

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em ENGENHARIA AMBIENTAL

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

Heloise Dugolin Ceccato

Rio Claro (SP)

2013

HELOISE DUGOLIN CECCATO

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1

*Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas,
Campus de Rio Claro (SP), da Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
para obtenção do grau de Engenheiro
Ambiental.*

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero
Co-orientadora: Dra. Roberta B. Lovaglio

Rio Claro (SP)
2013

604.6
C387p Ceccato, Heloise Dugolin
Produção e aplicação de ramnolipídios produzidos por
Pseudomonas aeruginosa LBI 2A1 / Heloise Dugolin Ceccato.
- Rio Claro, 2013
64 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e
Ciências Exatas
Orientador: Jonas Contiero
Coorientador: Roberta Barros Lovaglio

1. Resíduos. 2. Metais pesados de solo - Remoção. 3. Solo
contaminado. 4. Resíduos da atividade cerâmica. I. Título.

HELOISE DUGOLIN CECCATO

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE RAMNOLIPÍDIOS
PRODUZIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1**

*Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências Exatas,
Campus de Rio Claro (SP), da Universidade
Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
para obtenção do grau de Engenheiro
Ambiental.*

Comissão Examinadora
Prof. Dr. Jonas Contiero (orientador)
Dr. Fabrício Coutinho de Paula
Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro, 07 de junho de 2013.

assinatura da aluna

assinatura do orientador

*Dedicado a todos aqueles que me apoiaram,
auxiliaram e que de alguma forma contribuíram
comigo nestes cinco anos de curso. Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me guiar ao longo de todo o caminho percorrido para chegar até aqui.

Agradeço ao professor Jonas, pela grande oportunidade de realizar este projeto.

Agradeço imensamente à Rô, co-orientadora e amiga, pelo auxílio e apoio durante todo o trabalho; pelos momentos de risadas e diversão; pelo grande exemplo de pessoa, profissional, pesquisadora e mãe que é. Também ao Tulio e ao Vinicius, por toda a ajuda durante a realização do trabalho, pelos cafunés e risadas, pelos jantares e lanchinhos feitos por esses meninos tão prendados, e a todos os outros amigos que fiz no Laboratório de Microbiologia Aplicada.

Pela ajuda em análises, agradeço ao técnico de laboratório do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Roberto José Pedro, e ao técnico do laboratório didático de Geotécnica, Alan de Oliveira.

Aos professores, pelas oportunidades de aprendizado e até pelas dificuldades impostas, pois foram elas que me permitiram crescer muito.

Aos meus pais, Maria José e Geraldo, por todo o apoio, ajuda, força e suporte durante todo o curso e em minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim! Aos meus irmãos, Hugo e Haline, por me levarem os almoços durante os dias de laboratório durante as férias.

Um agradecimento especial ao meu namorado Gabriel Romin, pela ajuda com os trabalhos, paciência nos momentos estressantes de provas e fins de semestres, pelos abraços e palavras de orientação nos momentos difíceis. Amo você!

Agradeço às amigas de curso, Caroline Santesso, Carolina Pasetti, Verna Liu, Carolina Andrade, Ana Luiza Christianini, Fernanda Nosse, Fernanda Menin e Beatriz Picciafuoco. Obrigada pelas lembranças de risadas, nervosismo e de aprendizado durante os estudos e trabalhos; pelas distrações durante as aulas mais chatas; pelos chilikies (até engraçados) pós-provas; pelos almoços, lanches, jantares e festas de aniversários feitas juntas; por todas as séries e filmes compartilhados e animadamente acompanhados juntas; enfim, por cada momento especial vivido ao seu lado nestes últimos cinco anos! Cada uma de vocês é muito importante para mim, e têm um lugarzinho especial em minhas lembranças e no meu coração!

A quem mais participou deste momento de minha vida e que não foi citado aqui, o meu muito obrigada!

Agradeço também à CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France, escritor francês

RESUMO

O problema ambiental relacionado à contaminação de solos e efluentes por metais pesados oriundos de diversas atividades leva ao desenvolvimento de pesquisas visando formas menos impactantes de remoção desses metais. A aplicação de ramnolipídios produzidos por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* se mostra vantajosa neste aspecto, visto que diversas pesquisas indicam que este biossurfactante pode obter melhores resultados que os surfactantes comerciais. Como os custos de produção deste bioproduto são elevados, suas aplicações são por vezes limitadas a fins mais nobres. Por isso, visando reduzir os custos, o presente trabalho realizou a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando-se óleo de fritura usado do Restaurante Universitário da UNESP – Rio Claro como fonte de carbono. O biossurfactante produzido foi aplicado à remoção dos metais pesados chumbo, cobre, níquel e zinco de solos residuais da atividade cerâmica advindos da Região dos Lagos, em Santa Gertrudes - SP. Foram realizados experimentos de lavagem de solo em mesa agitadora, nas concentrações iniciais de 0,5 g/L e 1,0 g/L de ramnolipídios, além do caldo livre de células resultante da fermentação, nos valores de pH 8,0 e 9,0. Os resultados foram comparados à aplicação do surfactante comercial Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). As maiores porcentagens de remoção ocorreram com o caldo livre de células em pH 8,0, sendo iguais a 5,505%, 1,268%, 1,245% e 0,843%, respectivamente para chumbo, cobre, zinco e níquel. O uso do caldo apresenta vantagens econômicas, pois não é necessário realizar a extração do ramnolipídio, etapa que onera o processo. As porcentagens de remoção com o SDS foram mais baixas do que as com o caldo e com a solução de ramnolipídios em alguns casos, chegando a seu valor máximo de 0,115% para o chumbo, o que salienta a vantagem competitiva do biossurfactante sobre o surfactante comercial, além das vantagens ambientais. Embora os resultados sejam favoráveis, são necessárias mais pesquisas que visem aperfeiçoar o protocolo utilizado, a fim de serem alcançadas maiores porcentagens de remoção de metais pesados.

Palavras-chave: Ramnolipídios, *Pseudomonas aeruginosa*, metais pesados, solo contaminado, resíduos da atividade cerâmica.

ABSTRACT

The environmental problem related to the contamination of soils and effluents by heavy metals from various activities leads to the development of researches aiming at less impactful ways to remove these metals. Rhamnolipids application produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains shows advantages in this respect, since several researches indicate that this biosurfactant can get better results than commercial surfactants. As the production costs of this bioproduct are high, its applications are often limited to the noblest purposes. Therefore, in order to reduce costs, the present study tested the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* utilizing used waste cooking oil from UNESP Rio Claro's University Restaurant as a carbon source. The biosurfactant produced was applied to remove heavy metals as lead, copper, nickel and zinc from residual soils of ceramic activity arising from *Região dos Lagos* (the Lakes Region), in Santa Gertrudes, state of São Paulo. Soil washing experiments were carried out on rotary shakers using rhamnolipids at initial concentrations of 0.5 g/L and 1.0 g/L, as well as cell-free resulting from fermentation, on pH values 8,0 and 9,0. Results were compared to the application of commercial surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). Higher percentages of removal occurred with cell-free broth at pH 8,0, corresponding to 5.505%, 1.268%, 1.245% and 0.843%, respectively for lead, copper, zinc and nickel. The use of cell-free broth has economic advantages, as it is not necessary to perform the rhamnolipid extraction, step encumbering the process. In some cases, removal percentages using SDS were lower than with cell-free broth and rhamnolipids solution, reaching the maximum value of 0.115% for lead, which draws attention to the competitive advantage of biosurfactant instead of SDS, besides environmental advantages. Although the results are favorable, further researches are needed to improve this methodology in order to achieve higher percentages of heavy metals removal.

Keywords: Rhamnolipids, *Pseudomonas aeruginosa*, heavy metals, contaminated soil, ceramic waste.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios. RL1 e RL2: duas e uma moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas a duas moléculas de ácido graxo; RL3 e RL4: duas e uma moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas a uma molécula de ácido graxo (LOVAGLIO, 2011).....	19
Figura 2 – Colunas de vidro utilizadas nos experimentos. A: coluna com saída lateral; B: coluna reta.....	34
Figura 3 – Cromatografia em camada delgada indicando a presença de mono e di-ramnolipídios nas amostras das fermentações realizadas utilizando-se <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1 com diferentes concentrações da fonte de carbono.....	37
Figura 4 – Produção de ramnolipídios (homólogos RL1, RL2 e produção total) (g/L) para as concentrações de fonte de carbono de (a) 50 g/L, (b) 125 g/L e (c) 250 g/L. As barras correspondem aos desvios padrão.	38
Figura 5 – Crescimento microbiano (g/L), produção de ramnolipídios (g/L) e óleo residual (g/L) das fermentações com concentração inicial da fonte de carbono igual a (a) 50 g/L, (b) 125 g/L e (c) 250 g/L.....	40
Figura 6 – Estrada de acesso aos pesqueiros coberta por resíduos de cerâmica.	41
Figura 7 – Coleta das amostras de solo. Notar a presença de resíduos da indústria cerâmica no local.	42
Figura 8 – Curva granulométrica da amostra de solo. Nota-se que aproximadamente 85% da amostra é composta por silte e argila, partículas finas.	43
Figura 9 – (a) Configuração 1, sistema aberto com coluna A e fluxo descendente. (b) Compactação da coluna de solo após alguns minutos de experimento.	46
Figura 10 – (a) Configuração 2, sistema fechado com coluna A e fluxo descendente; o detalhe em (b) mostra que não ocorre a passagem de solução pelo solo (espaço sem líquido abaixo da camada de sílica).	47
Figura 11 – Configuração 3, sistema fechado com coluna A e fluxo ascendente; em (a) é possível observar a distância percorrida pelo solo em direção ao fluxo; em (b) nota-se a formação dos canais preferenciais de passagem da solução.....	48
Figura 12 – (a) Configuração 4, sistema fechado com coluna B e fluxo descendente. Apresentou os mesmos problemas que a configuração 2. (b) Configuração 5, sistema fechado	

com coluna B e fluxo ascendente. Apresentou os mesmos problemas que a configuração 3. É possível notar o deslocamento vertical da camada de solo.	49
Figura 13 – Lavagem de solo em mesa agitadora realizada por 48 horas a 150 rpm e 28 °C..	50
Figura 14 – Porcentagens de remoção de chumbo nos experimentos realizados.....	51
Figura 15 – Porcentagens de remoção de cobre nos experimentos realizados.....	51
Figura 16 – Porcentagens de remoção de níquel nos experimentos realizados.....	52
Figura 17 – Porcentagem de remoção de zinco nos experimentos realizados.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Valores orientadores para o solo (mg/kg de peso seco)	29
Tabela 2 – Distribuição granulométrica da amostra de solo	42
Tabela 3 – Teores totais dos metais pesados na amostra.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASPACER	Associação Paulista das Cerâmicas de Revestimento
CEAPLA	Centro de Análise e Planejamento Ambiental
CEPAGRI	Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CMC	Concentração Micelar Crítica
CN	Caldo nutriente
CTC	Capacidade de troca de cátions
D.O _{580nm}	Densidade Óptica em comprimento de onda de 580 nanômetros
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
m/v	Massa/volume
MLCTF	Meio Mineral Livre de Cálcio com Tampão Fosfato
mmol/kg	Milimol de carga por quilograma
NBR	Norma Brasileira
pH	Potencial Hidrogeniônico
RL1	Di-ramnolipídio
RL2	Mono-ramnolipídio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
VI	Valor de Intervenção
VP	Valor de Prevenção
VRQ	Valor de Referência de Qualidade

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Biossurfactantes.....	18
3.1.1 Classes dos biossurfactantes.....	18
3.2 Produção de biossurfactantes.....	19
3.2.1 Substratos alternativos/resíduos.....	21
3.3 Aplicações dos biossurfactantes.....	21
3.3.1 Remoção de metais de solos e efluentes contaminados.....	23
3.4 Metais pesados e o meio ambiente.....	27
3.4.1 Metais pesados no meio ambiente: a Região dos Lagos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Micro-organismo.....	31
4.2 Meios de cultura.....	31
4.2.1 Meio Mineral Livre de Cálcio com Tampão Fosfato (MLCTF).....	31
4.2.2 Caldo Nutriente (CN).....	31
4.3 Condições de cultivo.....	31
4.3.1 Preparo do inóculo.....	31
4.3.2 Produção de ramnolipídios.....	32
4.3.3 Extração de ramnolipídios.....	32
4.4 Aplicação de ramnolipídios em solo.....	32
4.4.1 Coleta de amostra de solo.....	32
4.4.2 Caracterização da amostra de solo.....	33
4.4.3 Lavagem de solo em coluna.....	33
4.4.4 Lavagem de solo em mesa agitadora.....	34
4.5 Métodos analíticos.....	35
4.5.1 Processamento das amostras.....	35
4.5.2 Avaliação da produção de ramnolipídios.....	35
4.5.3 Determinação da concentração de ramnolipídios.....	35

4.5.3 Determinação da biomassa microbiana	36
4.5.4 Determinação do óleo residual	36
4.5.5 Análise das lavagens do solo	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Avaliação da produção de ramnolipídios, crescimento celular e óleo residual	37
5.2 Coleta de amostras de solo	41
5.3 Caracterização da amostra de solo	42
5.3.1 Análise granulométrica	42
5.3.2 CTC e matéria orgânica	44
5.3.3 Metais pesados	44
5.4 Lavagem de solo em coluna	45
5.5 Lavagem de solo em mesa agitadora	50
6. CONCLUSÕES	55
7. RECOMENDAÇÕES	56
8. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a contaminação do meio ambiente por metais pesados é um problema recorrente. Diversas atividades antrópicas contribuem para o agravamento deste problema, como a cerâmica, a mineração, a galvanoplastia, o despejo de efluentes domésticos, a indústria de aço e de fundição, entre outros exemplos. Os metais pesados podem trazer prejuízos à saúde humana e aos demais seres vivos, pois são tóxicos e geralmente possuem um alto período de retenção no meio ambiente (BRIDGES, 1991). Exemplos de incidentes com metais pesados devido à contaminação do meio físico são muitos, podendo citar o famoso caso da Baía de Minamata – Japão, onde houve efeitos de biotransformação de mercúrio inorgânico em orgânico e a bioacumulação deste no ambiente, levando à contaminação da cadeia trófica local e consequentemente à morte de mais de 100 pessoas (KUDO et al., 1998).

O aumento da conscientização em relação à preservação do meio ambiente leva à utilização de bioprodutos, que auxiliam na recuperação de ambientes impactados sem acarretar consequências negativas. Um exemplo desses produtos são os biossurfactantes, metabólitos que apresentam atividade de superfície e são sintetizados por uma grande variedade de micro-organismos (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA, 2000; DESAI, BANAT, 1997). As vantagens destes compostos quando comparados aos surfactantes sintéticos residem na sua diversidade estrutural (glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos etc.), baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e produção a partir de substratos renováveis e de baixo custo, como resíduos agroindustriais, contribuindo para a redução da poluição ambiental e permitindo agregar valor comercial a esses produtos (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA, 2000; THANOMSUB et al., 2007).

O ramnolipídio é um biossurfactante produzido por diferentes linhagens de bactérias, mas a principal espécie produtora é *Pseudomonas aeruginosa* (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010). Possui atividade superficial e é classificado como um glicolipídio aniônico; contém moléculas de ramnose na porção hidrofílica e ácidos 3-hidroxialcanóicos na porção hidrofóbica; e pode ser produzido utilizando-se grande diversidade de substratos (MULLIGAN, 2009). Este biossurfactante é altamente biodegradável, tem baixa toxicidade e excelente atividade antimicrobiana (XIE; YE; LIU, 2006). Os ramnolipídios podem ser utilizados em diversas áreas industriais, desde a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos e metais pesados até fins farmacêuticos através da formação de vesículas de prata (KUMAR, MAMIDYALA, 2011; MULLIGAN, 2009; WANG, MULLIGAN, 2009b; ZEFTAWY, MULLIGAN, 2011).

O Polo Cerâmico de Santa Gertrudes, composto pelas cidades de Santa Gertrudes, Limeira, Cordeirópolis, Rio Claro, Ipeúna, Piracicaba e Araras, é responsável por 65% da produção nacional de cerâmica de revestimentos, com uma produção prevista de aproximadamente 420 milhões de m² em 2010 (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB, [2009?]; ASSOCIAÇÃO PAULISTA DAS CERÂMICAS DE REVESTIMENTO - ASPACER, 2009). Tal atividade gera resíduos sólidos, advindos principalmente das linhas de esmaltação, com grandes concentrações de chumbo, zinco e boro, bem como cromo, níquel, bário, cobre e zircônio, entre outros elementos, resíduos os quais durante grande período de tempo foram dispostos em cavas de mineração de argila (CETESB, 2005b).

