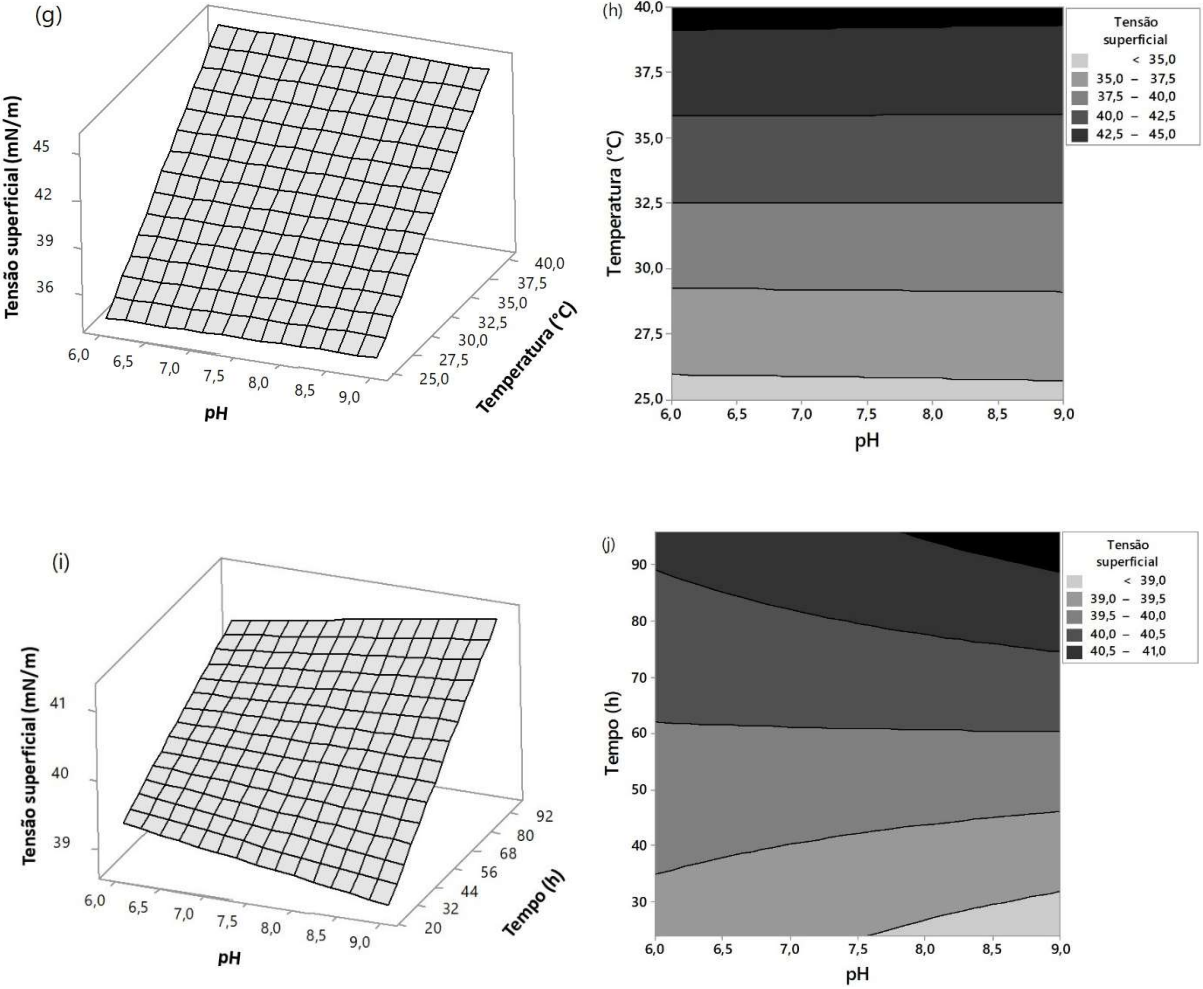
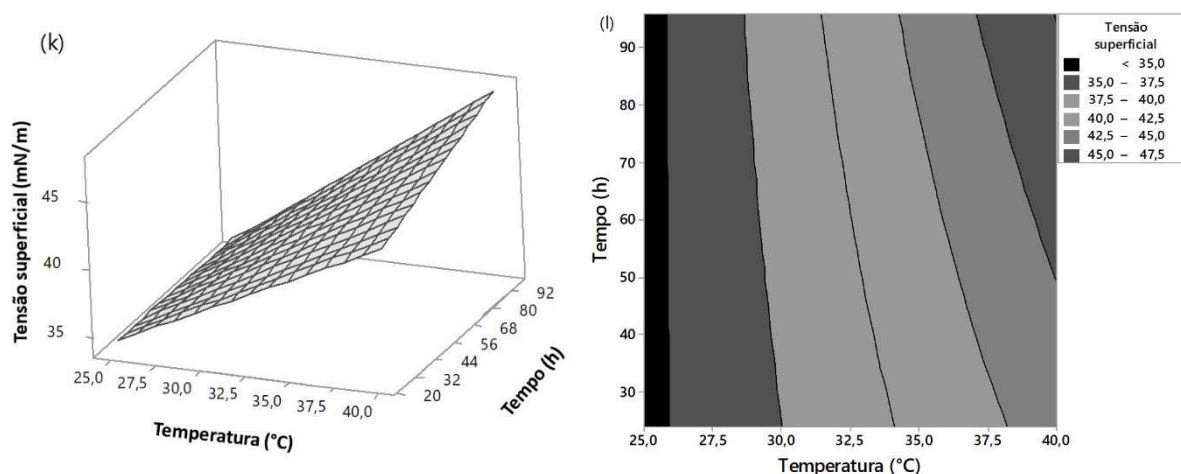


