

THAÍS SALES ANTUNES

**APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES
MICROBIANOS NA RECUPERAÇÃO DE METAIS
ORIUNDOS DE RESÍDUOS DE REFINARIA**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2016**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biossíntese, Biodegradação e Biocorrosão do Departamento de Engenharia Química, da Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Professora Dr^a. Eliana Flavia Camporese Sérvulo e do Mestre Vitor da Silva Liduino.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Aa Antunes, Thais Sales
 Aplicação de biossurfactantes microbianos na
recuperação de metais oriundos de resíduos de
refinaria / Thais Sales Antunes. -- Rio de
Janeiro, 2016.
 99 f.

 Orientadora: Eliana Flavia Camporese Sérvulo.
 Coorientadora: Vitor da Silva Liduino.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2016.

 1. Biossurfactantes. 2. Recuperação de metais.
3. Catalisadores de HDT. I. Camporese Sérvulo,
Eliana Flavia, orient. II. da Silva Liduino,
Vitor, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thaís Sales Antunes

Aplicação de biossurfactantes microbianos na recuperação de metais oriundos de resíduo de refinaria.

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2016.

Prof^a. Dr. Matheus Gomes de Godoy – IMPG/UFRJ – Presidente da banca.

Dr. Maria Aparecida de Melo - CENPES/PETROBRAS – Membro da banca.

M.Sc. Carolina Reis Guimarães – IQ/UFRJ – Membro da banca.

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mazotto - IMPG/UFRJ – Suplente.

Rio de Janeiro

Dezembro/2016

Dedico esse trabalho a um ser maior que rege toda a minha vida e minha fé, a minha família, ao meu noivo, aos meus amigos, a minha orientadora e meu co-orientador, aos professores e todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão dessa etapa tão importante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, o qual além de ter me dado o dom da vida, deu-me a possibilidade de realizar esse trabalho com saúde e amor. Agradecer à Ele que rege toda a minha vida, renova minha fé e me proporciona momentos de satisfação e gratidão como esse. Obrigada, meu Deus.

Agradeço também aos meus pais, Sônia e Luís. Não seria absolutamente nada sem o amor, dedicação, compreensão e luta diária de vocês dois. Vocês que me deram mais que educação, que me deram forças e motivo para lutar todos os dias da minha vida. A vocês que batalharam para que eu chegasse até aqui, me ensinaram os valores do caráter e respeito, a perseguir meus objetivos, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e por não medirem esforços para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida. Tudo sempre foi e sempre será para vocês. Muito obrigada por todas as vezes que me disseram “Calma, vai dar certo.”.

À Beatriz, minha amiga, minha parceira, minha confidente, meu orgulho, meu amor. Além de minha irmã sempre foi minha filha. Dedico a você que nunca me deixou desistir, que sempre me ouviu e que compartilhou a saudade que existiu durante esses quatro anos de faculdade.

Ao meu noivo Douglas que sempre acreditou em mim. Sem você nada teria sentido. Obrigada por ser esse companheiro e pessoa maravilhosa, com quem quero passar o resto dos meus dias e partilhar todas as minhas vitórias. Eu te amo.

À Professora Eliana Flavia Camporese Sérvulo, por gentilmente ter me aceitado em seu laboratório, por sempre ter acreditado em mim, por me transmitir conhecimento não somente científico, por ter me feito evoluir como aluna e profissional, e mais do que isso, por me servir de inspiração. Agradeço também ao meu coorientador Vitor da Silva Liduino, que nunca me deixou desistir, estando sempre por perto; obrigada por todos os ensinamentos, por não ter me abandonado, ter insistido junto a mim e por virar um amigo de verdade.

À todo Laboratório de Biossíntese, Biocorrosão e Biodegradação, mais conhecido como 107. Não teria sido possível sem a amizade diária de vocês. Obrigada não somente pela presença, mas pelas conversas, almoços, risadas e companheirismo. A cada dia mais nos

tornamos uma família. Obrigada Liz, Diogo, Douglas, Mariana, Dani e Cris - (Vamos almoçar?).

Aos amigos que a vida me deu, Priscila e Diogo. Obrigada por todas as vezes que estivemos juntos. Não era trabalho, era amizade. Obrigada pelo companheirismo e apoio, pelas risadas e conselhos. Vocês merecem toda felicidade do mundo.

À toda minha família, em especial à minha avó D. Conceição, que me deu força e inspiração e, ao meu avô Abrahão, por ter aumentado a minha saudade todos os domingos quando me perguntava “Hoje você não vai voltar pro Rio não, né?!. Não há nada melhor no mundo do que ver vocês felizes com as minhas conquistas. Obrigada.

Agradeço a todos os professores envolvidos de forma indireta e indireta, desde os ensinamentos teóricos no IMPG aos ensinamentos práticos na EQ. Agradeço à M.Sc. Carol (carinhosamente), por ter me dado luz quando esta resolveu faltar. Serei sempre grata, Carol.

Agradeço também aos meus amigos, em especial aquela que a Graduação me deu e eu escolhi dividir não somente o apartamento, mas a vida. Obrigada Gabriela Sousa por sempre ter estado presente no meu dia a dia, me ouvindo e colecionando boas risadas. Obrigada também ao Helver e ao Eduardo que além de dividirem noites mal dormidas, tornaram-nas menos dolorosas, sempre com uma parceria e alegria que nunca tinha visto antes. Nós três, sempre. Levarei você onde quer que eu vá.

Por fim, agradeço a todas as instituições que fomentaram este trabalho. Obrigada Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Coordenação de Projetos, Pesquisas e Estudos Tecnológicos (COPPETEC) e Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES).

ÍNDICE

I.	Introdução.....	1
1.1.	Surfactantes.....	1
1.2.	Propriedades dos surfactantes.....	4
1.2.1	Tensão superficial/Tensão interfacial.....	4
1.2.2	Adsorção.....	6
1.2.3	Formação de micelas/ Concentração micelar crítica.....	7
1.2.4	Solubilidade.....	9
1.2.5	Formação de emulsões/ Equilíbrio Hidrofílico/Hidrofóbico.....	11
1.2.6	Molhabilidade (umectância).....	12
1.2.7	Espumante/ Anti-espumante.....	14
1.2.8	Detergência.....	14
1.2.9	Dispersante.....	14
1.3	Problemas relacionados aos surfactantes.....	15
2.0	Biossurfactantes.....	15
2.1.	Função fisiológica dos biossurfactantes.....	18
3.0	Produção de biossurfactante por <i>Bacillus subtilis</i>	19
3.1.	Microrganismo.....	19
3.2.	Lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	20
4.	Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes.....	23
4.1.	Fonte de carbono.....	24
4.2.	Fonte de nitrogênio.....	27
4.3.	Outras fontes nutricionais.....	27
4.4.	Fatores ambientais.....	28

5.	Recuperação dos biossurfactantes do meio fermentado.....	28
6.	Aplicação dos biossurfactantes.....	30
7.	Catalisadores de HDT.....	31
7.1.	Metais pesados em catalisadores de HDT esgotados.....	33
II.	Justificativas.....	33
III.	Objetivos.....	35
IV.	Materiais e Métodos.....	36
4.1	Microrganismos.....	36
4.2.	Manutenção das culturas.....	36
4.3.	Meios de cultivo.....	36
4.3.1	Meio mineral (Bushnell-Hass).....	36
4.3.2.	Meio de crescimento.....	37
4.3.3.	Meios de produção.....	37
4.4.	Biossurfactante comercial.....	37
4.5.	Surfactante químico.....	38
4.6.	Catalisador.....	38
4.7.	Etapa experimental.....	41
4.7.1.	Isolamento de microrganismos potencialmente produtores de biossurfactante.....	41
4.7.2.	Produção de biossurfactante.....	42
4.7.3.	Avaliação das características do biossurfactante produzido.....	43
4.7.3.1.	Ensaio hemolítico.....	43
4.7.3.2.	Teste de colapso da gota.....	43
4.7.3.3.	Teste de deslocamento de óleo.....	43

4.7.3.4	Determinação do Índice de Emulsificação.....	44
4.7.4.	Estabilidade do biossurfactante.....	45
4.8.	Determinações analíticas.....	46
4.8.1	pH.....	46
4.8.2	Tensão Superficial.....	46
4.8.3.	Concentração do biossurfactante.....	47
4.8.4.	Concentração de metais.....	48
5.	Resultados	48
5.1.	Análise da seleção de microrganismos produtores de biossurfactante.....	48
5.2.	Características do biossurfactante produzido pela cepa isolada.....	51
5.3.	Aplicação de biossurfactante na recuperação de metais a partir de catalizador esgotado.....	58
6.	Discussão	58
7.	Conclusão	65
8.	Referências Bibliográficas	67
9.	Anexos	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura básica de um surfactante.....	1
Figura 2.	Classificação dos surfactantes segundo a região polar (cabeça).....	3
Figura 3;	Representação das forças moleculares em água e da tensão superficial	5
Figura 4.	Comportamento de surfactantes em sistemas.....	6
Figura 5.	Orientação dos monômeros de surfactante na interface líquido-ar, em diferentes concentrações.....	6
Figura 6.	Estruturas de surfactantes.....	8
Figura 7.	Efeito da adsorção de diferentes concentrações de um surfactante na interface ar-água.....	9
Figura 8.	Variação da tensão superficial, tensão interfacial e da solubilidade em função da concentração de surfactante.....	10
Figura 9.	Ação do surfactante entre líquidos imiscíveis, com formação de emulsões óleo em água e água em óleo.....	11
Figura 10.	Representação do molhamento sobre superfícies sólidas.....	13
Figura 11.	Lipopeptídios produzidos por <i>Bacillus subtilis</i>	21
Figura 12.	Distribuição da produção de cana-de-açúcar em território brasileiro....	26
Figura 13.	Partículas constituintes do catalisador: (A) antes e (B) após seu uso na unidade de HDT.....	38
Figura 14.	Equipamento e etapas necessárias para separação do catalisador esgotado da amostra procedente da refinaria.....	39
Figura 15.	Aspecto macroscópico das diferentes frações do catalisador.....	39
Figura 16.	Esquematização da metodologia de coloração de Gram.....	41
Figura 17.	Esquematização do ensaio de isolamento de microrganismos produtores de surfactante.....	42

Figura 18.	Visualização do crescimento de microrganismos presentes na água de recuperação de petróleo tendo óleo bruto como única fonte de carbono.....	49
Figura 19.	Crescimento da cepa <i>B. subtilis</i> isolada, proveniente de mosto fermentado, em placa contendo agar sangue.....	52
Figura 20.	Visualização superior (A) e planar (B) da interação dos diferentes tensoativos e o filme de óleo cru.....	53
Figura 21.	Interação do biotensoativo produzido em laboratório (A), do ramnolípídeo comercial (B) e do tensoativo sintético SDS (C) com fina camada de óleo cru.....	53
Figura 22.	Emulsões obtidas pelo contato do biossurfatante produzido frente a n-hexadecano(a), óleo mineral comercial (b) e óleo cru (c), logo após agitação em vortéx por 2 min (A) e decorridas 24 h de repouso (B).....	55
Figura 23.	Emulsões obtidas pela mistura óleo de soja com: (a) água; (b) mosto fermentado livre de células – biossurfactante; (c) JBR 1% e (d) SDS 5%, logo após agitação em vórtex por 2 min (A) e decorridas 24 h de repouso (B).....	56
Figura 24.	Avaliação da estabilidade da espuma após 24 horas de processo em temperatura ambiente (A) e 24 horas após descongelamento (B).....	59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1.	Exemplos de biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos.....	17
Tabela 2.	Alguns trabalhos de produção de biossurfactantes por diferentes cepas de <i>Bacillus subtilis</i> apresentando os dados relacionados.....	25
Tabela 3.	Possíveis aplicações dos biossurfactantes em diversos setores industriais.....	30
Tabela 4.	Caracterização química do catalisador HDT esgotado.....	40
Tabela 5.	Planejamento experimental utilizado para estudo de estabilidade do tensoativo produzido em escala laboratorial.....	45
Tabela 6.	Condições operacionais para quantificação do biossurfactante produzido através de CLAE.....	48
Tabela 7.	Índice de emulsificação (E_{24}) do biossurfactante produzido frente à diferentes compostos apolares.....	54
Tabela 8.	Índice de emulsificação dos tensoativos frente ao óleo de soja.....	55
Tabela 9.	Valores de TS para diferentes amostras de tensoativos.....	56
Tabela 10.	Análise da TS de amostras de mosto fermentado livre de células submetido a condições extremas de pH e temperatura, frente à salinidade 3,0%.....	57
Tabela 11.	Concentrações de metais, oriundos de catalisadores, na fase líquida após ensaio de recuperação, utilizando diferentes tensoativos.....	58
Quadro 1:	Exemplos de grupos hidrofóbicos típicos em surfactantes.....	2
Quadro 2:	Exemplos e classificação de surfactantes comerciais quanto à porção hidrofílica.....	3
Quadro 3:	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) e respectivas propriedades e aplicações.....	11
Quadro 4:	Métodos de recuperação de biossurfactantes, respectivas propriedades	

	físico-químicas e vantagens.....	29
Quadro 5:	Observações macro e microscópicas dos isolados bacterianos predominantes na água de produção de petróleo e avaliação de sua capacidade de redução da TS.....	49
Quadro 6:	Testes bioquímicos realizados para identificação de espécie do isolado bacteriano que melhor foi capaz de reduzir a TS.....	51

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SURFace:	Superfície
ACTive:	Ativo
AgeNTS:	Agentes
BS:	Biossurfactante
CH ₂ :	Metileno
n:	Número
CMC:	Concentração Micelar Crítica
DMC:	Diluição Micelar Crítica
TS:	Tensão superficial
pH:	Potencial Hidrogeniônico
NaCl:	Cloreto de sódio
μM:	Micromolar
MM	Massa Molecular
%:	Porcentagem
mL:	Mililitro
μL:	Micro litro
mN/m:	Mili-Newton/metro
m/v:	Massa/volume
Da:	Daltons
<i>B.subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
REDUC:	Refinaria de Duque de Caxias
Petrobras:	Petróleo Brasileiro SA.
IOC:	Instituto Oswaldo Cruz
FIOCRUZ:	Fundação Oswaldo Cruz
UFRJ:	Universidade Federal do Rio de Janeiro
YER207:	Designação de cepa bacteriana
g/L:	Gramas/litro
mL/L:	Mililitros/litro
mN/m	Mili-Newtons/metros
min:	Minutos
atm:	Atmosfera
h:	Horas
rpm:	rotações por minuto
m ³ :	Metro cúbico
kg:	Quilograma
t:	Tonelada
R\$:	Moeda brasileira
US\$:	Moeda americana
USA:	Estados Unidos da América
QS:	<i>Quorum sensing</i> (mecanismo)
HDT:	Hidrotratamento
ANP	Agencia Nacional do Petróleo
USEPA:	Agencia Proteção Ambiental americana
CEE:	Comunidade Européia
CMRVS:	Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância Sanitária
INCQS:	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
CH ₃ :	Metil

NaOH:	Hidróxido de sódio
NaNO ₃ :	Nitrato de sódio
KH ₂ PO ₃ :	Fosfito ácido de potássio
Na ₂ HPO ₄ :	Hidrogenofosfato de sódio
CaCl ₂ .2H ₂ O:	Cloreto de cálcio dihidratado
MgSO ₄ .7H ₂ O:	Sulfato de magnésio heptahidratado
H ₃ BO ₃ :	Ácido bórico
CoCl ₂ .6H ₂ O:	Cloreto de cobalto hexahidratado
CuSO ₄ .5H ₂ O:	Sulfato de cobre pentahidratado
MnSO ₄ .H ₂ O:	Sulfato de magnésio monohidratado
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ :	Molibdato de amônio
ZnSO ₄ :	Sulfato de zinco
Ni:	Níquel
Co:	Cobalto
W:	Tungstênio
V:	Vanádio
Mo:	Molibdênio
Al ₂ O ₃ :	Óxido de alumínio
Ca:	Cálcio
As:	Arsênio
Si:	Silício
Pb:	Chumbo
Fe:	Ferro
In:	Índio
Na:	Sódio

RESUMO

Thaís Sales Antunes

Aplicação de biossurfactantes microbianos na recuperação de metais oriundos de resíduos de refinaria

Biossurfactantes são compostos tensoativos sintetizados por via microbiana que apresentam propriedades de adsorção, ação espumante ou antiespumante, solubilidade ou detergência, dependendo de sua estrutura molecular. Além disso, estes biocompostos apresentam aspectos como baixa toxicidade, boa biodegradabilidade e, tolerância à temperatura, pH e força iônica. Diversas espécies bacterianas produzem grande variedade de tensoativos. Apesar das vantagens de sua aplicação, o uso industrial dos surfactantes biológicos ainda é limitado devido ao oneroso custo no processo de obtenção. Uma alternativa para redução do custo é a utilização de meios de produção que empregam matérias primas renováveis e de fácil obtenção. Na atualidade, os diversos setores industriais buscam atitudes socioeconômicas e ambientais que satisfaçam as rigorosas legislações governamentais e a opinião pública, por isso a minimização de rejeitos é fator fundamental para o sucesso da cadeia produtiva. Em particular, a indústria do petróleo pode ser considerada a principal fonte geração de rejeitos e de poluição ambiental. Ao ano, cerca de 10.000 toneladas de catalisadores utilizados no refino de óleo são descartados por apresentarem baixa eficiência. Neste cenário, a reciclagem de catalisadores esgotados permitirá reduzir os custos com o refino de petróleo, além de contribuir para proteção do meio ambiente. O presente estudo avaliou a eficiência do tensoativo produzido por isolado de *Bacillus subtilis* na recuperação de metais adsorvidos em catalisadores esgotados de refinaria. Comparativamente, um biossurfactante comercial e um surfactante químico também foram analisados. O biossurfactante produzido em escala laboratorial apresentou boa estabilidade a amplas faixas de pH e temperatura, além de ser eficiente no sequestro de metais, com destaque comparativo aos tensoativos comerciais para Al (30,44%) e Fe (98%), mesmo em baixas concentrações e por tempo limitado.

Palavras-chave: Biossurfactantes; *Bacillus subtilis*; Catalisadores de HDT

Rio de Janeiro

Dezembro/2016

SUMMARY

Thaís Sales Antunes

Application of microbial biosurfactants in the recovery of metals from refinery residues

Biosurfactants are tensoactive compounds synthesized by the microbial route that have properties of adsorption, foaming or antifoaming action, solubility or detergency, depending on their molecular structure. In addition, these biocomposites present aspects such as low toxicity, good biodegradability and tolerance to temperature, pH and ionic strength. Several bacterial species produce a wide variety of surfactants. Despite the advantages of its application, the industrial use of biological surfactants is still limited due to the expensive cost in the procurement process. An alternative to cost reduction is the use of means of production that employ renewable and easily obtainable raw materials. Nowadays, the various industrial sectors seek socioeconomic and environmental attitudes that meet strict government regulations and public opinion, so minimizing waste is a key factor for the success of the production chain. In particular, the oil industry can be considered the main source of tailings and environmental pollution. Per year, around 10.000 tons of catalysts used in oil refining are discarded because they present low efficiency. In this scenario, the recycling of exhausted catalysts will reduce the costs of refining oil, in addition to contributing to the protection of the environment. The present study evaluated the efficiency of the surfactant produced by *Bacillus subtilis* isolates in the recovery of adsorbed metals in depleted refinery catalysts. Comparatively, a commercial biosurfactant and a chemical surfactant were also analyzed. The biosurfactant produced in laboratory scale showed good stability at wide ranges of pH and temperature, besides being efficient in the sequestration of metals, with a comparative highlight to the commercial surfactants for Al (30.44%) and Fe (98%), even in low concentrations and for a limited time.

Key-words: Biosurfactants; *Bacillus subtilis*; Hydrotreating catalyst

Rio de Janeiro

December/2016

1. Introdução

1.1. Surfactantes

São moléculas orgânicas que, em comum, apresentam a capacidade de se acumular em interfaces como líquido/gás ou entre líquidos de diferentes polaridades, como, por exemplo, água e óleo (Schramm e Marangoni, 2000; Singh e Cameotra, 2002; Karsa, 2006; Marajan e Talib, 2012). Isto porque são moléculas anfifílicas, ou anfipáticas, isto é, possuem uma estrutura básica composta conjuntamente de pelo menos uma região hidrofílica (cabeça) e uma hidrofóbica (cauda), conforme ilustrado na **Figura 1**. O grupo polar é solúvel na fase aquosa, enquanto a cauda é insolúvel em água, embora solúvel em lipídios e solventes orgânicos.

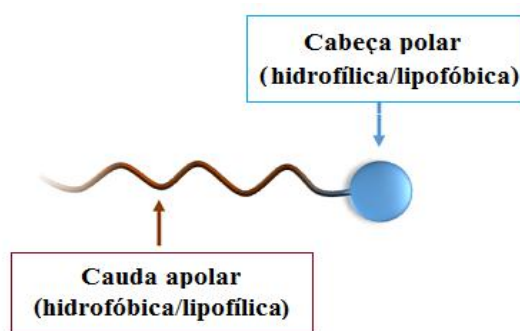


Figura 1: Estrutura básica de um surfactante. Fonte: adaptado de Karsa (2006).

O termo surfactante deriva da expressão inglesa *SURFace ACTIVE AgeNTS* (Cristofi e Ishiva, 2002; Salanger, 2002; Myers, 2006; Kjellin e Johansson, 2010), cuja tradução literal é “agente de atividade de superfície”. Na língua portuguesa, existem as denominações “substância tensoativa”, “agente tensoativo”, ou simplesmente “tensoativo”. Entretanto, por neologismo, tem sido adotado frequentemente o termo “surfactante” (Brandão, 1998; Nitschke e Pastore, 2002).

Nessas moléculas anfipáticas, a cauda (porção apolar) é comumente formada por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas (linear ou ramificada), grupos aromáticos ou policíclicos (Lichtenberg, Robson e Dennis, 1983; Schramm, Stasiuk e Marangoni, 2003; Myers, 2006). Portanto, essa parte da molécula possui efeito hidrofóbico; embora a baixa solubilidade em água, não se deva tão somente à atração entre grupos apolares,

mas esteja relacionada principalmente à dificuldade de haver “quebra” das fortes interações entre as moléculas de água. O **Quadro 1** apresenta alguns grupos apolares presentes em surfactantes comercialmente disponíveis.

Quadro 1: Grupos hidrofóbicos típicos. Fonte: adaptado de Schramm, Stasiuk e Marangoni (2003).

Grupo	Exemplo	Estrutura
Alquilbenzeno	Dodecilbenzeno linear	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4)(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
Alquil linear (saturado)	n-dodecil	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2^-$
Alquil ramificado (saturado)	2-2til hexil	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_3)$
Alquil linear (insaturado)	Oleil	$(cis-)\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7=\text{CH}(\text{CH}_2)\text{CH}_2^-$
Alquilfenil (ramificado)	Nonifenil	$\text{C}_9\text{H}_{19}(\text{isomeros ramificados})\text{C}_6\text{H}_4^-$
Polioxipropileno		$-\text{[OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)]_n^-$
Polisiloxano		$(\text{CH}_3)_3\text{Si}[\text{OCH}_3]\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$

O número de grupamentos metil (CH_2), n, pode variar de 1 a mais de 100, o que confere à molécula um amplo espectro de hidrofiliicidade (Karsa, 2006). De acordo com Porter (1994) tem-se:

- $n < 8$: molécula totalmente solúvel em água, com baixas propriedades como surfactante.
- $10 < n < 18$: molécula pouco solúvel em água, com altas propriedades como surfactante.
- $n > 18$: molécula praticamente insolúvel em água, o que torna impróprio seu uso como surfactante.

A cabeça ou a região polar (**Figura 1**) dos surfactantes sintéticos pode apresentar cargas distintas, o que permite classificá-los em: aniônicos (carga negativa), catiônicos (carga positiva), não iônicos (não possuem carga) e zwitteriônicos, ou anfóteros, (neutros, com ambas as cargas), **Figura 2**, (Lichtenberg, Robson e Dennis, 1983). Para os surfactantes anfóteros, a depender da conformação estrutural e do pH da solução, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou neutra (Haigh, 1996). No **Quadro 2** são apresentados alguns exemplos da fração hidrofílica para os distintos tipos de surfactantes, considerando os comercialmente disponíveis.

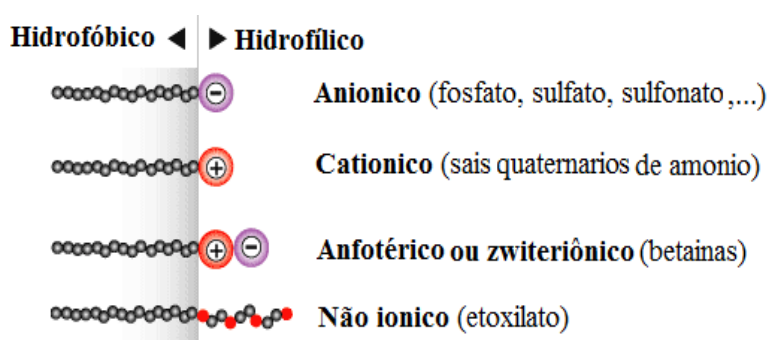


Figura 2: Classificação dos surfactantes segundo a região polar (cabeça). Adaptado do *site* Uk Essays.