A chamada Região dos Lagos, localizada no município de Santa Gertrudes e inserida na bacia hidrográfica do Rio Corumbataí, é formada por cavas abandonadas que foram preenchidas pela água do aquífero freático e pelos resíduos da atividade cerâmica, resultando nos lagos hoje existentes (MOURA, 2006).

Como os lagos são cortados pelo córrego da Fazenda Itaqui, o qual é subafluente do Rio Corumbataí, cuja bacia hidrográfica serve sete municípios da região (OLIVEIRA, 2006), esta área foi alvo de diversas pesquisas e um projeto de recuperação (CETESB, 2005b; MOURA, 2006; OLIVEIRA, 2006), pois altas concentrações de metais e outros elementos podem acarretar em riscos ao meio ambiente e à saúde humana. Porém, segundo dados sobre áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo, disponibilizados pela CETESB (2011), essa região ainda contém resíduos com metais, inviabilizando o uso da água superficial e subterrânea, sendo necessárias medidas de remediação como a remoção de solos e resíduos e/ou a atenuação natural monitorada.

Pelas características levantadas, e devido à importância de se desenvolver métodos mais eficazes e menos onerosos para a remediação de áreas contaminadas com metais pesados e outras substâncias, a Região dos Lagos foi escolhida como área de coleta para o desenvolvimento deste trabalho. Os pontos de coleta foram definidos tendo como base o trabalho realizado por Schoenlein (2006). Assim, este trabalho objetiva a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1, com o intuito de utilizar o biossurfactante produzido na remoção de metais pesados de solos residuais da atividade cerâmica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 utilizando óleo de fritura como fonte de carbono, visando à aplicação deste biossurfactante em solos residuais da atividade cerâmica para a remoção dos principais metais pesados presentes na amostra de solo.

2.2 Objetivos específicos

- Definir a concentração da fonte de carbono, óleo de fritura proveniente do Restaurante Universitário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Rio Claro, que resulte na maior produção de ramnolipídios por *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1;
- Caracterizar a amostra de solo para definir parâmetros para os experimentos de lavagem;
- Verificar o potencial do ramnolipídio na remoção de metais pesados de amostra de solo contaminado;
- Avaliar qual valor de potencial Hidrogeniônico (pH) inicial associado à qual concentração de solução de ramnolipídios ou caldo livre de células resulta em maiores remoções dos metais cobre, chumbo, níquel e zinco do solo;
- Comparar os resultados da aplicação do biossurfactante com a utilização de surfactante comercial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são metabólitos que apresentam atividade superficial, podendo ser sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos cultivados em diferentes fontes de carbono. Estes compostos são constituídos por uma porção hidrofóbica, usualmente uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados a uma porção hidrofílica que pode ser um éster, um grupo hidroxil, fosfato, carboxilato ou carboidrato (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998).

As porções hidrofílicas e hidrofóbicas presentes na molécula de surfactante tendem a se distribuírem na interface de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). Esta distribuição das moléculas é responsável pela principal propriedade desses compostos, que é a capacidade de redução das tensões superficial e interfacial. Estas propriedades os tornam adequados para serem utilizados em diferentes aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

3.1.1 Classes dos biossurfactantes

Os surfactantes sintéticos são usualmente classificados de acordo com o grupo polar, entretanto os biossurfactantes são diferenciados com base em sua natureza bioquímica. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, ácidos graxos e fosfolipídios e biossurfactantes poliméricos (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Pseudomonas aeruginosa sintetizam glicolipídios denominados ramnolipídios, no qual a porção hidrofílica é composta por moléculas de ramnose, enquanto ácidos 3-hidroxiálcanóicos constituem a parte hidrofóbica (JARVIS; JOHNSON, 1949). A mistura de homólogos de ramnolipídios produzidos por linhagens de *P. aeruginosa* podem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 30 mN/m (ABALOS et al., 2001) e sua concentração micelar crítica (CMC) está entre 5 mg/L e 200 mg/L (LANG; WULLBRANDT, 1999).

Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* têm sido bem estudados e são reportados como uma mistura de espécies homólogas de RL1 (Rha₂C₁₀C₁₀), RL2 (RhaC₁₀C₁₀), RL3 (Rha₂C₁₀) e RL4 (RhaC₁₀) (Figura 1) (LANG; WAGNER, 1987).

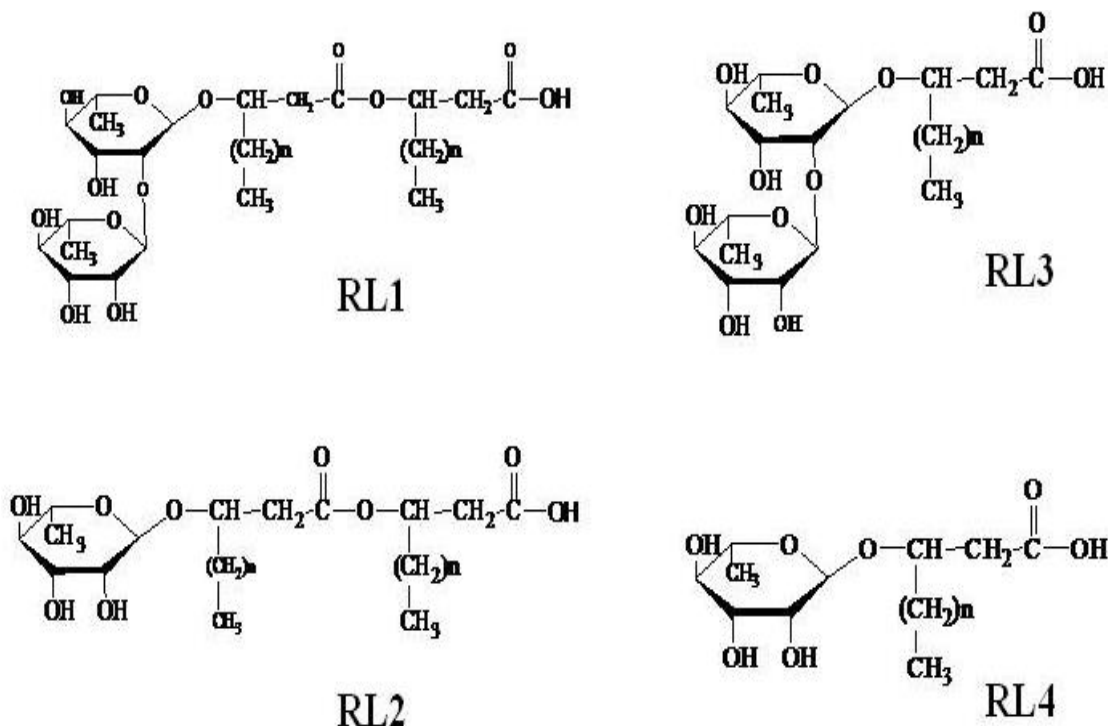


Figura 1 – Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios. RL1 e RL2: duas e uma moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas a duas moléculas de ácido graxo; RL3 e RL4: duas e uma moléculas de ramnose, respectivamente, ligadas a uma molécula de ácido graxo (LOVAGLIO, 2011).

3.2 Produção de biossurfactantes

Os biossurfactantes produzidos por micro-organismos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Apesar das vantagens apresentadas, os biotensoativos não são amplamente utilizados comercialmente devido aos altos custos de produção, o que está associado à baixa produtividade e ao uso de substratos caros.

De acordo com Mukherjee, Das e Sen (2006), três estratégias devem ser adotadas para tornar os custos do processo de produção mais baixo: (1) substrato - utilização de resíduos ou matéria-prima de baixo custo; (2) desenvolvimento de bioprocessos eficientes para produção e recuperação do produto, incluindo otimização das condições de cultivo e (3)

desenvolvimento de mutantes ou linhagens recombinantes para aumentar o rendimento do biossurfactante.

A produção de biossurfactantes se depara com várias dificuldades de processo. Entre os parâmetros que influenciam o tipo e a quantidade de produto formado estão: a natureza da fonte de carbono, possíveis limitações nutricionais e parâmetros físicos e químicos, como aeração, agitação, geração de espuma, temperatura e pH (FIECHTER, 1992; CHANG et al., 2005).

Elevadas proporções C/N (GUERRA-SANTOS, KÄPPELI, FIECHTER, 1984; RAZA et al., 2007; WU et al., 2007) e C/P (MULLIGAN; MAHMOURIDES; GIBBS, 1989) estimulam a síntese de ramnolipídios, enquanto altas concentrações de cátions bivalentes, especialmente ferro, são inibitórias (GUERRA-SANTOS, KÄPPELI, FIECHTER, 1986; RAMANA, KARANTH, 1989). Benincasa e Accorsini (2008) avaliaram a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI sob diferentes proporções C/N e alcançaram a mais alta concentração, 7,3 g/L, com a proporção C/N de 8/1. A utilização de amônio (NH_4^+), glutamina, asparagina e arginina, como fonte de nitrogênio, inibem a produção de ramnolipídios, enquanto nitrato (NO_3^-), glutamato e aspartato promovem a síntese (MULLIGAN, GIBBS, 1989; RAMANA, KARANTH, 1989; KÖHLER et al., 2000). De acordo com alguns autores o nitrato é a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada, pois estimula uma alta expressão de *rhlAB*, *operon* responsável pela síntese de mono-ramnolipídios (RAMANA, KARANTH, 1989; MANRESA et al., 1991; ARINO, MARCHAL, VANDECASTEELE, 1996; HENNING et al., 2008). De acordo com Manresa et al. (1991) a preferência por esta fonte de nitrogênio pode ser devido ao fato de *P. aeruginosa* ser apta a fazer desnitrificação e, portanto pode utilizar nitrato como aceptor de elétrons, mesmo na presença de oxigênio.

Segundo o trabalho de Guerra-Santos, Käppeli e Fiechter (1984), a produção de ramnolipídios por *Pseudomonas* sp. foi máxima quando o pH foi mantido entre 6,0 e 6,5; já acima de 7,0, a produção caiu bruscamente.

A temperatura ótima de produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* 44T1 foi 37 °C, de acordo com Robert et al., (1989). A temperatura pode afetar também a composição do biossurfactante produzido por linhagens de *Pseudomonas* sp. DSM-2874 (SYLDATK; LANG; WAGNER, 1985).

3.2.1 Substratos alternativos/resíduos

A utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo tais como subproduto agrícola ou de processamento industrial pode reduzir o problema econômico da produção de biossurfactantes. Estima-se que a matéria-prima seja responsável por cerca de 10% a 30% dos custos totais de produção em muitos processos biotecnológicos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). Além disto, o aproveitamento de resíduos pode contribuir para a redução da poluição ambiental, bem como permitir a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados.

Grandes quantidades de resíduos são geradas pela indústria de óleos e gorduras, estes são provenientes tanto da extração como da utilização de óleos vegetais. Estudos demonstraram que resíduos de óleos vegetais podem ser utilizados como substratos para a produção de ramnolipídios por alguns isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (BENINCASA et al., 2002; NITSCHKE et al., 2005; COSTA et al., 2005; RAZA et al., 2007).

Alguns autores relatam ainda a utilização de melão de cana, resíduos da produção de queijo, batata e mandioca como fontes para a produção de biotensoativos (MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006). Outra fonte alternativa é o glicerol, o principal subproduto obtido durante a produção de biodiesel. A água de maceração de milho, um subproduto do processamento dos grãos de milho, é um material ácido, rico em aminoácidos e polipeptídios, minerais e vitaminas. Devido à sua composição pode ser utilizado como suplemento de nutrientes em meio de cultivo para fermentações industriais (LIGGETT; KOFFLER, 1948).

Pode-se destacar a grande vantagem da utilização do caldo de fermentação de ramnolipídio em aplicações, pois segundo Mukherjee, Das e Sen (2006), os processos de extração dos biossurfactantes podem corresponder a até 60% do total dos custos de produção. Esta prática aliada ao uso de fontes de carbono renováveis, sejam elas os rejeitos da indústria ou produtos reutilizados, podem tornar viável o uso dos biossurfactantes para inúmeros fins, além da vantagem ambiental apresentada por tais bioprodutos.

3.3 Aplicações dos biossurfactantes

Os campos de utilização dos biossurfactantes incluem a agricultura e as indústrias farmacêutica, petrolífera, de alimentos e bebidas, de papel, de metal, de produtos de limpeza, de couro e têxtil (FIECHTER, 1992). São imensamente aplicados pela indústria petrolífera, na

qual são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes, assim como em biorremediação e dispersão no derramamento de óleo.

O biossurfactante pode ser adicionado ao local onde há contaminação por petróleo e derivados ou ainda o micro-organismo produtor pode ser inoculado na área impactada. A linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de metabolizar querosene, óleo Diesel e petróleo bruto como única fonte de carbono. A mais alta concentração de ramnolipídio, 9,9 g/L, foi alcançada com 30% de óleo Diesel (PIRÔLLO et al., 2008). De acordo com Wei, Mather e Fotheringham (2005) os biossurfactantes podem atuar na recuperação de adsorventes de óleos usados, dessa maneira este material pode ser reutilizado na recuperação de óleo ou em outras aplicações, como a engenharia civil.

De acordo com Wang e Mulligan, (2009a), biossurfactantes podem ser úteis na remoção de arsênico de rejeitos da mineração. Outra aplicação é a remoção de cromo (VI) da água e do solo. Ara e Mulligan (2008) relataram que houve retirada de 100% deste metal da água quando se estabeleceu condições físico-químicas ótimas, como pH 6,0, solução com 2% de ramnolipídios e temperatura de 25 °C.

Um estudo realizado por Qiuzhuo, Weimin e Juan, (2008) comprovou a eficiência dos ramnolipídios na decomposição de palha de arroz, aumentando em 22,3% a produção de açúcares redutores quando se adicionou biossurfactante purificado ao meio de sacarificação hidrolítica. Foi avaliado também o efeito da inoculação de *P. aeruginosa* para produção *in situ* do tensoativo, e a quantidade de açúcares redutores produzida foi 12,2% maior quando comparado ao controle (sem adição da bactéria), lembrando que este segundo método omite a etapa de purificação, reduzindo os custos do processo.

Os biotensoativos possuem propriedade antiadesiva, o que impede a formação de biofilmes patogênicos em materiais hospitalares, diminuindo o risco de infecções hospitalares sem a utilização de drogas sintéticas (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Os ramnolipídios podem atuar ainda como antimicrobianos, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral (ABALOS et al., 2001). Thanomsub et al. (2007) relataram a inibição do crescimento de células cancerosas humanas pelos homólogos de ramnolipídios, Rha₂C₁₀C₁₀ e Rha₂C₁₀C₁₂, produzidos por *P. aeruginosa* B189. Ainda dentro das aplicações na indústria farmacêutica há relatos de que a incorporação de 0,1% de di-ramnolipídios em pomadas aumentou a eficiência do tratamento de úlceras de pacientes decúbitos (PILJAC et al., 2008).

Wang et al., (2005) verificaram que a mistura de ramnolipídios produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* tem efeito potencial algicida, inibindo o crescimento de *Heterosigma akashiwo*, e quando em altas concentrações apresentam forte atividade lítica.

Na agroindústria, os ramnolipídios atuam na proteção de videiras contra o ataque de *Botrytis cinerea*, através da inibição da germinação de esporos e crescimento do micélio fúngico (VARNIER et al., 2009). Soluções contendo 0,01% de ramnolipídios estimularam o sistema imune de plantas contra fungos patogênicos (NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2011).

Nitschke, Costa e Contiero (2011), em sua revisão, descrevem aplicações de ramnolipídios em diferentes áreas da indústria alimentícia, nas quais podem atuar como controladores de consistência, solubilizadores de sabor, na conservação de produtos da panificação, e ainda em conjunto com nisina e natamicina inibem o crescimento microbiano em leite de soja, molhos de salada e queijo cottage. Além disso, os autores descrevem o retardo na formação de biofilme em superfícies tratadas com ramnolipídios.

O interesse na síntese biológica de nanopartículas tem aumentado devido à sua excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade. Os ramnolipídios estão sendo empregados na formação e estabilização de nanopartículas de óxido de níquel e zircônia e prata (MULLIGAN, 2009; PALANISAMY, RAICHUR, 2009; GANESH et al., 2010). As nanopartículas de ramnolipídios e prata exibiram atividade antibiótica contra diversos patógenos Gram positivos/negativos e leveduras da espécie *Candida*, evidenciando o amplo espectro de ação da sua atividade antimicrobiana (KUMAR; MAMIDYALA, 2011).

Foi descrito por Zhang e Ju (2011) a utilização de ramnolipídios para separação de β -glicosidase de uma mistura de enzimas através do fracionamento de espuma. Os ramnolipídios foram utilizados devido a sua propriedade espumante e pela presença de di-ramnose em alguns homólogos, a qual atua como um substrato análogo para a β -glicosidase.

3.3.1 Remoção de metais de solos e efluentes contaminados

O interesse na aplicação dos ramnolipídios para a remoção de metais de solos e efluentes contaminados vem crescendo ao longo dos últimos anos, e diversos autores têm conseguido bons resultados em pesquisas neste tema.

