UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis:* caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo.

MARIANA RUIZ FRAZÃO SANTIAGO

Rio de Janeiro
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS
DOUTORADO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis:* caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo.

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DA ESCOLA DE QUÍMICA, COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.

Orientadoras:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Maria Aparecida de Melo
Paula Fernandes de Aguiar

Colaborador:

Antônio Jorge Ribeiro da Silva

Rio de Janeiro
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ruiz Frazão Santiago, Mariana
Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria do petróleo / Mariana Ruiz Frazão Santiago. -- Rio de Janeiro, 2019.
154 f.

Orientadora: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Coorientadora: Maria Aparecida de Melo.
Coorientadora: Paula Fernandes de Aguiar.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2019.

1. Biossurfactante. 2. Surfactina. 3. Processo Fermentativo. 4. *Bacillus subtilis*. 5. Otimização. 6. Recuperação de petróleo. I. Camporese Sérvulo, Eliana Flávia, orient. II. De Melo, Maria Aparecida, coorient. III. Fernandes de Aguiar, Paula, coorient. IV. Título.

Mariana Ruiz Frazão Santiago

Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis:* caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo.

Tese de Doutorado apresentada à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor. Defesa em 2019.

Orientadores:

_____
Prof. Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo (EQ/UFRJ)

_____
Dra. Maria Aparecida de Melo (CENPES/Petrobras)

_____
Prof. Dra. Paula Fernandes de Aguiar (IQ/UFRJ)

Banca examinadora:

_____
Prof. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite (EQ/UFRJ)

_____
Prof. Dra. Débora França de Andrade (IQ/UFRJ)

_____
Dra. Rosane Alves Fontes (CENPES/Petrobras)

_____
Prof. Dra. Rosângela Barros Zanoni Lopes Moreno (UNICAMP)

Rio de Janeiro
2019

Dedico esta tese à minha família,
que sempre me apoiou, compartilhando
minhas angústias e vitórias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a Deus, por toda graça a mim concedida, nunca me deixando desamparada.

Agradeço a minha família, especialmente a minha mãe, Ana Maria Ruiz Frazão do Nascimento por seu amor incondicional, por suas orações, por seu apoio e amizade. Por ser o meu porto seguro e anjo da guarda em todos os aspectos da minha vida. Sem você nada disso seria possível.

Ao meu querido e saudoso pai, Ricardo Frazão do Nascimento pelos seus ensinamentos, carinho e incentivos. Mesmo ausente fisicamente neste plano, tenho certeza que sempre torce por mim e ilumina a cada dia meus caminhos.

Ao meu marido Raphael por todo amor, dedicação, carinho e conforto em todos os momentos. Por ter participado ativamente do trabalho, me auxiliando nos experimentos que não conseguiria fazer sozinha.

Ao meu sobrinho Miguel, por ser minha alegria de todos os dias. A ele, todo meu amor e dedicação sempre.

A minha irmã Ana Carolina, pela sincera amizade, apoio e pelos inúmeros momentos de descontração.

A minha orientadora, Professora Eliana Flávia Camporese Sérvulo, pelo carinho e por todo apoio, estímulo e dedicação. Agradeço grandiosamente pelos conhecimentos a mim concedidos.

As minhas co-orientadoras, Dra. Maria Aparecida de Melo e Professora Paula Fernandes de Aguiar, pela dedicação, prestatividade, colaboração, carinho ao me receber e confiança em mim depositadas. Meus sinceros agradecimentos.

Ao professor Antônio Jorge Ribeiro da Silva, pela colaboração com as análises de CLAE, essenciais para o trabalho.

Aos os integrantes do Laboratório de Biodegradação, Biocorrosaão e Biossíntese: Danielle Aparecida, Vitor, Juliana, Danielle Ferreira, Victor, Lizeth, Diogo e Douglas, pela amizade, auxílio e companheirismo.