Figura 4-2 Gráficos tridimensionais de superfície e contorno dos efeitos dos fatores na tensão superficial. (a-b) teor da fonte de carbono e pH; (c-d) teor da fonte de carbono e temperatura; (e-f) teor da fonte de carbono e tempo de cultivo; (g-h) pH e temperatura; (i-j) pH e tempo e (k-l) temperatura e tempo.

(Conclusão)





Fonte: Autores (2020).

A concentração de 5,0% de querosene foi mais eficiente na redução da tensão superficial do meio, conforme observado nas Figura 4-2a-b, Figura 4-2c-d e Figura 4-2 e-f, respectivamente. Nas Figuras 4-2c-d, 4-2g-h e 4-2k-l, demonstram que a elevação da temperatura no processo de produção, afeta a produção do biossurfactante, sendo as temperaturas inferior a 30°C as que apresentam os menores valores para a tensão superficial, independente da interação com os outros fatores, o que demonstra que o fator temperatura exerce elevado efeito significativo no processo. De acordo Saharan, Sahu e Sharma (2011) a maioria dos processos de fermentação visando a produção de biossurfactante ocorre em temperaturas entre 25 e 30 °C.

O pH quando associado a temperatura, é possível observar que o aumento não promoveu efeito significativo na redução da tensão superficial (Figura 4-2g-h). Contudo, o pH associado com o tempo de cultivo, observa-se que o menor valor para a tensão superficial se encontra em pH 9,0 e tempo de cultivo de 24 horas (Figura 4-2i-j) e concentração de querosene 5,0% (Figura 4-2a-b). Uma vez que a produção de biossurfactante ocorre por várias reações enzimáticas no interior da célula (BURGER; GLASER; BURTON, 1963), o pH pode prejudicar as suas atividades (MARCELINO et al., 2020) e, consequentemente o metabolismo do microrganismo.

O tempo de 24h associado a temperatura de 25 °C (Figura 4-2k-l) e concentração de 5,0% (Figura 4-2e-f) apresentou os menores valores para tensão superficial. A produção de composto tensoativos em meio de cultivo é um processo metabólico dependente do tempo (SHARMA; SINGH; VERMA, 2020).

As condições ótimas observadas foram concentração de 5,0% de querosene, pH 6,0, Temperatura de 25°C e tempo de cultivo de 24h, pré-selecionadas de acordo com a função de

desejabilidade (*Composite desirability*: 0,9971) no sentido de minimizar o valor da Tensão superficial. Visando identificar os fatores altamente significativos para serem otimizados, o planejamento fatorial foi analisado usando a opção de regressão multivariável (*Stepwise*), essa opção verifica a permanência ou não dos fatores no modelo matemático a 95% de confiança, apresentando no modelo apenas os fatores altamente significativos e suas interações.

Após essa análise, os fatores temperatura (*p-value*: 0,0000; *t-value*: 13,80), tempo (*p-value*: 0,036; *t-value*: 2,36) e a interação entre temperatura e tempo (*p-value*: 0,026; *t-value*: 2,54) apresentaram efeito significativo a 95% de confiança. O modelo da regressão multivariável (*Stepwise*) foi significativo ($R^2 = 0,9440$; *p-value*: 0,0000; *F-value*: 64,47). Com base nessa análise os fatores de temperatura e tempo foram pré-selecionados para a otimização das condições operacionais na produção de biossurfactante.