Dahrazma e Mulligan (2007) realizaram a remoção de cobre, zinco e níquel de solo contaminado originário de um local próximo a indústrias de metal e aço, no Canadá. Foram testadas diversas concentrações de ramnolipídios com e sem aditivos, em sistema de lavagem de solo em coluna. As maiores remoções alcançadas foram de 37% de cobre, 7,5% de zinco e aproximadamente 33,2% de níquel, utilizando-se uma solução de 5% de ramnolipídio (massa/volume - m/v) e fluxo a 0,5 mL/min.

Juwarkar et al. (2007) testaram a aplicação de um di-ramnolípido para a remoção de cádmio e chumbo de solo contaminado em laboratório. Realizando lavagem de solo em coluna, os autores concluíram que o di-ramnolípido removeu tanto a fração de metais disponíveis no solo como a fração ligada às partículas de solo, fração esta que o controle, realizado com água de torneira, não foi capaz de remover. Utilizando uma solução de 0,1% de biossurfactante, as remoções de cádmio e chumbo chegaram a 92% e 88%, respectivamente, ao final de 36 horas de tratamento. Tais autores destacaram que o pH do lixiviado resultante do tratamento do solo contaminado por metais passou de 6,78 para 6,6 após 36 horas, indicando grande dissociação dos metais em relação ao solo. Para finalizar, ressaltaram ainda que a única forma de aplicar os biossurfactantes *in situ* e conseguir uma boa relação custo-benefício seria criando um sistema no qual ocorresse a precipitação dos metais da solução após a lavagem do solo, a fim de recircular a mesma pela coluna.

Kim e Vipulanandan (2006) testaram um biossurfactante produzido por *Flavobacterium sp.*, isolada de solos contaminados, na remoção de chumbo presente em água e solo argiloso (caulinita), ambos contaminados artificialmente. Os autores também compararam os resultados obtidos utilizando o biossurfactante com dois surfactantes comerciais, Triton X-100 e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Neste trabalho, a descontaminação do solo foi realizada pela mistura de solo e solução de surfactante/biossurfactante na razão 1:20 em tubos de ensaio, colocados em agitador mecânico por 24 horas a 200 rpm. Os resultados mostram baixa porcentagem de remoção de chumbo por este método, mesmo assim é possível verificar que o biossurfactante alcançou maiores taxas de remoção que os surfactantes comerciais. No caso da água contaminada por chumbo, porém, os autores conseguiram bons resultados, chegando a 76% de remoção de chumbo da água contaminada com 100 mg/L deste metal, utilizando concentração do biossurfactante 10 vezes superior à CMC. Os surfactantes SDS e Triton X-100 chegaram a 26% e 6% de remoção, respectivamente, nas mesmas condições.

Mulligan e Wang (2006) compararam as remoções de níquel e cádmio de solo contaminado artificialmente, utilizando espuma e solução líquida de ramnolípido. Em experimentos, realizados em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), o solo predominantemente arenoso foi tratado em coluna com espuma produzida por solução de 0,5% de ramnolípidios. Os melhores resultados foram obtidos com solução cujo pH inicial foi ajustando para 10,0, sendo as porcentagens de remoção iguais a 68,1% para níquel e 73,2% para cádmio. Soluções com alto valor de pH funcionaram melhor provavelmente porque maiores valores de pH permitiram que os metais ligados à matéria orgânica do solo, neste

caso um pouco elevada, fossem liberados, ficando livres para se ligarem ao biossurfactante. Utilizando-se solução líquida de biossurfactante na mesma concentração que a espuma os autores obtiveram remoção de 61,7% de cádmio e 51% de níquel. Esta diferença de valores pode ser devido ao fato de que a transferência de metais do solo para a espuma se dá de forma mais uniforme e promovendo um contato mais eficiente com o biossurfactante, além de que a injeção de solução de ramnolipídio e ar ao mesmo tempo teve de forma efetiva a formação de canais na coluna, os quais permitiriam a livre passagem da solução em vez da passagem pelo solo.

Torres, Lopez e Beltran (2012) testaram onze diferentes surfactantes comerciais em concentrações de 0,5% no tratamento de solo contaminado por cobre, arsênio, cádmio, níquel, chumbo e zinco, originário do subsolo de indústria metalúrgica localizada na Cidade do México. As remoções variaram de 2,7 a 86,6%, sendo que as remoções médias de todos os metais realizadas pelos surfactantes variaram de 45 a 67,1%. Apesar dos bons resultados apresentados, a aplicação de surfactantes comerciais em solo *in situ* nem sempre é viável, visto que alguns produtos podem interferir negativamente na microflora presente neste meio por serem tóxicos ou mesmo por não apresentarem fácil biodegradação (FRANZETTI et al., 2006; YING, 2006).

O efeito de biossurfactantes/surfactantes aniônicos pode ser reduzido em solos contendo altas concentrações de íons positivos, como sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), pois parte de tais produtos podem se ligar aos cátions do solo em vez de se ligarem aos íons metálicos (TORRES; LOPEZ; BELTRAN, 2012).

Ochoa-Loza et al. (2007) estudaram os efeitos das argilas, óxidos metálicos e matéria orgânica na sorção de mono-ramnolipídio por solo, concluindo que tal efeito depende das concentrações do produto. Em baixas concentrações de mono-ramnolipídio, interessantes para melhorar a biodegradação de contaminantes orgânicos, a sorção segue a ordem: hematita > caulinita > MnO_2 ~ ilita ~ Ca-montmorillonita > gibbsita > sílica revestida por ácidos húmicos. Já em altas concentrações, relevantes para a complexação/remoção de metais ou substâncias orgânicas, a sorção deste biossurfactante segue a ordem: ilita >> sílica revestida por ácidos húmicos > Ca-montmorillonita > hematita > MnO_2 > gibbsita ~ caulinita. Os autores concluem que, em geral, hematita, ilita, caulinita e Ca-montmorillonita são os constituintes dos solos que têm maior efeito na sorção de mono-ramnolipídio. No caso da remoção de metais, é de interesse do processo que a sorção do biossurfactante pelo solo seja mínima, isto é, o biotensioativo deve permanecer na fase aquosa. Neste sentido, os autores afirmam que uma mistura de di-ramnolipídio e mono-ramnolipídio deve sofrer menor sorção

do que o mono-ramnolipídio sozinho, provavelmente devido ao fato do di-ramnolipídio possuir maior natureza hidrofílica.

Wang e Mulligan (2009b) realizaram experimentos em coluna com o objetivo de avaliar a possibilidade de uso de soluções de ramnolipídio para melhorar a remoção de arsênio e metais pesados de solo residual de mineração. Os autores concluem que o uso de uma solução 0,1% de ramnolipídio com pH inicial ajustado a 11,0 pode melhorar significativamente a remoção de arsênio e metais pesados simultaneamente. Os resultados obtidos após lavagem foram: remoção de 148 mg/kg de arsênio, 74 mg/kg de cobre, 2.379 mg/kg de chumbo e 259 mg/kg de zinco.

Asçi, Nurbas e Açikel (2007; 2008a; 2008b) realizaram experimentos sobre a sorção e dessorção de cádmio (Cd(II)) em diversos componentes do solo: caulim; feldspato potássico e sepiolita; e diferentes conteúdos de argilas, respectivamente. A recuperação deste metal, em todos os experimentos, foi analisada em função da concentração inicial de Cd(II), a concentração de ramnolipídio e o pH, sendo realizados testes em mesa agitadora por 72 horas a 150 rpm e 25°C. Os melhores resultados foram: 71,9% de remoção em caulim (pH 6,8, concentração inicial de Cd(II) 0,87 mM e 80 mM de ramnolipídios); 96% em feldspato potássico (pH 6,8, concentração de ramnolipídios entre 50 mM e 80 mM) e 10,1% em sepiolita (pH 6,8, concentração de ramnolipídios 50 mM). Em baixas concentrações de Cd(II), a recuperação deste metal seguiu a ordem inversa de sorção aos solos contendo diferentes porcentagens de argila, sendo que o solo com maior porcentagem (70%) foi o que obteve menor remoção; já em altas concentrações, esta ordem se inverteu, e o solo com menor porcentagem de argila (30%) foi o que obteve menor remoção de Cd(II).

Esses autores ainda testaram a remoção de zinco do componente feldspato sódico do solo utilizando ramnolipídios (2008c) em experimentos em mesa agitadora, nas mesmas condições dos artigos anteriormente citados. A concentração de ramnolipídios, o pH e a concentração de zinco foram variados. A máxima remoção de 98,83% ocorreu em 25 mM de ramnolipídios, 2,19 mmol Zn/kg de feldspato e pH 6,8.

No que diz respeito ao meio ambiente, Juwarkar et al. (2007) testaram os efeitos do ramnolipídio na população de micro-organismos presentes no solo. Concluíram que a aplicação do biossurfactante contribuiu para o aumento dos micro-organismos, já que os metais pesados removidos são tóxicos e possuem efeito inibitório sobre a microflora.

3.4 Metais pesados e o meio ambiente

Segundo Alloway (2013), o termo “metal pesado” é geralmente utilizado para se referir aos metais e metaloides de massa específica maior que $5,0 \text{ g/cm}^3$, como chumbo, cádmio e mercúrio, e que podem causar toxicidade, embora este termo nem sempre englobe todos os metais tóxicos, a exemplo de berílio e bário, que possuem massa específica menor que o valor citado.

A concentração dos metais no solo dependem de diversos fatores, como a interação dos íons metálicos com as partículas de solo, os cátions e a porção húmica presentes nele, bem como com o pH, a quantidade de água presente, mecanismos de oxidação, sorção, precipitação, entre outros (BONACIN SILVA, 2001).

Dentre tais metais, o chumbo é o elemento que mais tem sido utilizado pelo homem ao longo dos anos e é encontrado na crosta continental numa razão de $14,8 \text{ mg/kg}$ de solo (ALLOWAY, 2013). As fontes mais comuns de chumbo em solo, em decorrência da intervenção humana, são devido à: mineração e fundição de metais; emissões de chumbo na atmosfera advindo da queima de combustíveis fósseis e que posteriormente são depositados no solo; lodos de esgoto doméstico, se estes não são dispostos adequadamente no meio ambiente (BONACIN SILVA, 2001; ALLOWAY, 2013); baterias e pigmentos utilizados em tintas.

Quanto ao cobre, sua abundância na crosta terrestre está na média de 60 mg/kg de solo. Este elemento é utilizado em diversas áreas, como a elétrica, construção civil, transportes, artes e em moedas, sendo o terceiro metal mais usado pelo homem (ALLOWAY, 2013). Seus resíduos no meio ambiente advêm dessas áreas, e também de fertilizantes e pesticidas, resíduos domésticos e emissões industriais. A mobilidade do cobre no meio ambiente está ligada à concentração do mesmo (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001), e seus efeitos tóxicos dependem das propriedades do solo onde este metal se encontra; porém, em altas concentrações, pode ser tóxico a todos os organismos (ALLOWAY, 2013).

O níquel é muito utilizado atualmente em áreas desde moedas até automóveis e joias; possui diversas aplicações industriais e em pesquisas, sozinho ou em ligas com outros metais. Recentemente, a ampla liberação de níquel pelas atividades industriais, em especial pela fabricação do aço inoxidável, bem como pelo uso de lodo proveniente do tratamento de esgoto como condicionador de solos agrícolas, pela queima de óleo e carvão em usinas de geração de energia elétrica e na incineração de resíduos sólidos urbanos, causaram um aumento nos níveis deste metal na pedosfera e em outras matrizes ambientais. Embora seja

essencial às plantas e outros organismos em baixas quantidades, em altas concentrações o níquel pode ser tóxico (ALLOWAY, 2013; OLIVEIRA, 2006).

O zinco é utilizado em revestimentos anticorrosivos, misturas para fundições e em latões, chapas e lâminas de revestimento de baterias elétricas, entre outras áreas (OLIVEIRA, 2006). As atividades humanas têm aumentado as concentrações de zinco nos solos através das deposições atmosféricas, fertilização e aplicação do lodo de estações de tratamento de esgoto. Áreas localmente contaminadas são geralmente encontradas próximas às atividades de fundição, mineração e galvanização. Elevadas concentrações de zinco podem causar efeitos tóxicos em plantas e micro-organismos presentes no solo antes de causar efeitos ao homem (ALLOWAY, 2013).

A CETESB possui, para diversos elementos, valores orientadores para a concentração desses em solo e água subterrânea no Estado de São Paulo. Assim, define-se (CETESB, 2005a):

- Valor de Referência de Qualidade (VRQ): “é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo como limpo ou a qualidade natural da água subterrânea”. É utilizado como referência para ações de prevenção da poluição e de controle de áreas contaminadas;
- Valor de Prevenção (VP): “é a concentração de determinada substância, acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea”. Indica a qualidade de um solo capaz de sustentar as suas funções primárias;
- Valor de Intervenção (VI): “é a concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerado um cenário de exposição genérico” para diferentes usos do solo. Uma área é classificada como Área Contaminada sob Investigação quando se constatar a presença de um contaminante acima do VI, o que indica a necessidade de ações para proteger áreas de risco.

Assim, para os metais citados anteriormente, a Tabela 1 traz seus valores orientadores para o solo:

Tabela 1 – Valores orientadores para o solo (mg/kg de peso seco)

Metal	VRQ	VP	VI		
			Área agrícola	Área residencial	Área industrial
Chumbo	17	72	180	300	900
Cobre	35	60	200	400	600
Níquel	13	30	70	100	130
Zinco	60	300	450	1000	2000

VRQ: Valor de Referência de Qualidade; VP: Valor de Prevenção; VI: Valor de Intervenção.

(Adaptado de CETESB, 2005a)

3.4.1 Metais pesados no meio ambiente: a Região dos Lagos

Alguns metais pesados, como o chumbo, não são benéficos aos organismos, nem mesmo em baixíssimas concentrações. Outros metais podem tornar-se tóxicos quando em grandes quantidades, ou possuem efeito acumulativo, o que é um agravante quando presentes no meio ambiente (BONACIN SILVA, 2001).

Nas indústrias cerâmicas, os resíduos potencialmente mais tóxicos são: os lodos e efluentes líquidos do tratamento físico-químico aplicado aos resíduos da linha de esmaltação e corantes, os cacos de pisos descartados antes e após a queima (passo pós esmaltação/corantes) e os efluentes gasosos liberados na queima em forno (BONACIN SILVA, 2001).

Em estudos realizados por Bonacin Silva (2001) na Região dos Lagos, em Santa Gertrudes, foram encontradas amostras de solo (em pontos próximos ao da coleta realizada no presente trabalho) com teores de chumbo entre 270 mg/kg e 702 mg/kg, e zinco entre 83 mg/kg e 213 mg/kg, o que, segundo o autor, evidencia a influência dos resíduos gerados pela indústria cerâmica Poliglass no meio ambiente da região, indústria esta que já estava desativada na época da pesquisa. Em outros pontos, tais teores chegaram a mais de 34.000 mg/kg de chumbo e 17.000 mg/kg de zinco. Foram encontrados também altos teores de diversos metais nos sedimentos de fundo dos lagos da área de coleta (até 1.570 mg/kg de chumbo e até 365 mg/kg de zinco), principalmente nas camadas superficiais de até 15 cm de profundidade. No ponto mais atingido de outra área, os teores de chumbo e zinco chegaram a 4.178 mg/kg e 4.195 mg/kg, respectivamente.

Tal autor também analisou os materiais e resíduos de algumas indústrias cerâmicas localizadas em Santa Gertrudes, e concluiu que havia uma expressiva quantidade de chumbo, zinco, boro e outros metais (como cromo e níquel) e semi-metais empregados na confecção de esmaltes e corantes cerâmicos. Experimentos também indicaram que parte desses metais

poderia ficar disponível no meio ambiente, o que torna relevante o problema dos descartes de cacos de pisos realizados até hoje na região. Além disso, análises de amostras de água de chuva indicaram grandes quantidades de material particulado contendo chumbo, este provavelmente proveniente das emissões industriais.

O estudo do comportamento de chumbo e zinco em solos, sedimentos, águas subterrâneas e superficiais permitiu concluir que a recuperação ou remediação das áreas contaminadas, em Santa Gertrudes, pode ser feito através de: isolamento para a atenuação natural do problema, no caso de contaminação por chumbo e zinco; e tratamento *in situ* e/ou remoção dos metais contaminados, para contaminação por chumbo. Principalmente devido à sua baixa mobilidade, o chumbo é o maior contaminante da área estudada (BONACIN SILVA, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado para produção de ramnolipídios foi *P. aeruginosa* LBI 2A1, proveniente de um banco de mutantes randômicos do Laboratório de Microbiologia Industrial, UNESP – Rio Claro (LOVAGLIO, 2011). O micro-organismo encontrava-se em tubos criogênicos armazenados em ultra freezer a -80 °C.