Quadro 2: Exemplos e classificação de surfactantes comerciais quanto à porção hidrofílica. Fonte: adaptado de Nascentes, Arruda e Maniasso (2002); Van Hamme, Singh e Ward (2006).

Tipo	Surfactante
Catiônico	Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB)
	Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB)
	Cloreto de cetilpiridino (CICP)
Aniônico	Dodecil sulfato de sódio (SDS)
	Dihexadecil fosfato (DHF)
	Bis(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (Aerosol OT)
Não iônico	Polioxietileno (9-10) p-tercotil fenol (Triton X-100)
	Polioxietileno (23) dodecanol (brij 35)
	Polisorbatos (Incluindo Tween)
Zwitteriônico	3-(dodecildimetil amônio) propano 1-sulfato (SB-12)
	4-(dodecildimetil amônio) butirato (DAB)

São várias as possíveis combinações de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na composição das moléculas de surfactantes. Por sua vez, a ampla diversidade estrutural possibilita que os surfactantes apresentem diferenciadas propriedades, conferindo-lhes possibilidade de uso em variadas aplicações, quer domésticas, quer industriais (Zana, 2005; Ying, 2006; Mulligan, Sanjay e Mudhoo, 2014). Dentre as inúmeras aplicações, citam-se: agricultura, cosméticos, alimentos, fármacos, têxtil, medicina, recuperação de metais na mineração, no setor petrolífero, recuperação de áreas impactadas (Baptista, 2007). Também são usados para melhorar a qualidade de produtos acabados como tintas, cosméticos, fármacos e alimentos, entre outros (Rosenberg e Ron, 1999; Banat, Makkar, Cameotra, 2000; Ron e Rosemberg, 2002; Singh e Cameotra, 2002; Schramm, Stasiuk e Marangoni, 2003; Deleu e Paquot, 2004; Zahir *et al.*, 2004; Lourith e Kanlayavattanukul, 2009; Sachdev e Cameotra, 2013; Amorim *et al.*, 2014; Rufino *et al.*, 2014).

Como mencionado de início, a maior parte das propriedades dos surfactantes está relacionada a fenômenos de superfície, destacando-se a redução da tensão superficial ou interfacial. E, ainda, devido à presença de unidades estruturais distintas (grupos hidrofílico e hidrofóbico) na mesma molécula, têm-se dois fenômenos: adsorção e agregação (Eastoe e Tabor, 2014). Adicionalmente, os surfactantes podem apresentar propriedades como formação de macro e/ou microemulsões, dispersão ou degradação de sólidos, estabilização, quebra ou supressão de espuma, emulsificação, umectância ou molhabilidade, solubilidade ou detergência, entre outras (Mulligan, 2005; Bustamante, Durán e Diez, 2012). Em geral, a propriedade mais marcante dita a aplicação principal do surfactante, que por isso passa a ser denominado detergente, umectante, espumante, antiespumante, estabilizante, emulsionante, entre outros (Myers, 2006).

1.2. Propriedades dos surfactantes

1.2.1. Tensão superficial/Tensão interfacial

No interior de líquidos, as moléculas interagem entre si em todos os sentidos, ou seja, para cima, para baixo, para a esquerda, para a direita, para frente e para trás, se atraindo e repelindo mutuamente com a mesma força, de modo que o resultado das forças de atração e repulsão de cada molécula seja nulo (**Figura 3**). Para líquidos constituídos de moléculas iguais, a força de atração, denominada força coesiva, favorece

a aproximação das moléculas, enquanto a força repulsiva impede que duas ou mais moléculas ocupem o mesmo espaço ao mesmo tempo. Por outro lado, as moléculas situadas na superfície livre do líquido interagem apenas lateralmente e com aquelas situadas abaixo. Como resultado desse desbalanceamento vetorial, tem-se a formação na superfície da água de uma espécie de “membrana elástica”, que para ser rompida requer a aplicação de força. O efeito físico que ocorre na interface ar-água é denominado tensão superficial, definido como “a medida da energia livre da superfície por unidade de área necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície” (Nascentes, Arruda e Maniasso, 2001; Zana, 2005). A tensão superficial da água a 20 e 25°C é aproximadamente 72 e 73 mN/m ou dina/cm, respectivamente (Vargaftik, Volkov e Voljak, 1983). Estes autores apresentam a tensão superficial da água a várias temperaturas.

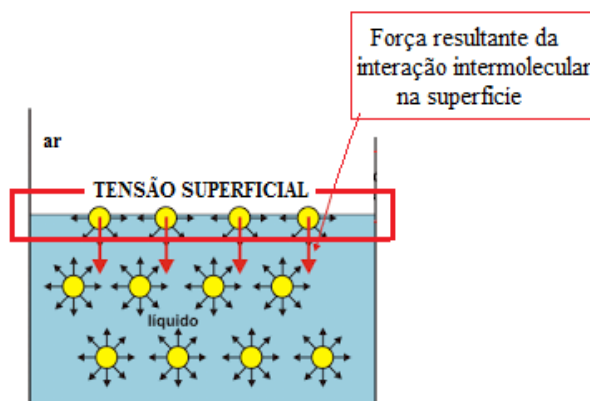


Figura 3: Representação das forças moleculares em água e da tensão superficial. Fonte: adaptado de *alfaconnection.pro.br*.

Da mesma forma, pode ser feita a análise da interação intermolecular na interface entre dois líquidos imiscíveis, fenômeno denominado tensão interfacial. Neste caso, uma segunda fase líquida mais densa do que o ar irá concorrer para um menor desequilíbrio das forças atuantes na interface. Por isso, o valor da tensão interfacial é menor do que o da tensão superficial (sistema líquido-ar).

Os surfactantes, devido à estrutura anfifílica, quando presentes em solução adsorvem a todo tipo de interface: líquido-ar, líquido-líquido e líquido-sólido - onde se orientam de modo a minimizar, tanto quanto possível, o contato entre seus grupos hidrofóbicos e a água, **Figura 4** (Karsa, 2006). Tal comportamento resulta em intensa modificação das propriedades da superfície (tensão superficial) ou da interface (tensão interfacial).

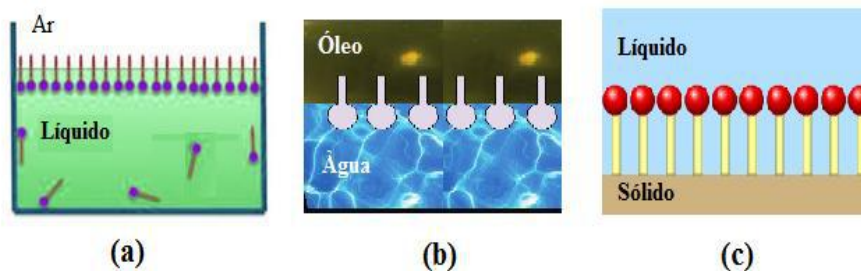


Figura 4: Comportamento de surfactantes em sistemas líquido-ar (a) e líquido-líquido (b) e líquido-sólido (c). Fonte: adaptado de Goyal (2016).

1.2.2. Adsorção

Como reportado, as moléculas de surfactante sem solução se distribuem nas interfaces líquido/líquido, líquido/sólido e líquido/ar. Este fenômeno é denominado sorção, e compreende os termos absorção (líquido/líquido) e adsorção (líquido/sólido) (Porter, 1994).

A sorção do surfactante à determinada superfície apresenta comportamento diferenciado à medida que aumenta a sua concentração em solução (Zhang e Somasundaran, 2006). A **Figura 5(a-c)** ilustra o efeito do aumento da concentração do surfactante em solução hidrofílica. Em baixas concentrações, as moléculas do surfactante se distribuem na superfície, ficando orientadas paralelamente a ela (**Figura 5a**). No entanto, o aumento da concentração de surfactante leva à alteração do rearranjo das moléculas na superfície (**Figura 5b**). Assim, quando a concentração de surfactante atinge o valor máximo na área disponível, os monômeros se apresentam unidirecionalmente dispostos (Porter, 1994).

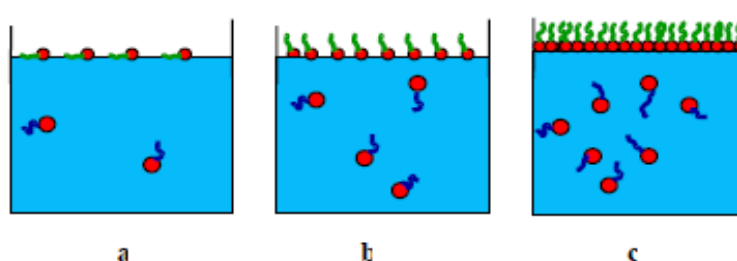


Figura 5: Orientação dos monômeros de surfactante na interface líquido-ar, em diferentes concentrações [a- baixa; b- média; c- alta]. Fonte: Porter (1994).

1.2.3. Formação de Micelas/ Concentração Micelar Crítica

Os surfactantes possuem como principal característica a formação, em solução, de agregados chamados micelas, que geralmente contêm de 50 a 100 moléculas, **Figura 6A**, (Rizzatti, Zanette e Mello, 2009). Em água, as micelas se formam pela associação entre os grupos hidrofóbicos (cauda) das moléculas, originando uma pseudofase termodinamicamente favorável (núcleo hidrofóbico). O processo de micelização ocorre quando a concentração de monômeros leva ao recobrimento de toda a superfície. Este ponto é referido como Concentração Micelar Crítica, CMC.

Como ilustrado na **Figura 6B**, as micelas podem variar a depender da concentração. Em água, os grupos polares (cabeça) ficam orientados para fora, enquanto no óleo tem-se a formação de micelas reversas (**Figura 6C**). Portanto, abaixo da CMC, os surfactantes se apresentam como moléculas individuais, ou monômeros (**Figura 7**). E, acima da CMC, a concentração dos monômeros está em equilíbrio com as micelas (Bognolo, 1999; Ou, 2000).

Em suma, micelas são agregados moleculares que possuem regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas, que se associam dinâmica e espontaneamente em solução a partir de uma determinada concentração, dita crítica (Maniasso, 2001). As micelas coexistem em equilíbrio dinâmico, termodinamicamente estável, e são passíveis de destruição quando a concentração do tensoativo estiver abaixo da CMC (Morais e Rezende, 2004). A CMC depende da estrutura do surfactante (tamanho da cadeia hidrofóbica) e das condições experimentais (força iônica, temperatura, pH, etc). Segundo Rosen (1989), a presença de matéria orgânica, qualquer que seja a sua concentração, como impureza de um surfactante pode produzir alterações expressivas na CMC. Ainda de acordo com este autor, as impurezas podem afetar a CMC quer por incorporação na micela quer por modificar a interação do solvente-micela ou solvente-surfactante.

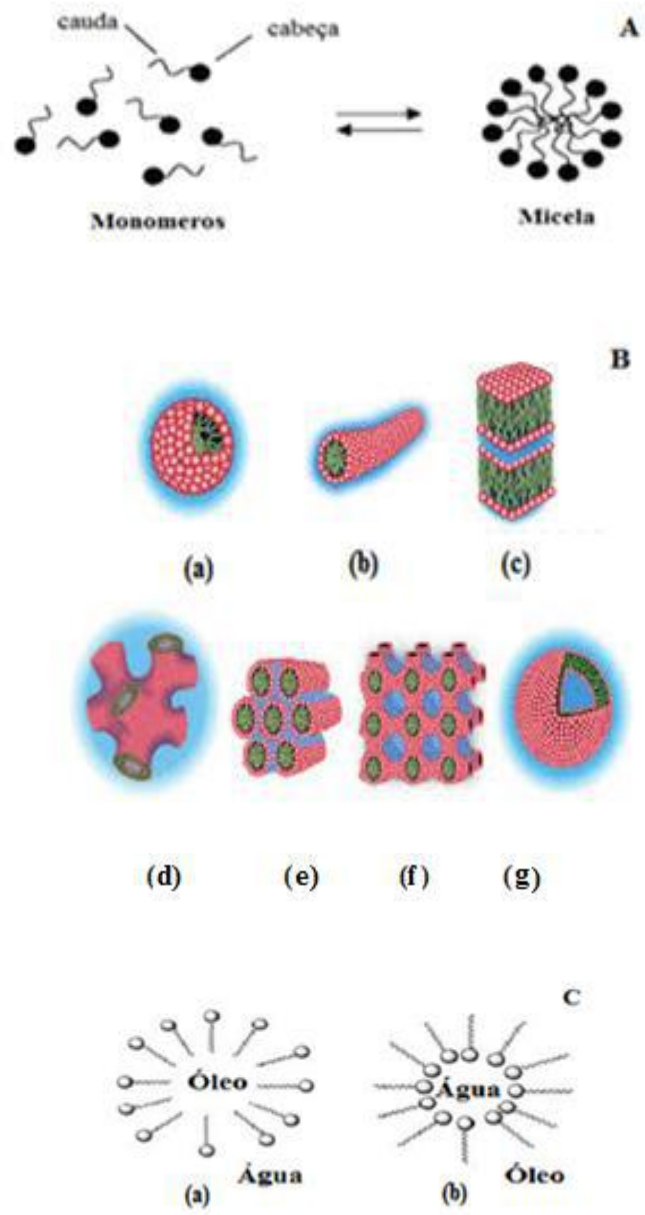


Figura 6: Surfactante [A: formação de micela; B: micelas esférica (a), cilíndrica (b), lamelar (c), desordenada (d), hexagonal (e), cúbica (f), e vesicular (h); e C: micela formada em água (a) e micela reversa formada em óleo (b)]. Fonte: Eastoe e Tabor (2014).

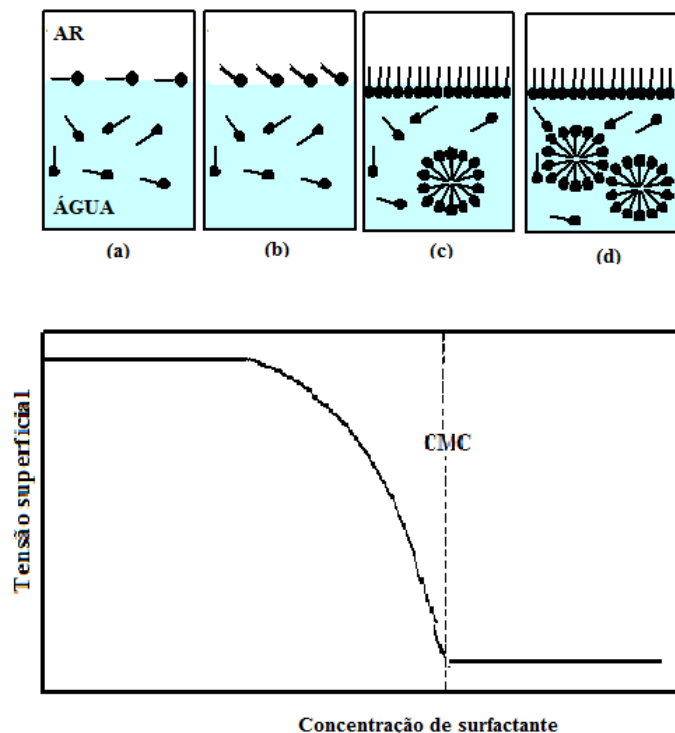


Figura 7: Efeito da adsorção de diferentes concentrações de um surfactante na interface ar-água (a- baixa; b- CMC; c- acima da CMC). Fonte: adaptado de Porter (1994) e Ibrahim (2011).

1.2.4. Solubilidade

A solubilidade de substâncias químicas entre si e em água está relacionada à polaridade das ligações e da espécie química, as forças de atração intermolecular e ao tamanho da cadeia carbônica (Martins, Lopes e Andrade, 2013; Eastoe e Tabor, 2014). Via de regra, tem-se que “semelhante dissolve semelhante”, uma vez que substâncias polares se dissolvem em substâncias polares e substâncias apolares em substâncias apolares. Assim, a maioria dos compostos orgânicos é insolúvel, ou pouco solúvel, em água.

Particularmente para os surfactantes, a solubilidade, ou seja, a capacidade de uma substância química de se dissolver em outra, está diretamente relacionada a sua estrutura molecular (Martins, Lopes e Andrade, 2013), haja vista que com o aumento da massa molecular do grupo hidrofílico do surfactante tem-se aumento da sua solubilidade em água; e, vice-versa, isto é, a redução da massa molecular torna-o menos solúvel. Por outro lado, para um mesmo grupo hidrofílico, o aumento da massa molecular do grupo hidrofóbico reduz a solubilidade do surfactante em água (Myers, 2006).

A solubilidade se baseia na migração diferencial dos componentes de duas fases imiscíveis - fase móvel e fase estacionária - o que resulta em uma mistura. Geralmente, a água é um dos líquidos.

Analogamente ao que ocorre com a maioria dos compostos orgânicos, a solubilidade dos surfactantes aumenta com o aumento da temperatura. Numa temperatura muito baixa, os surfactantes permanecem, principalmente, na forma cristalina e insolúvel. À medida que a temperatura aumenta ocorre aumento da solubilidade do surfactante até que seja atingida a CMC. Nesta temperatura, os monômeros estão em equilíbrio com as micelas, correspondendo ao ponto Kraft (Bhairi e Mohan, 2001). Segundo Nascentes, Arruda e Maniasso (2002), algumas características dos surfactantes, como molhabilidade, espumante, dispersante, entre outros exemplos, podem ser modificadas quando estes produtos são utilizados em temperaturas muito abaixo ou muito acima do ponto Kraft.

A **Figura 8** apresenta a relação entre tensão superficial, tensão interfacial, e solubilidade de um surfactante, antes e depois de atingida a CMC. A combinação destas propriedades confere à molécula características únicas que permitem a formação de emulsões óleo em água ou água em óleo (Rosen, 1989).

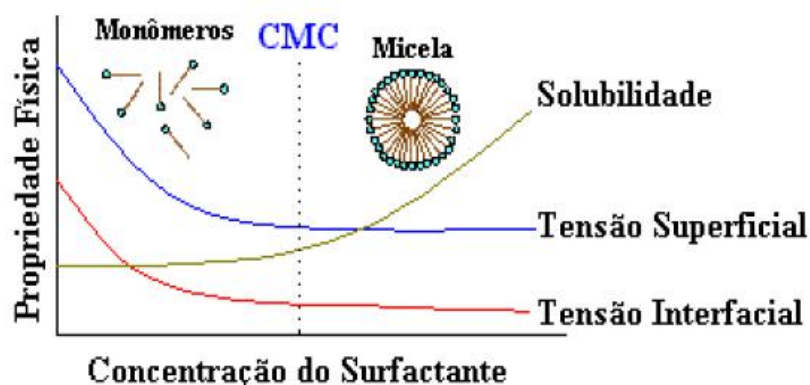


Figura 8: Variação da tensão superficial, tensão interfacial e da solubilidade em função da concentração de surfactante. Fonte: Mulligan, Yong e Gibbs (2001).

1.2.5. Formação de emulsões/ Equilíbrio Hidrofílico/Hidrofóbico

A emulsificação consiste na dispersão de um líquido em outro (Zajic e Seffens, 1984). Em geral, são poucas as substâncias orgânicas capazes de se solubilizar em água. Os surfactantes, por serem moléculas anfifílicas, são capazes de levar a aparente dispersão da água em óleo ou óleo em água, formando soluções visivelmente límpidas e estáveis, as quais são denominadas emulsões (**Figura 9**).

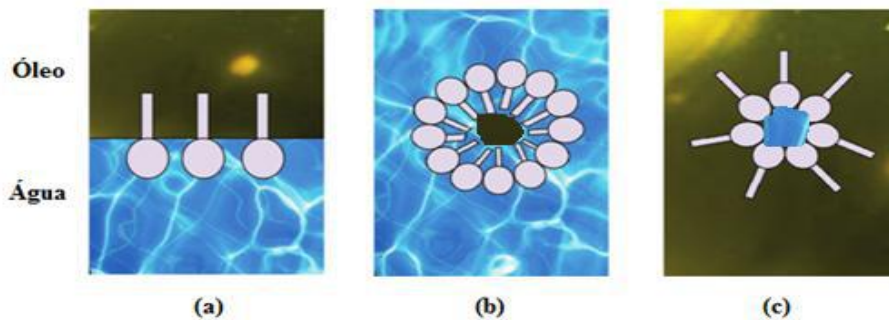


Figura 9: Ação do surfactante entre líquidos imiscíveis, com formação de emulsões óleo em água (a) e água em óleo (b). Fonte: adaptado Lotfallah *et al.* (2015).

A estabilidade das emulsões depende do equilíbrio entre as fases imiscíveis (fases aquosa e não aquosa, como por exemplo, água e óleo). Por isso, a importância de se determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do surfactante para definir a sua aplicação (Helenius e Simons, 1975). Os compostos mais hidrofóbicos têm um baixo valor de EHL (1-10) enquanto os mais hidrofílicos apresentam alto valor de EHL (>13). No **Quadro 3** estão listadas as características de surfactantes em função do valor EHL e as respectivas aplicações.

De acordo com Porter (1994), além de fatores como caráter iônico, pH em solução, entre outros, o valor de EHL também serve para identificar possíveis aplicações de um surfactante. Cabe destacar que a determinação de EHL não é precisa para surfactantes iônicos (aniônicos e catiônicos).

Quadro 3: Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) e respectivas propriedades e aplicações. Fonte: Silva, Ponsento e Rosa (2003).

EHL	Característica	Aplicação	Emulsão
1-4	Insolúvel em água	Emulsionante Anti-espumante	água em óleo
4-7	Dispersão leitosa instável em água	Agente de molhamento e espalhamento	água em óleo
7-9	Dispersão leitosa estável	Umectante	-
10-13	Solúvel em água (escura)	Detergente e Emulsionante	óleo em água
> 13	Solúvel em água (transparente)	Emulsificante Solubilizante	óleo em água

1.2.6. Molhabilidade (umectância)

Molhabilidade é a tendência de um fluido de molhar uma superfície sólida, quer por adesão quer por espalhamento, em função das interações intermoleculares (Duncan *et al.*, 2005; Schramm, 2005). É por isso que uma gota de água apresenta diferentes formatos sobre diferentes superfícies, a depender de como o volume de água se acomoda sobre o sólido onde foi depositada.

Como o grau de molhabilidade (umectação) se deve ao equilíbrio entre as forças de aderência e coesivas, em geral, a molhabilidade é primeiramente determinada pela medida do ângulo que o líquido forma ao interagir com a superfície do sólido, denominado ângulo de contato, **Figura 10A** (Yuan e Lee, 2013). Assim, conforme ilustrado na **Figura 10 B e C**, pequenos ângulos de contato ($< 90^\circ$) correspondem a maiores valores de molhabilidade, e vive-versa.

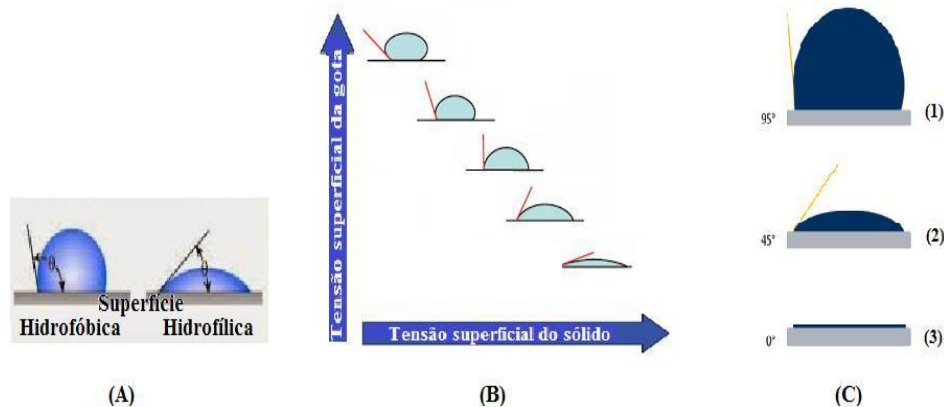


Figura 10: Representação do molhamento sobre superfícies sólidas [A: ângulo de contato; B: variação da gota em função das tensões superficiais da gota e da superfície; e C: molhabilidade ruim (1), boa (2) e total (3)]. Fonte: adaptado de Luz, Ribeiro e Pandolfelli (2008), e Togwt (2015).

Conforme representado na **Figura 10**, quando um líquido entra em contato com um sólido, a depender da afinidade dele com a superfície, haverá formação de gotículas ou se espalhará sobre o sólido formando um filme, para baixa ou alta afinidade, respectivamente. A adsorção de um surfactante a uma superfície sólida reduz a tensão interfacial, e, deste modo, modifica a capacidade da água ou do óleo de se espalhar sobre ela (Schramm e Marangoni, 2000). Para uma superfície umedecida, a orientação do surfactante repercute diretamente no seu papel como agente umectante. Deste modo, quando a cauda hidrofóbica está orientada para fora da superfície, ou ao longo dela, há diminuição da interação da água com o sólido, sendo favorecida a adsorção do óleo; ou, ao contrário, há aumento da molhabilidade quando a cabeça polar está em contato com a superfície (Silva, Ponsento e Rosa, 2003). A temperatura também pode alterar a molhabilidade quer por modificar a molécula do surfactante quer por interferir na sua adsorção à superfície.