Aos técnicos: Paulinho (EQ/UFRJ), pelo auxílio no Laboratório de Biodegradação, Biocorrosaão e Biossíntese, Douglas Braga (IQ/UFRJ), pelas análises de tensão superficial e pelo uso da centrífuga; Nívea Rodrigues da Silva

Fagundes Souza (NPPN/UFRJ) e Cristiane Cardoso dos Santos (NPPN/UFRJ) pelas análises no CLAE; Daniele Fraga Santana Miranda (CENPES/Petrobras), pelas análises de tensão superficial e interfacial; e Nikolas Santos Pessoa (CENPES/Petrobras) pelo ensaio de recuperação de petróleo.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

À FAPERJ, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. Introdução 19
2. Objetivos 23
2.1. Objetivo Geral 23
2.2. Objetivos Específicos 23
3. Revisão Bibliográfica 24
3.1. Surfactante: Definição, estruturas moleculares, propriedades e aplicações 24
3.2. Biossurfactantes (BS) 31
3.2.1. Classificação 33
3.2.2. Funções Fisiológicas dos Biossurfactantes 34
3.3. Produção de lipopetídeos por *Bacillus subtilis* 35
3.3.1. *Bacillus subtilis* 35
3.3.2. Lipopetídeos produzidos por *Bacillus subtilis* 36
3.3.3. Fatores que influenciam a produção de biossurfactante 41
3.3.4. Uso de *Very High Polarization sugar (*VHP*)* como matéria-prima 46
3.3.5. Publicações científicas da produção de surfactina por *Bacillus* spp. 46
3.4. Aplicações dos Biossurfactantes 50
3.4.1. Recuperação de petróleo 50
3.5. Planejamentos Experimentais 59
4. Materiais e Métodos 63
4.1. Microrganismo 63
4.1.1. Manutenção da cultura 63
4.2. Açúcar VHP 63
4.3. Meios de cultura 64
4.3.1. Meio de crescimento 64
4.3.2. Meio de produção 64
4.4. Detalhamento Experimental 65
4.4.1. Caracterização elementar do VHP 66
4.4.2. Produção do Biossurfactante 67
4.4.2.1. Em frascos *Erlenmeyers* 67
4.4.2.1.1. Seleção dos micronutrientes essenciais para síntese de biossurfactante por *B. subtilis* LFB 732 69
4.4.2.1.2. Seleção dos macronutrientes do meio para produção de biossurfactante 70
4.4.2.1.3. Otimização do meio de produção 71
4.4.2.2. Em biorreatores 72

4.5. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido 73
4.6. Métodos Analíticos 74
4.6.1. Quantificação da surfactina 74
4.6.2 .pH 75
4.6.3. Tensão superficial (TS) e Tensão Interfacial (TI) 75
4.6.4. Consumo de sacarose 76
4.7. Recuperação do petróleo 76
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 82
5.1. Curvas de calibração 82
5.2. Caracterização elementar do açúcar VHP 84
5.3. Seleção dos micronutrientes do meio de cultura para produção de BS por *Bacillus subtilis* LFB 732 85
5.4. Seleção dos macronutrientes do meio para produção de surfactina... 93
5.5. Otimização do meio de produção 97
5.6. Validação da produção de surfactina 101
5.7. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido 106
5.8. Recuperação de petróleo 110
Conclusões 124
Perspectivas Futuras 125
Referências Bibliográficas 126
APÊNDICES 151