3.3 Otimização dos parâmetros operacionais (temperatura e tempo de cultivo)

Um delineamento central composto rotacional foi utilizado para otimizar a produção de biossurfactante, com base em medições de tensão superficial. A matriz do projeto experimental foi apresentada na seção de metodologia (Tabela 4-2), enquanto as respostas podem ser vistas na Tabela 4-5. A fermentação foi conduzida com os dois parâmetros pré-selecionados anteriormente, mantendo constante o teor de querosene em 5,0% e pH em 7,0. O pH não apresentou efeito significativo, e foi mantido na neutralidade para a reduzir impacto ambiental do resíduo gerado, bem como a redução de custos pela não adição de ácido no processo de ajuste do pH.

Tabela 4-5 Variáveis codificadas e normais para a otimização por DCCR (Temperatura e tempo) e Tensão superficial do extrato livre de células produzido pela *Paenibacillus* sp. MK156435.

(Continue)

Corridas	Tensão Superficial (mN/m)	
	Valores observados	Valores Preditos
1	42,4 ± 0,19	41,5
2	40,4 ± 0,33	37,6
3	37,6 ± 0,38	37,5
4	40,4 ± 0,42	38,5
5	41,2 ± 0,15	41,3
6	36,6 ± 0,31	39,3

Tabela 4-5 Variáveis codificadas e normais para a otimização por DCCR (Temperatura e tempo) e Tensão superficial do extrato livre de células produzido pela *Paenibacillus* sp. MK156435.

(Continue)

7	36,3 ± 0,38	38,3
8	35,4 ± 0,25	36,2
9 (C)	35,5 ± 0,35	35,1
10 (C)	34,6 ± 0,41	35,1
11 (C)	35,5 ± 0,32	35,1
12 (C)	34,6 ± 0,11	35,1
13 (C)	35,1 ± 0,58	35,1

Fonte: Autores (2020).

O resultado da Análise de Variância para o Delineamento Central Composto Rotacional está apresentado na Tabela 4-6. O modelo de regressão não foi significativo a 5% (valor p : 0,058), o que não proporcionou um bom ajuste matemático ($R^2 = 0,7268$; $R^2_{Adj} = 0,5316$). Mesmo o modelo não apresentando significância, é possível observar na Tabela 4-6 que o modelo de segunda ordem para o fator temperatura foi significativo (p -value: 0,008; F -value: 13,43).

Tabela 4-6 Análise de variância (ANOVA) da variável dependente Tensão Superficial na otimização do processo de produção.

Fonte	GL	CP	SQ _{Adj}	QM _{Adj.}	F -value	p -value
Modelo	5	72,68%	66,4928	13,2986	3,72	0,058
Linear	2	9,49%	8,6788	4,3394	1,22	0,352
Temperatura (A)	1	4,45%	4,0689	4,0689	1,14	0,321
Tempo (B)	1	5,04%	4,6099	4,6099	1,29	0,293
Quadrático	2	56,89%	52,0541	26,0270	7,29	0,019
A*A	1	47,67%	47,9804	47,9804	13,43	0,008
B*B	1	9,22%	8,4365	8,4365	2,36	0,168
Interação dupla	1	6,30%	5,7600	5,7600	1,61	0,245
A*B	1	6,30%	5,7600	5,7600	1,61	0,245
Error	7	27,32%	24,9995	3,5714	-	-
Lack-of-Fit (Falta de ajuste)	3	26,44%	24,1875	8,0625	39,72	0,002
Pure Error	4	0,89%	0,8120	0,2030	-	-
Total	12	100,00%	-	-	-	-

Fonte: Autores (2020).

O mesmo efeito foi observado por Wang et al. (2011), os autores em seu trabalho verificaram que esse fator foi determinante para a biossíntese de exopolissacarídeos por *Paenibacillus* sp. TKU023, com temperatura ótima em 37 °C. A temperatura pode favorecer o decréscimo ou aumento da síntese de biosurfactante, pois o aumento da biomassa favorece a liberação dos produtos metabólitos da célula microbiana (SAHOO; DAS, 2011).