As tensões de superfície de sólidos variam de 18 mN/m para Teflon® a cerca de 46 mN/m para nylon (Schramm, Stasiuk e Marangoni, 2003). Consequentemente, a redução da tensão superficial de uma solução aquosa para valores abaixo de 40 mN/m pelo emprego de um surfactante adequado permite a molhabilidade das superfícies. Neste caso, os surfactantes aniônicos são mais interessantes do que os catiônicos, embora estes encontrem aplicação como agentes de molhamento para uso na limpeza de óleo de tanques. Além de baixar a tensão superficial do líquido, o surfactante deve também baixar a tensão superficial do sólido. Ademais, a característica anfifílica dos

surfactantes pode ter efeito direto no “empacotamento” das moléculas e, conseqüentemente, alterar a molhabilidade da superfície, direcionando sua aplicação.

Alguns exemplos da aplicação de surfactantes como agentes de molhamento são discutidos detalhadamente na revisão de Schramm, Stasiuk e Marangoni (2003). Como reportam estes autores, o efeito umectante, ou seja, a molhabilidade é de grande importância para aplicação dos surfactantes, como por exemplo na agricultura para aplicação de defensivos agrícolas.

1.2.7. Espumante e antiespumante

A maioria dos surfactantes é capaz de espumar, o que pode ser um efeito desejável ou não, dependendo da aplicação (Salvini *et al.*, 2006). A espuma consiste em dois sistemas de fases, termodinamicamente instáveis, de bolhas de gás em um líquido, ou seja, é uma emulsão presente na superfície ar-água.

Os agentes antiespumantes contêm componentes que atuam diretamente na estrutura da espuma, promovendo a perda de elasticidade. Outros fatores, como o aumento ou diminuição de temperatura, causam a perda da elasticidade, levando a emulsão (ar em água) a se romper.

1.2.8. Detergência

Este efeito é o que mais contribui para a aplicação dos surfactantes (Kissa, 1981; Porter, 1994). A detergência envolve uma combinação de propriedades para remover partículas oleosas de uma superfície, tais como, solubilidade, EHL, tensão interfacial, CMC, e efeitos umectante e espumante (Silva, Ponsento e Rosa, 2003). E, como ocorre para outras propriedades dos surfactantes, as condições físico-químicas, como temperatura, presença de eletrólito, dureza da água, ação mecânica do tempo, tipo de substrato, além do tipo e concentração do surfactante também têm influência neste efeito.

1.2.9. Dispersante

Os surfactantes com tal característica são capazes de manter a dispersão estável de partículas não solúveis na fase aquosa em um meio. Os dispersantes são muito

utilizados em processos de biorremediação após um derrame de petróleo em acidentes marinhos para sua recuperação (Nitschke e Pastore, 2002).

1.3. Problemas relacionados aos surfactantes

No início deste século, a produção mundial de surfactantes já era superior a 3 milhões de toneladas por ano (Banat, Makkar e Cameotra, 2000), sendo a maioria utilizada como matéria-prima na fabricação de detergentes de uso doméstico (Schramm, Stasiuk e Marangoni, 2003). Entretanto, os surfactantes normalmente comercializados de origem petroquímica, correspondem a 70-75% do consumo nos países industrializados (Nitschke e Pastore, 2002). Isto porque, além das suas propriedades, os surfactantes quimicamente sintetizados são eficientes e baratos. Portanto, um grande volume desses produtos é lançado no ambiente ou faz parte de formulações empregadas no dia-a-dia. Isto é alarmante uma vez que não são biodegradáveis, e apresentam diferentes graus de toxicidade, cujo efeito acumulativo em seres vivos e no ambiente ainda é desconhecido (Pereira *et al.*, 2013). Este fato tem incentivado a criação de legislações de controle do meio ambiente cada vez mais rígidas, o que tem refletido na busca por produtos naturais com propriedades tensoativas para substituição dos surfactantes químicos (Zajic e Seffens, 1984; Nitschke e Pastore, 2002). São várias as publicações científicas neste tema, alguns datando de mais de cinquenta anos.

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, como plantas (saponinas), humanos (sais biliares) e microrganismos, e, portanto, podem ser considerados surfactantes naturais (Bognolo, 1999; Lang, 2002). Particularmente, os surfactantes produzidos por via microbiana, conhecidos como biossurfactantes, são de interesse posto serem biodegradáveis, podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, incluindo rejeitos industriais, apresentam propriedades químicas similares aos surfactantes sintéticos, e outras vantagens como especificidade, termoestabilidade e tolerância à força iônica (Mulligan, Mahmoudides e Gibbs, 1989; Al-Araji *et al.*, 2007).

2. Biossurfactantes

Estruturalmente, os biossurfactantes se assemelham aos surfactantes de origem sintética. Portanto, são moléculas anfipáticas constituídas por uma parte hidrofóbica

constituída de uma ou muitas cadeias longas de ácidos graxos, com número de átomos de carbono variando de 10 a 18, e parte hidrofílica que pode ser um carboidrato, um aminoácido, um peptídeo cíclico, ânions ou cátions, ésteres ou álcool (Georgiou, Lins e Sharma, 1992; Banat, Makkar e Cameotra, 1995; Bognolo, 1999; Mulligan, 2005).

A maior parte dos biossurfactantes são aniônicos ou neutros, variando em massa molecular (MM) desde ácidos graxos de cadeia curta até macromoléculas (Bognolo, 1999; Banat *et al.*, 2010). Apenas alguns são catiônicos, como os que apresentam um grupamento amino.

Os biossurfactantes podem ser produzidos por várias espécies microbianas, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, isolados do solo, da água marinha, de sedimentos do mar e áreas contaminadas por óleos (Barros *et al.*, 2007). Muitos biossurfactantes têm sido produzidos a partir de espécies bacterianas pertencentes a uma ampla variedade de gêneros, tais como *Pseudomonas*, *Pseudoxanthomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Nocardiopsis* e *Alcaligenes*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Ochrobactrum* (Coronel-León *et al.*, 2015; Li, 2015; Liu *et al.*, 2015; Rahman e Randhawa, 2015).

Alguns autores classificam os biossurfactantes segundo a massa molecular (Rosenberg e Ron, 1999; Bodour, Guerrero-Barajas e Maier, 2004; Van Hamme, Singh e Ward, 2006). A massa molecular dos biossurfactantes, geralmente, situa-se entre 500 e 1500 Da, e seu valor de CMC varia de 1 a 300 mg/L.

Comumente, os biossurfactantes (BS) são divididos em duas classes principais (Desai e Banat, 1997; Deleu *et al.*, 1999; Neu, 1996; Banat *et al.*, 2010):

- BS de baixa MM - glicolipídios, lipopeptídios e fosfolipídios e ácidos graxos;
- BS de alta MM – surfactantes poliméricos, polissacarídios, lipopolissacarídios ou lipoproteínas (Rosenberg e Ron, 1997; Smyth *et al.*, 2010), considerados bioemulsificantes (Uzoigwe *et al.*, 2015), e surfactantes particulados.

As moléculas de baixa MM são mais eficientes em baixar a tensão superficial, enquanto as de alta MM se caracterizam por formar emulsões óleo-água mais estáveis.

A **Tabela 1** apresenta uma relação de biossurfactantes e seus respectivos microrganismos produtores.

Tabela 1: Exemplos de biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos. Fonte: adaptado de Ron e Rosenberg (2002); Van Hamme, Singh e Ward (2006).

Massa molecular	Biossurfactante	Microrganismo
Baixa	Rhamnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
	Trealipídios	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
	Soforolipídios	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Torulopsis bombicola</i>
	Celobioselipídios	<i>Ustilma maydis</i>
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. pumilis</i>
	Fosfolipídios	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
	Lipopeptídios	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>P. syringae</i> , <i>P. fluorescens</i>
	Flavolipídios	<i>Flavobacterium</i> sp.
	Gramicidina	<i>Brevibacillus</i>
	Alta	Alasan
Emulsan		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan		<i>Candida lipolytica</i>

Pode-se concluir que os biossurfactantes formam um grupo heterogêneo de moléculas, sendo o tipo e a quantidade dependente do microrganismo produtor, das condições operacionais e do meio de produção. Porém, apesar da grande diversidade estrutural dos biossurfactantes, estes compostos são capazes de apresentar propriedades químicas similares às dos surfactantes sintéticos, e ainda outras vantagens, tais como (Mulligan, Mahmoudides e Gibbs, 1989; Banat, 1995; Mulligan *et al.*, 2005):

- Baixa toxicidade, visto serem moléculas naturais e, comprovadamente não danosas aos seres vivos estruturalmente mais complexos;
- Alguns apresentam ação antimicrobiana;
- Biodegradabilidade, o que possibilita o uso no ambiente;

- Baixos valores de CMC;
- Baixos valores de tensão superficial e de tensão interfacial, mesmo em baixas concentrações;
- Elevada estabilidade térmica, já que as atividades de superfície não são afetadas por altas temperaturas. Por exemplo, uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi isolada de reservatórios de óleo cru na Venezuela, onde a temperatura era de 90°C. O ramnolípido foi produzido *in vitro*, mesmo em temperatura elevada, em altos teores de salinidade, e em pH ácido, característicos do reservatório;
- Estabilidade em ampla faixa de pH;
- Não precipitam ou saturam em soluções salinas acima de 10% NaCl, enquanto 2-3% deste sal são suficientes para desativar os surfactantes químicos.

Tecnicamente, um bioproduto é considerado um bom biosurfactante quando é capaz de reduzir a tensão superficial da água a 20°C de 72 mN/m para valores iguais ou inferiores a 35 mN/m, ou a tensão interfacial de sistema água-hexadecano de 40 mN/m para 1 mN/m (Cooper, 1986; Christofi e Ivshina 2002; Mulligan, 2014; Eastoe e Tabor, 2014).

2.1. Função fisiológica dos biosurfactantes

As moléculas de tensoativos produzidas por microrganismos podem ser excretadas para o meio ambiente ou podem ser constituintes da parede celular do próprio microrganismo produtor (Raaijmakers *et al.*, 2010). Portanto, muitas vezes as próprias células podem por si só apresentar capacidade tensoativa, ou emulsificante. Entretanto, apenas os biosurfactantes extracelulares possuem o poder de reduzir a tensão superficial de um sistema líquido-ar. E, tão somente os microrganismos potencialmente produtores de biosurfactantes excretam estas moléculas para o meio (Francy *et al.*, 1991).

A assimilação de hidrocarbonetos pelos microrganismos está muitas vezes relacionada à produção e função dos biosurfactantes. Porém, a função fisiológica exata dos biosurfactantes é ainda desconhecida. Sabe-se que a maioria destes produtos constitui um metabólito secundário essencial para a sobrevivência da célula microbiana. Algumas suposições são levantadas por alguns autores (Rosenberg e Ron, 1999; Davey, Caiazza e O'Toole, 2003; Van Hamme, Sing e Ward, 2006):

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos, possibilitando a sua metabolização pelos microrganismos. Abaixo da CMC, micelas de biossurfactantes se formam, permitindo que os substratos hidrofóbicos se aproximem das células microbianas, e por sua vez na sua interiorização;
- Adesão ou remoção de materiais adsorvidos a superfícies, podendo, inclusive, facilitar a interação da célula com o hospedeiro. Os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à parede celular para regular as propriedades da superfície celular, visando adesão ou desligamento a determinado ambiente, visando a disponibilidade de nutrientes em outros habitats, ou mesmo se livrar de ambientes desfavoráveis;
- Formação, manutenção e maturação de biofilmes, que podem ser constituídos por denso agregado de células inseridas em uma matriz polimérica. Algumas espécies mutantes podem formar biofilmes a partir da expressão de genes de produção de surfactantes;
- Mediar o mecanismo de *quorum sensing* entre as células bacterianas, proporcionando a regulação de genes.
- Ação antimicrobiana, visto que vários microrganismos produzem substâncias de ação antagonista na fase exponencial de crescimento, para evitar a competição por fontes nutricionais quando em uma mesma comunidade microbiana;
- Função quelante com metais pesados para minimizar a toxicidade.

3. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*

3.1 Microrganismo

O gênero *Bacillus* compreende mais de 200 espécies, que podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, mas principalmente em solos (Claus e Berkeley, 1984; Ghafoor e Hasnain, 2009). Em geral, o estudo de *B. subtilis* serve de base para a maioria das informações referentes à biologia, bioquímica e genética das bactérias Gram-positivas (Kenneth, 2005).

As células da espécie *Bacillus subtilis* se apresentam como bastonetes Gram-positivos retos, de 0,7 a 0,8 µm, apresentando-se isolados, aos pares e raramente em cadeias. São móveis por meio de flagelos polares e formam endosporos centrais medindo de 0,8 µm por 1,5 a 1,8 µm (Claus e Berkeley, 1984; Branda, 2001; Moszer *et*

al., 2002; Errington, 2003; Carballido-Lopez e Formstone, 2007; PHE, 2015). As suas colônias apresentam variações nas características morfológicas em função da composição do meio de cultura empregado para seu cultivo (Rudner *et al.*, 1998). Normalmente, apresentam coloração creme ou marrom, são opacas, com formato arredondado ou irregular.

São quimioheterotróficos, com crescimento em meio mínimo constituído de glicose e sal amoniacal como únicas fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Na presença de sacarose, podem formar polissacarídios extracelulares como levana e dextrana. Em meio de crescimento contendo arabinose, xilose ou manitol ocorre a produção de ácidos orgânicos. São também capazes de degradar macromoléculas, como o amido, a pectina e a caseína. A composição do meio de crescimento também pode induzir a síntese de polipeptídios com ação antimicrobiana e/ou de pigmentos (Claus e Berkeley, 1984). A espécie *B. subtilis* pode apresentar diferentes respostas a alterações do ambiente, como motilidade, secreção de enzimas extracelulares, produção de bioativos e esporulação (Carvalho *et al.*, 2010).

Em geral, este microrganismo apresenta metabolismo oxidativo, mas pode crescer em anaerobiose utilizando nitrato como aceptor final de elétrons (Claus e Berkeley, 1984; Ramos *et al.*, 2000; Fritze, 2004). O seu crescimento em meios complexos contendo glicose, na presença de oxigênio, é intenso. Porém, o crescimento é reduzido em condição de anaerobiose.

B. subtilis apresenta a capacidade de crescer em amplas faixas de temperatura e pH. O crescimento ocorre na faixa de 10 a 50°C, embora temperaturas entre 30 e 40°C sejam referidas como mais apropriadas (Claus e Berkeley, 1984; Korsten e Cook, 1996; Ghafoor e Hasnain, 2009). O pH varia de 5,5 a 8,5.

3.2. Lipopeptídios produzidos por *Bacillus subtilis*

A espécie *B. subtilis* pode produzir uma variedade de metabólitos bioativos, com destaque para os lipopeptídios de baixa massa molecular: iturina, liquenisina, fengicina e surfactina (**Figura 11**), conhecidos pelas propriedades antimicrobianas e atividades tensoativas (Vollenbroich *et al.*, 1997; Peypoux, Bonmatim e Wallach, 1999; Zahir *et al.*, 2004; Haas e Défago, 2005; Al-Ajlani *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2010; Raaijmakers *et al.*, 2010).

Estes lipopeptídios cíclicos, de caráter anfifílico, são compostos de uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi (ácido 3 hidroxi-13-metil-tetradecanóico, o principal) ligada a um peptídeo cíclico de sete (surfactinas e iturinas) ou dez aminoácidos (fengicinas) (Barros *et al.*, 2007; Ongena *et al.*, 2007; Sen, 2010). O número de átomos de carbono da cadeia carbônica pode variar de 13 a 16 para surfactinas, de 14 a 17 para iturinas, e de 14 a 18 para fengicinas. Por isso, diferentes homólogos são comumente coproduzidos (Ongena *et al.*, 2007)

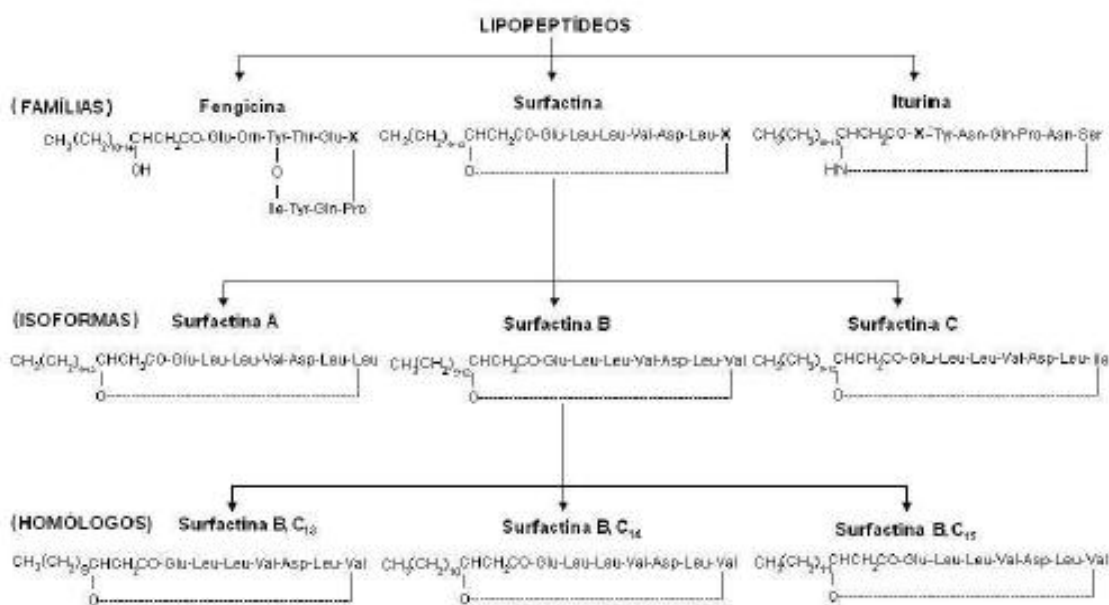


Figura 11: Lipopeptídios produzidos por *Bacillus subtilis*. Fonte: Bugay (2009).

A síntese destes lipopeptídios é regulada por um sistema *quorum-sensing* dependente (Duitman *et al.*, 2007). Segundo Vater *et al.* (2002), as surfactinas são sintetizadas durante a fase de desaceleração, enquanto a síntese de iturinas e fengicinas se dá na fase estacionária. No entanto, em trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi observada produção de surfactante por cepa isolada de *B. subtilis* associada ao crescimento celular (Reis, Sérvulo e De França, 2004).

Segundo a literatura, o principal bioproduto sintetizado por *B. subtilis* é a surfactina, também denominada sublisina A, um surfactante aniônico, com propriedades tensoativa e emulsificante (Reis, Sérvulo e De França, 2004). A biossíntese da surfactina é proposta por um mecanismo não ribossomal catalisado por um complexo

multienzimático tiotemplate, constituído de peptídeos, ácidos graxos e policetídeo sintases (Finking; Marahiel, 2004). O complexo multifuncional da surfactina sintase reflete sua organização genética (Machado *et al.*, 2004).

Os diferentes tipos de surfactina (**Figura 11**) produzidos por *Bacillus subtilis* variam com a cepa e as condições operacionais do processo fermentativo (Vater *et al.*, 2002; Mukherjee e Das, 2005; Mukherjee e Das; Sen, 2006; Mizumoto e Shoda, 2007). As variações ocorrem tanto no comprimento quanto na conformação da cadeia lipídica, bem como nos aminoácidos constituintes da parte proteica, o que possibilita serem produzidos diferentes compostos homólogos e isômeros. As alterações estruturais geram mudanças nas propriedades físico-químicas do bioproduto e, conseqüentemente, na sua aplicação. A produção pode ainda ser afetada quantitativamente visto que há influencia também dos fatores ambientais na produção do biosurfactante, os quais estão diretamente relacionados à atividade metabólica do microrganismo (Pereira *et al.*, 2013).

A surfactina é reconhecida como um dos biosurfactantes mais eficazes (Mulligan, 2004). Em comparação aos surfactantes sintéticos como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e o brometo de trimetil amônio (BTA) e, inclusive com outros biosurfactantes, a surfactina apresenta maior capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, além de possuir valores de concentração micelar crítica (CMC) inferiores. Além disso, a surfactina é capaz de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis em água. De acordo com a literatura, a surfactina, mesmo em baixas concentrações (< 20 mM), permite reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m, e ainda segundo Barros *et al.* (2007), a CMC é de 0,017g/L.

A propriedade tensoativa e o caráter emulsificante permitem seu uso nas mais diversas aplicações, como na biorremediação de ambientes poluídos e até mesmo na área terapêutica devido à baixa toxicidade constatada para células de mamíferos (Kim *et al.*, 2007; Baptista, 2007). Alguns estudos também mostraram a efetividade da surfactina como antiviral, antitumoral, como anticoagulante e inibidor de enzimas (Barros *et al.*, 2007; Sen, 2010). Porém, ainda é restrito o embasamento científico para estes tipos de aplicação.

A atividade biológica da surfactina depende da composição de aminoácidos, da sequência do peptídeo, e da natureza da sua parte lipídica. As substituições de aminoácidos interferem na distribuição polar/apolar e/ou na acessibilidade de grupos carboxílicos a cátions. Estas modificações resultam em diferenças na capacidade hemolítica, quelação de metais, CMC e atividade superficial (Lang, 2002; Barakat, 2010).

A surfactina se apresenta estável a variações de temperatura, pH e salinidade. Por exemplo, o biossurfactante produzido pela cepa *Bacillus subtilis* C9 manteve sua propriedade emulsificante quando exposto a temperaturas de 20-100°C por 1 h, pH de 5,0 a 9,5 e concentrações salinas de 1.000 mM de NaCl e 10 mM de CaCl₂ (Kim *et al.*, 1997). Porém, segundo Cooper *et al.* (1981) existe dependência das propriedades tensoativas da surfactina em relação ao pH, uma vez que em solução aquosa com pH igual a 2, a tensão superficial foi de 62 mN/m, embora após ajuste do pH 6, a tensão tenha voltado para 27 mN/m. De acordo com Barros *et al.* (2007), em meio ácido, a surfactina precipita, mas não tem a estrutura alterada.

A surfactina é produzida pela empresa Sigma-Aldrich ao custo de R\$ 5.940,00/50 mg, o que inviabiliza seu uso industrial. Logo, assim como ocorre para a maioria dos surfactantes naturais, a restrição do seu emprego comercial se deve basicamente a problema de ordem econômica (Li *et al.*, 2016).

4. Fatores que influenciam a produção de biossurfactantes

Nos últimos anos tem crescido o número de publicações atribuídas à produção de biossurfactantes, o que demonstra que estes compostos estão se tornando tecnologicamente importantes. Apesar das vantagens na síntese, o uso industrial dos biossurfactantes ainda é limitado devido aos custos da produção. Assim, a otimização do processo de produção parece ser o fator chave para que se melhore o rendimento e se diminua os custos. Estimativas demonstram que a utilização de fontes renováveis como substrato podem diminuir em até 30% os custos da produção (Amaral *et al.*, 2008).

A produção do composto tensoativo é afetada qualitativamente e quantitativamente pelo microrganismo e cepa produtora, pela natureza e concentração da fonte de carbono, por possíveis limitações nutricionais, e por parâmetros físico-químicos do processo (aeração, temperatura e pH).

Em cultivos em batelada, o acúmulo de lipídios é favorecido quando no meio há um excesso da fonte de carbono e limitação de um ou mais dos outros nutrientes (Colla e Costa, 2013). Na fase inicial de crescimento, a assimilação dos nutrientes é semelhante, e os níveis lipídicos se mantêm praticamente inalterados. Iniciada a limitação de nutrientes, a velocidade de crescimento decresce, embora a fonte de carbono continue a ser transportada para dentro da célula e utilizada para a biossíntese de lipídios. Nestas condições, os produtos finais formados podem ser surfactina, ou ainda, polissacarídios, polímeros de estocagem como o polihidroxitirato, ou antibióticos. Nutrientes limitantes que podem levar a essas condições são o nitrogênio, magnésio, ferro e fósforo. Outras condições de crescimento importantes são o pH, atividade de água, concentração de O₂, temperatura e salinidade. Segundo alguns autores, como Abushady *et al.* (2005), aumentos de rendimentos de surfactina, assim como de outros biossurfactantes, são alcançados em condições limitantes de um ou mais nutrientes durante o cultivo microbiano.

4.1. Fonte de carbono

É sabido que os tensoativos são produzidos muitas vezes somente quando os microrganismos são cultivados na presença de hidrocarbonetos. Mas, em alguns casos, como da produção de surfactina, podem ser empregados substratos simples, solúveis em água, como os carboidratos, e inclusive fazer uso de resíduos industriais (Fox e Bala, 2000; Bala *et al.*, 2002; Reis, Sérvulo e De França, 2004; Barros, Ponezi e Pastore, 2008; Barros, Quadros e Pastore, 2008; García-Becerra, Allen e Acosta, 2010; Colla e Costa, 2013).