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Principais propriedades dos surfactantes e respectivas funções e aplicações 29
Tabela 3.2: Matérias-primas e respectivos microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes 48
Tabela 4.1: Composição do meio de crescimento para o microrganismo *Bacillus subtilis* 64
Tabela 4.2: Composição do meio de produção de biossurfactante por *B. subtilis*. 64
Tabela 4.3: Composição dos micronutrientes adicionados ao meio de produção de biossurfactante por *B. subtilis* 65
Tabela 4.4: Variáveis analisadas e respectivos níveis do planejamento Plackett-Burman (PB)..... 69
Tabela 4.5: Variáveis analisadas e respectivos níveis do planejamento Plackett-Burman..... 70
Tabela 4.6: Variáveis analisadas e respectivos níveis do planejamento Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)..... 72
Tabela 4.7: Variáveis analisadas e respectivos níveis do planejamento Box-Behnken (BB)..... 73
Tabela 4.8: Condições utilizadas para quantificação do lipopeptídeo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)..... 74
Tabela 5.1: Quantificação dos elementos contidos no açúcar VHP..... 85
Tabela 5.2: Matriz do planejamento PB12 com os valores codificados das variáveis: $FeSO4.7H_2O$ (x_1), $MnSO4.\ 4\ H_2O$ (x_2), H_3BO_3 (x_3), $CuSO_4$ (x_4),$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (x_5), $CoCl_2$ (x_6), $ZnSO_4$ (x_7), $CaCl_2$ (x_8) e valores de tensão superficial (T.S.), concentração de surfactina (B.S.) e produtividade (Q_p), correspondentes, em 24 e 48 horas de processo. 86
Tabela 5.3: Matriz do planejamento PB12 com os valores codificados das variáveis: KH_2PO_4 (x_1), Na_2HPO_4 (x_2), $MgSO_4$ (x_3), $FeSO4.7H_2O$ (x_4) e $ZnSO_4$ (x_5), e valores de tensão superficial (T.S.) e concentração de surfactina (B.S.), correspondentes, em 24 horas de processo 93
Tabela 5.4: Matriz do planejamento DCCR com os valores codificados das variáveis: Açúcar VHP (x_1), NH_4NO_3 (x_2) e Na_2HPO_4 (x_3) e valores de concentração de surfactina (B.S.) correspondentes, em 24 horas de processo 98
Tabela 5.5: Matriz do planejamento Box Behnken com valores codificados das variáveis: temperatura (x_1), pH (x_2) e salinidade (x_3) e valores de tensão superficial correspondentes, para tempo de contato de 1 hora..... 108
Tabela 5.6:Características físico-químicas e cálculo do número capilar da surfactina e da água..... 111
Tabela 5.7:Características das rochas A e B..... 112
Tabela 5.8:Resultados dos testes de recuperação secundária para as amostras A e B. 115
Tabela 5.9: Resultados dos testes de recuperação terciária para as amostras A e B..... 117
Tabela 5.10: Resultados dos testes de recuperação secundária para as amostras A e B..... 120