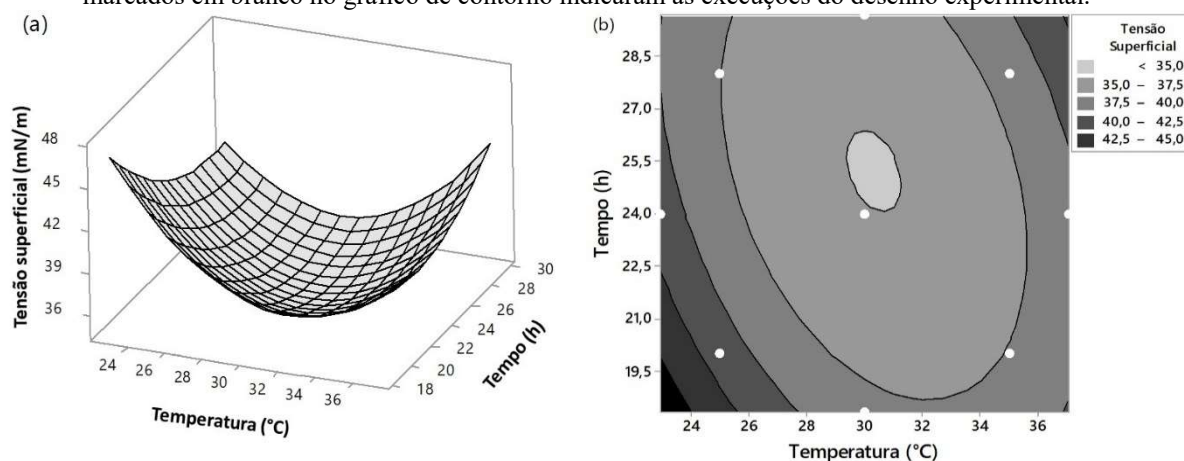
Mesmo o modelo não apresentando significância, verificamos que ele foi adequado pois permitiu a otimização da produção com a redução da tensão superficial para valores inferiores a 43 mN/m. A otimização pode ser melhor ajustada para os parâmetros em estudo conforme pode ser observada na Tabela 4-6, onde a falta de ajuste do modelo foi significativa (*p-value*: 0,002; *F-value*: 39,72). O modelo matemático obtido para representar a tensão superficial (TS) em função temperatura e tempo com seus respectivos coeficientes são apresentados na Equação (2):

$$\text{Tensão Superficial} = 221,3 - 7,89A - 5,29B + 0,1051A^2 + 0,0688B^2 + 0,0600A*B$$

Eq. (2)

O objetivo da otimização foi alcançar um valor mínimo para a tensão superficial durante o cultivo de *Paenibacillus* sp. MK156435 utilizando meio suplementado com uma fonte hidrofóbica e pH neutro, ajustando as variáveis temperatura e tempo na faixa em estudo. Os gráficos de superfície e de contorno de resposta para o modelo matemático estão apresentados na Figura 4-3a e Figura 4-3b, respectivamente.

Figura 4-3 Superfície de resposta que mostra as influências mútuas dos níveis da temperatura e tempo na tensão superficial do meio a partir da produção de biosurfactante por *Paenibacillus* sp. MK156435. Os pontos marcados em branco no gráfico de contorno indicaram as execuções do desenho experimental.



Fonte: Autores (2020).

O gráfico de superfície (Figura 4-3a) apresenta-se côncavo e o gráfico de contorno (Figura 4-3b) exibe regiões de diferentes faixas de tensão superficial, as quais estão separadas por elipses concêntricas, com uma região mais baixa (< 35 mN/m) a qual indica a região elíptica na parte inferior da superfície côncava do gráfico tridimensional. A temperatura de 30°C no intervalo de tempo de 18 a 30 horas de cultivo apresentaram os menores valores para a tensão superficial na faixa de 35 a 37,5 mN/m (Figura 4-3b).

De acordo com Najafi et al., (2011) a produção de biossurfactante depende da temperatura e do pH, ocorrendo uma produção ótima em uma faixa específica em que a cepa bacteriana é mais ativa, por exemplo mesófilos a 35-40 °C e pH 7 a 7,5. De acordo com o mesmo autor a temperatura ideal de cada tipo de bactéria ocorre em uma faixa relativamente bem definida nas quais esses microrganismos operam com mais eficiência, indicando o caráter dependente da temperatura nos processos de produção de biossurfactante.

Em nosso trabalho as tensões superficiais mais baixas foram observadas na faixa de temperatura entre 25 e 30°C e pH 6,0 a 9,0. Trabalhando com *Paenibacillus* sp. D9, Jimoh e Lin (2019) também encontrou os valores mais baixos para tensão superficial na temperatura de 30 °C. No processo de otimização da produção de biossurfactante por uma cepa de *Paenibacillus alvei* ARN63 ficou evidenciado que a cepa apresentou faixa ótima pH entre 6 e 8, sendo o maior rendimento no pH de 6,89 (NAJAFI et al., 2011).

Em relação ao tempo de fermentação, o valor mais baixo da tensão superficial foi observado 24 horas após a inoculação. Na literatura diversos tempos foram relatados durante o processo de otimização, tempos similares (NAJAFI et al., 2010, 2011) e superiores (ALMEIDA et al., 2017; AMIRABADI et al., 2013; JIMOH; LIN, 2019) ao encontrado em nosso estudo.