A depender da fonte de carbono poderá ser alterada a estrutura do biotensoativo produzido e, conseqüentemente, as suas propriedades, o que pode ser desejável para uma aplicação específica. Há um grande número de estudos envolvendo a produção de biossurfactantes a partir da otimização das suas propriedades físico-químicas. A redução dos custos pode se dar pela utilização de fontes alternativas de nutrientes, a qual pode também alcançar altos rendimentos na produção. Assim, a reutilização de resíduos industriais ou agroindustriais torna-se uma estratégia que reduz simultaneamente a poluição e os custos da produção (Fontes *et al.*, 2008).

Kim *et al.* (2007) obtiveram elevada produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* C9 utilizando glicose como única fonte de carbono. No entanto, a produção foi inibida quando os autores substituíram a glicose por hidrocarbonetos. Também foi possível obter altos rendimentos pelo emprego de amido como substrato na tentativa de simular o emprego de resíduos de indústria de processamento de batatas (Fox e Bala, 2000).

Vários estudos estão sendo conduzidos em diversos países a fim de verificar a possibilidade de empregar matérias-primas regionais de baixo custo disponíveis como alternativa para a produção de surfactina. Na **Tabela 2**, são apresentados alguns trabalhos que demonstram os parâmetros determinados na produção de biossurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*.

Tabela 2: Referências de trabalhos de produção de biossurfactantes por diferentes cepas de *Bacillus subtilis* apresentando os dados relacionados. Fonte: adaptado de Valpuesta (2008).

Linhagem	Matéria- prima	Tensão superficial final (mN/m)	Outros parâmetros	Referências
LB5a	Manipueira	36,6	CMC: 33 mg/L	NITSCHKE e PASTORE (2006)
sp.	Glicose	27	Tensão interfacial: 1mN/m	COOPER (1981)
sp. Termofílica	Glicose e ácido oléico	27-29	N.A	BANAT (1993)
ATCC 21332	Efluente da indústria de batata	28,3 ^a -34,2 ^b	N.A	FOX e BALA (2000)
MTCC 2423	Melaço	29	45°C	MAKKAR e CAMEOTRA, 1997
DM-03	Glicerol	N.A	Redução da tensão no meio: 37,2 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
DM-03	Querosene	N.A	Redução da tensão no meio: 2,6 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
DM-04	Diesel	N.A	Redução da tensão no meio: 10,9 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
DM-04	Amido	N.A	Redução da tensão no meio: 24,3 mN/m	MURKHEJEE e DAS, 2005
R1	Melaço	30,1	Temperatura: 45°C	JOSHI, <i>et al.</i> , 2008
ATCC 6633	Vinhoto	35,3	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
ATCC 6633	Caldo de cana	34,8	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
ATCC 6633	Açúcar cristal	30,6	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
ATCC 6633	Melaço	34,4	N.A	REIS, SÉRVULO e DE FRANÇA, 2004
LB5a	Soro de leite	48,8	N.A	NITSCHKE e PASTORE, 2003
LB5a	Melaço	29,5	N.A	NITSCHKE e PASTORE, 2003

*a (resíduo líquido); b (resíduo sólido) NA – não apresentado

Açúcar cristal

O Brasil é um país que possui uma fonte inestimável de recursos naturais e renováveis que, devido à sua biodiversidade, possibilitam a formulação de meios de cultivo de baixo custo. A cana-de-açúcar está entre um dos principais produtos agrícolas produzidos no Brasil, graças ao clima tropical e tipo de solos em diversas regiões

próprias para o desenvolvimento desta cultura. Atualmente encontramos lavouras de cana-de-açúcar nas regiões nordeste, centro-oeste e sudeste do país, sobretudo no estado de São Paulo, onde ocorre a maior produção (**Figura 12**).

Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a cana-de-açúcar ocupa 6,1 milhões de hectares do território nacional. No ano de 2015, a safra bateu recorde de produção, com 655,2 milhões de toneladas, representando um acréscimo de 3,2% em relação à safra anterior (Governo do Brasil, 2015). A produção de cana-de-açúcar estimada para a safra 2016/17 é de 690,98 milhões de toneladas, equivalendo à crescimento de 3,8% em relação à safra anterior (CONAB, 2016).

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar proveniente da cana-de-açúcar, com os menores custos. É também o maior exportador, embora metade da produção se destine ao mercado interno. Isto se deve ao fato de ser a cana-de-açúcar, a principal fonte de biomassa energética, com aplicações industriais nos setores alimentícios, como o açúcar cristal, e de combustíveis, com destaque na produção de etanol (CONAB, 2016).

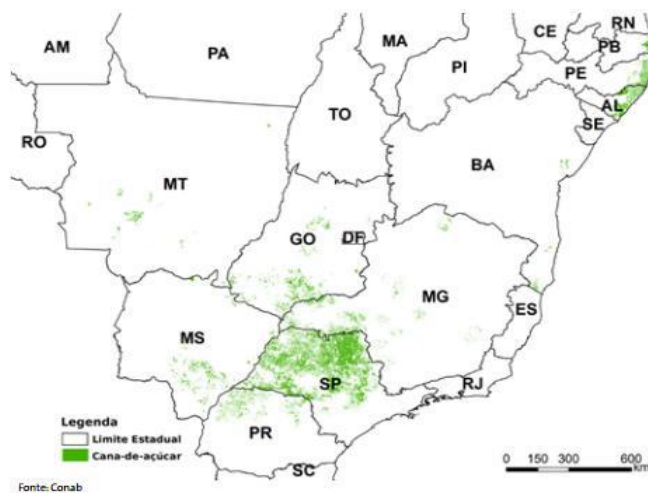


Figura 12: Distribuição da produção de cana-de-açúcar em território brasileiro. Fonte: CONAB (2016).

Para a fabricação do açúcar cristal a partir da cana-de-açúcar, o vegetal é moído para que se extraia o caldo, que a seguir é aquecido à 105°C, e posteriormente filtrado para a remoção de impurezas. Segue-se sua evaporação em evaporadores de múltiplos estágios e, então, o produto é depositado em bandejas para que ocorra a formação de

cristais. Para obtenção do açúcar cristal, após a evaporação, o caldo sofre um leve refinamento, com remoção de 90% dos sais minerais (CONAB, 2015).

Graças ao custo, disponibilidade e facilidade de transporte e armazenamento, o açúcar cristal tem se tornado uma matéria-prima convencionalmente empregada em diferentes bioprocessos industriais.

4.2. Fonte de nitrogênio

O nitrogênio, após a fonte de carbono, é essencial na formulação de meios de cultivo para propiciar o crescimento microbiano, visto a sua importância na síntese de material celular como proteínas estruturais e enzimas, e para a síntese de produtos de interesse, como é o caso dos biossurfactantes (Fontes *et al.*, 2008).

Diferentes fontes de nitrogênio têm sido utilizadas para a produção de biossurfactantes, como ureia, peptona, extrato de levedo, extrato de malte, extrato de carne, nitrato de amônio e nitrato de sódio. O extrato de levedo tem sido a fonte de nitrogênio mais utilizada no meio científico por propiciar aumento do rendimento de biossurfactante. Mas, a concentração de extrato de levedo varia em função da cepa e da composição do meio de cultivo (Fontes *et al.*, 2008).

Em particular, para produção de surfactina são usados nitrato de amônio e nitrato de sódio (Davis *et al.*, 1999; Al-Ajlani *et al.*, 2007; Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna, 2008; Liu *et al.*, 2012).

4.3. Outras fontes nutricionais

Sais minerais também apresentam efeito importante na síntese de surfactina. Dentre os cátions investigados - Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Al^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} - foi identificada ser a disponibilidade de ferro e manganês a mais expressiva (Cooper *et al.*, 1981; Wei e Chu, 1998; Sheppard e Cooper, 1991; Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna, 2008; Huang *et al.*, 2015). Ambos elementos são imprescindíveis posto que atuam como cofatores de enzimas para a biossíntese de surfacina (Shaligram e Singhal, 2010).

Outros estudos mostraram a importância de potássio e magnésio como cofatores (Wei e Chu, 2002; Kinsinger, Shirk e Fall, 2003; Kinsinger *et al.*, 2005; Wei, Lai e Chang, 2007).

4.4. Fatores ambientais

Além das condições nutricionais, os fatores ambientais são extremamente importantes na produção de biossurfactantes, não apenas em termos de quantidade, mas por interferir na estrutura da molécula, o que leva a alteração das suas propriedades. Para se obter a maior quantidade do produto, é necessário otimizar as condições do processo, pois a produção de um biotensoativo pode ser influenciada pelo pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio (aeração) e velocidade de agitação (Cameotra e Makkar, 1998; Apka *et al.*, 2001; Fontes *et al.*, 2008).

Em geral, há queda na produção de biossurfactante com o aumento da temperatura, apesar da sua comprovada estabilidade térmica. Porém, temperaturas de 30°C são mais indicadas do que 45°C. Em relação à influência do pH, foram alcançadas quedas significativas de produção com o decréscimo do seu valor de 6,5 para 4,5. Entretanto, efeito diferenciado foi observado em relação à concentração de oxigênio dissolvido; em condição de anaerobiose houve maior queda da tensão superficial do meio (70 mN/m) que atingiu 28mN/m ao final do processo fermentativo.

5. Recuperação dos biossurfactantes do meio fermentado

A viabilidade econômica do processo industrial depende tanto dos custos do processo fermentativo, majoritariamente da matéria-prima, quanto dos processos envolvidos com a recuperação do bioproduto. Isto porque, em geral, os bioprodutos são produzidos em pequenas quantidades e os meios fermentados apresentam várias impurezas. De modo que, a recuperação e, se houver necessidade, a purificação do produto podem corresponder a cerca da metade do total do custo do processo.

Para recuperação de biossurfactantes de meios fermentados, a literatura apresenta alguns métodos convencionais que se mostraram válidos: precipitação ácida, extração com solvente, cristalização, precipitação com sulfato de amônio e centrifugação. Também são descritos métodos menos convencionais como ultrafiltração, adsorção em resinas, cromatografia de carga iônica e cromatografia

liquida de alta resolução (Mukherjee, Das e Sen, 2006). No **Quadro 4** são descritos procedimentos para recuperação de biossurfactantes, assim como seus princípios e vantagens.

Os processos *downstream* concorrem maciçamente no ônus do processo de produção. No entanto, nem sempre há necessidade de purificar o biossurfactante produzido, como, por exemplo, para aplicação em reservatórios de petróleo para sua recuperação. Tal processo só se faz necessário em indústrias farmacêuticas que, para tanto, devem fazer uso de técnicas mais sofisticadas.

Quadro 4: Métodos de recuperação de biossurfactantes, respectivas propriedades físico-químicas e vantagens. Fonte: Mukherjee, Das e Sen (2006).

Processo de recuperação	Propriedade responsável pela separação	Vantagens
Precipitação ácida	Biossurfactantes tornam-se insolúveis em baixo de pH.	Baixo custo e eficiente.
Extração com solventes orgânicos	Biossurfactantes são solúveis devido a sua cadeia hidrofóbica	Eficiente, parcial purificação, reutilizável.
Precipitação com sulfato de amônio	Utilizado para biossurfactantes poliméricos	Eficientes no isolamento de certos poliméricos
Centrifugação	Biossurfactantes insolúveis são precipitados devido à força centrípeta	Reutilizável e eficiente
Espuma fracionada	Biossurfactantes na superfície do líquido são coletados através da espuma formada	Alta pureza do bioproduto, recuperação contínua
Ultrafiltração	Biossurfactantes formam micelas (CMC), ficam retidos em uma membrana polimérica;	Rápido, apenas uma etapa de recuperação, alta pureza do produto.
Adsorção em resinas de poliestireno	Biossurfactantes são adsorvidos e depois são removidos por solventes orgânicos	Rápido, apenas uma etapa de recuperação, alta pureza do produto e reutilizável
Adsorção em carvão ativado	Biossurfactantes são adsorvidos e depois são removidos por solventes orgânicos	Alta pureza do produto, reutilizável, barato e recuperação direta do meio de cultura
Cromatografia de troca iônica	Biossurfactantes carregados aderem na coluna e são removidos com tampões.	Alta pureza do produto, reutilizável e baixo custo

6. Aplicação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam propriedades que permitem ações específicas, diferentemente dos surfactantes sintéticos. Em consequência, e devido ao seu maior custo, seu uso é mais indicado em aplicações particulares do que de forma genérica (Singh, Van Hamme e Ward, 2007). Isto se deve as propriedades tensoativas que se mantêm estáveis mesmo em súbitas variações das condições ambientais, como pH, força iônica e temperatura (Bognolo, 1999). Na **Tabela 3**, uma compilação de aplicações industriais dos biossurfactantes.

Tabela 3: Possíveis aplicações dos biossurfactantes em diversos setores industriais. Fonte: adaptado de Mukherjee, Das e Sen (2006).

FUNÇÕES	CAMPOS DE APLICAÇÃO
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, alimentos, tintas, óleos, biorremediação
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Umectantes	Produtos farmacêuticos, cosméticos, e têxteis, e em tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, na agricultura
Espumantes	Produtos de higiene, na flotação de minérios
Espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de micelas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Redutores de viscosidade	Transporte de óleo em oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos
Agentes de recuperação	Recuperação terciária de petróleo (MEOR)

No mercado global, os custos dos biossurfactantes são pelo menos 50 vezes maiores dos surfactantes quimicamente produzidos. Para ramnolipídios, estima-se o valor de US\$ 6-25/kg para uma escala de produção de 25 a 200 m³ (Edser, 2008). Apenas para exemplificar, o preço do surfactante etoxilato de origem petroquímica é de US\$ 1-3/ kg.

Por conta das várias possíveis aplicações, a estimativa no começo do século em curso era de que a demanda de biossurfactantes alcançasse no futuro cerca de 10% do mercado dos surfactantes sintéticos, correspondendo a 200 milhões de dólares por ano (Hester, 2001; Mulligan, 2005).

7. Catalisadores de hidrotratamento (HDT)

Grandes quantidades de catalisadores são utilizadas na indústria de refino para o beneficiamento de vários derivados do petróleo (Marafi e Stanislau, 2008). Por exemplo, o mercado mundial de catalisadores de HDT é superior a 10^5 t/ano, dos quais cerca da metade é utilizada no processamento de destilados médios (Pacheco, 2008; Ferreira, 2010). Segundo Dufresne (2007), a estimativa é que a demanda mundial de catalisadores para a indústria de refino apresente crescimento em torno de 4% ao ano.

O hidrotratamento é um processo de refino que utiliza hidrogênio com a finalidade de remover impurezas do petróleo ou de suas frações (gases, naftas, querosene, diesel, gás, óleos para craqueamento, lubrificantes, parafinas, resíduos atmosféricos e de vácuo, etc.), de modo a garantir a sua estabilidade, bem como enquadrar os níveis de enxofre, particularmente na gasolina e no diesel. São consideradas impurezas: metais, heteroátomos como N, S, O e insaturações.

A remoção de nitrogênio e principalmente de enxofre se deve aos problemas ambientais causados pela emissão de NO_x e SO_x para a atmosfera pela queima de combustíveis. A emissão atmosférica de SO_x causa o envenenamento da fase ativa dos conversores catalíticos veiculares. Adicionalmente, na atmosfera, estes óxidos podem reagir com as partículas de água levando à formação da chuva ácida que em face da toxicidade compromete a vida dos seres humanos, plantas e animais, e contaminam rios, lagos, regiões costeiras marinhas, mangues, além de causar danos às construções, monumentos e veículos pela ação corrosiva. Os efeitos à saúde humana se devem principalmente a problemas respiratórios, sendo as exposições prolongadas e repetidas causas de inflamações crônicas. Ademais, o contato da chuva ácida com o solo pode levar à mobilização de metais que assim podem vir a contaminar os lençóis freáticos e reservatórios.

Os catalisadores são substâncias que possuem grande área superficial e que diminuem a energia de ativação de uma reação química, e por conseguinte aceleram a velocidade de reação. Particularmente para o processo de hidrotratamento, os catalisadores mais empregados são constituídos de óxidos ou sulfetos de metais de transição, tais como Níquel, Cobalto, Molibdênio, Tungstênio e Vanádio, combinados aos pares (NiW, CoW, e principalmente CoMo, NiMo), geralmente em suportes de

alumina (Al_2O_3) (Liu, Yu e Zhao, 2003). O suporte tem a função de fornecer uma superfície específica elevada, de modo que os componentes ativos estejam dispersos sob a forma de pequenas partículas, e desta forma, conferem melhor atividade nas reações de hidrogenação ou maior resistência térmica durante o uso.

Em geral, os óxidos de molibdênio e cobalto (CoMo) em alumina são os mais populares, por apresentarem alta seletividade, resistência aos contaminantes e pela facilidade de regeneração para mais utilizações (Gary e Handwerk, 2001). Tradicionalmente, estes catalisadores são os mais utilizados quando o interesse é a hidrodessulfurização de cargas procedentes da destilação atmosférica. Porém, para cargas advindas de processos de craqueamento catalítico, contendo elevados teores de compostos insaturados ou de compostos nitrogenados, os catalisadores de NiMo usualmente apresentam melhor desempenho.

Durante o processo HDT, ocorre a desativação do catalisador pelo ácido sulfídrico (H_2S), amônia, metais, olefinas e aromáticos (Leffler, 2000). Portanto, ao término da reação química, o catalisador deve ser regenerado para subsequente reutilização. No entanto, após alguns ciclos de regeneração, o catalisador tem sua atividade reduzida para níveis abaixo do aceitável, sendo o seu reuso não mais viável do ponto de vista técnico e econômico (Marafi, Hauserb e Stanislaus, 2007). Neste ponto, o catalisador esgotado deve ser substituído por um novo, podendo a vida útil variar de 1 a 3 anos (Afonso, Laiter e Góes, 1997; Afonso *et al.*, 2003).

Vários elementos químicos são encontrados em catalisadores esgotados de HDT no fim de seu ciclo. A origem desses elementos é variada, podendo ser atribuída à(s): (i) presença de metais nas próprias cargas de alimentação a serem tratadas na unidade de HDT (como exemplos, principalmente V, Ni, Ca, As, Na); (ii) uso de aditivos durante as operações de refino (ex.: Si, Pb); reações ocorridas no próprio catalisador; e (iii) corrosão dos equipamentos (ex.: Fe) (Marafi e Stanislaus, 2008).

É cada vez maior a quantidade de catalisadores esgotados gerada pelas refinarias em função tanto da queda da qualidade do óleo cru processado quanto das especificações de qualidade dos derivados, em vista da legislação ambiental cada vez mais restritiva. Por sua vez, os catalisadores esgotados de HDT, dada a sua periculosidade e a excessiva quantidade a ser disponibilizada, se constituem em um sério problema para o ambiente, o que faz com que as refinarias busquem

incessantemente uma forma de sustentabilidade. Há que se considerar ainda que os teores de metais em catalisadores superam, em geral, as quantidades presentes em minérios, portanto a obtenção de metais a partir de catalisadores tem interesse estratégico, já que poderia garantir o suprimento de metais nas próximas décadas (Afonso, Lajter e Góes, 1997).

7.1. Metais pesados em catalisadores de HDT esgotados

A presença de metais como Al, Mo, Ni e V nos catalisadores HDT são de grande valia e de uso intenso na indústria do aço, em concentrações expressivas e frequentemente superiores às encontradas em fontes naturais (Al-Dalama e Stanislaus, 2006). Logo, existe o interesse pela reciclagem dos catalisadores. Por exemplo, materiais contendo Ni e Cu são amplamente empregados industrialmente na manufatura de componentes eletrônicos, em eletrodeposição, no preparo de catalisadores e na síntese de produtos químicos (Afonso *et al.*, 2003). Adicionalmente, Co e Mo são de uso frequente na confecção de catalisadores que, por sua vez, constituem uma fatia considerável do mercado industrial.

A reciclagem, além de ser uma forma estratégica de garantir o suprimento de metais de valor comercial e, por conseguinte, de reduzir a dependência da sua importação, também representa uma alternativa para o gerenciamento de um rejeito de alto potencial poluente para solos, vegetais e lençóis freáticos (Lima, Campos e Afonso, 1998). Portanto, faz-se necessário desenvolver tecnologias adequadas de reciclagem para a recuperação dos metais de catalisadores desativados.

2. Justificativas

No passado, o objetivo principal das indústrias era obter a maior quantidade de materiais a um baixo custo, negligenciando tanto a sua qualidade quanto a quantidade de rejeitos gerados durante as etapas de processamento. No entanto, a partir de meados do século XX, mudanças comportamentais socioeconômicas e ambientais impuseram a adoção de medidas voltadas para um desenvolvimento sustentável.

No século XXI, o desafio visa privilegiar a qualidade e não tanto a quantidade e, ainda, conter ou minimizar a poluição do meio ambiente. Por isso, muitas empresas passaram a adotar um conjunto de medidas para a preservação do meio ambiente. Em particular, a indústria do petróleo por ser considerada mundialmente potencial fonte de poluição. A redução de enxofre no petróleo e derivados é primordial não apenas do ponto de vista ambiental, mas se constitui em um dos principais problemas relacionados a corrosão de equipamentos e tubulações, bem como da inativação de catalisadores empregados nas refinarias.

As refinarias brasileiras dispõem de unidades de hidrotratamento que permitem adequar os combustíveis, inclusive, aos padrões dos mercados europeu e norte-americano. De acordo com a legislação nacional em vigor, os combustíveis devem conter teor máximo de enxofre de 10 ppm (ANP, resolução nº 30, 2016).

Para adequação do teor de enxofre, o petróleo passa por um processo denominado hidrotratamento (HDT). Por reações de hidrogenação na presença de um catalisador, tem-se a remoção parcial de metais e heteroátomos tais como N, S, O, tanto de cargas brutas pesadas (petróleo) quanto dos produtos finais (destilados) (Lima, Campos e Afonso, 1998).

O catalisador compreende um suporte, em geral, constituído de óxidos refratários, tais como alumina, sílica, sílica-alumina ou magnésio, individualmente ou em mistura; um metal do grupo VI, de preferência Mo ou W; e um metal do grupo VII, Co ou Ni. Exemplos de catalisadores usados são: Co-Mo/Al₂O₃ ou Ni-Mo/Al₂O₃.

A vida útil do catalisador é bastante variável, de um a três anos. Nesse período, o catalisador é contaminado por vários elementos, particularmente, Al, Mo, Ni e V, o que resulta na perda da sua atividade catalítica (Lima, Campos e Afonso, 1998). Por isso, os catalisadores esgotados são classificados como resíduos de alta periculosidade. Apesar disso, não existem regras rígidas quanto à condução do descarte, devido à existência de vários tipos de catalisadores e processos industriais. De acordo com normas regulamentadoras da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1998, 1996) e da Comunidade Européia (CEE, 1999, 1996, 1991), para seu descarte, os catalisadores esgotados devem ser previamente submetidos a uma pré-oxidação a alta temperatura, seguindo depois para disposição em um aterro industrial para materiais classe I (perigosos).

Estima-se que o mercado global produza de 150.000 a 170.000 t/ano de catalisadores esgotados (Marafi e Stanislau, 2008). Há ainda que se considerar o descarte da ordem de 10.000 t/ano de catalisadores sem qualquer tratamento, basicamente em países do terceiro mundo, em aterros clandestinos sem qualquer norma de segurança, o que acaba levando a um comprometimento ambiental em curto prazo (Alves, 1998).

Neste cenário, a reciclagem dos catalisadores permitirá garantir um suprimento de metais de valor comercial nas próximas décadas e, por conseguinte, reduzir eventuais dependências de fornecedores externos, além de contribuir na proteção do meio ambiente. O emprego de Al, Co, Mo e Ni em catalisadores representa uma considerável fatia das aplicações industriais para esses elementos, como por exemplo, na utilização de diferentes suportes para processos de hidrotreamento (Marafi, Hauser e Stanislau, 2007) e na indústria siderúrgica na composição de ligas metálicas (Marafi e Stanislau, 2008). De acordo com estes autores, é possível recuperar os metais de valor agregado a partir da reciclagem dos catalisadores esgotados do processo de hidrotreamento pelo emprego de técnicas econômicas e sustentáveis.

O presente estudo pretende levantar dados que permitam contribuir para a recuperação de metais de catalisadores esgotados. Com este fim, espera-se mostrar a exequibilidade do emprego de biossurfactantes a despeito do que já vem sendo adotado com êxito em tecnologias para biorremediação de ambientes contaminados com metais (Slizovskiy, Kelsey e Hatzinger, 2011; Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2014; Pathaka e Nakhate, 2015). O interesse na interação de biossurfactantes com metais pode ser comprovado em uma simples busca a *Web of Science*, que mostra 160 publicações no tema no ano de 2012 (Mulligan, Shama e Mudhoo, 2014).