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Estrutura molecular do surfactante dodecil sulfato de sódio (fórmula quimica $C_{12}H_{25}NaSO_4$). 24
Figura 3.2: Classificação dos surfactantes em função do grupo hidrofílico. 25
Figura 3.3: Aplicações dos surfactantes em função da relação hidrofilicidade e lipofilicidade (HBL, em inglês hydrophilic-lipophilic balance)..... 26
Figura 3.4: A) Exemplos de interação entre moléculas em diferentes interfaces A) líquido-ar; B) Interface líquido-líquido.. 28
Figura 3.5: Estruturas moleculares de biossurfactantes: (A) glicolipídeo (Raminolipídeo); (B) Polimérico (Emulsan); (C) Lipopeptídeo (Surfactina); (D) Fosfolipídeo (fosfatidilinositol) 33
Figura 3.6: Lipopeptídios produzidos por *Bacillus subtilis*.. 39
Figura 3.7: Esquema de um reservatório. 51
Figura 3.8: Mecanismos de recuperação de petróleo..... 52
Figura 3.9: Malha de poços injetores/produtores..... 53
Figura 3.10: Métodos de recuperação de petróleo e as faixas média de seus respectivos fatores de recuperação. 55
Figura 3.11: Métodos químicos de recuperação de petróleo..... 57
Figura 3.12: Curva típica de recuperação secundária (injeção de água) seguida da recuperação terciária de petróleo..... 58
Figura 3.13: Exemplo de gráfico de Pareto. 60
Figura 3.14: Exemplo de superfície de resposta. 61
Figura 4.1: Fluxograma da obtenção até a aplicação do BS.. 66
Figura 4.2: Amostras de rochas arenitos com 2,3 cm de diâmetro e comprimentos variados 77
Figura 4.3: Simulador físico de teste de escoamento em meios porosos do laboratório de Caracterização de Rochas e Fluidos/CENPES/Petrobras [A: Sistema de injeção (bomba + fluido); B: Camisa metálica; e C: Sistema de coleta/ monitoramento e quantificação] 78
Figura 4.4: Camisa de aço (*core holder*) com 4,6 cm de diâmetro e 22 cm de comprimento..... 79
Figura 4.5: Esquema do meio poroso acondicionado..... 79
Figura 5.1: Curva de calibração (A) e gráfico de resíduos (B) para concentração celular..... 82
Figura 5.2: Curva de calibração (A) e gráfico de resíduos (B) para surfactina.. 83
Figura 5.3: Curva de calibração (A) e gráfico de resíduos (B) para sacarose..83
Figura 5.4: Perfis cromatográficos A) surfactina (Sigma-Aldrich); B) surfactina produzida por *B. subtilis* 89
Figura 5.5: Gráfico de Pareto para valores de tensão superficial obtidos para seleção de micronutrientes..... 92
Figura 5.6: Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina obtidos para seleção de micronutrientes 92
Figura 5.7: Gráfico de Pareto para valores de tensão superficial obtidos para seleção de macro e micronutrientes..... 96
Figura 5.8: Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina obtidos para seleção de macro e micronutrientes 97

Figura 5.9: Superfície de resposta (3 D) para concentração de surfactina em função das concentrações de açúcar VHP e NH_4NO_3 100
Figura 5.10: Superfície de resposta (2 D) para concentração de surfactina em função das concentrações de açúcar VHP e NH_4NO_3. 100
Figura 5.11: Parâmetros cinéticos referentes ao consumo de sacarose e crescimento celular pela atividade de *Bacillus subtilis* em meio definido pelo DCCR.. 102
Figura 5.12: Parâmetros cinéticos referentes à concentração de surfactina, TS e pH pela atividade de *Bacillus subtilis* LFB 732 em meio definido pelo DCCR 102
Figura 5.13: Superfície de resposta (3 D) e gráfico de contorno (2 D) para tensão superficial em função de pH e salinidade para T= 30 °C 109
Figura 5.14: Superfície de resposta (3 D) e gráfico de contorno (2 D) para tensão superficial em função de pH e salinidade para T= 55 °C. 109
Figura 5.15: Superfície de resposta (3 D) e gráfico de contorno (2 D) para tensão superficial em função de pH e salinidade para T= 80 °C. 110
Figura 5.16: Relação linear entre as vazões e pressões do óleo 114
Figura 5.17: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (injeção de água) na amostra A (T1-A). 115
Figura 5.18: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (injeção de água) na amostra B (T1-B). 116
Figura 5.19: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (inj. de água) e terciária (inj. de surfactina) na amostra A (T1 e T2-A)..... 118
Figura 5.20: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (inj. de água) e terciária (inj. de surfactina) na amostra B (T1 e T2-B)..... 119
Figura 5.21: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), e secundária (surfactina) na amostra A (T1 e T3-A). 121
Figura 5.22: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), e secundária (surfactina) na amostra B (T1 e T3-B). 122
Figura 5.23: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), terciária (surfactina) e secundária (surfactina) na amostra A (T1, T2 e T3-A)..... 123
Figura 5.24: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), terciária (surfactina) e secundária (surfactina) na amostra B (T1, T2 e T3-B)..... 123