Apesar do modelo gerado pelo DCCR não ter apresentado redução adicional na tensão superficial quando comparado aos valores encontrados no planejamento fatorial completo, a justificativa pode estar associada ao pH 7,0 do meio, pois no experimento anterior foi observado um efeito significativo do termo (pH/tempo/temperatura). Isso pode ser sugerido porque os três fatores (tempo; temperatura; e pH/tempo/temperatura) apresentaram efeito positivo na tensão superficial, ou seja, contribuem para a redução da tensão superficial. Dessa forma, a utilização do pH neutro, nesse caso, pode ter impedido uma otimização adicional da tensão superficial. De acordo com Najafi et al. (2011) é muito improvável prever distintamente os efeitos de todos os parâmetros e suas interações, isso devida à natureza complexa dos processos biológicos.

4 CONCLUSÕES

Foram testadas fontes hidrofílicas e hidrofóbicas como indutoras no processo de produção de biosurfactante por um isolado de *Paenibacillus* sp. MK156435. A fonte hidrofóbica (querosene) foi a que apresentou o maior índice de emulsificação ($40,49\% \pm 2,70\%$) e o menor valor de tensão superficial ($36,5 \text{ mN/m} \pm 0,3$). No planejamento fatorial os fatores fonte de carbono, temperatura e tempo, a interação dupla temperatura/tempo e a interação tripla pH/temperatura/tempo foram significativos. O modelo matemático gerado apresentou bom ajuste ($R^2 = 0,9999$), com menor valor para tensão superficial ($31,8 \pm 0,4 \text{ mN/m}$) no ponto ótimo de 5% de querosene, pH 6,0, temperatura 25°C e tempo de cultivo de 24 horas. Não houve uma redução adicional na otimização das condições operacionais do processo por DCCR, apresentando modelo matemático que não ficou bem ajustado ($R^2 = 0,7268$), o modelo apresentou falta de ajuste significativo indicando que as condições operacionais podem ser melhoradas para a redução da tensão superficial. Essa falta de ajuste pode estar associada ao pH meio, o qual foi aumentado para a neutralidade para reduzir possíveis custos operacionais e impactos ambientais, mas acima do valor ótimo observado no planejamento anterior. O microrganismo *Paenibacillus* sp. MK156435 conseguiu produzir biosurfactante extracelular nas condições de estudo reduzindo consideravelmente a tensão superficial do meio em tempo de cultivo de 24 horas, demonstrando potencial para diversas aplicações industriais.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WAHAIBI, Y. et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324–333, 2014.
- ALMEIDA, D. G. et al. Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–13, 2017.
- AMIRABADI, S. S. et al. Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: Medium optimization to break heavy crude oil emulsion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 109, p. 244–252, 2013.
- BEZERRA, K. G. O. et al. Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 6, p. 1482–1493, 2018.
- BHARDWAJ, G.; CAMEOTRA, S. S.; CHOPRA, H. Biosurfactants from Fungi: A Review. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 04, n. 06, 2013.
- BURGER, M. M.; GLASER, L.; BURTON, R. M. The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-

Containing Glycolipid By Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of biological chemistry, v. 238, n. 8, p. 2595–2602, 1963.

DEEPAK, V. et al. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8170–8174, 2008.

DEEPIKA, K. V.; NAGARAJU, G. P.; BRAMHACHARI, P. V. Optimization of Cultural Conditions for Marine Microbial Biosurfactant Production: Future Prospects from Untapped Marine Resources. In: NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. (Eds.). **Marine Pollution and Microbial Remediation**. Singapore: Springer, 2017. p. 105–128.

DU NOÛY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v. vi, p. 625–632, 1925.

GARRIDO-LÓPEZ, Á.; TENA, M. T. Experimental design approach for the optimisation of pressurised fluid extraction of additives from polyethylene films. **Journal of Chromatography A**, v. 1099, n. 1–2, p. 75–83, 2005.

HE, Z. et al. A novel surfactant, N,N-diethyl-N'-cyclohexylthiourea: Synthesis, flotation and adsorption on chalcopyrite. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 37, p. 107–114, 2016.

JIMOH, A. A.; LIN, J. Enhancement of *Paenibacillus* sp. D9 Lipopeptide Biosurfactant Production Through the Optimization of Medium Composition and Its Application for Biodegradation of Hydrophobic Pollutants. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 3, p. 724–743, 2019.