4.2 Meios de cultura

4.2.1 Meio Mineral Livre de Cálcio com Tampão Fosfato (MLCTF)

Este meio foi utilizado para produção de ramnolipídios em frascos Erlenmeyer. Sua composição consiste em (g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; KCl - 0,1; NaNO_3 - 1,5; fonte de carbono - 50, 125 e 250; tampão fosfato 0,1 M pH 6,5 e 1 mL/L da solução de elementos traços. Esta solução é composta por (g/L): citrato de sódio dihidratado - 2,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,28; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,4; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1,2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,8. Como fonte de carbono foi utilizado óleo residual de fritura, proveniente do Restaurante Universitário da UNESP – Rio Claro.

4.2.2 Caldo Nutriente (CN)

Composição do meio utilizado para o pré-cultivo do micro-organismo em (g/L): peptona - 5,0; extrato de carne - 3,0.

4.3 Condições de cultivo

4.3.1 Preparo do inóculo

Primeiramente os micro-organismos foram pré-cultivados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio CN e 100 μL da cultura estoque de *P. aeruginosa* LBI 2A1, com incubação em mesa agitadora durante 24 horas a 37 °C e 200 rpm. Em seguida transferiu-se 2,5 mL do pré-cultivo para frascos de 500 mL com 200 mL de MLCTF e 6%

(m/v) de óleo residual de fritura; os frascos foram incubados por 24 horas a 30 °C e 200 rpm. Esta cultura foi utilizada para inoculação do meio de produção, resultando em uma Densidade Óptica em comprimento de onda de 580 nanômetros ($D.O_{580nm}$) inicial da fermentação de 0,1.

4.3.2 Produção de ramnolipídios

Foram avaliadas três concentrações de óleo residual, 50 g/L, 125 g/L e 250 g/L. A produção do biossurfactante foi feita em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio MLCTF e o inóculo foi adicionado de acordo com o que foi descrito no item 4.3.1. Os frascos foram incubados por 120 horas, a 200 rpm e 37 °C. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para análise do crescimento, produção de ramnolipídios e consumo da fonte de carbono. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

4.3.3 Extração de ramnolipídios

O caldo livre de células foi misturado com clorofórmio e metanol (3:2:1 volume/volume - v/v) e agitado vigorosamente por 10 minutos. Posteriormente, a mistura foi mantida em repouso até ocorrer a separação das fases. Coletou-se a fase inferior contendo ramnolipídios e solvente, e o processo foi repetido. Após a repetição, o solvente foi evaporado em rotavapor para a obtenção do tensoativo. A fase com óleo foi descartada.

4.4 Aplicação de ramnolipídios em solo

4.4.1 Coleta de amostra de solo

Foram coletadas três amostras superficiais de solo (profundidade de até cinco centímetros) na Região dos Lagos, Santa Gertrudes. O local de coleta fica às margens de um pesqueiro que ainda contém muitos resíduos de cerâmica (cacos e pedaços de pisos e azulejos esmaltados). Antes de ser composta a amostra, todo o material coletado foi peneirado para a remoção dos cacos de cerâmica de menor tamanho.

4.4.2 Caracterização da amostra de solo

A caracterização do tipo de solo foi feita segundo as seguintes análises físicas e químicas: análise granulométrica no laboratório didático de Geotécnica, Departamento de Geologia Aplicada, UNESP – Rio Claro, segundo Norma Brasileira (NBR) 7181/1984 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1994); capacidade de troca de cátions (CTC) e porcentagem de matéria orgânica da amostra de solo, ambas realizadas pelo Laboratório de Fertilidade do Solo do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), segundo metodologia própria.

As concentrações dos metais presentes na amostra de solo foram determinadas pelo Laboratório de Fertilizantes e Resíduos do IAC, segundo metodologia 3051a do *United States Environmental Protection Agency* (US EPA).

4.4.3 Lavagem de solo em coluna

A lavagem de amostras de solo residual da cerâmica foi realizada em dois tipos de coluna de vidro. A primeira com 20 cm de altura por 2,2 cm de diâmetro, saída lateral e camada de sílica na extremidade anterior, antes da saída (Figura 2A). O segundo tipo de coluna era reta, sem saída lateral, com 23 cm de altura, 1,1 cm de diâmetro e foi colocado um tampão de gaze antes da saída inferior, para evitar a perda de solo (Figura 2B). Empregou-se os métodos utilizados por Juwarkar et al. (2007) e Wang e Mulligan (2009b) para a lavagem de solos contaminados artificialmente e rejeitos de mineração, respectivamente, ambos com modificações. Foram testadas várias configurações em sistema aberto e fechado, com fluxo descendente e ascendente de 0,75 mL/min, o qual foi determinado devido às características da amostra de solo. Diversos problemas na realização deste tipo de lavagem foram encontrados, o que levou à mudança do método.



Figura 2 – Colunas de vidro utilizadas nos experimentos. A: coluna com saída lateral; B: coluna reta.

4.4.4 Lavagem de solo em mesa agitadora

Para a remoção de metais pesados das amostras, foram testadas soluções com concentrações de 0,5 g/L e 1,0 g/L do biossurfactante e também o caldo livre de células, em dois valores de pH inicial, $8,0 \pm 0,1$ e $9,0 \pm 0,1$, resultando em seis experimentos. O caldo livre de células utilizado é resultado de uma fermentação em reator, a qual seguiu o mesmo protocolo anteriormente citado, contendo uma concentração de ramnolipídios igual a 36 g/L.

Foram utilizados 80 g de solo e 240 mL de solução em Erlenmeyer de 500 mL, numa razão de massa de solo por volume de solução de 1:3 m/v. A lavagem foi realizada em mesa agitadora a 150 rpm por 48 horas na temperatura de 28 °C, a qual corresponde aproximadamente à média anual das temperaturas máximas no município de Santa Gertrudes, segundo o Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura (CEPAGRI) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A baixa agitação foi escolhida pelas características do solo. O controle foi feito com água de torneira, seguindo análise de Juwarkat et al. (2007). A fim de comparar os resultados obtidos, foram também realizados testes utilizando-se o surfactante comercial SDS na concentração de 1,0 g/L e pH $9,0 \pm 0,1$. Foram retiradas amostras somente ao final dos experimentos, após um período de

descanso sem agitação para a sedimentação das partículas finas de solo, seguida pela centrifugação da fase líquida por 20 minutos a 5.000 rpm e 23 °C (temperatura ambiente do laboratório).

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 *Processamento das amostras*

O processamento das amostras seguiu-se da seguinte maneira (LOVAGLIO, 2011): a 10 mL do caldo fermentado foi adicionado n-hexano (1:1). As amostras foram agitadas vigorosamente por 1 minuto e centrifugadas a 5.000 rpm, 4 °C durante 30 minutos, para que ocorresse a separação das três fases: células/fase aquosa/n-hexano. A fase aquosa foi utilizada para quantificação de ramnose, o pellet para quantificação da biomassa, e o n-hexano para quantificação do consumo da fonte de carbono, ambos descritos abaixo.

4.5.2 *Avaliação da produção de ramnolipídios*

Uma alíquota de 2 ml da fase aquosa foi utilizada para quantificação de ramnolipídios. Primeiramente adicionou-se H_3PO_4 85% 1:100 (v/v) para ajustar o pH para 2,0 ou 3,0, levando à precipitação dos ramnolipídios presentes. Em seguida utilizou-se acetato de etila 1:1,25 (v/v) para extração do tensoativo; centrifugou-se a 10.000 rpm, 4 °C e 10 minutos, retirou-se a fase superior e repetiu-se o procedimento com acetato de etila.

4.5.3 *Determinação da concentração de ramnolipídios*

Antes de realizar as análises em *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ou cromatografia líquida de alta eficiência em português, foi feita a cromatografia em camada delgada para verificar se houve produção de ramnolipídios. Em placas de sílica-gel foram colocadas 4 µL de cada triplicata de amostras das fermentações, formando um ponto para cada tempo de fermentação. Como fase móvel foi utilizada a mistura de clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2 v/v) e como agente revelador a mistura de 2 mL de anisaldeído em 100 mL de ácido acético acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico.

Para que os ramnolipídios fossem analisados via detector ultravioleta (UV), os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com o que foi descrito por

Schenk, Schuphan e Schmidt (1995), com pequenas modificações. As amostras, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 μL de acetonitrila e 40 μL da mistura 1:1 (v/v) de brometo de 4-bromofenacil 40 mM e Trietilamina 20 mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 1,5 horas a 60 °C e 1.400 rpm, em um banho seco (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

As análises foram feitas com um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono- e di-ramnolipídio nas concentrações de 0,25 g/L; 0,50 g/L; 0,75 g/L e 1,0 g/L. Para as análises utilizou-se uma coluna de fase reversa (C18, Shimadzu - 150 mm x 4,6 mm, 5 μm sílica gel) a 30 °C. As fases móvel foram Solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, ambas em água ultra pura. Para que ocorresse a separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 a 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de 0 à 17 minutos, aumento da Solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 minutos. Em seguida ocorre um decréscimo para 80% até 30 minutos, mantendo-se por mais 5 minutos para que ocorra equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL/min e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram 21,5 min $\pm$ 0,1 min para Rha-Rha-C₁₀C₁₀ e 22,2 $\pm$ 0,1 min para Rha-C₁₀C₁₀.

4.5.3 Determinação da biomassa microbiana

Após a separação das três fases (item 4.5.1) o pellet de células foi ressuspenso em cloreto de sódio (NaCl) 0,85% (mesmo volume que a amostra inicial) e centrifugado a 4.600g, a 4 °C por 30 minutos. Em seguida o pellet foi dissolvido em menor volume de solução salina e mantido em estufa a 100 °C até atingir peso constante.

4.5.4 Determinação do óleo residual

A fase de n-hexano foi usada para determinação gravimétrica das concentrações de óleo, depois da evaporação do solvente.

4.5.5 Análise das lavagens do solo

As concentrações de metais nas soluções líquidas antes e após a aplicação no solo foram analisadas pelo Laboratório de Fertilidade do Solo do IAC, através de determinação

direta por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* - ICP-OES).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da produção de ramnolipídios, crescimento celular e óleo residual

A análise da cromatografia em camada delgada (Figura 3) indicou que houve a produção de ramnolipídios durante as fermentações realizadas. Os *spots* mostram a presença de mono (RL2) e di-ramnolipídios (RL1) nas amostras coletadas.

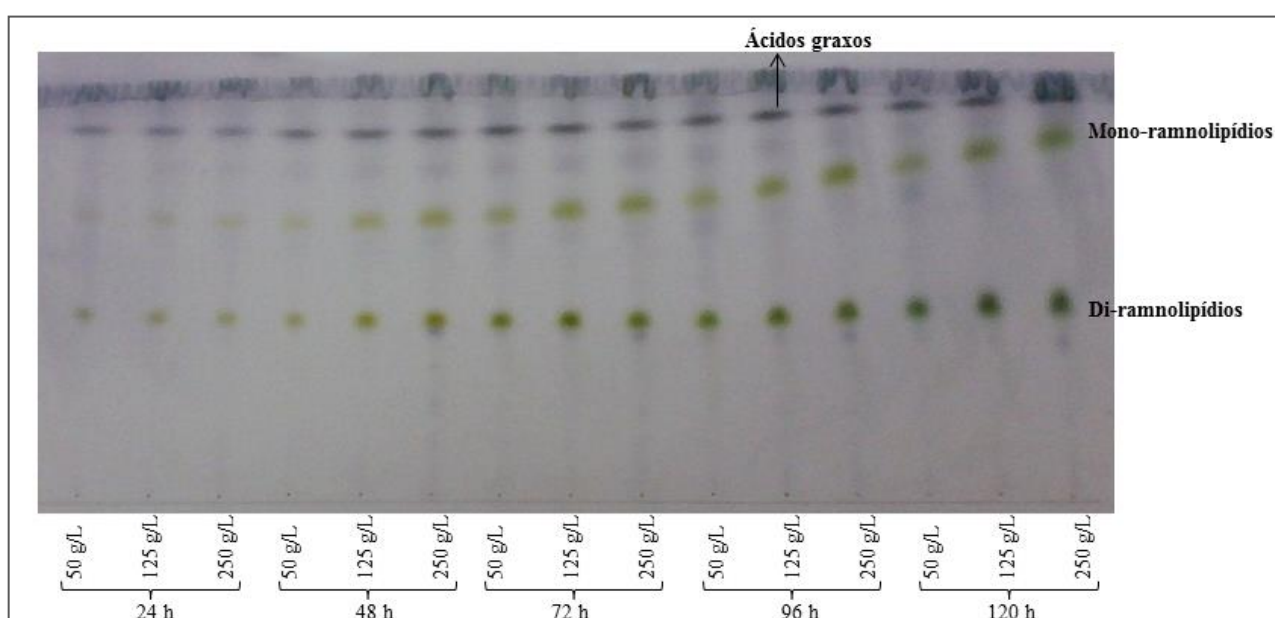


Figura 3 – Cromatografia em camada delgada indicando a presença de mono e di-ramnolipídios nas amostras das fermentações realizadas utilizando-se *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 com diferentes concentrações da fonte de carbono.

A cromatografia em camada delgada serviu de base para a determinação do volume das amostras de ramnolipídios e acetato de etila a serem evaporadas antes da fase de derivatização. Quanto mais forte a tonalidade do *spot*, menor o volume a ser evaporado.

Após a passagem das amostras de ramnolipídios derivatizadas pelo HPLC, as áreas correspondentes aos homólogos dos ramnolipídios RL1 e RL2 foram convertidas em concentrações de ramnolipídios produzidos, como consta na Figura 4.

Como é possível observar nesta figura, todas as fermentações obtiveram maior produção final de RL2 do que de RL1. Verificou-se que as maiores produções de

ramnolipídios ocorreram para as concentrações de fonte de carbono de 125 g/L e 250 g/L. A produção total dessas fermentações (produção somada de RL1 e RL2) foram próximas, atingindo respectivamente 0,415 g/L e 0,441 g/L.

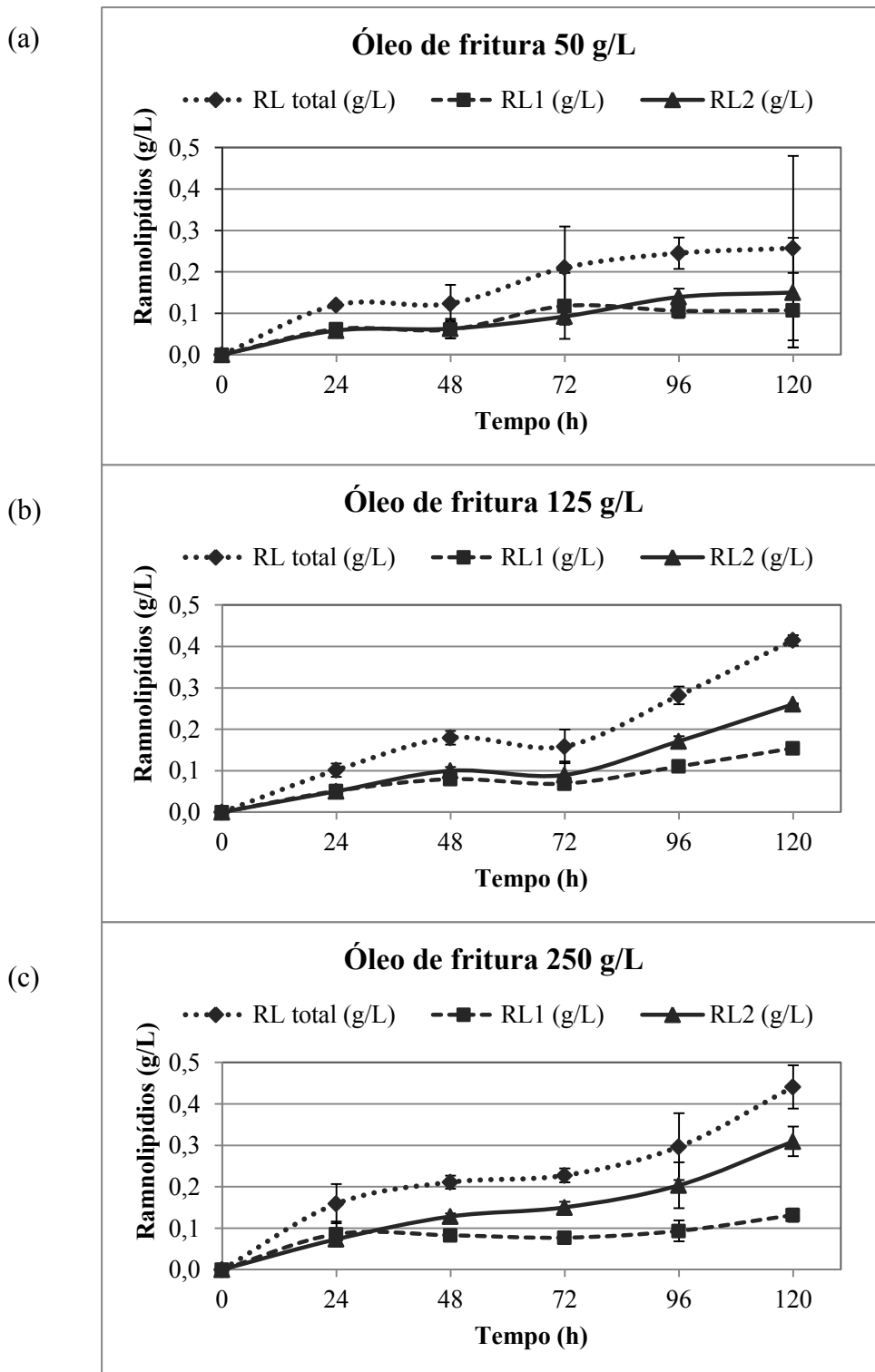


Figura 4 – Produção de ramnolipídios (homólogos RL1, RL2 e produção total) (g/L) para as concentrações de fonte de carbono de (a) 50 g/L, (b) 125 g/L e (c) 250 g/L. As barras correspondem aos desvios padrão.