3. Objetivos

Este trabalho teve como propósito avaliar a recuperação de metais oriundos de resíduo da indústria do petróleo – catalisador esgotado do processo de hidrotreamento – por ação de biossurfactante aniônico natural, produzido por microrganismo em escala de bancada. Para fins comparativos, também serão testados dois produtos comerciais, um biossurfactante e um surfactante químico.

Para tal, os seguintes objetivos específicos foram analisados:

- Isolar microrganismo potencialmente produtor de biossurfactante a partir de amostra de água de recuperação secundária de petróleo;
- Produzir biossurfactante pelo cultivo em batelada de cepa isolada de *Bacillus subtilis* em açúcar cristal e nitrato de amônio, como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente;
 - Caracterizar o bioproduto obtido como agente tensoativo e emulsificante;
 - Avaliar a estabilidade do biossurfactante selecionado em diferentes valores de pH e temperatura, fixando a salinidade, comparativamente ao surfactante comercial;
 - Comparar o sequestro de metais pelo biossurfactante produzido e pelos produtos comerciais: biossurfactante (ramnolipídio) e surfactante químico (dodecil sulfato de sódio, SDS).

4. Materiais e Métodos

4.1. Microrganismos

Neste estudo, foi utilizada cepa de *Bacillus subtilis*, previamente isolada de água oriunda da recuperação secundária de petróleo, coletada na Refinaria de Duque de Caxias (REDUC)/ PETROBRAS. A área se localiza no Distrito Industrial de Campos Elíseos, no Município de Duque de Caxias, Estado do Rio de Janeiro, coordenadas geográficas 22°43'05.41”S (Sul) e 43°16'14.23”W (Oeste).

4.2. Manutenção das culturas

A cepa bacteriana foi mantida sob refrigeração, a cerca de $4 \pm 1^\circ\text{C}$, em tubos de ensaio contendo meio agar nutriente (Merck 105450) inclinado, através de repiques mensais (cultura estoque).

4.3. Meio de cultura

4.3.1. Meio mineral (Bushnell-Haas)

A seleção dos microrganismos potencialmente produtores de biossurfactante, foi realizada em meio mineral, sendo sua composição em g/L: sulfato de magnésio (0,20); cloreto de cálcio (0,02); fosfato de potássio monobásico (1,00); fosfato de potássio dibásico (1,00); nitrato de amônio (1,00) e cloreto férrico (0,05). O pH do meio foi ajustado em 7,0 com 1M NaOH e, em seguida, autoclavado em 1atm por 15 min.

4.3. 2. Meio de crescimento

A ativação e propagação do microrganismo foi realizada em caldo nutriente (Merck 105443), acrescido de glicose, sendo a composição final em g/L: glicose (5); peptona (5); extrato de carne (3) e extrato de levedo (3). O pH do meio foi ajustado em 7,0 com 1M NaOH e, em seguida, autoclavado em 1atm por 15 min.

4.3. 3. Meio de produção

A produção do biossurfactante foi realizada em meio definido por Valpuesta (2008), constituído em g/L de: NH_4NO_3 (1,4); KH_2PO_4 (3,0); Na_2HPO_4 (6,0); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01); acrescido de 10 g/L de açúcar cristal, como única fonte de carbono. Logo após ajuste do pH do meio para 7,0 com 1M NaOH, foi conduzida a sua esterilização em autoclave a 121°C por 15 min.

Antes do uso, os meios foram incubados em estufa bacteriológica por 24 h para prova de esterilidade.

4.4. Biossurfactante comercial

Utilizou-se o biossurfactante comercial aniônico JBR425, que contém 25% de uma mistura de mono-(R1) e di-(R2) ramnolipídios, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*, em solução aquosa. O biossurfactante comercial, mantido a 4°C, foi usado tal como recebido do fornecedor Jeneil Biosurfactant Company (USA).

Conforme definido pelo fabricante, o JBR425 apresenta as seguintes especificações: estrutura química [$\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{O}_9$ (R1), $\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{O}_{13}$ (R2), R2:R1=0,97:1]; Massa molecular = 576 g/mol; EHL=24; CMC =0,07 mM.

4.5. Surfactante químico

Foi testado dodecil sulfato de sódio (SDS) fornecido pela Indukern do Brasil Quimica Ltda com o nome comercial lauril éter sulfato de sódio.

O produto comercial, de fórmula química $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, apresenta 26-28% do princípio ativo e as seguintes propriedades físico-químicas: líquido; límpido incolor; pH =6,5-8; ponto de ebulição=100°C; MM=288,372 g/mol; densidade: 1,01 g/cm³; inflamável [110°C]; e miscível em água e álcoois inferiores.

4.6. Catalisador

Utilizou-se um catalisador comercial ($\text{CoMo}/\text{Al}_2\text{O}_3$) esgotado procedente de unidade de hidrotratamento, especificamente para a hidrodessulfurização de óleo diesel, de refinaria de petróleo nacional (**Figura 13**). Todos os ensaios foram realizados com o catalisador conforme recebido da refinaria, ou seja, com amostra pré-oxidada, por aquecimento em altas temperaturas, e por isso se apresentavam bem secas.



Figura 13: Partículas constituintes do catalisador: (A) antes e (B) após seu uso na unidade de HDT.

Conforme pode ser visualizada na **Figura 13B**, a amostra do catalisador HDT esgotado se apresentava constituída de partículas diferenciadas em tamanho e forma, variando de esferas a bastões, de coloração escura devida às impurezas nelas adsorvidas. Na **Figura 13A** pode ser observada a coloração verde clara do catalisador antes do uso na unidade de hidrotratamento.

Para separação do catalisador, a amostra bruta foi peneirada em peneira vibratória vertical (Pen Vibrat modelo PVA/IS) no Laboratório de Hidrometalurgia

CPMA-SPMB, CETEM/MCT, sendo empregadas peneiras padronizadas da série Tyler - malhas 1,68 mm (10 mesh) e 3,36 mm (6 mesh). A sequencia do peneiramento é mostrada na **Figura 14**.



Figura 14: Equipamento e etapas necessárias para separação do catalisador esgotado da amostra procedente da refinaria.



Figura 15: Aspecto macroscópico das diferentes frações do catalisador (A e B: fração >6 mesh; C e D: 10 < fração < 6 mesh; E e F: fração < 10 mesh).

O material de recheio (**Figura 15 A e B**), representando cerca de 30% do total da amostra, tem como finalidade adequar à distribuição da carga (diesel) através do catalisador. A observação da **Figura 15B** revela a presença de regiões claras e escuras no material de recheio, que podem ser atribuídas à coloração do óxido que o compõe, e à adsorção de impurezas advindas do processo de hidrotreatamento como, por exemplo, o sulfeto de ferro. As superfícies claras possivelmente foram resultantes do atrito pelo manuseio durante o fracionamento do catalisador.

A **Tabela 4** apresenta a caracterização química do catalisador HDT esgotado empregado neste estudo. A presença de altas concentrações de Al, Co e Mo no catalisador, se deve à sua composição química, já que é constituído de um suporte de alumina com inserção de cobalto e molibdênio (CoMo/Al₂O₃).

Tabela 4: Caracterização química do catalisador HDT esgotado.

Elementos Inorgânicos	Concentração (mg/kg)
Nitrogênio (como Nitrato)	1,99
Mercúrio	0,206
Alumínio	21.614,6
Arsênio	90,1
Bório	3,75
Boro	6,01
Chumbo	120,3
Cobalto	9.714,6
Cobre	556,6
Cromo	14,6
Ferro	8.484,4
Manganês	76,1
Molibidênio	16.083,3
Níquel	8733,0
Vanádio	120,2
Zinco	107,0
Sulfeto	181.000,00

4.7. Etapa experimental

4.7.1. Isolamento de microrganismos potencialmente produtores de biossurfactante

Para o isolamento de microrganismos potencialmente produtores de compostos tensoativos, uma amostra de 10 mL de água marinha oriunda da recuperação secundária

do petróleo foi inoculada em Erlenmeyer contendo 90 mL do meio mineral *Bushnell-Haas* líquido estéril adicionado de óleo cru, na concentração de 1% (v/v). A seguir, o cultivo foi incubado em mesa agitadora à 150 rpm, com controle de temperatura ($30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) por 5 dias

Após o período de incubação sob agitação, uma alíquota de 1 mL do meio líquido com crescimento celular foi inoculado em agar nutriente utilizando a técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 72 horas à $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As colônias predominantes foram transferidas pela técnica de esgotamento para novas placas de Petri com meio agar nutriente e a pureza das culturas foi determinada através de observações macroscópicas e microscópicas de preparações coradas pelo método de Gram, conforme apresentado na **Figura 16**, a seguir:

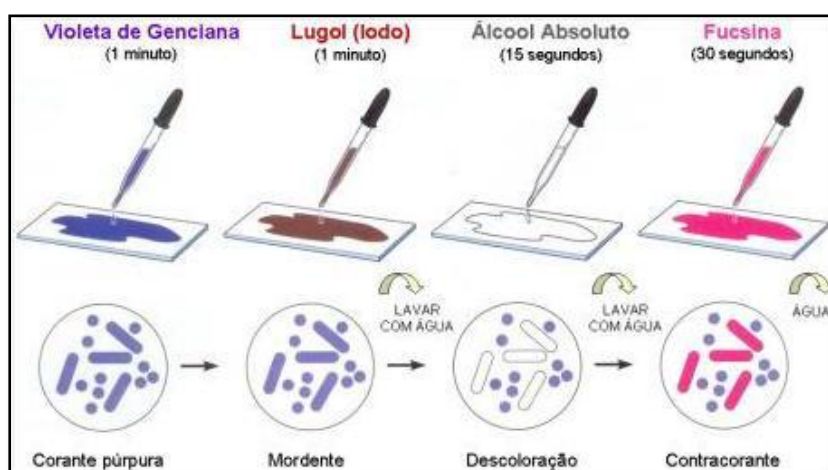


Figura 16: Esquematização da metodologia de coloração de Gram.

A determinação do potencial dos isolados bacterianos em produzir surfactante foi verificada pela análise da tensão superficial do meio de produção. A **Figura 17** ilustra as etapas realizadas durante o ensaio de isolamento.

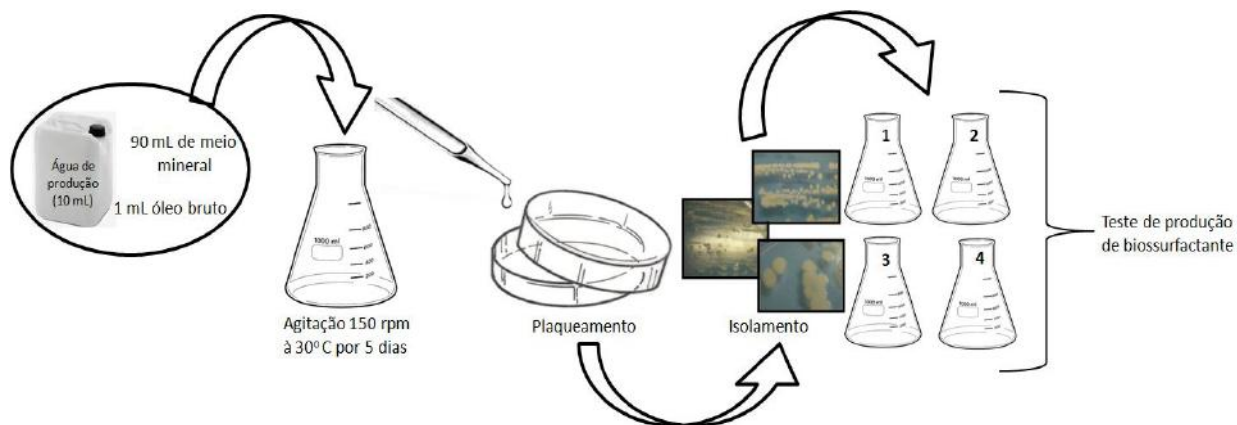


Figura 17: Esquematização do ensaio de isolamento de microrganismos produtores de surfactante.

O isolado bacteriano que apresentou a melhor capacidade de reduzir a TS do meio fermentado após 24 h de processo foi identificado por técnicas bioquímicas através do equipamento PhoenixTM, modelo 100 (Bencton & Dickinson). Estas técnicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), localizado na cidade de Niterói - RJ.

4.7.2. Produção do biossurfactante

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL de capacidade, contendo 200 mL do meio de produção. A incubação foi realizada a 30°C, sob agitação de 250 rpm, em agitador rotatório (Controlled Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co, USA), por 24 h.

Inicialmente, a ativação da cultura estoque foi realizada pelo repique em tubo de ensaio contendo o meio de cultura agar nutriente. Após incubação a 30 ±2°C por 24 h, duas alçadas da cultura ativada foram inoculadas em 200 mL do meio de crescimento contido em Erlenmeyer de 500 mL de capacidade. Os cultivos foram incubados em agitador rotatório a 250 rpm, com controle de temperatura (30 ±2°C) por 24 horas. Deste cultivo, tomou-se uma alíquota de 20 mL como inóculo bacteriano para o meio de produção. A fim de verificar a pureza da cultura, foram realizadas observações microscópicas de preparações coradas pela técnica de Gram em todas as etapas experimentais.

Findo o processo fermentativo, os mostos fermentados foram analisados quanto à tensão superficial, capacidade de hemólise, colapso de gota e deslocamento do óleo a fim de comprovar a produção de biotensioativo(s). Também foram feitas as

determinações de concentração micelar crítica (CMC), diluição micelar crítica (DMC) e índice de emulsificação (E_{24}), conforme descrições a seguir.

4.7.3. Avaliação das características do biossurfactante produzido

4.7.3.1. Ensaio hemolítico

Para avaliar a atividade hemolítica do biossurfactante produzido, alíquota de 5 μ L do meio de produção fermentado foi espalhada sobre ágar sangue de ovelha, 5% (v/v), em placa de Petri (Carillo *et al.*, 1996). Após incubação a 32°C por 48 h, foi determinada se havia presença de uma zona clara ao redor da colônia indicativa de lise das hemáceas (hemólise). Em caso positivo, foi feita a leitura do diâmetro do halo com auxílio de paquímetro.

4.7.3.2. Teste de colapso da gota (*drop-collapse technique*)

Este teste foi realizado seguindo a técnica descrita por Person e Molin (1987). Para tanto, uma lâmina de vidro foi primeiramente recoberta com fina camada de óleo do tipo árabe leve e, em seguida, na parte central foi disposta delicadamente uma gota do meio fermentado livre de células. A redução da tensão superficial faz com que a gota se espalhe pela superfície, não entrando em colapso. Deste modo, decorridos 60 s, a forma da gota foi analisada, considerando-se como resultado positivo a alteração do feitio da gota em relação a observação inicial; e negativo, quando não era perceptível alteração da forma. Para fins comparativos, também foram testados o surfactante comercial e água destilada.

Conforme indicado pelos autores, antes do uso, as lâminas de vidro foram lavadas com água quente, etanol e água destilada, três vezes cada, e por fim secas em estufa.

4.7.3.3. Teste de deslocamento de óleo (*oil spreading assay*)

Este teste, que tem como base a diferença de polaridade entre o biotensoativo e o óleo (Morikawa, Hirata e Imanaka, 2000), consiste em dispor delicadamente uma alíquota de 10 μ L do meio fermentado livre de células sobre fina camada superficial de óleo cru (20 μ L) recobrendo 50 mL de água destilada em placa de Petri (90 x 10 mm).

Como controle positivo, foram utilizados 10 µL de solução 5% (v/v) de SDS e 10 µL de solução 1% (v/v) de JBR425, enquanto para o controle negativo foi utilizada alíquota de igual volume (10 µL) do meio de produção não inoculado.

Se houver tensoativo na alíquota em teste, haverá deslocamento do óleo, com formação de uma zona clara. O diâmetro da zona clara sobre a camada de óleo pode ser correlacionado à atividade do surfactante. O teste foi realizado à temperatura ambiente, sendo o diâmetro medido visualmente.

4.7.3.4. Determinação do índice de emulsificação

A capacidade emulsificante foi realizada seguindo a técnica descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Com este fim, 2 mL do meio fermentado livre de células foram adicionados a igual volume (2 mL) de um composto apolar em tubo de vidro (13 mm de diâmetro) e tampa de rosca. No presente trabalho foram testados como composto apolar: óleo bruto, n-hexadecano, óleo mineral comercial.

As misturas (meio fermentado com cada composto apolar) foram agitadas em vortex em alta agitação por 2 min, sendo a seguir os tubos acondicionados gentilmente em estante, onde foram deixados em repouso à temperatura ambiente por 24 h. O índice de emulsificação corresponde a camada estável de emulsão que se evidencia após o repouso, representado por E_{24} . Para seu cálculo devem ser determinadas as alturas totais de coluna líquida e da emulsão, e correlacioná-las segundo a equação:

$$E_{24} = [\text{altura da camada emulsionada (mm)} / \text{altura total da coluna do líquido (mm)}] \times 100$$

Para fins comparativos, foi efetuada a determinação de E_{24} para óleo de soja com o biossurfactante produzido (mosto fermentado), solução de 5% (v/v) SDS e 1% (v/v) JBR425. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultura estéril em substituição às soluções aquosas dos surfactantes.

4.7.4. Estabilidade do biossurfactante

A estabilidade do produto obtido foi avaliada quanto aos parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e salinidade) afim de verificar sua interferência isoladamente e/ou em conjunto. Realizou-se um planejamento experimental, tendo dois fatores combinados (pH e temperatura) em dois níveis (máximo e mínimo), em um

experimento fatorial 2x2. Amostras do meio fermentado livre de células ajustado a salinidade de 3% (m/v), foram submetidas a valores de pH ácido, neutro e básico em combinação com temperaturas de 4°C e 100°C por 1 h. Depois de 24 h foram feitas as determinações de tensão superficial pelo método Du-Nouy no tensiômetro Krüss GmbH (modelo K11-Mk3). Este valor de salinidade foi adotado para verificar possíveis aplicações do tensoativo em ambientes marinhos, como, por exemplo, na recuperação de petróleo em reservatórios *offshore*.

Tabela 5: Valores reais do planejamento experimental utilizado para estudo da estabilidade do tensoativo produzido em escala laboratorial por isolado de *Bacillus subtilis*.

Experimento	pH	Temperatura (°C)
1	5,0	4
2	9,0	4
3	5,0	100
4	9,0	100
5	7,0	52
6	7,0	52
7	7,0	52

4.7.5. Aplicação do biossurfactante na recuperação de metais

O biossurfactante (BS) obtido no presente trabalho foi testado quanto à capacidade de recuperação de metais de catalisadores HDT esgotados. Para fins comparativos, foram conduzidos simultaneamente ensaios com soluções de ramnolípídio comercial (1% v/v) e do tensoativo sintético SDS (5% v/v), nas mesmas condições operacionais.

No caso do teste com o BS obtido foram preparadas misturas de catalisador e mosto fermentado livre de células, na proporção de 1:10, conforme descrito por Mulligan e Gibbs (1993). Após 1h de agitação em shaker (100 rpm), a perda de água foi

contabilizada e igual volume de água desmineralizada foi acrescida aos sistemas experimentais. A fração líquida foi separada por filtração e analisada para quantificação dos metais em solução.

Também foi realizado um ensaio controle (catalisador e meio estéril ou água estéril), isto é, na ausência de tensoativo, de modo a verificar a remoção de metais por processo físico. Os resultados finais de remoção foram calculados descontando a remoção por processo físico e expressos em percentagem de remoção de metal.

4.8. Determinações Analíticas

4.8.1. pH

As medições de pH foram realizadas, adotando uma alíquota do mosto fermentado livre de células, em potenciômetro digital de bancada (DIGIMED, modelo DMPH-1).

4.8.2. Tensão Superficial

As medições da atividade superficial do mosto fermentado livre de células foram realizadas de modo direto empregando duas diferentes técnicas.

Na etapa de caracterização do biossurfactante produzido, as medidas de TS foram feitas com auxílio de goniômetro Krüss DAS100 (Modelo OF 3210) pelo método da gota pendente, descrito por Song e Springer (1996). Em consonância ao protocolo, a umidade relativa foi mantida em 55% e a temperatura a 25°C.

A medição se dá por método óptico, com uma gota do líquido que pende de um tubo capilar. O perfil da gota é função do raio do tubo, da tensão, da densidade do líquido e do campo gravitacional.

A análise da gota pendente se deu mediante um sistema de processamento de imagem obtida pelo aparelho acoplado a um computador, onde a curvatura do perfil de cada gota pendente foi analisada, e que corresponde a tensão superficial ou interfacial. Os resultados foram expressos em valores médios de no mínimo cinco determinações para cada amostra analisada.

Para os testes de estabilidade do biossurfactante produzido foi utilizado o método do anel Du-Nouy-Ring que tem como base a medida da força necessária para elevar o anel de platina na interface do sistema líquido/ar (tensão superficial) ou líquido/líquido de polaridades distintas (tensão interfacial) (Tados, 2005). Quanto maior a força, maior a tensão superficial ou interfacial. Para cada medição, foi utilizado volume de 30 mL da solução do surfactante e as análises realizadas em ambiente climatizado a 25°C (± 2 °C).

Foram realizadas pelo menos cinco leituras para cada amostra, e os resultados expressos em valores médios. Entre as medições, o anel foi aquecido em chama e rinsado com água e acetona de modo a garantir ausência de impurezas.

4.8.3. Concentração do Biossurfactante

A concentração do biossurfactante no mosto fermentado previamente centrifugado para remoção das células foi determinada seguindo duas distintas metodologias:

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)** – determinação feita conforme adaptação dos protocolos descritos por Bence (2011) e Ellouze-Chaabouni e Ghribi (2013), e efetuada por Guimarães (2015). As condições operacionais estão especificadas na **Tabela 6**. A concentração do BS produzida deve ser calculada a partir da correlação das áreas de picos da amostra e da surfactina comercial padrão (Sigma-Aldrich), cuja curva encontra-se em Anexo. Além de quantificar, esta metodologia permite a detecção de homólogos.

Para análise, alíquota do mosto fermentado livre de células foi diluída em acetonitrila (500 μ L: 500 μ L), filtrada em seringa Nylon 0,22 μ m de porosidade, e então injetada no equipamento.

Tabela 6: Condições operacionais para quantificação do biosurfactante produzido por CLAE. Fonte: Guimarães, 2015.

Especificações do CLAE	
Coluna	C ₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Detector	UV
Fase Móvel	20% de ácido trifluoroacético (3,8 mM) e 80% de acetonitrila
Fluxo	1 mL/min
Absorbância	210 nm
Temperatura	30°C

- **Diluição Micelar Crítica (DMC)** – quantificação indireta da surfactina no mosto fermentado livre de células. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas do mosto fermentado livre de células e determinados os respectivos valores de TS pelo método da gota pendente, descrito anteriormente (**item 4.8.2**). Estes valores foram plotados em gráfico TS *versus* diluições e então determinado o ponto de inflexão da curva que corresponde a DMC. Quanto menor for o valor da DMC, maior será a diluição necessária para causar a mudança da tensão superficial e, portanto, maior a concentração do bioproduto no meio.

4.8.4. Concentração dos metais

A quantificação dos metais foi realizada por espectrometria de massa acoplada a uma fonte de plasma indutiva (ICP-MS), na UFRS, empregando a técnica de padrão interno com o elemento químico índio (¹¹⁵In), de modo que as concentrações finais tanto nos padrões como nas amostras e no controle, fossem de 20 µg/L. Este elemento (In) foi selecionado por não estar nas matrizes a serem analisadas. Desta forma, as interferências geradas pelas mudanças na taxa de aspiração e nebulização, instabilidade eletrônica do instrumento e efeitos da matriz, poderão ser corrigidas para melhor exatidão e repetitividade das análises.

5. Resultados

5.1. Análise da seleção de microrganismos produtores de biossurfactante






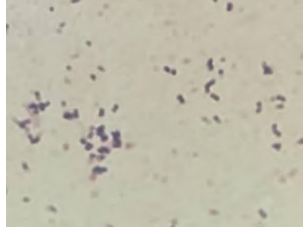

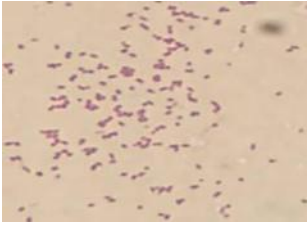
Após uma amostra de 10 mL de água marinha oriunda da recuperação secundária do petróleo ser inoculada em meio mineral *Bushnell-Haas* líquido estéril adicionado de óleo cru e incubado por 5 dias, conforme ítem 4.7.1, pode-se observar que a microbiota da água utilizada apresentou crescimento, caracterizado pela turvação do meio em relação ao controle (sem adição de água do petróleo), e alteração do filme de óleo.



Figura 18: Visualização do crescimento de microrganismos presentes na água de recuperação de petróleo tendo óleo bruto como única fonte de carbono: teste controle sem adição de água do petróleo (A) e com adição da água após 5 dias de incubação (B).

Com base nas diferenças morfológicas foram obtidos 4 isolados bacterianos predominantes a partir do cultivo da amostra de água de recuperação secundária de petróleo, os quais também foram analisados microscopicamente, relevando predominância de bastonetes em sua maioria Gram-positivos (**Quadro 5**).