LISTA DE SIGLAS

A: Área

AG: Ácido graxo

Asn: Asparagina

Asp: Aspartato

BB: Box-Behnken

BS: Biossurfactante

°C: Grau Celcius

CENPES: Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello

CICP: Cloreto de cetilpiridino

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

C:N: Relação carbono nitrogênio

CMC: Concentração Micelar Crítica

CRF: Caracterização de rochas e fluidos

CTAB: Brometo de cetiltrimetil amônico

D: Diâmetro

DCCR: Delineamento Composto Central Rotacional

DHF: Dihexadecil fosfato

D.O.: Densidade ótica

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

DTAB: Brometo de Dodeciltrimetil Amônio

ED: Eficiência de Deslocamento

EOR: *Enhanced Oil Recovery*

EV: Eficiência de Varrido

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

F_c: Forças Capilares

F_v: Forças Viscosas

FR: Fator de Recuperação

Glu: Glutamato

GRAS: *Generally Recognized as Safe*

h: hora

HBL: *hydrophilic-lipophilic balance*

ILe: Isoleucina

Ko: Permeabilidade absoluta ao óleo

Kg: Permeabilidade absoluta ao gás

Kw: Permeabilidade absoluta à água

l: litro

L: Comprimento

L.D.: Limite de Detecção

Leu: Leucina

mD: Milidarcy

mg: miligrama

mJ/m^2: milijoule por metro quadrado

mN/m: milinewton por metro

MEOR: *Microbial Enhanced Oil Recovery*

MM: Massa Molar

Nc: Número capilar

OOIP: *Original Oil in Place*

Orn: Ornitina

PB: Plackett-Burman

PDEP: Pesquisa e Desenvolvimento em Exploração e Produção

Pro: Prolina

Qg: Vazão de gás

Qo: Vazão de óleo

Qw: Vazão de água

$\mathbf{Q_p}$: Produtividade

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

Ser: Serina

SLS: Lauril sulfato de sódio

SQ: Surfactante Químico

Soi: Saturação de óleo inicial

Sor: Saturação de óleo residual

Swi: Saturação de água inicial

Swr: Saturação de água residual

TI: Tensão Interfacial

TS: Tensão Superficial

Tyr: Tirosina

Val: Valina

VHP: *Very High Polarization*

Vp: Volume poroso

Voi: Volume de óleo inicial

Vt: Volume total

vvm: volume de ar por volume de meio por minuto

Vwi: Volume de água inicial

$\mathbf{Y_{P/S}}$: rendimento do produto por substrato consumido

Δ**p**: Pressão

v: Velocidade intersticial

μ: Velocidade específica de crescimento

μg: viscosidade do gás

μw: viscosidade da água

μo: viscosidade do óleo

ɣ: Tensão interfacial

RESUMO

SANTIAGO, Mariana Ruiz Frazão. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis:* caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo. Orientadores: Eliana Flávia Camporese Sérvulo, Maria Aparecida de Melo, Paula Fernandes de Aguiar. Rio de Janeiro, 2019. Doutorado (Programa de Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A injeção de surfactantes químicos (SQ) tem sido um dos métodos adotados para a recuperação avançada de petróleo (*EOR*, *enhanced oil recovery*), pela comprovada eficácia e relação custo-benefício. No entanto, os surfactantes produzidos por rota química são tóxicos para os seres vivos, e, portanto, sua aplicação em campo pode resultar em contaminação ambiental. Comparativamente, os surfactantes sintetizados por microrganismos, denominados biossurfactantes (BS), são biodegradáveis e atóxicos, além de possuírem poder tensoativo similar ou mesmo melhor, e ainda apresentam estabilidade em ampla faixa de temperatura, pH, e força iônica. Assim, o objetivo do presente trabalho foi a produção microbiana de BS pela linhagem *Bacillus subtilis* LFB 732 utilizando açúcar bruto VHP (*very high polarization*), matéria-prima renovável e economicamente vantajosa, uma vez que o custo de produção é o principal entrave à comercialização de BS. O trabalho incluiu a otimização da composição do meio empregando como estratégias estatísticas os planejamentos Plackett-Burmann (PB) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Ensaios em frascos *Erlenmeyer* (500 mL), dispostos em agitador orbital a 150 rpm, 30±1°C por 24 h, demonstraram o efeito positivo dos macronutrientes Na_2HPO_4 e $MgSO_4$, e do micronutriente $FeSO_4$. Adicionalmente, os perfis cromatográficos dos BS obtidos nas distintas condições nutricionais testadas foram comparáveis ao do padrão comercial de surfactina. Ensaios posteriores de fermentação em batelada convencional em biorreator de bancada à 30±1°C, 300 rpm e 1,0 