O resultado do crescimento microbiano, consumo da fonte de carbono e produção de ramnolipídios totais para as amostras retiradas das fermentações utilizando as três concentrações de óleo de fritura do Restaurante Universitário estão na Figura 5.

O crescimento microbiano foi variável e baixo em todos os experimentos, não ultrapassando 1,43 g/L (Figura 5 (c)). Porém, a produção de ramnolipídios não foi comprometida, indicando que o metabolismo celular foi direcionado para a produção do tensoativo e não para o crescimento da bactéria.

Tal variação do crescimento microbiano, principalmente próxima aos tempos de 72 horas e 96 horas, deve-se à dificuldade do método adotado para o processamento das amostras quantificar este parâmetro, pois a grande produção de polímeros pela *Pseudomonas aeruginosa* atrapalha a centrifugação das células, afetando o resultado final.

O óleo residual também se apresentou variável, e os dados indicam que houve baixo consumo do mesmo, com taxas de 2,27% de consumo na fermentação com 50 g/L de óleo; 17,23% no experimento com 125 g/L de óleo e 36,2% na fermentação com 250 g/L de óleo. A eficiência na conversão da fonte de carbono em ramnolipídios foi superior na fermentação onde se utilizou 125 g/L da fonte de carbono, pois com um consumo 50% menor, produziu concentração semelhante à obtida com 250 g/L de óleo de fritura.

A análise estatística das produções de ramnolipídios através do uso da ferramenta ANOVA mostrou que os valores alcançados com as três concentrações de óleo de fritura não são estatisticamente significantes ($p = 0,423$).

Assim, as maiores produções de ramnolipídios corresponderam às concentrações de óleo de 250 g/L e 125 g/L, nesta ordem. Tanto as produções quanto o crescimento microbiano desses experimentos foram semelhantes. Portanto, escolheu-se utilizar a concentração de 125 g/L para a produção do ramnolipídio, pois esta acarretou em uma produção semelhante à concentração de 250 g/L, porém utilizando-se de metade da concentração da fonte de carbono, resultando em um melhor produção em relação ao consumo de óleo de fritura.

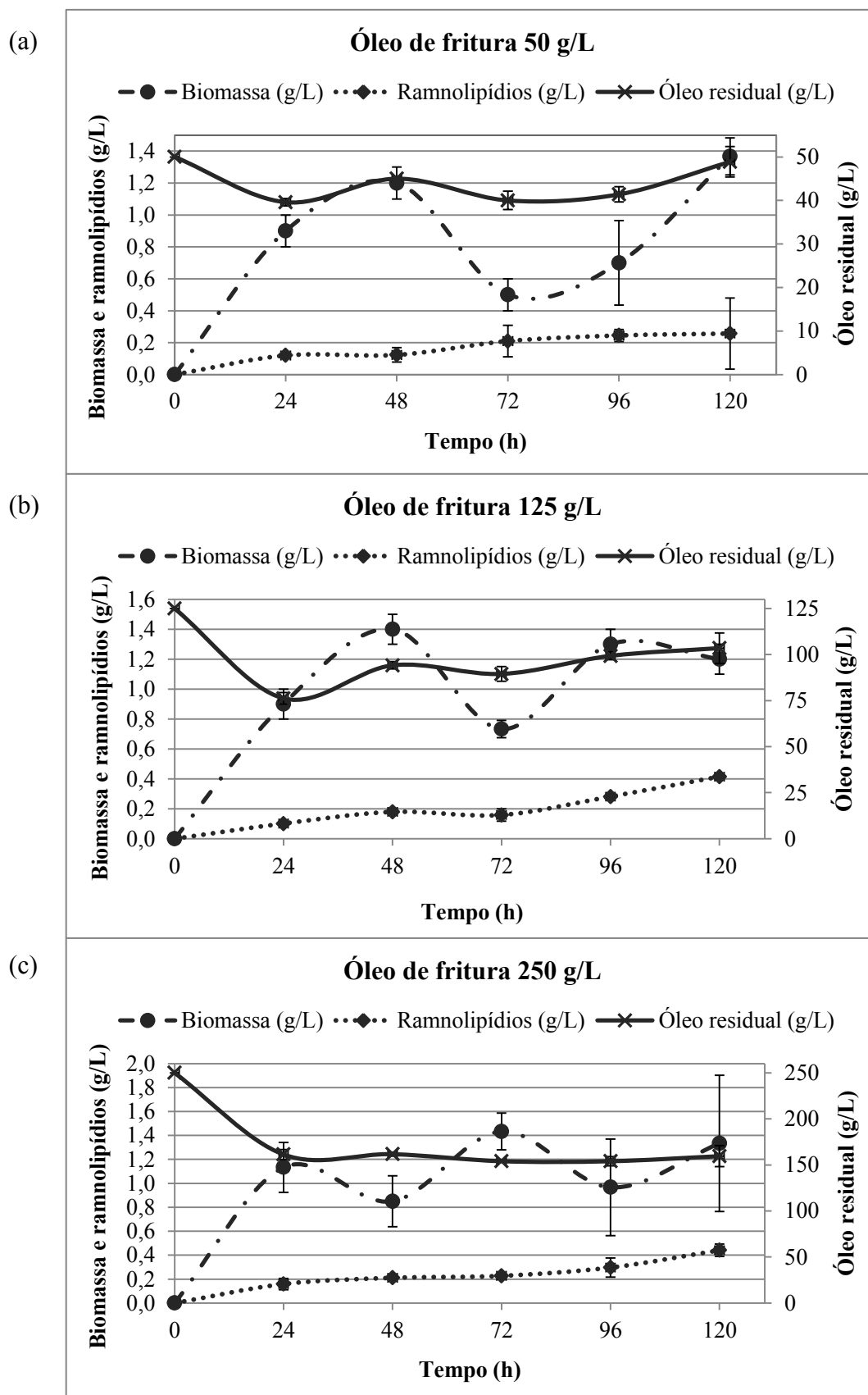


Figura 5 – Crescimento microbiano (g/L), produção de ramnolipídios (g/L) e óleo residual (g/L) das fermentações com concentração inicial da fonte de carbono igual a (a) 50 g/L, (b) 125 g/L e (c) 250 g/L.

5.2 Coleta de amostras de solo

A coleta de solo foi realizada no dia 15 de fevereiro de 2013, no período da manhã. Segundo dados da estação meteorológica localizada no Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA) da UNESP – Rio Claro, a temperatura às 9 h era de 26,3 °C, e a umidade relativa do ar situava-se entre os valores máximo e mínimo de 97% e 50%, respectivamente.

A estrada de terra que dá acesso aos pesqueiros encontra-se coberta por cacos de cerâmica, como mostra a Figura 6. Os pontos de coleta também continham cacos de cerâmica, porém em menor quantidade (Figura 7). Tais pontos encontram-se em uma área de menor altitude, o que favoreceu a concentração de metais pesados ao longo do tempo, visto que os metais devem ter sido lixiviados das áreas de maior altitude para as de menor altitude, como indicado por Schoenlein (2006) e também pela CETESB (2005b), o que levou à contaminação das águas e dos sedimentos dos pesqueiros.

Foram coletados aproximadamente três quilogramas de amostra, de três pontos próximos, resultando em uma amostra composta de solo, a qual foi caracterizada.



Figura 6 – Estrada de acesso aos pesqueiros coberta por resíduos de cerâmica.



Figura 7 – Coleta das amostras de solo. Notar a presença de resíduos da indústria cerâmica no local.

5.3 Caracterização da amostra de solo

5.3.1 Análise granulométrica

A análise granulométrica realizada mostrou a predominância de partículas finas (silte e argila) na amostra de solo, como indica a Tabela 2 e a Figura 8. A massa específica dos sólidos foi determinada como sendo de 2,735 g/cm³.

Tabela 2 – Distribuição granulométrica da amostra de solo

Fração	Diâmetro (mm)	Distribuição (%)
Argila	< 0,002	31,53
Silte	0,002 < d < 0,06	53,34
Areia fina	0,06 < d < 0,2	6,89
Areia média	0,2 < d < 0,6	8,24
Areia grossa	0,6 < d < 2,0	0

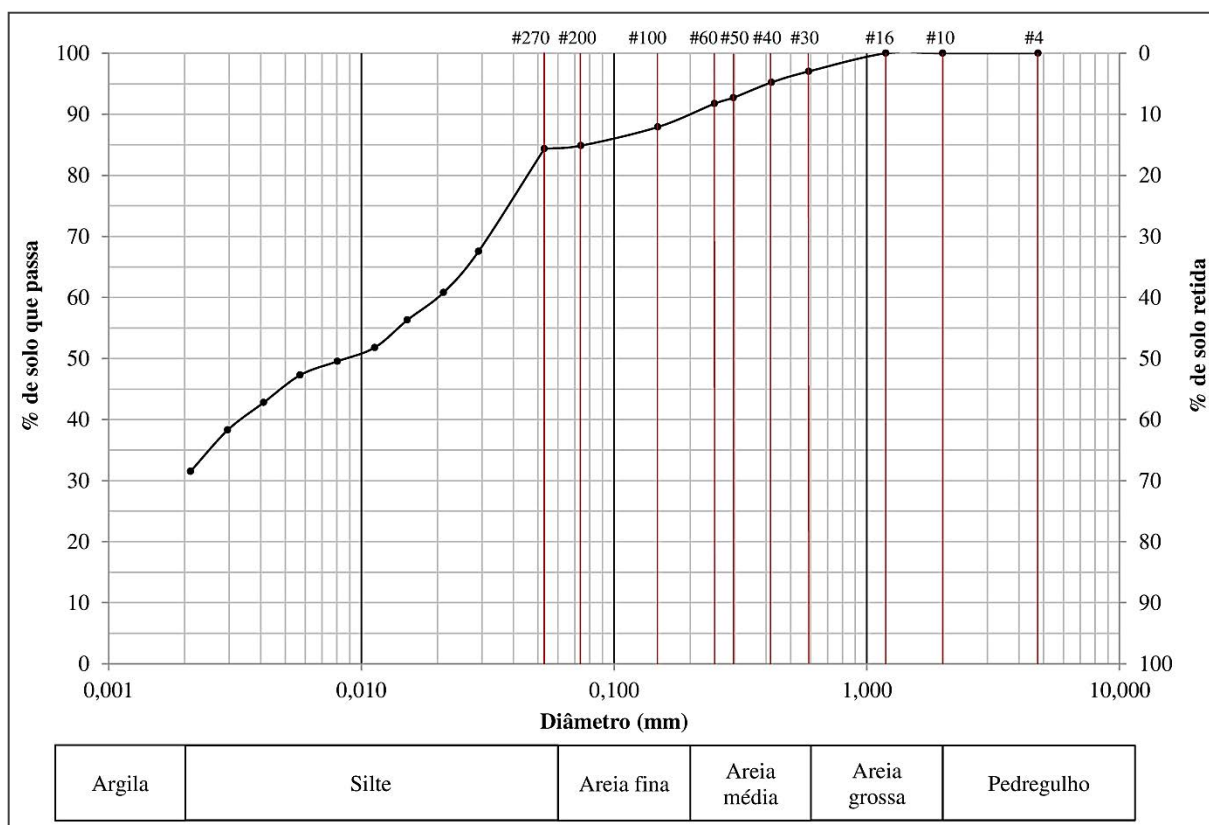


Figura 8 – Curva granulométrica da amostra de solo. Nota-se que aproximadamente 85% da amostra é composta por silte e argila, partículas finas.

Em termos geológicos, o município de Santa Gertrudes localiza-se na Bacia Sedimentar do Paraná, e os solos com grande potencial para a indústria cerâmica são originados pela Formação Corumbataí, a qual possui rochas com características argilosas e de coloração arroxeada ou avermelhada (CHRISTOFOLETTI; MORENO, 2004). A área estudada possui tanto latossolos roxos como terras roxas estruturadas (OLIVEIRA et al., 1999).

O resultado da análise granulométrica, entretanto, mostra que o principal componente da amostra de solo é o silte, o que indica que tal amostra é composta pelos resíduos resultantes da exploração da fração argila do solo encontrado no local da coleta, o que condiz com a observação de Moura (2006) de que, pedologicamente, o material coletado não mais pode ser chamado de solo, já que houve a mistura do mesmo com resíduos sólidos (resultantes do processo cerâmico).

5.3.2 CTC e matéria orgânica

A capacidade de troca de cátions é definida como a quantidade total de cátions retidos à superfície do solo e seus componentes em condição permutável (ligações são reversíveis), e é calculada pelas concentrações dos íons de cálcio, magnésio, potássio, hidrogênio e alumínio presentes no solo (RONQUIM, 2010). Assim, quanto maior a CTC do solo, maior número de cátions o mesmo pode reter. Por outro lado, um solo com alta CTC influenciaria negativamente os experimentos, pois as soluções utilizadas poderiam remover os cátions trocáveis em vez dos metais pesados.

O valor de CTC encontrado na amostra foi de 102,869 milimol de carga por quilograma (mmol_c/kg). Este é um valor baixo se comparado a valores médios de CTC em amostras de solos argilosos, como o latossolo roxo e a terra roxa estruturada do estado de São Paulo, as quais apontam 289 mmol_c/kg e 244 mmol_c/kg , respectivamente (RAIJ, 2010).

A matéria orgânica é composta pelos restos de seres vivos em decomposição. A parte húmica, que corresponde à porção de matéria orgânica relativamente estável no solo, possui potencialmente mais cargas negativas do que qualquer mineral de argila (LEPSCH, 2011). Dessa forma, altas porcentagens de matéria orgânica podem influenciar no tratamento adotado para a remoção de metais pesados da amostra de solo, devido à sua alta capacidade de retenção de metais.

A porcentagem de matéria orgânica contida na amostra de solo é de 1%, o que equivale a 10 g/dm^3 (pH 7,3). Este teor é correspondente à classe de solos arenosos, o que é outro indicador da descaracterização do solo presente no local em relação ao seu conteúdo original. Solos argilosos possuem de 31 g/dm^3 a 60 g/dm^3 de matéria orgânica (INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS, 2012), portanto o valor encontrado para a amostra é muito abaixo deste limite.

5.3.3 Metais pesados

As análises realizadas pelo Laboratório de Fertilizantes e Resíduos do IAC para os metais pesados analisados (chumbo, cobre, níquel e zinco) resultaram nos seguintes teores totais (Tabela 3):

Tabela 3 – Teores totais dos metais pesados na amostra

Parâmetro	Unidade	Resultado
Chumbo	mg Pb/kg	2039
Cobre	mg Cu/kg	198
Níquel	mg Ni/kg	8,9
Zinco	mg Zn/kg	366

Observa-se que, desses metais, a única concentração abaixo do Valor de Referência de Qualidade determinado pela CETESB é a do níquel; cobre e zinco estão acima do Valor de Prevenção, mas abaixo do Valor de Intervenção (VI) de qualquer uma das três classes de uso do solo.

O chumbo, porém, está muito acima do VI para qualquer uma das classes de uso do solo, o que configura riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana.