JOY, S. et al. Biosurfactant Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Environment. In: HEIMANN, K.; KARTHIKEYAN, O.; MUTHU, S. (Eds.). **Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons. Environmental Footprints and Eco-design of Products and Processes**. Singapore: Springer, 2017. p. 259–305.

KUYUKINA, M. S. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p. 149–156, 2001.

LIANG, T. W. et al. Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 933–950, 2014.

MARCELINO, P. R. F. et al. Sustainable Production of Biosurfactants and Their Applications. In: Lignocellulosic Biorefining Technologies. [s.l: s.n.]. p. 159–183.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments Eighth Edition**. 9th. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2017. v. 2

MOTTA DOS SANTOS, L. F. et al. An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 944–952, 2016.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509–515, 2006.

NAJAFI, A. R. et al. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a response surface methodology. **Chemical Engineering Journal**, v. 163, n. 3, p. 188–194, 2010.

NAJAFI, A. R. et al. Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 33–39, 2011.

OMOTAYO, A. E. et al. Hydrocarbon Degradation by Free-Living Nitrogen-Fixing Bacteria. **Journal of Scientific Research and Development**, v. 14, p. 75–84, 2013.

RODRIGUES, L. et al. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. 2, p. 109–116, 2006.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Applications , Current. v. 2011, p. 1–42, 2011.

SAHOO, P.; DAS, S. K. Tribology of electroless nickel coatings - A review. **Materials and Design**, v. 32, n. 4, p. 1760–1775, 2011.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source - Their production, modeling and properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 100–111, 2015.

SANTOS, D. K. F. et al. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–31, 2016.

SATPUTE, S. K.; PŁAZA, G. A.; BANPURKAR, A. G. Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 25, n. 1, p. 46–54, 2017.

SEGHAL KIRAN, G. et al. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2389–2396, 2010.

SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SAS-1 and *Bacillus subtilis* BR-15. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 25, n. September 2019, p. 101575, 2020.

WANG, C. L. et al. Production and characterization of exopolysaccharides and antioxidant from *Paenibacillus* sp. TKU023. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 559–565, 2011.

WANG, X. et al. Optimization of the fermentation process of actinomycete strain Hhs.015(T). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

YETILMEZSOY, K.; SARAL, A. Stochastic modeling approaches based on neural network and linear-nonlinear regression techniques for the determination of single droplet collection

efficiency of countercurrent spray towers. *Environmental Modeling and Assessment*, v. 12, n. 1, p. 13–26, 2007.

ZARUR COELHO, M. A. et al. Factorial design to optimize biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um total de 318 microrganismos foram isolados de amostras de solo da Amazônia Amapaense, e 43 apresentaram como bactérias promissoras da produção de biossurfactante apresentando capacidade de emulsificação acima de 50%, quando produzidos intracelularmente. Através do sequenciamento do gene 16S rDNA, foram identificados três diferentes gêneros que pertencem a *Serratia* sp., *Paenibacillus* sp e *Citrobacter* sp. Após o screening, 15 isolados apresentaram alto potencial de emulsificação e redução da tensão superficial pela excreção de biossurfactante extracelular.

Entre os isolados selecionados, *Serratia* sp. MK156427 e *Paenibacillus* sp., foram capazes de desenvolver e produzir biossurfactante em diferentes fontes de carbono (hidrofóbica e hidrofílica), fontes de nitrogênio e diferentes parâmetros operacionais. As interações entre esses fatores afetaram significativamente a redução da tensão superficial dos sistemas (óleo de milho/ureia/ pH 8/ 25°C/ 48 h), (glicerol/ureia/ pH 7/ 30°C/ 96h) e (querosene/ pH 7/ 30°C/ 24 h), que apresentaram os menores valores de tensão superficial (35,70 mN / m; 37,10 mN / m e 34,6 mN/m), respectivamente.

Foi possível sintetizar nanoemulsões a partir de extratos provenientes do cultivo da *Serratia* sp. em sistemas contendo óleo de milho/ureia e glicerol/ureia, as quais apresentaram menores valores do tamanho médio de gotículas (453,1 nm e 667,3 nm) respectivamente, com uma concentração mínima de fase oleosa.

A *Serratia* sp. MK156427 e *Paenibacillus* sp. MK156435 apresentaram potencial de produção de biossurfactante para aplicações industriais, inclusive para a síntese de nanoemulsões. Como nenhuma pesquisa anterior sobre bactérias produtoras de biossurfactantes dos solos do Amapá foi encontrada na literatura, o presente estudo pode ser considerado como uma nova contribuição para o avanço do conhecimento da diversidade microbiana dessa região.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar o processo de extração e caracterizar por técnicas não destrutivas os tipos de biossurfactantes metabolizados pelos isolados;

Avaliar o potencial de aplicação dos extratos como estabilizantes, antimicrobianos, controle biológico e na biorremediação de ambientes contaminados;

Estudar diferentes tipos de técnicas na síntese de nanoemulsões e avaliar o potencial destas em aplicação na melhora de biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade de diferentes compostos.