vvm, com o meio definido (g/L: VHP, 35; NH_4NO_3 , 3; Na_2HPO_4 , 3; $MgSO_4$, 0,2; e $FeSO_4$, 0,005) mostraram ser o crescimento celular associado à síntese de surfactina, com máximo de 364,3 mg/L de surfactina alcançado em 10 horas de processo. Por fim, foi avaliada a aplicabilidade do mosto fermentado isento de células na recuperação de óleo médio. Os testes de fluxo foram realizados para duas amostras de rocha reservatório de arenito, para permeabilidades de 50 mD (Amostra A) e de 500 mD (Amostra B). A injeção do mosto fermentado na rocha reservatório, posteriormente à recuperação secundária com água, resultou em valores de fator de recuperação de óleo (FR) de 87 e 64 % em relação ao OOIP (*original oil-in place*), respectivamente. Quando o mosto fermentado foi diretamente injetado no sistema, isto é, sem previa recuperação secundária com água, foram determinados FR de 80 % e 81% OOIP, respectivamente. Assim, pode-se afirmar que a surfactina produzida por *B. subtilis* LFB 732 a partir de VHP com pouca suplementação nutricional apresenta potencial eficiência na recuperação de petróleo, inclusive para aplicação em rochas de baixa permeabilidade.

Palavras Chaves: biossurfactante, surfactina, *Bacillus subtilis*, otimização, recuperação avançada de petróleo.

ABSTRACT

SANTIAGO, Mariana Ruiz Frazão. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis:* caracterization, optimization and application in oil industry. Advisors: Eliana Flávia Camporese Sérvulo, Maria Aparecida de Melo, Paula Fernandes de Aguiar. Rio de Janeiro, 2019. PhD (Chemical and Biochemical Process Engineering Program) – School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Injection of chemical surfactants (SQ) has been one of the methods adopted for enhanced oil recovery (EOR) due to its proven efficacy and cost-effectiveness. However, chemically produced surfactants are toxic to living things and therefore their application in the field can result in environmental contamination. Comparatively, surfactants synthesized by microorganisms, called biosurfactants (BS), are biodegradable and non-toxic, having similar or even better surfactant power, and still maintaining stability over a wide temperature, pH, and ionic strength range. Thus, the objective of the present work was the microbial production of the BS by *Bacillus subtilis* LFB 732 strain using very high polarization (VHP) raw sugar. Since the production cost is the main obstacle to the commercialization of BS, VHP raw sugar was used as a renewable and economically advantageous raw material. The work included the optimization of evironmental composition using the Plackett-Burmann (PB) and Central Rotational Composite Design (DCCR) designs as statistical strategies. Tests in Erlenmeyer flasks (500 mL), placed on orbital shakers at 150 rpm, 30 ± 1 ° C for 24 h, demonstrated a positive effect for Na2HPO4 and MgSO4 macronutrients, and FeSO4 micronutrient. Additionally, the chromatographic profiles of the BS obtained under different nutritional conditions tested were comparable to the commercial surfactin standard. Subsequent, conventional batch fermentation tests in a bench top bioreactor at 30 ± 1 ° C, 300 rpm and 1.0 vvm, with the defined medium (g/L: VHP, 35; NH_4NO_3, 3; Na_2HPO_4, 3; $MgSO_4$, 0,2; and $FeSO_4$, 0.005) were shown to be the cell growth associated with surfactin synthesis, with a maximum of 364,3 mg /L surfactin achieved within 10 hours of process. Finally, the applicability of cell-free fermented mash in medium oil recovery was evaluated. Flow tests were performed for two sandstone reservoir rock samples for permeability of 50 mD (Sample A) and 500 mD (Sample B). Injection of fermented mash into reservoir rock after secondary recovery (RS) with water resulted in oil recovery factor (FR) values of 87% and 64% respectively, compared to original oil-in place (OOIP). When the fermented must was directly injected into the system, that is, without previous secondary recovery with water, a FR of 80% and 81% OOIP were determined, respectively. Hence, the surfactin produced by B. subtilis LFB 732 from VHP with little nutritional supplementation has potential oil recovery efficiency, even for application in low permeability rocks.