Quadro 5: Observação macroscópica e microscópica dos isolados bacterianos predominantes na água de produção de petróleo e avaliação de sua capacidade de redução da tensão superficial.

Isolado	Observação Macroscópica	Observação Microscópica	Tensão Superficial (mN/m)
(1)			59,4
(2)			48,5
(3)			30,2
(4)			42,1

O isolado 3 foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de produção em aproximadamente 50% quando comparado ao meio não fermentado, em apenas 24 h de cultivo. Ao passo que os isolados 1, 2 e 4 reduziram a TS do meio em 4,2%, 21,7% e 32,1%, respectivamente. Deste modo, o isolado 3 foi adotado como único microrganismo para as posteriores etapas deste trabalho e a sua identificação se deu por variados testes bioquímicos, os quais são apresentados no **Quadro 6**.

Quadro 6: Testes bioquímicos realizados para identificação de espécie do isolado bacteriano que mais reduziu a tensão superficial do meio fermentado.

Teste bioquímico	Resultado real	Resultado esperado <i>B.subtilis</i>
A_Arginine-Arginine	-	-
A_Glycine-Proline	-	-
A_L-Alanine	-	-
A_L-Arginine	+	+/-
A_L-Histidine	-	-
A_L-Isoleucine	-	-
A_L-Leucine	+	+/-
A_L-Phenylalanine	-	+/-
A_L-Proline	-	-
A_L-Pyroglutamic Acid	-	+/-
A_L-Tryptophane	-	-
A_Metronine	-	-
C_3-Methyl Glutaric Acid	-	+
C_Colistin	-	-
C_D-Fructose	+	+
C_D-Gluconic Acid	+	+
C_D-Mannitol	+	+
C_Iminoacetic Acid	-	+
C_Ketoglutaric Acid (A)	+	+
C_3-Methyl Adipic Acid	+	+
C_Polymyxin B	-	-
C_Thymidine	-	-
M_4-Methylumbelliferyl	-	+/-
M_4-Methylumbelliferyl	-	+/-
M_4-Methylumbelliferyl	-	-
M_4-Methylumbelliferyl	-	-
M_4-Methylumbelliferyl	+	+
M_4-Methylumbelliferyl	-	-
M_4-Methylumbelliferyl Phosphate	+	+/-
M_4-Methylumbelliferyl Phosphate	+	+
N_Alanine-Alanine p-Nitroalanine	+	+/-
N_L-Proline-p-Nitroanilide	+	+
N_Valine-Alanine p-Nitroanilide	+	+
P_p-Nitrophenyl-a-D-Glucoside	+	+
P_p-Nitrophenyl Phosphate at pH	+	+
R_B-Gentiobiose	-	-
R_Dextrose	+	+
R_D-Sucrose	+	+
R_D-Togatoose	-	-
R_D-Techalose	+	+/-
R_Maltose	-	-
R_N-Acetyl-Glucosamine	-	-
S_Urea	-	-
T-Esculin	+	+
Methyl-a-Glucopyranoside	+	+/-

5.2. Caracterização do biossurfactante produzido pela cepa isolada

O meio de produção empregado neste estudo, cuja composição química (ítem **4.3.2**) se deu por padronização prévia pelo nosso grupo com base em planejamento experimental, foi analisado anteriormente à adição de inóculo bacteriano e após 24 e 48 horas de ensaio fermentativo.

A atividade hemolítica da cultura bacteriana isolada foi testada a fim de ratificar sua capacidade de produção de tensoativo. Conforme pode ser observado na **Figura 19**, as colônias resultantes do plaqueamento pela técnica de espalhamento em superfície (*spread plate*) em agar sangue, apresentaram regiões claras no seu entorno, características de lise das hemáceas. Logo, pode-se inferir que houve alteração no equilíbrio físico-químico da membrana das hemácias pela ação de substâncias com propriedade tensoativa.

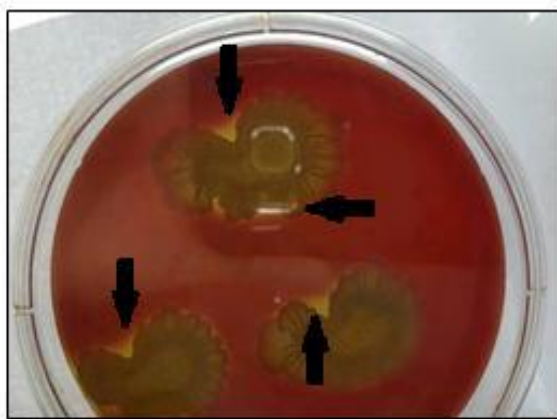


Figura 19: Crescimento da cepa *B. subtilis* isolada, proveniente de mosto fermentado, em placa contendo agar sangue de ovelha (5% v/v). As setas indicam regiões claras, indicativas de hemólise das hemáceas.

A atividade tensoativa do biossurfactante produzido foi analisada pelo teste do colapso da gota. Para fins comparativos, o teste foi feito simultaneamente com uma gota do biossurfactante produzido em laboratório, com biossurfactante comercial JBR425 diluído (1% v/v) e surfactante comercial SDS diluído (5% v/v). A **Figura 20** permite observar que houve interação do biossurfactante produzido em laboratório e a superfície hidrofóbica da camada de óleo árabe leve, embora diferente quando comparada aos tensoativos comerciais.

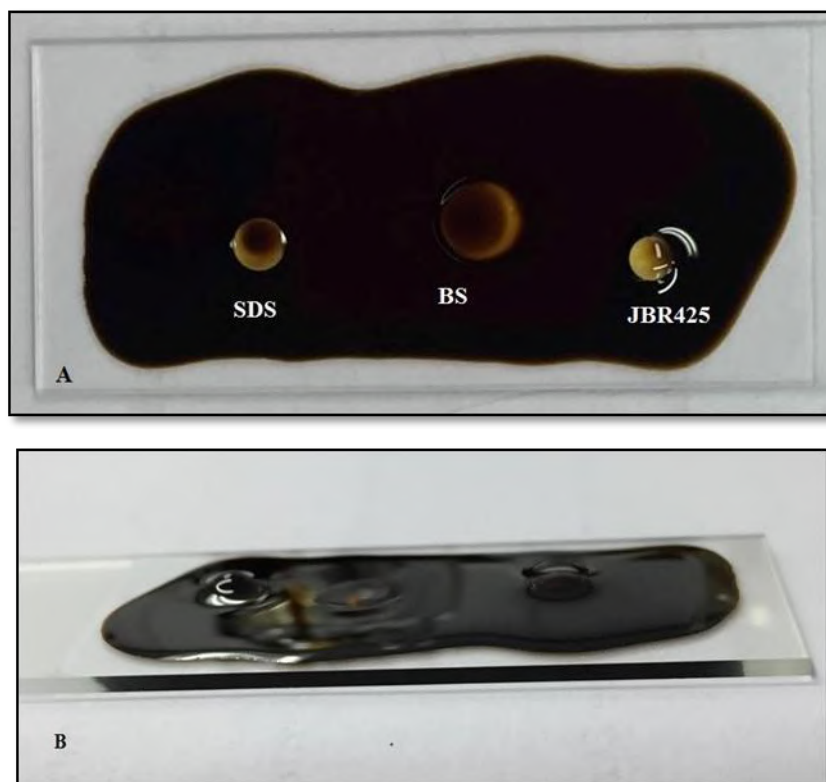
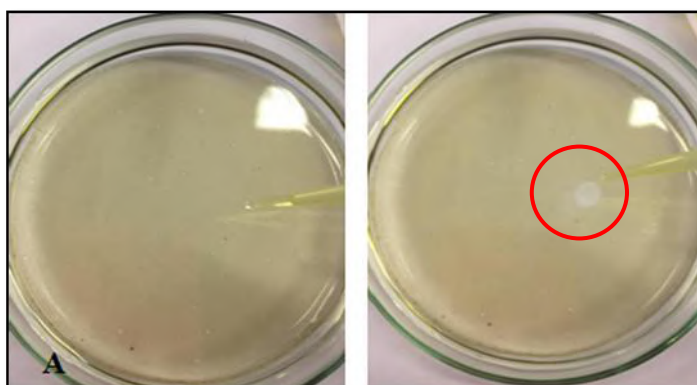


Figura 20: Visualização superior (A) e planar (B) da interação dos diferentes tensoativos e o filme de óleo cru.

Outro método analítico para biossurfactantes quanto as suas propriedades é o teste de deslocamento de óleo, cujos resultados deste trabalho são apresentados na **Figura 21**. Quando o biossurfactante produzido em laboratório foi gotejado, observou-se a formação de uma pequena área de repulsão no centro da fina camada de óleo formada sobre água destilada (destacada pelo círculo em vermelho). Contudo, quando adicionado os surfactantes comerciais o halo formou-se mais rapidamente e de maior diâmetro.



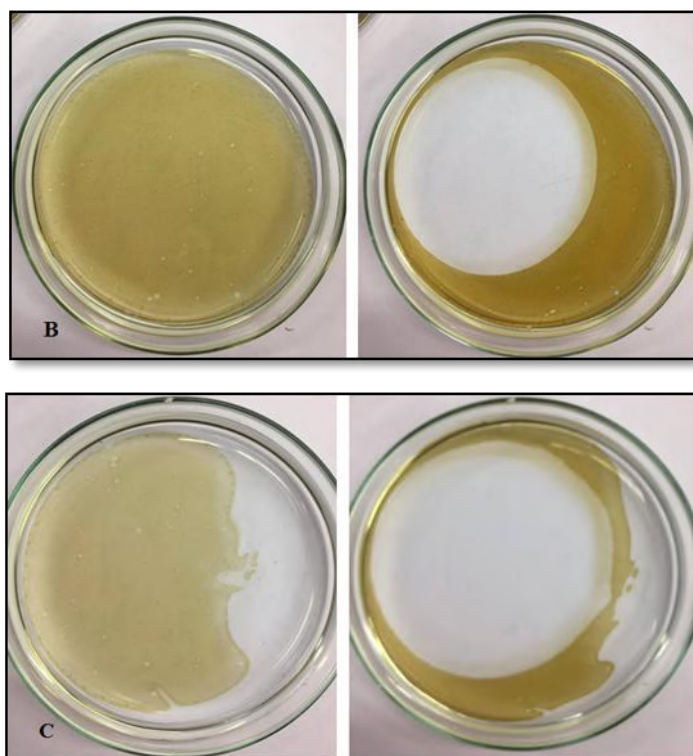


Figura 21: Interação do biotensoativo produzido em laboratório (A), do ramnolípídeo comercial (B) e do tensoativo sintético SDS (C) com fina camada de óleo cru.

Os resultados da capacidade emulsificante do biosurfactante produzido indicaram boa atividade quando em contato com óleo mineral e, especialmente nos testes quando utilizado n-hexadecano (**Tabela 7**). A **Figura 22** ilustra as emulsões formadas após brusca agitação e após 24 h de repouso.

Tabela 7: Índice de emulsificação (E_{24}) do biosurfactante produzido frente aos diferentes compostos apolares.

Produtos testados	E_{24} (%)
Óleo bruto	10,7
Óleo mineral	58,0
n-hexadecano	38,8

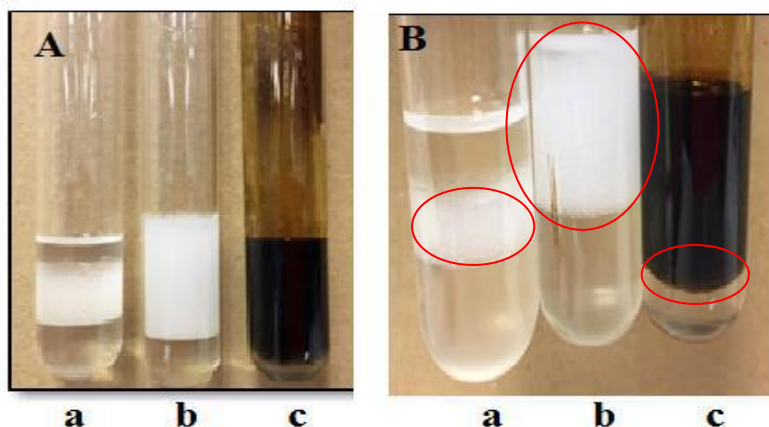


Figura 22: Emulsões obtidas pelo contato do biossurfatante produzido frente a n-hexadecano(a), óleo mineral comercial (b) e óleo cru (c), logo após agitação em vortéx por 2 min (A) e decorridas 24 h de repouso (B).

A atividade emulsificante do biossurfactante também foi testada em óleo de soja. Neste caso, para fins comparativos também foram avaliadas amostras diluídas dos surfactantes comerciais, SDS e JBR425, e da água como controle negativo. O melhor resultado foi alcançado com o emprego do surfactante químico, embora em concentração bem superior a dos biossurfactantes (**Tabela 8**). Entretanto, os biossurfactantes, produzido no laboratório e comercial, apresentaram igual comportamento.

Tabela 8: Índice de emulsificação dos tensoativos frente ao óleo de soja.

Produtos testados	E_{24} (%)
H₂O	0
Mosto Fermentado (BS produzido)	35,0
JBR (1%)	35,0
SDS (5%)	62,0

Na **Figura 23** podem ser observadas as emulsões formadas logo após agitação e 24 h depois. A exceção da água, todos os tensoativos testados apresentaram capacidade emulsificante.

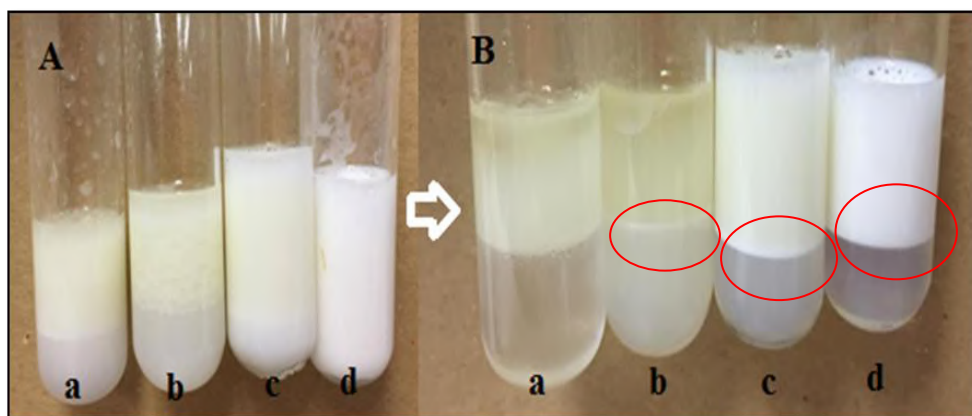


Figura 23: Emulsões obtidas pela mistura óleo de soja com: (a) água; (b) mosto fermentado livre de células – biossurfactante; (c) JBR 1% e (d) SDS 5%, logo após agitação em vórtex por 2 min (A) e decorridas 24 h de repouso (B).

A **Tabela 9** apresenta os valores de tensão superficial para o meio fermentado livre de células (biotensoativo produzido), bem como para diferentes concentrações do biossurfactante comercial (JBR 425) e do tensoativo químico (SDS). O valor da tensão superficial para o mosto fermentado por 24 horas foi de 30,2 mN/m, sendo valor similar observado em 48 horas de processo. Os tensoativos comerciais foram analisados nas concentrações de 1 e 5%, e os resultados relevaram que não houve diferença estatística para as tensões superficiais em ambas concentrações do mesmo produto.

Tabela 9: Valores de tensão superficial para diferentes amostras de surfactantes, produzido (mosto fermentado), biossurfactante comercial (JBR425) e surfactante químico (SDS).

Amostra Analisada	Tensão superficial (mN/m)
Água	72 ±0,8
Meio não fermentado	62 ±0,2
Meio fermentado (24 h)	30,2 ±0,3
Meio fermentado (48 h)	29,8 ±0,2
JBR (1%)	28,7 ±0,5
JBR (5%)	26,2 ±1,2
SDS (1%)	34,4 ±0,6
SDS (5%)	33,2 ±0,6

Na tentativa de quantificação do tensoativo produzido pelo isolado de *Bacillus subtilis*, diferentes diluições seriadas foram analisadas quanto à tensão superficial, e então calculou-se o valor da diluição micelar crítica (DMC). Os valores obtidos foram plotados em gráfico TS *versus* diluição, apresentado em anexo, cujo ponto de inflexão da curva que corresponde ao valor da DMC, o qual equivaleu a 238,7 mg/L.

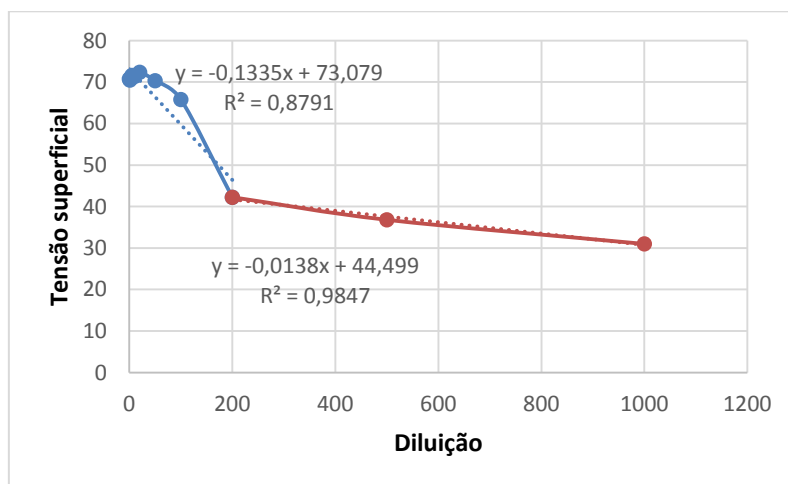


Gráfico 1: Curva de calibração para diluição micelar crítica para biossurfactante produzido.

A fim de quantificar e detectar homólogos de surfactina presente no meio fermentado, através de CLAE, este foi preparado e introduzido no aparelho conforme ítem **4.8.3**. O cromatograma obtido está representado no **gráfico 2** e foi comparado ao cromatograma obtido pela surfactina comercial Sigma-Aldrich (**Anexo 1**).

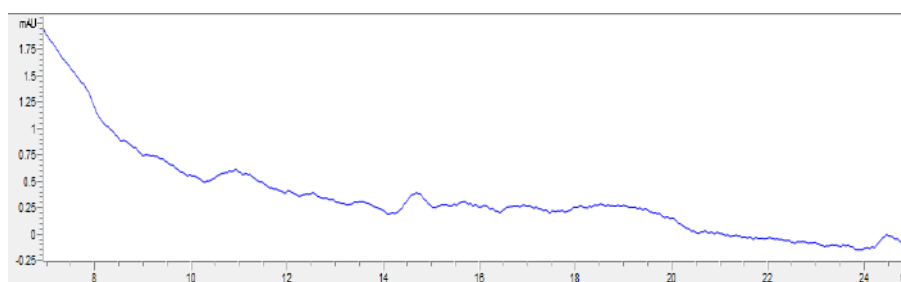


Gráfico 2: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para biossurfactante produzido.

A **Tabela 10** mostra os resultados de TS obtidos para os vários experimentos do planejamento experimental adotado para análise da estabilidade do produto obtido em laboratório. Pode-se observar que não houve grande diferença da tensão superficial do

mosto fermentado para as diversas condições avaliadas, o valor máximo obtido foi de 30,21 mN/m para a condição de pH 5 e aquecimento a 100°C e o mínimo foi de 28,08 mN/m para condição de pH 7 e aquecimento a 48°C, ambos com salinidade ajustada a 3%. Assim, não se fez possível a realização de ANOVA (variância amostral) e de gráficos de superfície de resposta.

Tabela 10: Análise da tensão superficial de amostras de mosto fermentado livre de células submetido a condições extremas de pH e temperatura, à salinidade 3,0%.

Experimento	pH	Temperatura (°C)	TS (mN/m)
1	5,0	4	30,11 ±0,2
2	9,0	4	28,30 ±0,1
3	5,0	100	30,21 ±0,3
4	9,0	100	29,57 ±0,2
5	7,0	52	28,44 ±0,1
6	7,0	52	28,08 ±0,2
7	7,0	52	28,20 ±0,1

A visualização da estabilidade da espuma produzida pelo mosto fermentado, quando agitado, é apresentada na **Figura 24**. Pode-se notar que após o processo fermentativo a espuma mostrou-se robusta e consistente, alcançando altura de 190mm (**Figura 24A**), contudo quanto deixada em descanso por 24 horas após descongelamento do mosto, a coluna de espuma foi de 97mm (**Figura 24B**).

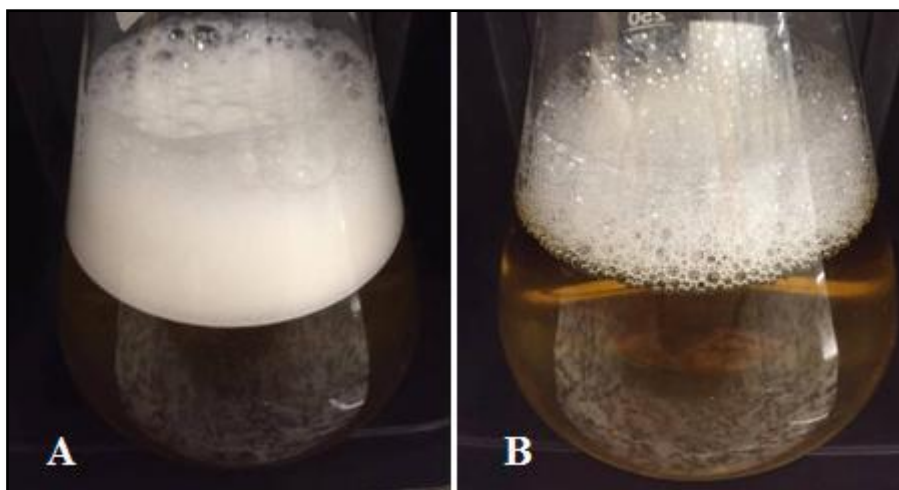


Figura 24: Avaliação da estabilidade da espuma após 24 horas de processo em temperatura ambiente (A) e 24 horas após descongelamento (B).

5.3. Aplicação de biossurfactantes na recuperação de metais a partir de catalisador esgotado

Os ensaios foram realizados como descrito nos ítems **4.7.5** e **4.8.4** visando avaliar a capacidade de um biotensoativo produzido em laboratório e tensoativos comerciais em remover metais de um suporte esgotado. A molécula tensoativa é capaz de se ligar ao metal por diferença de polaridade de modo a agir como sequestrante, retirando-o do suporte em que estava adsorvido.

Pode-se observar após análise dos resultados que os metais que mais foram sequestrados pelos tensoativos foram: Al, Fe e Ni. O biossurfactante produzido mostrou-se capaz de retirar Al do catalisador de maneira tão eficiente quando o ramnolípídeo comercial. O mesmo não pode ser observado quando as concentrações de cromo (Cr) na fase aquosa foram obtidas, visto que o tensoativo que melhor foi capaz de recuperá-lo foi o tensoativo sintético SDS. Outro valor de recuperação satisfatório compreende a recuperação de cobalto (Co) pelo biossurfactante produzido quando comparado ao sequestro por JBR425, o qual seria interessante para a recuperação de catalisadores esgotados em unidade de hidrotreatamento devido as altas concentrações deste metal.

Tabela 11: Concentrações de metais, oriundos de catalisadores, na fase líquida após ensaio de recuperação, utilizando diferentes tensoativos

Analíto	Meio de produção fermentado (mg L ⁻¹)	Meio de produção não fermentado (mg L ⁻¹)	JBR 1% (mg L ⁻¹)	SDS 5% (mg L ⁻¹)
Al	1316 ± 118	902 ± 10	1266 ± 54	823 ± 91
As	1,6 ± 0,2	0,81 ± 0,01	1,15 ± 0,05	0,68 ± 0,04
Cd	0,8 ± 0,1	0,42 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,6 ± 0,1
Co	0,9 ± 0,1	0,77 ± 0,01	0,25 ± 0,09	0,13 ± 0,06
Cr	0,21 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,28 ± 0,04
Fe	1676 ± 155	780 ± 10	1217 ± 38	892 ± 31
Ni	1451 ± 150	867 ± 12	1120 ± 54	1127 ± 132
Pb	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Sb	20 ± 1	11,0 ± 0,2	11 ± 2	22 ± 3
Mn	21 ± 4	12,0 ± 0,6	14 ± 1	18 ± 1
Cu	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,02
Zn	12 ± 1	8 ± 1	10,4 ± 0,4	25 ± 1

6. Discussão

Assim como os surfactantes quimicamente sintetizados, os surfactantes de origem microbiana também apresentam vasto campo de aplicação que, devido às suas características de biodegradabilidade e baixa toxicidade, possivelmente seja maior quando comparado ao dos primeiros. Em particular no setor petroquímico, os surfactantes podem ser empregados na recuperação de óleo de reservatórios rochosos, facilitador do transporte de óleos e derivados em oleodutos, auxílio no tratamento de ambientes impactados por derrame de petróleo, sequestrante de metais, entre outros (Nitschke e Pastore, 2012; Silva *et al.*, 2015; De Almeida *et al.*, 2016).