5.4 Lavagem de solo em coluna

Após a caracterização do solo, foi decidida a utilização de um fluxo baixo de 0,75 mL/min para a lavagem de solo. O fluxo foi determinado com o intuito de permitir o maior contato entre as soluções de lavagem e as partículas de solo, além de evitar o carreamento das partículas finas do solo pelo sistema. Foram testadas diversas configurações do sistema disponível em laboratório, descritas abaixo:

- Configuração 1: sistema aberto composto pela coluna de vidro A, uma bomba e dois béqueres para armazenar a solução (Figura 9 (a)); a coluna foi parcialmente preenchida com 50 g da amostra composta de solo. A bomba impulsionava a solução líquida para a coluna, resultando em um fluxo descendente de 0,75 mL/min. Após alguns minutos de teste, porém, a solução parou de descer pela coluna de solo (Figura 9 (b)), pois o mesmo ficou muito compactado, o que impedia a passagem da solução;

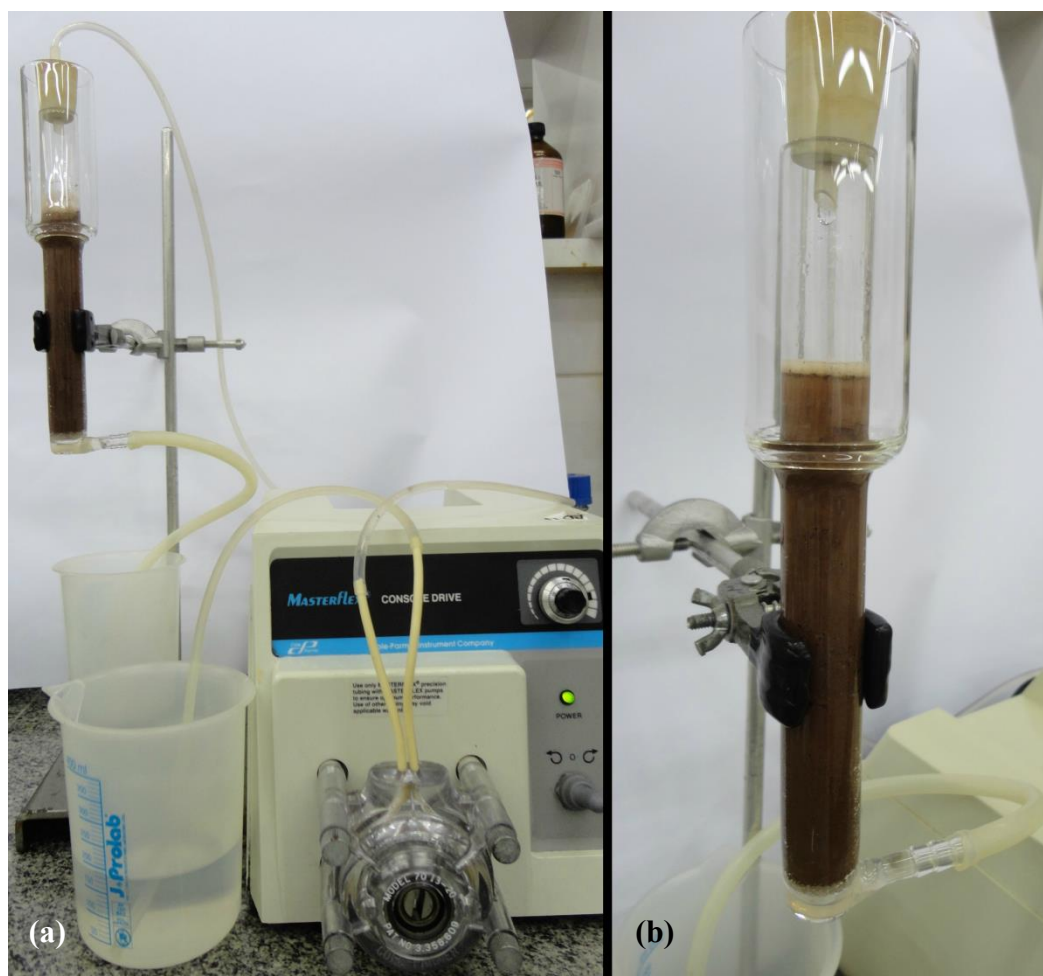


Figura 9 – (a) Configuração 1, sistema aberto com coluna A e fluxo descendente. (b) Compactação da coluna de solo após alguns minutos de experimento.

- Configuração 2 (Figura 10 (a)): sistema fechado composto pela bomba e por duas colunas do tipo A, uma contendo 50 g de solo e outra para o armazenamento da solução. A bomba impulsionava a solução da coluna de armazenamento para a coluna com solo, em um fluxo descendente de 0,75 mL/min, e retornava a solução que saía para a coluna de armazenamento. Ocorreu o mesmo problema da configuração anterior (Figura 10 (b)); um fluxo maior somente fez com que o solo ficasse mais compactado na coluna. Realizou-se um teste com menor quantidade de solo na coluna (20 g), e os mesmos problemas surgiram;

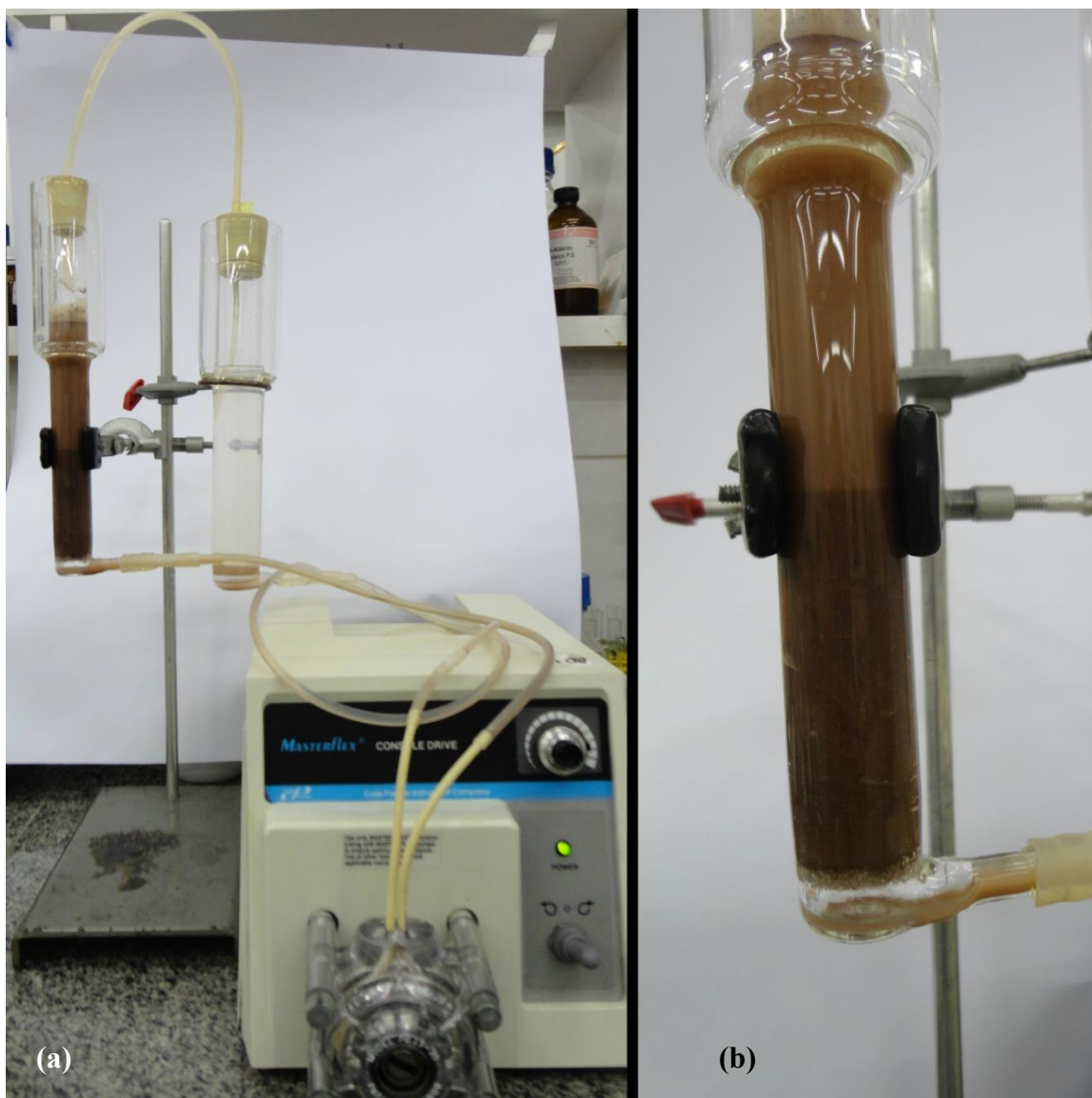


Figura 10 – (a) Configuração 2, sistema fechado com coluna A e fluxo descendente; o detalhe em (b) mostra que não ocorre a passagem de solução pelo solo (espaço sem líquido abaixo da camada de sílica).

- Configuração 3: sistema idêntico à configuração anterior, porém com fluxo ascendente de 0,75 mL/min que, mesmo sendo baixo, fez com que as partículas finas de solo entrassem em suspensão. Após alguns minutos, a camada inferior de solo começou a se compactar e a subir a coluna (Figura 11 (a)). Partículas de solo passaram para a coluna de armazenamento e para os tubos de ligação do sistema e da bomba, e também começaram a se acumular ao longo dos mesmos. Como o tubo que passa pela bomba possui um diâmetro interno muito reduzido, surgiu a preocupação de que pudesse ocorrer o entupimento do mesmo pelas partículas, causando danos ao aparelho. Além disso, foi possível verificar que a solução que passava pela pequena parte da amostra

de solo que ficou retida no fundo da coluna seguia sempre os mesmos caminhos abertos pelo líquido (Figura 11 (b)), o que minimizava a área de contato sólido-líquido e poderia influenciar em baixas remoções de metais, uma vez que nem todo o material estaria sujeito a um contato com a solução;

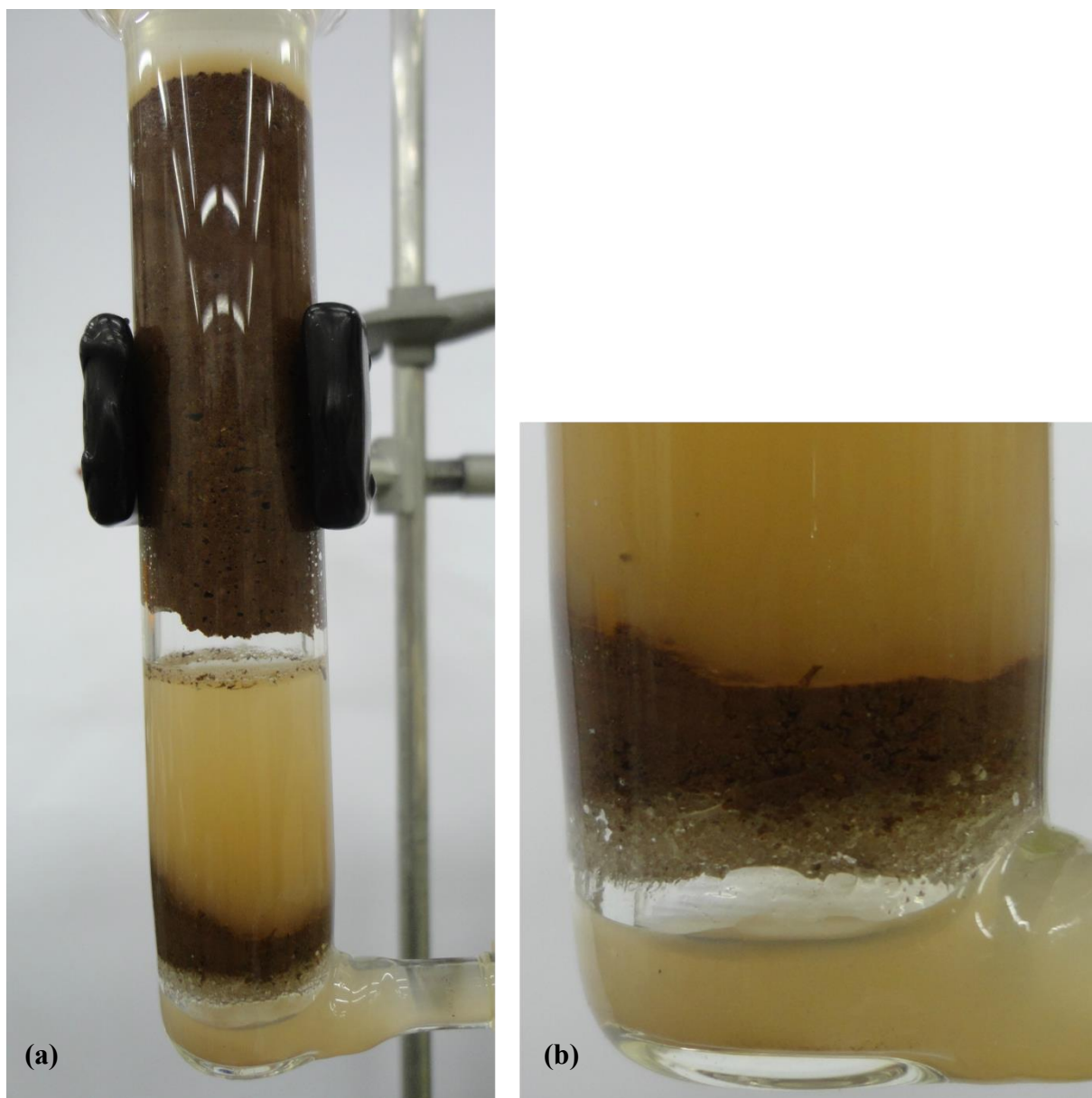


Figura 11 – Configuração 3, sistema fechado com coluna A e fluxo ascendente; em (a) é possível observar a distância percorrida pelo solo em direção ao fluxo; em (b) nota-se a formação dos canais preferenciais de passagem da solução.

- Configuração 4 (Figura 12 (a)): semelhante à configuração 2, porém com a amostra de solo sendo colocada na coluna do tipo B. Fluxo descendente de 0,75 mL/min. Observaram-se os mesmos problemas da configuração 2;

- Configuração 5: sistema igual ao anterior, porém com fluxo ascendente de 0,75 mL/min. Ocorreram as mesmas dificuldades da configuração 3 (Figura 12 (b)).

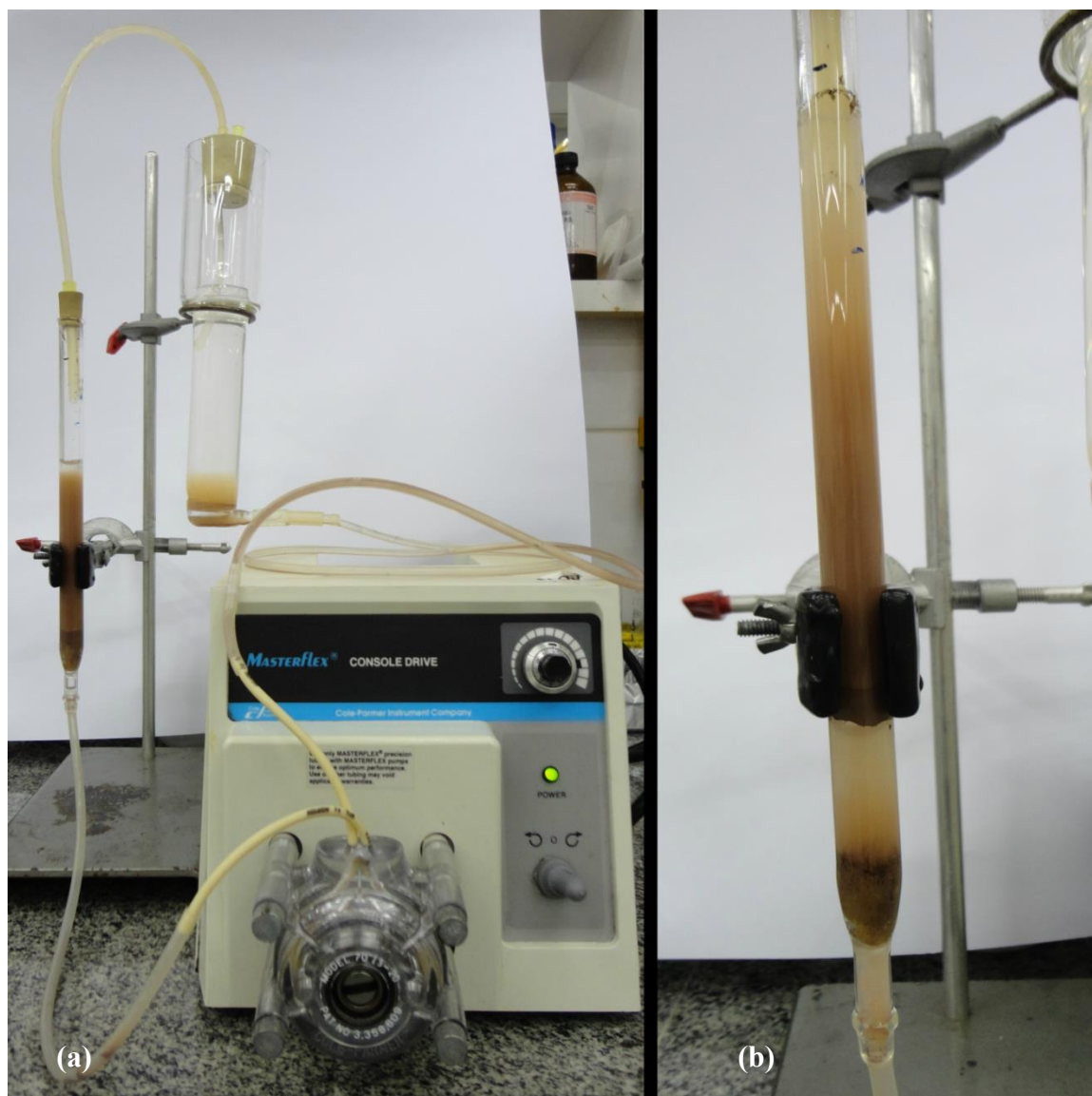


Figura 12 – (a) Configuração 4, sistema fechado com coluna B e fluxo descendente. Apresentou os mesmos problemas que a configuração 2. (b) Configuração 5, sistema fechado com coluna B e fluxo ascendente. Apresentou os mesmos problemas que a configuração 3. É possível notar o deslocamento vertical da camada de solo.