Keywords: biosurfactant, surfactin, *Bacillus subtilis*, optimization, advanced oil recovery.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas estruturalmente constituídas por grupos hidrofílico e hidrofóbico, o que permite que se distribuam nas interfaces entre fluidos imiscíveis (SANTOS *et al*, 2016). Forma-se, então, um filme molecular que propicia a redução da tensão superficial entre fase gás/líquido ou da tensão interfacial entre fases líquido/líquido e sólido/líquido (DE *et al*, 2015). As propriedades de superfície, únicas aos surfactantes, possibilitam efeitos variados como detergência, umectação, emulsificação, solubilização, dispersão e formação de espuma, entre outras (LOURITH & KANLAYAVATTANAKUL, 2009; SHAH; BHATTARAI; CHATTERJEE, 2013) e, por conseguinte, uma ampla gama de aplicações industriais. Dentre os possíveis usos destaca-se o seu emprego em formulações de cosméticos, fármacos, alimentos, bebidas, tintas, produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza, produtos químicos orgânicos, agroquímicos, fertilizantes, inseticidas, além da importância já constatada em processos de biorremediação de solos e águas contaminados, inclusive por óleo bruto, e de recuperação de minérios (KARSA, 1998; SCHRAMM, 2010; FELIPE & DIAS, 2017; VARJANI & UPASANI, 2017).

Dados do início do século XXI apontavam ser a oferta mundial de surfactantes sintéticos superior a 3 milhões de toneladas ao ano, sendo, segundo a literatura, a maior parte destinada à fabricação de detergentes para uso doméstico (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; YU; ZHAO; BAYLY, 2008). Ainda hoje, aproximadamente 60 % da produção de surfactante é direcionada para uso em detergentes (BABAJANZADEH; SHERIZADEH; RANJI, 2019; FALK, 2019). De acordo com a publicação da *Allied Market Research* (2019), o mercado global de surfactantes equivale a pouco mais de US $ 43 bilhões, com taxa de crescimento anual de 5 % a 9 %, prevista para o periodo 2019-2025, quando é previsto alcançar US $ 66 bilhões. Este cenário mostra a importância econômica, em nível mundial, dos surfactantes, no cenário atual e nos próximos anos.

Em geral, a maior parte dos surfactantes comercializados é obtida por síntese química a partir de derivados do petróleo (PIISPANEN, 2002; BENVEGNU; PLUSQUELLEC; LEMIEGRE, 2008; FREITAS *et al*, 2016), ou

seja, são produtos não biodegradáveis e de elevada toxicidade. Logo, se considerada a produção atual dos surfactantes químicos e o crescimento esperado, bem como o uso intensivo destes produtos químicos em distintas formulações em todo o mundo, pode-se prever o grau do impacto ambiental nas próximas décadas. Por outro lado, a conscientização da sociedade pela conservação do meio ambiente, aliada à efetiva participação de orgãos governamentais com a criação de diretrizes regulatórias, fiscalização e controle para promover o seu cumprimento, tem reforçado a necessidade da substituição dos surfactantes sintéticos por produtos naturais, ambientalmente amigáveis.