Em face da capacidade de várias espécies microbianas de produzir biosurfatantes de estruturas químicas diversas, tem sido dada grande importância ao isolamento de microrganismos potencialmente produtores. Em geral, amostras são coletadas em locais contaminados com compostos hidrofóbicos como, por exemplo, ambientes contaminados com petróleo e seus derivados (Amorim, *et al.*, 2014; Marajan,

Talib e Bin, 2014; Christofi e Ivshina, 2002). Essa escolha se baseia nos aspectos fisiológicos dos processos degradativos que ocorrem em ambientes impactados com compostos orgânicos, visto que, existem microrganismos capazes de sobreviver nestas condições adversas e, até mesmo, utilizar o contaminante em seus processos metabólicos (Andrade Silva *et al*, 2014).

Geralmente, os hidrocarbonetos são utilizados como fonte de carbono para o crescimento celular, ou seja, aumento da biomassa (Moreira e Siqueira, 2006). A produção de biossurfactantes, entre outras funções, é uma das formas encontradas pelos microrganismos para conseguir metabolizar os hidrocarbonetos. A parte lipofílica (característica apolar) do biossurfactante se liga ao contaminante (também com característica apolar), facilitando assim, a sua entrada (pinocitose) na célula, e sua posterior metabolização (Atlas e Raymond, 1997). Diversos gêneros e espécies isoladas de ambientes oleosos foram descritos por apresentarem elevados rendimentos de tensoativos quando inoculado em meios de produção apropriados.

No presente trabalho, água de recuperação secundária de petróleo foi utilizada como fonte de isolamento de microrganismos produtores de biossurfactante. Este método de recuperação do petróleo consiste em injetar água do mar, adicionada ou não de polímeros sintéticos, no reservatório rochoso quando este apresenta baixa ou nenhuma pressão interna capaz de elevar o óleo à superfície, melhorando os níveis de óleo recuperado (Curbelo, 2006). Estima-se que, a recuperação primária do petróleo recupere apenas 10 a 30% do volume total de óleo contido no reservatório (Borges, 2009). Cabe destacar que, mesmo após os rigorosos processos de separação óleo/água, uma pequena fração oleosa permanece na água produzida, ao passo que também há o arraste de água junto ao óleo para os dutos de transporte e tanques de estocagem.

Com base nas diferenças morfológicas foram obtidos quatro isolados bacterianos a partir do cultivo de amostra de água de recuperação de petróleo oriunda de reservatório nacional. Contudo apenas um isolado foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de cultura em torno de 50%, o qual foi identificado como pertencente à espécie *Bacillus subtilis*. Em sua pesquisa de diversidade microbiana, Lopes (2010) descreveu a predominância de espécies do gênero *Bacillus* em água de produção coletadas em reservatórios de petróleo localizados na Bacia de Campos - RJ. Embora o fornecedor não tenha informado a origem da amostra da água, dados

disponíveis no site da Companhia permitem deduzir que neste estudo empregou-se água produzida por ao menos um daqueles reservatórios de petróleo investigados por Lopes.

A surfactina, principal produto tensoativo produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*, é um biossurfactante muito efetivo, capaz de reduzir a tensão superficial da água a valores abaixo de 30 mN/m, mesmo em baixas concentrações (Barros *et al.*, 2007). Apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina na década de 60, poucos estudos foram realizados a respeito de suas aplicações (Sen, 2010; Barros *et al.*, 2007). As características químicas e propriedades funcionais permitem evidenciar o grande potencial dessa substância para aplicação em diversos segmentos industriais como uma alternativa atraente para substituir os surfactantes sintéticos.

A redução da tensão superficial por cultivo de isolado de *Bacillus subtilis*, em meio de cultura contendo açúcar cristal e nitrato de amônio como fontes economicamente viáveis de carbono e nitrogênio, respectivamente, se mostrou eficaz em apenas 24 h de processo fermentativo. Na busca de melhores resultados, os ensaios foram conduzidos até 48 h de fermentação, contudo não houve melhoria significativa na redução da tensão superficial. Não se pode afirmar que o tempo de processo não tenha melhorado o rendimento do isolado bacteriano na produção de biossurfactante, visto que concentrações de BS acima da concentração micelar crítica não são detectadas pela análise da tensão superficial. Estudo realizado por Nitschke e Pastore (2006), também utilizando cepa de *Bacillus subtilis* (LB5a), apresentou resultados de redução da TS semelhantes ao obtido neste trabalho.

Estes autores utilizaram a manipueira, um resíduo aquoso da mandioca, como fonte nutricional, com intuito de avaliar o sobrenadante do meio de cultivo como biocida para espécies bacterianas patogênicas, entre elas *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. Apesar dos biossurfactantes agirem na membrana celular de microrganismos de modo semelhante aos surfactantes sintéticos, a atividade biológica da surfactina da linhagem de *B. subtilis* isolada pelos autores mostrou-se mais elevada que a surfactina comercial.

Na busca por baixo custo de produção aliado à sustentabilidade e alto rendimento, este processo de produção tornou-se eficiente em escala laboratorial, sendo promissor para aplicação em escala piloto e possivelmente industrial. O crescimento celular rápido aliado a significativa redução da tensão superficial do meio de cultura, nos permitem dizer que o isolado de *B. subtilis* adaptou-se ao meio de produção de

forma rápida e satisfatória, tornando-se capaz de se desenvolver e de produzir agente tensoativo a partir das fontes nutricionais oferecidas.

A confirmação da competência produtora de biossurfactante pelo isolado de *Bacillus subtilis* foi dada pelo teste de hemólise em meio de cultura agar sangue, sendo esta técnica constantemente utilizada para seleção de microrganismos produtores dessas substâncias. Em geral, os tensoativos, especialmente os lipopeptídeos, apresentam atividade hemolítica, devido às características anfipáticas de sua estrutura química. A presença de zonas de hemólise ao redor de cada colônia de *Bacillus* indica a produção de surfactina ou outros tensoativos em menores proporções como, a iturina A, subtilina, subtilosina A e isoformas (Bugay, 2009).

O crescimento do isolado deste trabalho apresentou a formação de pequena zona clara ao redor das colônias, configurando resultado positivo para o teste da hemólise. Este teste é uma análise qualitativa para seleção de microrganismos produtores de biossurfactante, desta forma não existe relação entre a área do halo formado e a concentração do tensoativo produzido. Walter, Syldatk e Hausmann (2010) utilizaram esta mesma metodologia para seleção de microrganismos a partir de solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e observaram a predominância de isolados produtores pertencentes à espécie *Pseudomonas aeruginosa*.

Fato interessante é descrito por Youssef e colaboradores (2014), onde estes autores constataram que dos 205 microrganismos por eles isolados, 38% não apresentaram atividade hemolítica, porém foram hábeis na redução da tensão superficial do meio de cultura em valores abaixo de 35 mN/m. Estes resultados indicam que nem todos os tipos biossurfactantes apresentam capacidade de lisar células do sangue, ademais este método apresenta algumas limitações, como: (i) zonas claras ao redor de colônias também pode ser indicativo da produção de enzimas líticas, (ii) alguns microrganismos que somente produzem biossurfactante na presença de hidrocarbonetos podem não ser selecionados e, (iii) a ausência de halo de hemólise pode ser devido à dificuldade de difusão do composto através do agar. Por isso, a utilização unicamente do teste de hemólise como forma de seleção de microrganismos produtores de biossurfactante não é indicada. A avaliação do meio após cultivo de isolado potencialmente produtor de BS se deve dar, preferencialmente, por um conjunto de técnicas.

A propriedade emulsificante do tensoativo produzido em laboratório foi considerada satisfatória quando em contato com óleo mineral e n-hexadecano,

revelando índices de 38,8% e 58%, respectivamente. De acordo com Bognolo (1999), compostos com índices de emulsificação superiores a 30% são considerados bons emulsificantes. Surfactantes com alto poder emulsificante são considerados bons aliados da indústria do petróleo, sendo, por exemplo, uma alternativa viável como aditivo na limpeza de tanques de estocagem (Kunert, 2007). Resultados semelhantes de emulsificação foram descritos por Alvarez e colaboradores (2015). Estes autores verificaram que a surfactina produzida por *Bacillus amynoliquefaciens* TSBSO 3.8 apresentou bons índices de emulsificação mesmo em altas faixas de salinidade e temperatura.

Em teste utilizando óleo bruto, o tensoativo produzido obteve baixo índice de emulsificação, cerca de 10%. O emprego deste óleo como fase apolar do teste de emulsificação é não habitual e não foi descrito por nenhum trabalho consultado, contudo o mesmo foi utilizado por estar disponível no laboratório e por se tratar de um trabalho de investigação. Barros, Quadros e Pastores (2008) observaram índices de emulsificação acima de 70% para biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em contato com diferentes compostos oleosos. Entretanto, diferentemente deste trabalho, o tensoativo por eles utilizado foi semi-purificado por metodologia apropriada e atingiu a maior redução da tensão superficial na concentração de 12 mg.L⁻¹.

Comparativamente aos tensoativos comerciais, o biocomposto produzido também obteve índice de emulsificação apreciável ($E_{24} = 35\%$) quando em contato com óleo de soja. Valor igual foi obtido pelo ramnolípídeo comercial JBR 425 na concentração de 1% (v/v). Diversos trabalhos se referem aos biossurfactantes do tipo ramnolípídeo como um tensoativo de excelente poder emulsificante para uma variedade de hidrocarbonetos (Lovaglio *et al.*, 2011; Das e Mukherjee, 2007). Lovaglio e colaboradores (2011) realizaram teste similar ao deste trabalho, compararam a força emulsificante de biossurfactante ramnolípídeo e surfactante químico SDS (dodecil sulfato de sódio), ambos na concentração de 0,01% (m/v), frente ao óleo de soja. Eles obtiveram índice de emulsificação análogo para os dois tensoativos, em torno de 60%, em diferentes faixas de pH. Neste trabalho, semelhante índice de emulsificação à daqueles autores somente foi obtido quando utilizado o surfactante SDS.

Diferentemente dos testes descritos acima, o teste de colapso da gota é utilizado como método comparativo para avaliar qualitativamente a produção de biossurfactante por diferentes isolados microbianos. Bodour e Miller-Maier (1998) correlacionaram a tendência do colapso da gota de diferentes concentrações de ramnolípídeo com sua

atividade superficial. O sobrenadante do meio de cultura fermentado livre de células do isolado de *Bacillus subtilis* foi eficiente em interagir com a superfície coberta de óleo, mesmo sem nenhum processo de concentração do produto, indicando que esta técnica é mais simples e rápida para seleção de isolados produtores comparada ao teste em agar sangue. O biossurfactante produzido, similarmente aos surfactantes comerciais, foi capaz de reduzir a tensão interfacial entre as fases hidrofílica (mosto) e hidrofóbica (óleo), caracterizado pela penetração e espalhamento da gota na camada de óleo (Figura 19).

Outras avaliações do colapso da gota adotando diferentes concentrações do tensoativo produzido não foram realizados, pois a determinação da concentração inicial do biossurfactante no mosto fermentado pela técnica da cromatografia líquida de alta eficiência não foi possível. Os resultados obtidos indicam que o tensoativo produzido é estruturalmente diferente da surfactina padrão comercializada pela Sigma-Aldrich ou está em concentração abaixo do limite detectável pela técnica. Também há de se considerar que o isolado de *Bacillus subtilis* pode ter sintetizado um isômero da surfactina padrão ou se tratar de outro lipopeptídeo. Ainda como tentativa de dosar o tensoativo por CLAE, foi testada a recuperação do biossurfactante pelo método da precipitação ácida (Ghiribi, 2011), porém também sem sucesso. É possível que o composto tensoativo obtido neste trabalho apresente diferentes propriedades físico-químicas, o que poderá proporcionar outros tipos de aplicações. Obviamente, outras investigações para comprovação serão necessárias.

A possível baixa concentração do biossurfactante no mosto pode estar relacionada à formação da alta coluna de espuma durante o processo fermentativo (Figura 22). A formação de espuma densa causada por emulsificação de biossurfactante durante agitação vigorosa (por exemplo, acima de 200 rpm) pode diminuir a eficiência de transferência de oxigênio no meio líquido, sendo, portanto, inadequado para produção de tensoativos de culturas submersas. Fontes *et al* (2010) apresentaram dados que ao aumentar a razão de aeração, ocorria grande formação de espumas, decaindo a concentração de biossurfactantes em 84%. No caso da produção especificamente de surfactina por *Bacillus subtilis*, Colla e Costa (2013) concluíram que a transferência de oxigênio foi um dos parâmetros chave para o sucesso de otimização do aumento da escala na produção.

Uma das vantagens dos biossurfactantes em comparação aos seus similares químicos é a de manter suas propriedades tensoativas em condições extremas de pH e

temperatura. Esta característica propicia uma maior amplitude de aplicações, além de ser fundamental para uso na recuperação do petróleo. O planejamento experimental detalhado na **Tabela 10** apresenta os valores de tensão superficial obtidos para os diferentes testes. Único valor de salinidade, fixo em 3% (m/v) de NaCl, foi adotado a fim de avaliar a estabilidade do tensoativo produzido numa condição real de aplicabilidade, mimetizando, ao menos, uma condição de reservatório *offshore* de petróleo. Cabe destacar que alguns reservatórios, principalmente na cama do pré sal, apresentam elevada salinidade, em torno de 16% (m/v) de NaCl (Morigaki, 2010).

Pode se observar que não houve alteração expressiva dos valores de tensão superficial, variando em 29 ± 1 mN/m para todos os testes. Andrade Silva *et al* (2014), utilizando linhagem de *Cunninghamella echinulata*, produziram biossurfactante com estabilidade a variações de temperatura de 100 °C, contudo quando foi avaliada sua estabilidade em elevado pH (12), um pequeno aumento na tensão superficial foi detectado. Isto deve ter acontecido pela desnaturação de compostos protéicos do biossurfactante, como sugerido por Ghurye *et al* (1994). Em função dos resultados deste trabalho, está claro que o comportamento da molécula de biossurfactante, em diferentes níveis de acidez ou basicidade, e submetida a diferentes temperaturas, apresentou comportamento muito satisfatório, o que permite ambicionar sua aplicação em ampla gama de setores industriais, incluindo-se a recuperação do petróleo.

Um conhecimento recente da atividade dos biossurfactantes é sua capacidade de se complexar com metais, despontando como uma nova aplicabilidade industrial desses compostos. Alguns trabalhos já descreveram a capacidade de tensoativos em aprisionar metais dentro das suas micelas, tornando-os menos disponíveis, contudo avaliaram os biossurfactantes para remoção de metais apenas em amostras ambientais (Barakat, 2010). Métodos convencionais de tratamento de solo e água impactados são complexos e custosos. Por isso, os agentes biológicos complexantes podem ser uma alternativa ambientalmente amigável para remoção de contaminantes inorgânicos (Shah *et al*, 2016).

O ineditismo deste trabalho consistiu em utilizar biossurfactante produzido por isolado de *Bacillus subtilis* no sequestro de metais adsorvidos em catalisadores esgotados resultantes da etapa de hidrotreamento do refino do petróleo. A compilação dos resultados mostrou que o biossurfactante produzido em laboratório, mesmo não recuperado, é um promissor complexante de Alumínio, Ferro, Cobalto e Níquel, sendo

os valores de recuperação de 30%, 98%, 46,3% e 89%, respectivamente. Nas concentrações testadas, o comportamento da recuperação de Alumínio e Arsênio foi semelhante para o tensoativo produzido e o biossurfactante comercial JBR. Em processo otimizado, Mulligan, Yong e Gibbs (2001) verificaram que a surfactina purificada foi capaz de recuperar 60% de Cobre e Zinco em solo contaminado. Diferentemente do descrito por Slizovskiy, Kelsey e Hatzinger (2011), neste trabalho o biossurfactante JBR 425 não foi eficiente, na concentração avaliada, para recuperação de Cobre, reduzindo apenas 0,03%.

Para os três surfactantes avaliados, o químico SDS obteve as menores porcentagens de recuperação para a maioria dos metais. Resultados similares foram obtidos por Chen *et al* (2011), os autores observaram que a surfactina comercial promoveu melhor remoção de Mercúrio de água artificialmente contaminada em comparação com os surfactantes SDS e Tween-80.

Cabe destacar que os valores de recuperação dos metais apresentados neste documento foram obtidos em apenas 1 hora de contato dos tensoativos e catalisador. Vijayanand e Divyashree (2015) empregaram, no mínimo, tempo de contato de 24 horas; contudo destacam que os melhores valores de remoção de Zinco (93,18%) Cromo (87,9%) e Chumbo (84,13%) de água residual de indústria foram no tempo de 72 horas de incubação.

7. Conclusões

- O isolado, identificado como *Bacillus subtilis*, produziu composto capaz de reduzir a tensão superficial do meio de produção em valor abaixo de 30 mN/m, indicando seu potencial como produtor de biossurfatante;
- O tensoativo produzido apresentou bons índices de emulsificação para óleo cru, óleo mineral e óleo de soja;
- O bioproduto obtido se apresentou estável em ampla faixa de pH (4 a 9) e temperatura (4 a 100°C), em salinidade de 3% (m/v) NaCl;
- Em geral, o biossurfactante produzido apresentou propriedades tensoativas e emulsificantes iguais ou melhores ao surfactante (SDS) e biossurfactante (ramnolipídeo JBR425) comerciais;

- A aplicação dos três surfactantes no seqüestro de metais oriundos de catalisador de hidrotratamento do petróleo apresentou comportamento diferenciado, sendo as captações de Al, Fe, Co e Ni maiores com o BS produzido.

Em suma, o biossurfactante se mostrou promissor para aplicação na recuperação de catalisadores, uma vez que valores consideráveis de remoção de metais foram alcançados em condições não otimizadas, e por curto período de contato. Portanto, o estudo deve ser continuado em face da importância da recuperação desses catalisadores industriais, que além do custo elevado são usados em grandes quantidades pela indústria do petróleo. Neste contexto, deverão ser realizados diferentes ensaios para definição da razão concentração BS e quantidade de catalisador, temperatura e pH em diferentes sistemas experimentais tais como reator e colunas.

8. Referências Bibliográficas

- Abdel-Mawgoud, A.M.; Aboulwafa, M.M.; Hassouna, N.A. (2008). Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.150, n.3, p.305-325.
- Abushady, H.M.; Bashandy, A.S.; Aziz, N.H.; Ibrahim, M.M. (2005). Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and the factors affecting its production. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.7, n.3, p.1-8.
- Afonso, J.C.; Lajter, K.; Góes, R.S. (1997). Recuperação de metais de catalisadores usados de hidrotratamento (NiMo E CoMo/Al₂O₃). *Química Nova*, v.20, n.4, p.349-355.
- Afonso, J.C.; Lima T.S; Campos, P.C; Pinheiro, A.A.S. (2003). Recovery of metals from monometallic and non-supported catalysts. *Química Nova*, v.26, n.6, p.924-930.
- Akpa, E.; Jacques, P.; Wathelet, B.; Paquot, M.; Fuchs, R.; Budzikiewicz, H.; Thonart, P. (2001) Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemical and Biotechnology*, v.91, p.551–561.
- Al-Ajlani, M.M; Sheikh, M.A.; Ahmad, Z.; Hasnain, S. (2007). Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, v.6, p.17-25.
- Al-Dalama, K.; Stanislau, A. (2006). Comparison between deactivation pattern of catalysts in fixed-bed and ebullating –bed residue hydroprocessing units. *ChemicalEngineering Journal*, v.120, n.1-2, p.55-69.
- Alfa Connection. Disponível em: <http://alfaconnection.pro.br>. Acesso em 25/5/2016.
- Alvarez, V.M.; Jurelevicius, D.; Marques, J.M.; Souza, P.M; Araújo, L.V.; Barros, T.G.; De Souza, R.O.M.A.; Freire, D.M.G; Seldin, L. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, v.136, p.14-21.
- Alves, F. (1998). O que está sendo feito com os resíduos industriais? *Revista Saneamento Ambiental*, v.54, p.16-24.
- Amorim, H.S.; Brito, J.G.M.; Corrêa, P.F.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A. (2014). Formulação do biossurfactante produzido por *Candida lipolytica* para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo contidos em água do mar. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 19 a 22 de outubro de 2014.
- Andrade Silva, N.R.; Luna, M.A.C.; Santiago, A.L.C.M.A.; Franco, L.O.; Silva, G.K.B.; Souza, P.M.; Okada, K.; Albuquerque, C.D.C.; Silva, C.A.A.; Campos-Takaki, G.M. (2014). Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. *Biotechnology and Bioengineering*. V.15, p.15377-15395.
- ANP, AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS – Resolução Nº 30, DE 23.06.2016 - DOU 24.06.2016.
- ASTM D971 Standard Test Method for Interfacial Tension of Oil Against Water by the Ring Method, 2011.
- Bala, G.A.; Bruhn, D.F.; Fox, S.L.; Noah, K.S.; Thompson, D.N. (2002). Microbiological production of surfactant from agricultural residuals for ior application. *SPE/DOE Thirteenth Symposium on Improved Oil Recovery*. Disponível em: <https://inldigitallibrary.inl.gov/STI/2591623.pdf>. Acesso em 24/10/2016.
- Banat, IM. (1995). Les biosurfactantes production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation. *Bioresource Technology*, v.51, n.5, p.1-12.

- Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.53, n.5, p.495-508.
- Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.G.; Fracchia, L.; Smyth, T.J.; Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.87, p.427-444.
- Baptista, S.J. (2007). Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel. Orientadora: Denize Dias de Carvalho e Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D. Sc. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ/Escola de Química – EQ, 146p., Tese (Doutorado em Ciências).
- Barakat, M.A. (2010). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, v.4, p. 361-377.
- Barros, C.F.F.; Quadros, C.P.; Maróstica Jr. M.R.; Pastore, G.M. (2007). Surfactin: chemical, technological and functional properties for food application. *Química Nova*, v.30, n.2, p. 409-414.
- Barros, F.; Ponezi, A.; Pastore, G. (2008). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.35, n.9, p.1071-1078.
- Barros, F.F.C.; Ponezi, A.N.; Pastore, G.M. (2008). Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v.35, p.1071-1078.
- Barros, F.F.C.; Quadros, C.P.; Pastore, G.M. (2008). Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.4, p. 979-985.
- Bhairi, S.M.; Mohan, C. (2001). Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. San Diego: EMD Biosciences, Calbiochem.
- Bodour, A.A; Gerrero-Barajas, C.; Maier, M. (2004). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavolipid sp.* strain MTN11. *Applied and Environmental Microbiology*, v.10, n.6, p.1114-11120.
- Bodour, A.A.; Miller-Maier, R.M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. v.32, p.273-280.
- Bognolo, G. (1999). Biosurfactant emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. V.152, p41-52.
- Bognolo, G. (1999). Physicochemical and engineering aspects: Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A*, v.152, p.41-52.
- Borges, Sarah M. Santana. (2009). Recuperação avançada de petróleo (EOR) com utilização de glicerina bruta (GB) co-produto da produção de biodiesel. Dissertação (mestrado em Química). Universidade Federal da Bahia.
- Branda, S. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *PNAS* 98, 11621-11626.
- Brandão, M.S.B. (1998). Substâncias tensoativas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.2, n.6, p.30-34.
- Bugay, C. (2009). Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização. Orientadora: Nadia Krieger, D.Sc. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 82p. Dissertação (Mestrado em Química).

- Borba, C.E; Guirardello, R.; Silva, E.A.; Veit, M.T.; Tavares, C.R.G. (2006). Removal of flichel (II) íons from aqueous solution by biosorption in a fixed bed column: experimental and theoretical breakthrough curves. *Biochemistry Engineering Journal*. V.30. p184-191.
- Bustamante, M.; Durán, N.; Diez, M.C. (2012). Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v.12, n.4, p.667-687.
- Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.50, p.520–529.
- Carballido-Lopez, R.; Formstone, A. (2007). Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, v.10, p.611–616.
- Carrillo, P.G.; Mardaraz, C.; Pitta-Alvarez, S.I.; Giuliett, A.M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.12, p.62-6.
- Carvalho, A.L.U.; Oliveira, F.H.P.; Mariano, R.L.R.; Gouveia, E.R. Souto-Maior, A.N. (2010). Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.53, n.3, p.643-652.
- Chen, H.R; Chen, C.C; Reddy, A.S; Chen, C.Y; Li, W.R.; Tseng, M.J.; Liu, H.T; Pan,W.; Maity, J.P; Atla, S.B. (2011). Removal of Mercury by Foam Fractionation Using Surfactin, a Biosurfactant. *International Journal of Molecular Sciences*. v.12, p.8245–8258.
- Chen, H-L.; Chen, Y-S.; Juang, R-S. (2007). Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *Journal of Membrane Science*, v.299, p.114–121.
- Christofi, N.; Ivshina, I. (2002). Microbial surfactants and the use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, n.6, p.915-929.
- Claus, D.; Berkeley, R.C.W. (1984). In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Kieg, N.R.; Hoh, J.G. (ed.). London: Williams, Wilkins Co., v.2, p.1130-1984.
- Christofi, N.; Ivshina, I.B. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, p.915–929.
- Colla, L.M.; Costa, J. A.V. (2013). Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. *Revista Vetor*, Rio Grande, v.13, p.85-103.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2015). Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf. Acesso em 20/03/2016.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. (2016). Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Observatório Agrícola. Primeiro levantamento safra 2016/17. Monitoramento agrícola. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Boletim. Acesso em 20/03/2016.
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A.; Farfan, M.; Rabanal, F.; Manresa, A.; Marqués, A.N. Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties *Annals of Microbiology*, v.65, n.4, p.2065-2078.
- Cooper, D. (1986) Biosurfactants. *Microbiol Sciences*, v.3, n.5, p.145–149.
- Cooper, D.; Goldenberg, B. (1987). Surface-active agents from 2 *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.2, p.224–229.