O uso de diversas configurações e colunas diferentes para a realização dos experimentos mostra que, neste caso, a dificuldade de realização da lavagem de solo em coluna consiste no conteúdo granulométrico da amostra, que contém grande porcentagem de partículas finas (aproximadamente 85% de silte e argila), e não nos tipos de coluna utilizados.

Devido aos problemas encontrados e à ausência de outros aparelhos disponíveis no laboratório para a realização de novos testes com outras configurações, a solução encontrada foi a alteração do protocolo a ser utilizado. Optou-se, então, por testar a remoção dos metais pesados da amostra de solo em mesa agitadora, de acordo com o que foi descrito por Asçi, Nurbas e Açikel em estudos sobre a sorção e recuperação de cádmio (II) em diversos tipos de solos (2007; 2008a; 2008b) e também sobre a remoção de íons de zinco de um componente do solo (2008c).

Pretendeu-se que tais modificações possibilitassem aumentar tanto a superfície de contato como o tempo de contato entre solo com metais e solução de tratamento, o que poderia permitir uma remoção mais eficiente dos metais pesados do solo.

5.5 Lavagem de solo em mesa agitadora

A Figura 13 mostra o experimento de lavagem de solo em mesa agitadora, solução adotada após ser verificada a impossibilidade de realização da lavagem da amostra de solo em colunas de vidro.



Figura 13 – Lavagem de solo em mesa agitadora realizada por 48 horas a 150 rpm e 28 °C.

As Figuras 14 a 17 trazem os resultados de remoção de chumbo, cobre, níquel e zinco, respectivamente, para as seis condições testadas utilizando-se ramnolipídios, além da comparação com o SDS e do experimento controle.

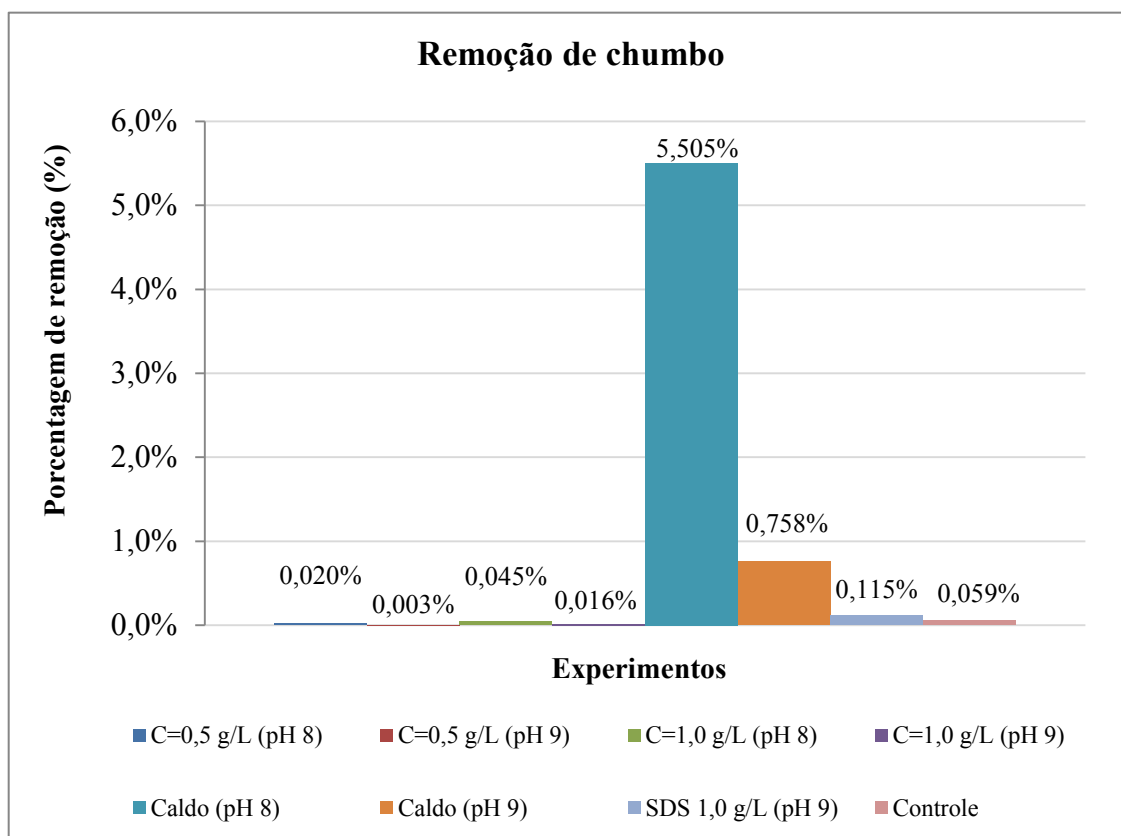


Figura 14 – Porcentagens de remoção de chumbo nos experimentos realizados.

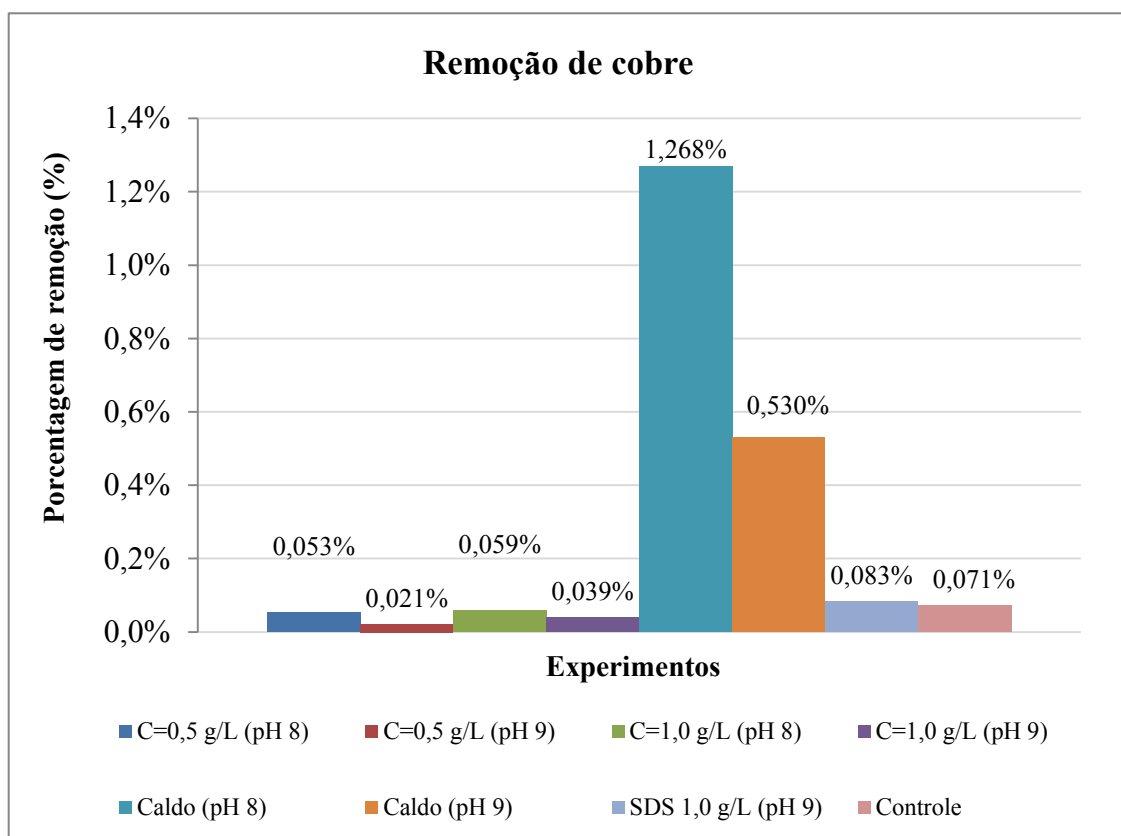


Figura 15 – Porcentagens de remoção de cobre nos experimentos realizados.

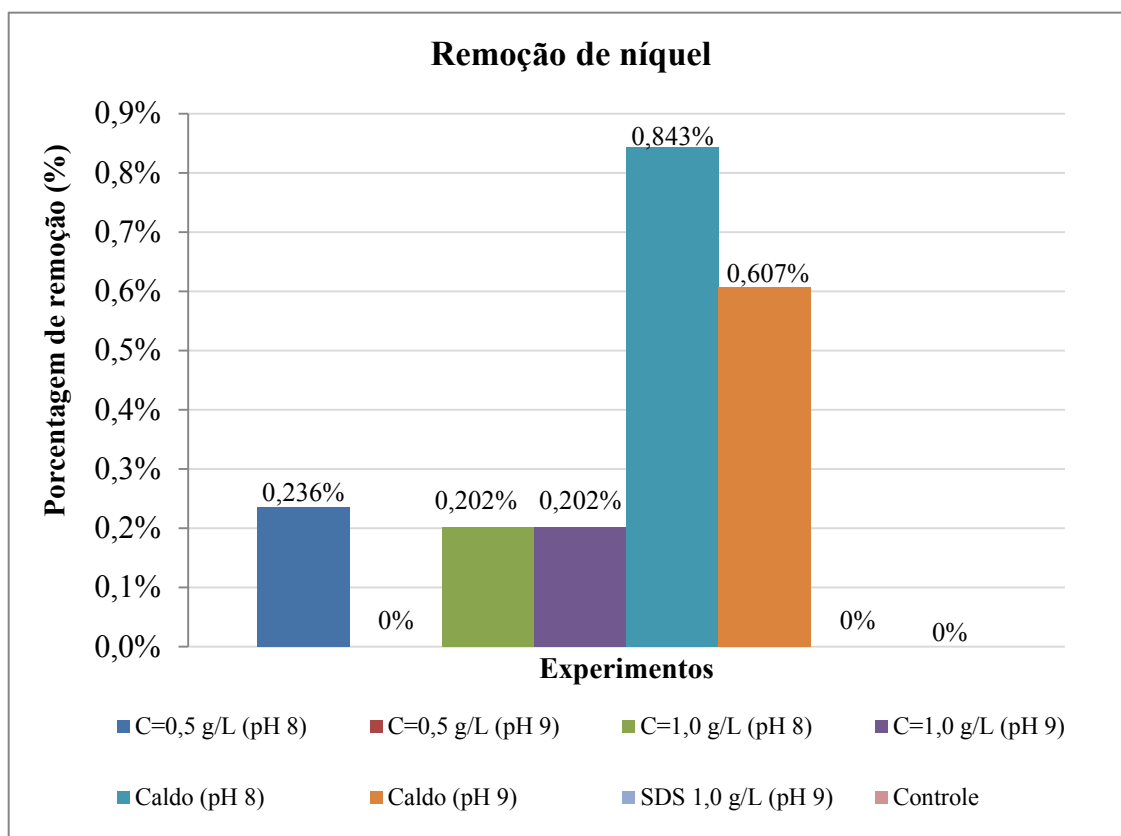


Figura 16 – Porcentagens de remoção de níquel nos experimentos realizados.

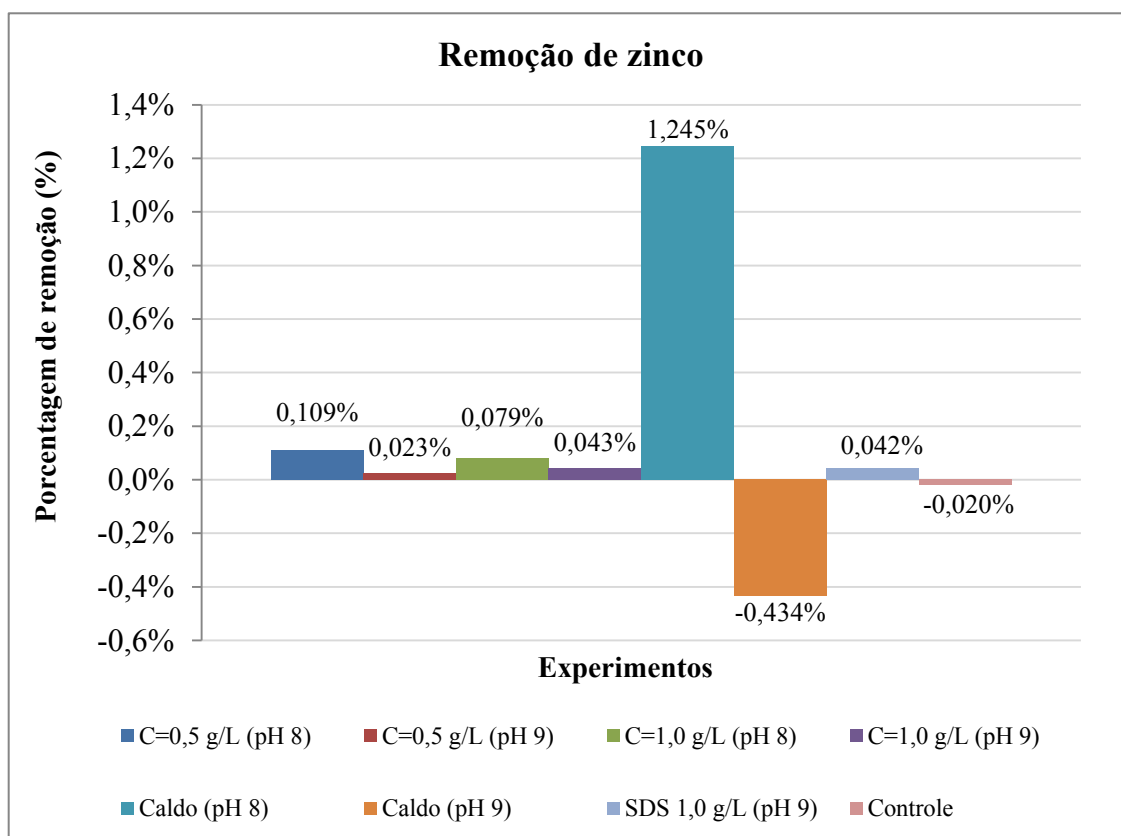


Figura 17 – Porcentagem de remoção de zinco nos experimentos realizados.

Como é possível observar, para os quatro elementos avaliados, as maiores porcentagens de remoção corresponderam ao uso do caldo livre de células em pH 8,0. A concentração de ramnolipídios no caldo é superior às concentrações testadas nas soluções. Além disso, é provável que o conteúdo diferenciado do caldo pode ter auxiliado nas maiores remoções, visto que o mesmo contém polissacarídeos sintetizados pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ao final da fermentação. Tais polímeros podem ter se ligado aos metais presentes no solo, facilitando a remoção dos mesmos pelo caldo utilizado.

Uma observação realizada foi de que, após o término dos experimentos, após centrifugação das amostras, foi necessário repetir o processo diversas vezes para os experimentos que utilizaram o caldo. Devido à alta densidade do meio, as partículas finas do solo continuavam em suspensão, mesmo após repetidas centrifugações. Esta maior retenção das partículas do solo, devido à alta viscosidade do caldo, pode ter favorecido a remoção dos metais pesados.

O melhor resultado obtido pelo uso do caldo livre de células em relação às soluções de ramnolipídios implica em vantagens econômicas para a utilização desse biossurfactante na remoção de metais, uma vez que não é necessário realizar a etapa de purificação do caldo, a qual corresponde à maior porcentagem de custo do produto.