ANEXO 1 COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO CAPÍTULO DE LIVRO



Compartilhando informações e experiências
por um mundo melhor!

DECLARAÇÃO

Declaramos a quem possa interessar que os Professores ELISA MARIA DE OLIVEIRA, VICTOR HUGO GOMES SALES, EMERSON ADRIANO GUARDA, WARDSSON LUSTRINO BORGES, MARCELO SILVA ANDRADE e TIAGO MARCOLINO DE SOUZA são coautores do capítulo intitulado "SURFACTANTES DE ORIGEM MICROBIANA PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS" do livro intitulado "TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE – VOLUME 2, apreciado e aprovado por pareceristas *ad hoc*, com previsão de publicação para 2018.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2018

Por ser verdade, assino

Ralison Moura
Editor-Chefe



TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

VOLUME II

Clemilson Antonioda Silva
Alessandra Maria de Lima Naoe
Elisa Maria de Oliveira
Paulo Victor Gomes Sales
Michele Cezimbra Perim
Patrícia Martins Guarda
Aline Aires Aguiar
Organizadores



Clemilson Antonio da Silva
Alessandra Maria de Lima Naoe
Elisa Maria de Oliveira
Paulo Victor Gomes Sales
Michele Cezimbra Perim
Patrícia Martins Guarda
Aline Aires Aguiar
(Organizadores)

TÓPICOS ESPECIAIS EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

Volume 2

EDITORA CRV
Curitiba - Brasil
2018

Copyright © da Editora CRV Ltda.
Editor-chefe: Railson Moura
Diagramação e Capa: Editora CRV
Revisão: Os Autores

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
 SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

T634
 v. 2

Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade – volume 2 / organização Clemilson Antonio da Silva, Alessandra Maria de Lima Naoe, Elisa Maria de Oliveira, Paulo Victor Gomes Sales, Michele Cezimbra Perim, Patricia Martins Guarda, Aline Aires Aguiar - 1. ed. - Curitiba, PR: CRV, 2018.

130 p. (Coleção Tópicos especiais em biotecnologia e biodiversidade, v. 2)

Inclui bibliografia
 ISBN COLEÇÃO 978-85-444-2150-5
 ISBN VOLUME 978-85-444-2294-6
 DOI 10.24824/978854442294.6

1. Biotecnologia. I. Silva, Clemilson Antonio da. org. 2. Naoe, Alessandra Maria de Lima. org. 3. Oliveira, Elisa Maria de. org. 4. Sales, Paulo Victor Gomes. org. 5. Perim, Michele Cezimbra. org. 6. Guarda, Patricia Martins. org. 7. Aguiar, Aline Aires. org.

18-48187

CDD: 660.6

CDU: 606

ESTA OBRA TAMBÉM ENCONTRA-SE DISPONÍVEL EM FORMATO DIGITAL.
 CONHEÇA E BAIXE NOSSO APLICATIVO!



2018

Foi feito o depósito legal conf. Lei 10.994 de 14/12/2004
 Proibida a reprodução parcial ou total desta obra sem autorização da Editora CRV
 Todos os direitos desta edição reservados pela: Editora CRV
 Tel.: (41) 3039-6418 - E-mail: sac@editoracrv.com.br
 Conheça os nossos lançamentos: www.editoracrv.com.br

Conselho Editorial:

Aldira Guimarães Duarte Domínguez (UNB)
 Andréia da Silva Quintanilha Sousa (UNIR/UFRN)
 Antônio Pereira Gaio Júnior (UFRRJ)
 Carlos Alberto Vilar Estêvão (UMINHO - PT)
 Carlos Federico Domínguez Avila (UNIEURO)
 Carmen Tereza Velanga (UNIR)
 Celso Conti (UFSCar)
 Cesar Gerónimo Tello (Univer. Nacional
 Trés de Febrero - Argentina)
 Elione Maria Nogueira Diógenes (UFAL)
 Élsio José Corá (UFFS)
 Elizeu Clementino (UNEB)
 Francisco Carlos Duarte (PUC-PR)
 Gloria Fariñas León (Universidad de La Havana – Cuba)
 Guillermo Arias Beatón (Universidad de La Havana – Cuba)
 Jailson Alves dos Santos (UFRJ)
 João Adalberto Campato Junior (UNESP)
 Josania Portela (UFPI)
 Leonel Severo Rocha (UNISINOS)
 Lídia de Oliveira Xavier (UNIEURO)
 Lourdes Helena da Silva (UFV)
 Maria de Lourdes Pinto de Almeida (UNICAMP)
 Maria Lília Imbiriba Sousa Colares (UFOPA)
 Maria Cristina dos Santos Bezerra (UFSCar)
 Paulo Romualdo Hernandez (UNICAMP)
 Rodrigo Pratte-Santos (UFES)
 Sérgio Nunes de Jesus (IFRO)
 Simone Rodrigues Pinto (UNB)
 Solange Helena Ximenes-Rocha (UFOPA)
 Sydione Santos (UEPG)
 Tadeu Oliver Gonçalves (UFPA)
 Tania Suely Azevedo Brasileiro (UFOPA)

Comitê Científico:

Claudio Lorenzo (Université de Sherbrooke, USherbrooke, Canadá)
 Dirceu Bartolomeu Greco (UFMG)
 Dora Porto (UNB)
 Eduardo Rueda (Colômbia)
 Flávio Rocha Lima Paranhos (UNB)
 Helena Carneiro Leão (PUC/SP)
 J. M. de Barros Dias (Universidade de Evora/Portugal)
 Jose Eduardo Siqueira (PUC/PR)
 José Roque Junges (UNISINOS)
 Mario Antônio Sanches (PUC/PR)
 Marlene Braz (FIOCRUZ)
 Regina Ribeiro Parizi Carvalho (UNESCO)
 Sérgio Ibiapina Ferreira Costa (ICF)
 Sérgio Rogério Azevedo Junqueira (Universitá
 Pontificia Salesiana di Roma, UPS, Itália)
 Susana Vidal (UNESA)
 Thiago Rocha da Cunha (UNB)
 Volnei Garrafa (UNESP)

Este livro foi avaliado e aprovado por pareceristas *ad hoc*.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	9
<i>Victor Hugo Gomes Sales</i>	
CAPÍTULO I	
O USO DE PLANTAS MEDICINAIS	
E A RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	11
<i>Michele Cezimbra Perim</i>	
<i>Joelma da Costa Borges</i>	
<i>Maria Cristina da Silva Pranchevicius</i>	
CAPÍTULO II	
TECNOLOGIA DE COINOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasiliense</i>	
SOBRE A EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA EM CULTIVARES	
DE SOJA SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO	27
<i>Alessandra Maria de Lima Naoe</i>	
<i>Joênes Mucci Peluzio</i>	
<i>Antônio Humberto Simão</i>	
CAPÍTULO III	
PANORAMA DO CONSUMO DE AGROTÓXICOS	
E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL:	
olhar sobre o cerrado tocanintense	39
<i>Patrícia Martins Guarda</i>	
<i>Emerson Adriano Guarda</i>	
<i>José Expedito Cavalcante</i>	
CAPÍTULO IV	
SURFACTANTES DE ORIGEM MICROBIANA	
PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS	57
<i>Elisa Maria de Oliveira</i>	
<i>Victor Hugo Gomes Sales</i>	
<i>Emerson Adriano Guarda</i>	
<i>Wardsson Lustrino Borges</i>	
<i>Marcelo Silva Andrade</i>	
<i>Tiago Marcolino de Souza</i>	
CAPÍTULO V	
AMIDO RESISTENTE: um potencial ingrediente funcional	
para promoção da saúde intestinal.....	79
<i>Clemilson Antonio da Silva</i>	
<i>Fernanda Pereira da Silva</i>	
<i>Caroline Roberta Freitas Pires</i>	
<i>Abraham Damian Giraldo Zuniga</i>	

CAPÍTULO VI	
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	
E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE	
E ANTIMICROBIANA DE <i>Amburana cearensis</i>	93

Aline Aires Aguiar

Ilamar Mendes Soares

Poliana Guerino Marson

Ernane Gerre Pereira Bastos

Sérgio Donizeti Ascêncio

Raimundo Wagner de Souza Aguiar

CAPÍTULO VII	
TEOR DE ÓLEO E PROTEÍNA DA SOJA SUBMETIDOS	
À DIFERENTES NÍVEIS DE DESFOLHA NOS ESTÁDIOS	
REPRODUTIVOS.....	107

Paulo Victor Gomes Sales

Joênes Mucci Peluzio

Ana Cláudia Rodrigues da Costa Sales

Victor Hugo Gomes Sales

SOBRE OS AUTORES	125
------------------------	-----