- Cooper, D.G.; Macdonald, C.R.; Duff, S.J.; Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied Environment and Microbiology*, v.42, p.408-412.
- Curbelo, F.D.S. (2006). Recuperação avançada de petróleo utilizando tensoativos. Orientador: Eduardo Lins de Barros Neto, D. Sc. Natal: Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
- Das, K.; Murkerjee, A.K. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*. V.42, p1191-1199.
- Davey, M.E.; Caiazza, N.C.; O'Toole, G.O. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, v.185, p.1027-1036.
- Davis, D.A.; Lynch, H.C.; Varley, J. (1999). The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, n.3-5, p.322-329.
- De Almeida, D.G; Soares, da Silva, R.C.F.; Luna, J.M; Rufino, R.D.; Santos, V.A.; Banat, I.M; Sarubbo, L.a. (2016). *Frontiers in Microbiology*. v.7, article 1718.
- Desai, J.O.; Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, n.1, p.47-64.
- Deleu, M.; Paquot, M. (2004). From renewable vegetable resources to microorganisms: new trends in surfactant. *CR Chimie*, v.7, p.641-646.
- Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineu, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquat, M. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.152, p.3-10.
- Dufresne, P. (2007). Hydroprocessing catalysts regeneration and recycling. *Applied Catalysis A: General*, v.322, p.67-75.
- Duncan, B.; Mera, R.; Leatherdale, D.; Taylor; Musgrove, R. (2005). Techniques for characterising the wetting, coating and spreading of adhesives on surfaces. National Physical Laboratory NPL REPORT, DEPC MPR 020. Disponível em: http://www.npl.co.uk/upload/pdf/depc_mpr_020_coating.pdf. Acesso em 27/9/2016.
- Duitman, E.H.; Wyczawski, D.; Boven, L.G.; Venema, G.; Kuipers, O.P.; Hamoen, L.W. (2007). Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.11, p.3490-3496.
- Eastoe, J.; Tabor, R.F. (2014). Surfactants and nanoscience. In: *Colloidal Foundations of Nanoscience*, chapter 6, Berti, D. and Palazzo, G. (eds.). Oxford: Elsevier, p.135-157.
- Edser, C. (2008). Status of global Surfactants markets. *Focus on Surfactants*, v.11, p.1-2.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews of Microbiology*, v.1, p.117-126.
- Ferreira, P.F. (2010). Recuperação de metais em catalisador HDT esgotado através da lixiviação química e microbiana. Orientadores: Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc e Antônio Carlos Augusto da Costa, D.Sc. Dissertação (Mestrado em Ciências).
- Finking, R.; Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Reviews of Microbiology*, v.58, p.453-488.

- Fontes, G.C.; Amaral, P.F.F.; C., M.A.Z. (2008). Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*, v.31, n.8, p.2091-2099.
- Fox, S.L.; Bala, G.A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, v.75, p.235 – 240.
- Francy, D.M.; Thomas J.M.; Raymond, R.L.; Ward, C.H. (1991). Emulsification of hydrocarbons by surface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, v.8, p.237-246.
- Fritze, D. (2004). Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*, v.94, p.1245-1248.
- García Becerra, F.Y.; Allen, D.G.; Acosta, E. J. (2010). Surfactants from waste biomass. In: *Surfactants from renewable resources*, Kjellin, M.; Johansson, I. (eds). UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gary, J.H.; Handwerk, G.E. (2001). *Petroleum refining: Technology and Economist*, 4th ed. New York: Marcel Dekker Inc., 441pp.
- Georgiou, G.; Lins, S.C; Sharma, M.M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, v.10, p.60-65.
- Ghafoor, A.; Hasnain, S. (2009). Production dynamics of *Bacillus subtilis* strain AG-1 and EAG-2, producing moderately alkaline proteases. *African Journal of Microbiology Research*, v.3, n.5, p.258-263.
- Ghrib, D.; Ellouche-Chaabouni, S. (2011). Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*. V.2011, p1-6.
- Ghurye, G.L.; Vipulanandan, C.; Wilson, R.C. (1994). A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. V.44, p.661-666.
- Governo do Brasil (2015). Safra 2015/2016 de cana-de-açúcar deve crescer 3.2%. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/08/safra-2015-2016-de-cana-de-acucar-deve-crescer-3-2>. Acesso em 4/04/2016.
- Goyal, S. (2016). Mechanical properties of fluids. Disponível em: <http://www.jagranjosh.com/general-knowledge/mechanical-properties-of-fluids-1458563942-1>. Acesso em 31/5/2016.
- Guimarães, C.R. (2015). Avaliação da produção de surfactina-like por *Bacillus sp.* H20-1. Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc e Livia Vieira de Araujo, D.Sc. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Haas, D.; Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology*, v.3, p.307–319.
- Haigh, S.D. (1996). A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Science of The Total Environment*, v.185, n.1-3, p.161-170.
- Helenius, A.; Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica and Biophysica Acta*, v.415, p.29-79.
- Hester, S. (2001). IBmMarket forecast. *Industrial Bioprocessing*, v.23, n.5, p.3.
- Huang, X.; Liu, J.; Wang, Y.; Liu, J.; Lu, L. (2015). The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology and Biotechnol Equipment*, v.29, n.2, p.381–389.
- Ibrahim, S. (2011). Corrosion inhibitors in the oilfield. Disponível em: <http://www.isalama.wordpress.com>. Acesso em 19/6/2016.

Karsa, D.R. (2006). What are surfactants? In: Chemistry and Technology of Surfactants. Farn, R.J. (ed). Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

Kenneth, T. (2005). In: Text Book of Bacteriology. Disponível em: <http://www.textbookofbacteriology.net>. Acesso em 31/5/2016.

Kjellin, M.; Johansson, I. (2010). Surfactants from Renewable Resources. Kjellin, M.; Johansson, I (eds). UK: John Wiley and Sons, Ltd, Publication.

Kim, S.H.; Kim, J.Y.; Bae, H.J.; Yi, H.; Yonn, S.H.; Koo, B.S.; Cho, J.Y.; Lee, C.; Hong, S. (2007). Surfation from *Bacillus subtilis* displays anti-apoptoses induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. FEBS Letters, v.581, n.5, p.865-871.

Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.; Katsuragi, T.; Tani, Y. (1997). Journal of Fermentation and Bioengineering, v.84, p.41-46.

Kinsinger, R.F.; Shirk, M.C.; Fall, R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. Journal of Bacteriology, v.185, p.5627–5631.

Kinsinger, R.F.; Kearns, D.B.; Hale, M.; Fall, R. (2005). Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, v.187, p.8462–8469.

Kissa, E. (1981). Wetting and Detergency - Pure and Applied Chemistry, v.53, p.2255-2268.

Korsten, L.; Cook, N. (1996). Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. South African Avocado Growers' Association Yearbook, v.19, p.54-58.

Kunert, R. (2007). Processamento primário de petróleo. Recursos humanos. Universidade Petrobras. Escola de Ciência e Tecnologia.

Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid and Interface Science, v.7, p.12–20.

Lavaglio, R.B.; dos Santos, F.J.; Jafallici, M.Jr.; Contiero, J. (2011). Ramnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. Colloids Surf B: Biointerfaces. V.85, p301-305.

Leffler, W.L. (2000). Petroleum refining nontechnical language, chapter 15. Oklahoma: Pennwell, p.173-181.

Lichtenberg, D.; Robson, R.J.; Dennis, E.A. (1983). Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. Biochimica and Biophysica Acta, v.737, n.2, p.285-304.

Lima, T.S.; Campos, P.C.; Afonso, J.C. (1998). Solubilização de catalisadores desativados em meio contendo fluoreto – II: Catalisadores de hidrotratamento. Boletim Técnico da Petrobras, v.41, p.169-178.

Liu, J. F.; Mbadinga, S. M.; Yang, S. Z.; Gu, J. D.; Mu, B. Z. (2015). Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. International Journal of Molecular Science, v.16, p.4814–4837.

Liu, J. ; Chen, Y. ; Xu, R. ; Jia, X. (2013). Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oilfield wastewater. Indian Journal of Microbiology, v.53, n.2, p.168-174.

Liu, J. F. ; Mbadinga, S. M. ; Yang, S. Z. ; Gu, J.D. ; Mu, B. Z. (2015). Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. International Journal of Molecular Science, v.16, p.4814-4837.

Liu, J.G.; Zhao, Y.; Zhang, Z.J. (2003). Low-temperature synthesis of large-scale arrays of aligned tungsten oxide nanorods. Journal of Physics: Condensed Matter, n.29 (L453).

- Liu, X.; Ren, B.; Gao, H.; Liu, M.; Dai, H.; Wang, S.; Hu, J.; Kokare, C.R.; Zhang, L. (2012). Optimization for the production of surfactin with a new synergistic antifungal activity. *PLoS ONE*, v.7, n.5, e34430.
- Lotfallah, A.H.; Burguete, M.I.; Alfonso, I.; Luis, s.v, (2015). Highly stable oil-in-water emulsions with a gemini amphiphilic pseudopeptide. *RSC Advances*, v.5, n.4, p.3689 - 36893.
- Lopes, P.R. (2010). Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatório de petróleo da bacia de campos (RJ). Orientadora: Dra. Valéria Maria de Oliveira. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo.
- Lourith, N.; Kanlayavattanakul, M. (2009). Lipopeptides in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, v.32, p.1-8.
- Luz, A.P.; Ribeiro, S.; Pandolfelli, V.C. (2008). Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. *Cerâmica*, v.5, p.174-183.
- Machado, A.; Liria, C.L.; Proti, P.B.; Remuzgo, C.; Miranda, T. (2004). Chemical and enzymatic peptide syntheses: basic aspects and applications. *Química Nova*, v.27, p.781-789.
- Maniasso, M. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v.24, n.1, p.87-93.
- Marafi, A.; Hauserb, A.; Stanislaus, A. (2007). Deactivation patterns of Mo/Al₂O₃, Ni-Mo/Al₂O₃ and Ni-MoP/Al₂O₃ catalysts in atmospheric residue hydrodesulphurization. *Catalysts and Processes for Heavy Oil Upgrading*, v.125, n.3-4, p.192-202.
- Marafi, M.; Stanislaus, A. (2008). Spent catalyst waste management: A review Part I—Developments in hydroprocessing catalyst waste reduction and use. *Resources, Conservation and Recycling*, v.52, p.859-873.
- Marajan, C.; Talib, S. Bin D.A. (2014). Role of biosurfactants in enhancing bioremediation of soils contaminated by NAPLs. *Jurutera*, p.14-15. Disponível em: <http://dspace.unimap.edu.my/dspace/bitstream/123456789/23061/1/pg%2016-19.pdf>. Acesso em 01/11/2016.
- Martins, C.R.; Lopes, W.A.; Andrade, J.B. (2013). Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova*, v.36, n.8, p.1248-1255.
- Mizumoto, S.; Shoda, M. (2007). Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.76, n.1, p.101-108.
- Moraes, S.L. de; Rezende, M.O.O. (2004). Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. *Química Nova*, v.27, n.5, p. 701-705.
- Moreira, F.M.S; Siqueira, J.O. (2006). *Microbiologia e Bioquímica do solo*. Editora UFLA. Lavras, MG.
- Morigaki, M.K.; Chimin, R.Q.; Sad, C.M.D.S.; Filgueiras, P.R.; de Castro, E.V.; Dias, J.C. (2010). Salinidade em petróleo bruto: otimização de metodologia e proposta de um novo método para extração de sais de petróleo. *Química Nova*. V.33, p607-612.
- Morikawa, M.; Hirata, Y.; Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica and Biophysica Acta*, v.1488, n.3, p.211-218.
- Moszer, I.; Jones, L.M.; Moreira, S.; Fabry, C.; Danchin, A. (2002) SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome. *Nucleic Acids Research*, v.30, p.62-65.
- Mukherjee, S.; Das, P.; Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, v.24, p.509-515.

- Mulligan, C.N. (2004), Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v.133, p.183-198.
- Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v.133, n.2, p.183-198.
- Mulligan, C.N.; Mahmoudides, G.; Gibbs, B.F. (1989). The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biotechnology*, v.12, p.199–210.
- Mulligan, C.N.; Gibbs, B.F. (1993). In: *Biosurfactants Production, Properties, Application. Factors Influencing the Economics of Biosurfactants*. Kosaric, N. (ed). New York: Marcel Dekker, p.329-371.
- Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. (2001). Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, v.60, p.371-380.
- Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. (2001). Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials*, v.85, p11-125.
- Mulligan, C.N; Sanjay K. Mudhoo, S.A. (2014). *Biosurfactants Research Trends and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 352p.
- Mulligan, C.N., Sharma, S.K., Mudhoo, A. (2014). *Biosurfactants: Research Trends and Applications*, 1 st. ed. Boca Raton: CRC Press, Francis & Taylor Group.
- Mukherjee, A.K.; Das, K. (2005). Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology and Ecology*, v.54, n.3, p.479-489.
- Mukherjee, A.K.; Das, K.; Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, v.24, n.11, p. 509-515.
- Myers, D. (2006). *Surfactant science and technology*, 3 ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 393p.
- Nascentes, C.C.; Arruda, A.Z.; Maniasso, N. (2002). Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pre-concentração. *Química Nova*, v.25, n.3, p.483-489.
- Neu, T. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, v.60, p.151–166.
- Nitschke, M.; Pastore, G.M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v.25, n.5, p.772-776.
- Ongena, M.; Jourdan, E.; Adam, A. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, v.9, p.1084–1090.
- Ou, Z.Q. (2000). Separate and combine environmental behavior of surfactants and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Disponível em: <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2000/ou.pdf>. Acesso em 25/4/2016.
- Pacheco, M.E. (2008). Desenvolvimento de metodologia para desativação acelerada de catalisadores de hidrotratamento em plantas piloto. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro – COPPE, 349p.
- Pacwa-Płociniczak, M.; Płaza, G.; Poliwoda, A.; Piotrowska-Seget, Z. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas sp.* P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v.21, n. 15, p.9385-9395.

- Pathaka, A.N.; Nakhate, P.H. (2015). Optimization of rhamnolipid: A New age biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 1688 and its application in oil recovery, heavy and toxic metals recovery. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v.5, p. 229-243.
- Pereira, C.B.; Marin, A.; Dalmora, S.L.; Necchi, R.M.M.; Moresco, R.N.; Manfron, M.P. (2013). Atividade anti-inflamatória e avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.34, n.1, p.43-46.
- Persson, A.; Molin, G. (1987). Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.26, n.5, p.439-442.
- Peypoux, F.; Bonmatin, J. M.; Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.51, p.553-563.
- PHE Public Health England (2015) Bacteriology – Identification Standards Unit, Microbiology Services, n. 3, p. 1-27. Disponível em: http://Users/elian/Downloads/identification_of_bacillus_species.pdf. Acesso em 31/10/2016.
- Porter, M.R. (1994). *Handbook of biosurfactants*. New York: Chapman & Hall, 2a. ed., 324p.
- Porsunthorntawee, O.; Arttaweeporn, N.; Paisanjit, S.; Somboonthanate, P.; Abe, M.; Rujiravanit, R.; Chavadej, S. (2008). Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal*, v.42, p. 172-179.
- Raaijmakers, J.M.; Bruijn, I.; Nybroe, O.; Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, v.34, p.1037-1062.
- Rahman, P.K.S.M.; Randhawa, K.K.S. (2015). Microbiotechnology based surfactants and their applications. *Front Microbiology*, v.6, p.1344.
- Ramos, H.C.; Hoffmann, T.; Marino, M.; Nedjari, H.; Presecan-Siedel, E.; Dreesen, O.; Glaser, P.; Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *Journal of bacteriology*, v.182, n.11, p.3072-3080.
- Raymond, R.L.; Atlas, R.M. (1997). *Biosurfactants: properties and applications*.
- Reis, F.A.S.L.; Sérvulo, E.F.C.; De França, F.P. (2004). Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.113-116, p.899-912.
- Rizzatti, I.M.; Zanette, D.R.; Mello, L.C. (2009). Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de Química. *Química Nova*, v.32, n.2, p.518-521.
- Ron, E.Z.; Rosenberg E. (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.249-252.
- Rosen, M.J. (1989). *Surfactants and interfacial phenomenon*. 2a ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 431pp.
- Rosenberg, E.; Ron, E.Z. (1997). Bioemulsions: microbial polymeric emulsifiers. *Current Opinion in Biotechnology*, v.8, n.3, p.313-6.
- Rosenberg, E.; Ron, E.Z. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Technology*, v.52, p.154-162.
- Rudner, R.; Martsinkevitch, O.; Leung, W.; Jarvis, E.D. (1998). Classification and genetic characterization of pattern-forming Bacilli. *Molecular Microbiology*, v.27, n.4, p.687-703.

- Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Takaki, G.M.C.; Sarubbo, L.A. (2014). Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.17, n.1, p.34-38.
- Rufino R.D., Luna J.M., Takaki G.M.C., Ferreira S.R.M., Sarubbo L.A., 2012, Applications of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the remediation of heavy metals. *Chemical Engineering Transactions*, v.27, p.61-66.
- Sachdev, D.P.; Cameotra, S.S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied in Microbiology and Biotechnology*, v.97, p.1005–1016.
- Salanger, J-L. (2002). Surfactant types and uses. Laboratory of formulating interface rheology and processes, Universidad De Los Andes, Mérida, Venezuela. Disponível em: <http://www.nanoparticles.org/pdf/Salanger-E300A.pdf>. Acesso em 07/04/2016.
- Salvini, V.R.; Garcia, J.R.; Oliveira, I.R, Pandolfelli, V.C. (2006). Agente espumante e seus efeitos nas propriedades físicas de alumina porosa. *Cerâmica*, v.52, p.57-62.
- Schramm, L.L.; Marangoni, D.G. (2000). Surfactants and their solutions: Basic principles. In: *Surfactants: Fundamentals and applications in the petroleum industry*, Schramm, L.L. (ed.), chapter 1. Cambridge: Cambridge University Press, p.3-50.
- Schramm, L.L.; Stasiuk, E.N.; Marangoni, D.G. (2003). Surfactants and their applications. *Annual Reports on the Progress of Chemistry*, v.99, p.3–48.
- Schramm, L.L. (2005). Emulsions, foams, and suspensions. *Fundamentals and applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA.
- Sen, R. (2010). *Biosurfactants*. New York: Springer-Verlag New York.
- Shah, A.; Shahzad S.; Munir A.; Nadagouda M.N.; Khan G.S.; Shams D.F.; Dionysiou D.D. (2016) Micelles as Soil and Water Decontamination Agents. *Chemical. Revist.* v.116 (10), p.6042–6074.
- Shaligram, N.S.; Singhal, R.S. (2010). Surfactin – A Review. *Food Technology and Biotechnology*, v.48, n.2, p.119–134.
- Sheppard, J.D.; Cooper, D.G. (1991). The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.72-76.
- Silva, A.L.C.; Ponsento, E.; Rosa, F. (2003). Tensoativos: conceitos gerais e aplicações em tintas. ART TV007-08/03. Oxileno S/A Indústrias e Comércio. Disponível em: <http://www.oxileno.com.br/aplicacoes/mercadorias/doc/>. Acesso em 22/03/2016.
- Singh, P.; Cameotra, S.S. (2002). Potencial application of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends of Biotechnology*, v.22, n.3, p.142-146.
- Singh, A.; Van Hamme, J.D.; Ward, O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v.25, p.99-121.
- Slizovskiy, I.B.; Kelsey, J.W.; Hatzinger, P.B. (2011). Surfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils: Efficacy and toxicological consequences to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.30, n.1, p.112–123
- Smyth, T. J. P.; Perfumo, A.; Marchant, R.; Banat, I. M. (2010). Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Timmis, K. N. (ed) Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 3706–3723.

Song, B.; Springer, J. (1996). Surface phenomena of liquid crystalline substances: temperature-dependence of surface tension. *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology. Section A.*, v.307, n.1, p.69-88.

Togwt (2015). Disponível em: <http://togwt1980.blogspot.com.br/2015/06/is-your-paint-coating-still-viable.html>. Acesso em 08/8/2016.

Tadros, T. (2005). Adsorption of surfactants at the air/liquid and liquid/liquid interfaces. In: *Applied Surfactants: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley VCH, p. 81–82.

Uk Essays. Disponível em: <http://ukessays.com>. Acesso em 05/05/2016.

Uzoigwe, J.; Burgess, G.; Ennis, C.J.; Rahman, P.K.S.M. (2015) Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, v.6, p.1-6.

Valpuesta, R.R.F. (2008). Otimização da produção de biossurfactante por isolado de *Bacillus subtilis* a partir de material prima renovável. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 95p.

Valitutto, R.S.; Sella, S.M.;Silva-Filho E.V.; Pereira, R.G.; Miekeley, N. (2006). Accumulation of metals in macrophytes from water reservoirs of a power supply plant, Rio de Janeiro State, Brazil. *Water Air Soil Pollution*, v. 178, p. 89–102.

Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, v.24, n.6, p.604-620.

Vargaftik, N.B.; Volkov, B.N.; Voljak, L.D. (1983). International tables of the surface tension of water. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, v.12, n.3, p.817-820.

Vater, J.; Kablitz, B.; Wilde, C.; Franke, P.; Mehta, N.; Cameotra, S.S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.2, p.6210-6219.

Vedaraman, N.; Venkatesh, N. (2011). Production of surfactin by *Bacillus subtilis* mtcc 2423 from waste frying oils. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.28, n.2, p.175-180.

Vijayanand,S.; Divyashree, M. (2015). Bioremediation of heavy metals using biosurfactant producing microorganisms. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. v.6.

Vollenbroich, D; Ozel, M; Vater, J; Kamp, R. M; Pauli, G. (1997). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, v.25, p.289-297.

Zajic, J.E., Seffens, W. (1984). Biosurfactants. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, v.1, p.87-107.

Zana, R. (2005). Surfactant Science Series, volume 125. In: *Dynamics of Surfactant Self-Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases*. Zana R. (ed.). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Zahir, Z.A.; Arshad, M.; William, T.; Frankenberger, W.T. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, v.81, p.97–168.

Zhang, L; Somasundaran, P. (2006). Adsorption of mixtures of nonionic sugar-based surfactants with other surfactants at soil/liquid interfaces. II. Adsorption of n-dodecyl- β -D-maltoside with a cationic surfactant and a nonionic ethoxylated surfactant on solids. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.302, p.25-31.

Walter, V.; Syldatk, C.; Hausmann, R. (2000-2013). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Austin (TX): Landes

Bioscience; 2000-2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6189/>. Acesso em 03/11/2016.

Wei, Y.M.; Chu, I.M. (1998). Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme Microbial Technology*, v.22, p.724–728.

Wei, Y.M.; Chu, I.M. (2002). Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, v.24, p.479–482.

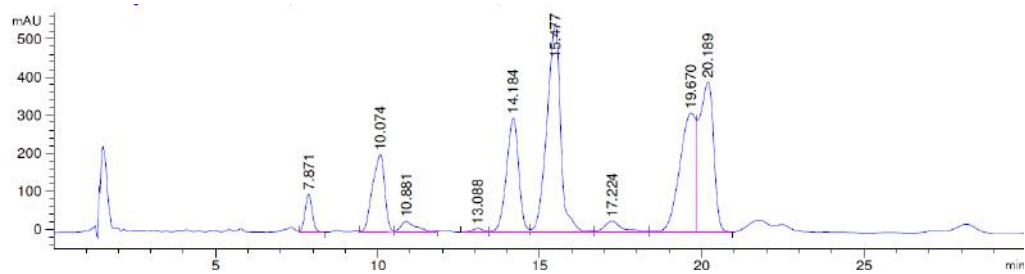
Wei, Y.M.; Lai, C.C.; Chang J.S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, v.42, p.40–45.

Ying, G.-G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, v.32, p.417 – 431.

Yossef, N.H.; Duncan, K.E.; Nagle, D.P.; Savage, K.N.; Kanapp, R.M.; Mc Inerney, M.J. (2003). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiological Methodes*. V.56, p339-347.

Yuan, Y.; Lee, T.R. (2013). Contact angle and wetting properties. In: *Surface Science Techniques*, Springer Series in Surface Sciences 51, chapter 1, Bracco, G.; Holst, B. (eds). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.

Anexos



Anexo I: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para surfactina Sigma-Aldch.