A estrutura do ramnolipídio se modifica conforme ocorre a variação de pH. Assim, as maiores remoções em pH 8,0 podem indicar uma mudança de estrutura que favoreceu a retirada dos metais contidos no solo. Ishigami et al. (1987) concluíram que a estrutura desse biossurfactante passa de vesículas em pH ácido (4,3 a 5,8), para lamelas na faixa de pH de 6,0 a 6,5, a partículas de lipídios em pH 6,2 a 6,6, e finalmente, a micelas em pH alcalino (maior que 6,8). Champion et al. (1995) analisaram o efeito do pH na morfologia do ramnolipídio utilizando um laser de espalhamento de luz dinâmico, concluindo que em pH de 7,5 a 8,0 ocorre a presença de estruturas micelares, aumentando sua predominância com o aumento do pH. Lovaglio et al. (2011) testaram a capacidade de emulsificação de benzeno, óleo de soja e querosene utilizando o ramnolipídio e o surfactante comercial SDS na faixa de pH de 3,0 a 9,0, e os melhores resultados se deram também no pH 8,0. Essas observações indicam que a forma micelar favorece a atividade dos ramnolipídios, tanto na remoção dos metais como na emulsificação de compostos hidrofóbicos.

Como tanto a CTC como a porcentagem de matéria orgânica se encontram em baixas concentrações na amostra, é possível que os resultados de remoção de metais não tenham sido afetados por tais íons contidos no solo.

O SDS, um dos surfactantes comerciais mais utilizados no mundo, apresentou resultados pouco expressivos, com menores porcentagens de remoção do que os experimentos com ramnolipídios/caldo livre de células. Isto assinala uma vantagem de substituição desses produtos, uma vez que o biossurfactante se mostrou mais eficiente e possui características biodegradáveis que não causam danos ao meio ambiente e aos seres vivos. De acordo com Juwarkar et al. (2007), a aplicação de ramnolipídios em solo contaminado por metais contribuiu para o aumento da população microbiana presente, comprovando sua compatibilidade com os seres vivos.

Os experimentos controle utilizando água de torneira também obtiveram baixas porcentagens de remoção dos elementos. A água de torneira simula a remoção das frações móveis dos metais, fração fracamente ligada às partículas de solo (JUWARKAR et al., 2007). Serve como um comparativo entre o que seria a remoção natural dos metais por lixiviação e a ação das soluções com ramnolipídios ou o caldo livre de células. Assim, o metal mais facilmente removido por lixiviação seria o cobre, enquanto os demais são mais fortemente ligados ao solo, o que mostra a atuação dos biossurfactantes na sua remoção.

Dos metais analisados, a maior porcentagem de remoção foi do chumbo. Este é um resultado de grande interesse, pois tal elemento apresentou-se em níveis elevadíssimos no solo da Região dos Lagos (2039 mg/kg). Embora a remoção de 5,505% (caldo livre de células em pH 8,0) não reduza os níveis de chumbo a limites aceitáveis definidos pela CETESB, diversos métodos podem ser usados em conjunto para reduzir tal passivo ambiental. Outrossim, mais estudos podem ser realizados visando aumentar a eficiência de remoção, como testes com a adição de polímeros produzidos por outras bactérias ao caldo livre de células.

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- Os resultados de produção mostram a viabilidade de utilização do óleo de fritura do Restaurante Universitário como fonte de carbono para *Pseudomonas aeruginosa* LBI 2A1 sintetizar ramnolipídios. Como vantagem, existe a possibilidade de reutilização de um resíduo para a produção deste tensoativo, o qual pode ser usado para a remediação do meio ambiente;
- Os testes com diferentes concentrações da fonte de carbono mostraram que 125 g/L de óleo de fritura é o valor que possui a maior vantagem produtiva, se comparado ao teste com 250 g/L de óleo;
- A caracterização granulométrica da amostra de solo coletada na Região dos Lagos, em Santa Gertrudes (SP), mostrou a prevalência de partículas finas (silte e argila), as quais correspondem a aproximadamente 85% da amostra. A composição granulométrica indica que o local de coleta não apresenta mais características do solo original. Os baixos valores de CTC e porcentagem de matéria orgânica também apontam para esta conclusão;
- Os experimentos de lavagem de solo em coluna apresentaram diversos problemas devido aos componentes finos presentes na amostra. A solução encontrada foi a mudança do protocolo escolhido, adotando a lavagem de solo em mesa agitadora;
- Os experimentos em mesa agitadora mostraram que as maiores porcentagens de remoção para chumbo, cobre, níquel e zinco ocorreram com caldo livre de células a pH 8,0, o que é uma vantagem, pois a não realização da etapa de purificação do ramnolipídio leva a menores gastos; e,
- Tanto o experimento controle quanto o com SDS mostraram baixas porcentagens de remoção. A superioridade de remoção de metais do ramnolipídio contra o SDS indica uma vantagem de substituição do surfactante comercial.

7. RECOMENDAÇÕES

- Testes com adição de polímeros produzidos por bactérias ao caldo livre de células ou solução de ramnolipídios a fim de verificar se ocorrem aumentos nas porcentagens de remoção e se tais polímeros influenciam nessas taxas;
- Testes com diversos protocolos em conjunto ou subsequentes para verificar se há variação nas porcentagens de remoção dos metais pesados;
- Aprimoramento do método de lavagem de solo em coluna, a fim de verificar se com tal procedimento há maior retirada dos metais das partículas de solo;
- Teste de remoção de metais pesados em reator;
- Utilização da própria bactéria para a remoção dos metais.

8. REFERÊNCIAS

- ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, Washington, v. 17, p. 1367-1371, 2001.
- ABDEL- MAWGOUD, A.M; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, p. 1323-36, 2010.
- ALLOWAY, B.J. **Heavy Metals in Soils - Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability**. 3. ed. Springer, 2013.
- ARA, I.; MULLIGAN, C.N. Conversion of Cr (VI) in water and soil using rhamnolipid. **61. St Canadian Geotechnical Conference**, Edmonton, p. 20-24, Set. 2008.
- ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Identification and production of a rhamnolipid biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 45, p. 162-168, 1996.
- ASÇI, Y.; NURBAS, M.; AÇIKEL, Y.S. A comparative study for the sorption of Cd(II) by K-feldspar and sepiolite as soil components, and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. **J. Environ. Manage.**, v. 88, p. 383–392, 2008a.
- ASÇI, Y.; NURBAS, M.; AÇIKEL, Y.S. A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. **J. Hazar. Mater.**, v. 154, p. 663–673, 2008b.
- ASÇI, Y.; NURBAS, M.; AÇIKEL, Y.S. Removal of zinc ions from a soil component Na-feldspar by a rhamnolipid biosurfactant. **Desalination**, v. 223, p. 361–365, 2008c.
- ASÇI, Y.; NURBAS, M.; AÇIKEL, Y.S. Sorption of Cd(II) onto kaolin as a soil component and desorption of Cd(II) from kaolin using rhamnolipid biosurfactant. **J. Hazar. Mater.**, v. B139, p. 50–56, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181**: Solo: Análise Granulométrica. Rio de Janeiro, dez. 1984.
- ASSOCIAÇÃO PAULISTA DAS CERÂMICAS DE REVESTIMENTO. **Estatística**, 2009. Disponível em: <http://www.aspacer.com.br/estatisticas/est_2009_1.html>. Acesso em: 14 jan. 2013.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 53, p. 495-508, 2000.
- BENINCASA, M.; ACCORSINI, F.R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Biores. Technol.**, Essex, v. 99, p. 3843-3849, 2008.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **J. Food Eng.**, Essex, v. 54, p. 283-288, 2002.

BONACIN SILVA, A.L. **Caracterização ambiental e estudo do comportamento do chumbo, zinco e boro em área degradada por indústrias cerâmicas** – região dos lagos de Santa Gertrudes. 2001. 230 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Minerais e Hidrogeologia) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRIDGES, E.M. The soils of Wales and their Vulnerability to Chemical Pollution. In: MAPPING OF SOIL AND TERRAIN VULNERABILITY TO SPECIFIED CHEMICAL COMPOUNDS IN EUROPE AT SCALE 1:5 M, 1991, Wageningen, Holanda. **Proceedings of the International Workshop on...** Wageningen, Holanda: 1991. p. 125-135.

CAMEOTRA, S.S.; MAKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** Oxford, v. 50, p. 520-529, 1998.

CENTRO DE ANÁLISE E PLANEJAMENTO AMBIENTAL, UNESP - Rio Claro. **Previsão do tempo**. Disponível em: < <http://www.rc.unesp.br/igce/ceapla/tempo.php>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA, UNICAMP. **Clima dos Municípios Paulistas**: Santa Gertrudes. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_525.html>. Acesso em: 03 mar. 2013.

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

CHANG, J.S.; CHOU, C.L.; LIN, G.H.; SHEU, S.Y.; CHEN, W.M. *Pseudoxanthomonas kaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. **Syst. and Appl. Microbiol.**, Stuttgart, v. 28, n. 2, p. 137-144, 2005.

CHRISTOFOLETTI, S.R.; MORENO, M.M.T. Características das rochas da Formação Corumbataí utilizadas na indústria de revestimento cerâmico. **Geociências**, São Paulo, v. 23, n. 1/2, p. 79-88, 2004.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo**. Dez. 2011. P. 1998. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areas-contaminadas/2011/municipios.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Câmara ambiental da indústria de produtos de minerais não metálicos**. [2009?]. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/cas-em-atividade/45-ca-da-ind-de-minerais-nao-metalicos>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Decisão de Diretoria Nº 195-2005-E**, 23 nov. 2005a. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Projeto Corumbataí Cerâmicas**: negociação de conflitos ambientais com o envolvimento de segmentos sociais e o Polo Cerâmico de Santa Gertrudes. Piracicaba, set. 2005b. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Noticentro/2006/01/corumbatai.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2013.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids flowing growth on Brazilian native oils. **Proc. Biochem.** Oxford, v. 41, p. 483-488, 2005.

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

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Rev.**, v.61, p.47-64, 1997.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnol.** Amsterdam, v. 10, p. 208-217, 1992.

FRANZETTI, A.; DI GENNARO, P.; BEVILACQUA, A.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. **Chemosphere**, n. 62, p. 1474-1480, 2006.

GANESH, K.C.; MAMIDYALA, S.K.; DAS, B.; SRIDHAR B.; DEVI, G.S.; KARUNA, M.S. Synthesis of Biosurfactant-Based Silver Nanoparticles with Purified Rhamnolipids Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 1061-68, 2010.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 24, p. 443-448, 1986.

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. Environ. Microb.** Washington, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1984.

HENNING, S.B.; SANTOS, P.M.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J.; LOSHCHAGIN, P.E. Factors affecting rhamnolipids production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Res. J. Biotechnol.**, v. 3, n. 1, p. 45-49, 2008.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Informação sobre interpretação de análise de solo – Matéria orgânica e argila. 2012. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/produtoseservicos/analisedosolo/interpretacaoanalise.php>>. Acesso em: 26 abr. 2013.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAHORA, H.; YAMAGUCHI, M.; NAKAHARA, H.; KAMATA, T. The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. **Chem. Lett.**, p. 763-766, 1987.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glyco-lipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Am. Chem. Soc.**, v.71, p. 4124-4126, 1949.

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

KIM, J.; VIPULANANDAN, C. Removal of lead from contaminated water and clay soil using a biosurfactant. **J. Environ. Eng.**, v. 132, n. 7, p. 777-786, July. 2006.

KÖHLER, T.; CURTY, L.K.; BARJA, F.; VAN DELDEN, C.; PECHÈRE, J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 182, p. 5990-5996, 2000.

KUDO, A.; FUJIKAWA, Y.; MIYAHARA, S.; ZHENG, J.; TAKIGAMI, H.; SUGAHARA, M.; MURAMATSU, T. Lessons from Minamata mercury pollution, Japan — After a continuous 22 years of observation. **Water Sci. Technol.**, v. 38, n. 7, p. 187-193, 1998.

KUMAR, C.G.; MAMIDYALA, S.K. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloid. Surf. B**, v. 84, p. 426-466, 2011.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. (ed), **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnolipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LEPSCH, I.F. **19 lições de Pedologia**. 1. ed. Oficina de textos, 2011.

LIGGETT, R.W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. **Bacteriol Rev.**, v. 12, n. 4, p. 297-311, 1948.

LOVAGLIO, R.B. **Produção de Rhamnolipídios por Mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2011. 148 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2011.

LOVAGLIO, R.B.; dos SANTOS, F.J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloid. Surf. B**, v. 85, p. 301–305, 2011.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. An update to the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 58, p. 428-434, 2002.

MANRESA, A.; BATISDA, J.; MERCADÉ, M.E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M.J.; GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Society Ind. Microbiol.** Amsterdam, v. 8, p. 133-136, 1991.

MOURA, A.N. **Remediação de áreas contaminadas com metais pesados utilizando *Acidithiobacillus* sp.** 2006. 251 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Curr. Op. Coll. Interf. Sci.**, v. 14, p. 372-378, 2009.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, p. 3016-3019, 1989.

MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B.F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 12, p. 199-210, 1989.

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

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

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L.A.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.**, New York, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

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

OLIVEIRA, J.B.; CAMARGO, M.N.; ROSSI, M.; CALDERANO FILHO, B. **Mapa Pedológico do Estado de São Paulo**: legenda expandida. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 4 mapas. Escala 1: 500.000.

OLIVEIRA, L.P. **Tratabilidade de solos tropicais contaminados por resíduos da indústria de revestimentos cerâmicas.** 2006. 109 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PALANISAMY, P.; RAICHUR, A.M. Synthesis of spherical NiO nanoparticles through a novel biosurfactant mediated emulsion technique. **Mater Sci Eng. C Biomim. Supramol. Syst.**, v. 29, p. 199-204, 2009.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0,1% dirhamnolipid ointment. **J. Cutan. Med. Surg.**, v. 12, p. 142-146, 2008.

PIRÔLLO, M.P.S.; MARIANO, A.P.; LOVAGLIO, R.B.; COSTA, S.G. V.A.O.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. **J. Appl. Microbiol.**, v. 105, n. 5, p. 1484-1490, 2008.

QIUZHUO, Z.; WEIMIN, C.; JUAN, W.; Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing. **J. Environ. Sci.**, v. 20, p. 975-980, 2008.

RAIJ, B. van. Fertilidade do solo no Brasil. **Jornal Informações Agronômicas**, n. 132, p. 1-13, dez. 2010.

RAMANA, K.V.; KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, Oxford, v. 45, p. 249-257, 1989.

RAZA, Z.A.; REHMAN, A.; KHAN, M.S.; KHALID, Z.M. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, p. 115-121, 2007.

ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M.P.; PARRA, J.L.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 871-874, 1989.

RONQUIM, C.C. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 8** - Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. Embrapa, Campinas, 2010.

SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High Performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Chromatogr.**, v. 693, p. 7-13, 1995.

SCHOENLEIN, N.C. **Diversidade dos fungos anamorfos no solo do polo cerâmico do município de Santa Gertrudes, São Paulo, Brasil e tolerância de *Aspergillus terreus* Thom e *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson a sais de chumbo e de zinco.** 2006. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S.S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends Biotechnol.** Amsterdam, v. 22, n. 3, 142-146, 2004.

SYLDATK, C.; LANG, S.; WAGNER, F. Chemical and physical characterization of 4 interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec DSM 2874 grown on normal-alkanes. **Z. Naturforsch. C**, Tübingen, v. 40, n. 1-2, p. 51-60, 1985.

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. **Biores. Technol.**, v. 98, p. 1149-1153, 2007.

TORRES, L.G.; LOPEZ, R.B.; BELTRAN, M. Removal of As, Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn from a highly contaminated industrial soil using surfactant enhanced soil washing. **Phys. Chem. Earth**, v. 37–39, p. 30–36, 2012.

VARNIER, A.L.; SANCHEZ, L.; VATSA, P.; BOUDESOCQUE, L.; GARCIA-BRUGGER, A.; RABENOELINA, F.; SOROKIN, A.; RENAULT, J.; KAUFFMANN, S.; PUGIN, A.; CLEMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. **Plant Cell Environ.**, v. 32, p. 178-193, 2009.

WANG, S.; MULLIGAN, C.N. Arsenic mobilization from mine tailings in the presence of a biosurfactant. **Appl. Geochem.**, v. 24, p. 935-938, 2009a.

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

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

WEI, Q.F.; MATHER, R.R.; FOTHERINGHAM, A.F. Oil removal from used sorbents using a biosurfactant. **Biores. Technol.**, Orlando, 96, p. 331-334, 2005.

WU, J.Y.; YEH, K.L.; LU, W.B.; LIN, C.L.; CHANG, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 5, p. 1157-1164, 2007.

XIE, Y.; YE, R.; LIU, H. Synthesis of silver nanoparticles in reverse micelles stabilized by natural biosurfactant. **Colloid. Surf. A**, v. 279, p. 175-178, 2006.

YING, G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environ. Int.**, v. 32, p. 417–431, 2006.

ZEFTAWY, M.A.M.E., MULLIGAN, C.N. Use of rhamnolipid to remove heavy metals from wastewater by micellar-enhanced ultrafiltration (MEUF). **Sep. Purif. Technol.**, n. 77, p. 120-127, 2011.

ZHANG, Q.; JU, L.K. Rhamnolipids as affinity foaming agent for selective collection of b-glucosidase from cellulase enzyme mixture. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 48, p. 175-80, 2011.