Neste contexto, os surfactantes produzidos por microrganismos, denominados biossurfactantes, têm forte apelo, posto que são biodegradáveis e inócuos ou de baixa toxicidade para os seres vivos, e apresentam propriedades similares ou, até mesmo, melhores que as dos surfactantes químicos, além da possibilidade de envolver um desenvolvimento tecnológico sustentável, contribuindo para minimizar a geração de resíduos industriais (LOURITH & KANLAYAVATTANAKUL, 2009; MARCHANT & BANAT, 2012a; DE ALMEIDA *et al*, 2016; SILVA *et al*, 2018).

Os biossurfactantes (BS) podem ser produzidos por diferentes microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CAO *et al*, 2009; SEKHON; KHANNA & CAMEOTRA, 2012; SANTOS *et al*, 2016; SILVA *et al*, 2018). Estes grupos microbianos compreendem várias espécies potencialmente produtoras de BS, as quais originam difentes biomoléculas tensoativas que, mesmo para uma única linhagem, pode variar estruturalmente dependendo das condições de cultivo, isto é, da composição do meio de cultura e/ou variação dos fatores operacionais, como por exemplo, temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio (DE *et al*, 2015; NURFARAHIN;MOHAMED; PHANG, 2018). A grande diversidade estrutural de moléculas de BS permite garantir a substituição dos surfactantes químicos em variadas aplicações industriais e, inclusive, com novas possibilidades (LOURITH & KANLAYAVATTANAKUL, 2009; BANNAT *et al*, 2010; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013; SHEKHAR; SUNDARAMANICKAM; BALASUBRAMANIAN, 2015; GARCÍA-REYES & OCAMPO, 2016; LIDUINO; SERVULO; OLIVEIRA, 2018).

As bactérias, dentre os microrganismos potenciais produtores de biossurfactantes, englobam o maior número de espécies (MARCHANT & BANAT, 2012b). Particularmente as espécies do gênero *Bacillus* são capazes de produzir grandes quantidades de moléculas tensoativas (MADSEN *et al*., 2015; SANTOS *et al*, 2019). Por exemplo, diferentes linhagens de *B. subtilis*, geralmente consideradas GRAS (acrônimo de *Generally Recognized As Safe*) podem produzir uma variedade de metabólitos bioativos, com destaque para os lipopeptídeos, biossurfactantes de baixa massa molecular (MARCHANT & BANAT, 2012a), e reconhecidos pelas propriedades antimicrobianas e tensoativas (CARVALHO *et al*, 2010; RAAIJMAKERS & MAZZOLA, 2012).

O principal lipopeptídeo sintetizado por *B. subtilis* é a surfactina, uma molécula aniônica, que apresenta propriedades tensoativa e emulsificante (MULLIGAN, 2005; REIS *et al*, 2004). Em comparação aos surfactantes sintéticos como o dodecilsulfato de sódio (SDS), normalmente empregado na EOR e, inclusive a outros biossurfactantes, a surfactina apresenta maior capacidade de redução da tensão superficial e da tensão interfacial (BARROS *et al,* 2007). Contudo, a aplicação industrial da surfactina, assim como de outros biossurfactantes, se por um lado é tecnicamente competitiva com os surfactantes químicos, por outro apresenta elevado custo de produção, inviabilizando sua utilização comercial (SYLDATK & HAUSMANN, 2010). Uma estratégia, segundo Maneerat (2005), é o emprego de fontes renováveis na elaboração dos meios, o que pode reduzir em até 30 % os custos globais da produção. De fato, várias publicações têm demonstrado ser o aproveitamento dos recursos renováveis a melhor tática para produção de biossurfactantes por via microbiana (MANEERAT, 2005; BENVEGNU, PLUSQUELLEC & LEMIEGRE, 2008; AMODU; NTWAMPE; OJUMU*,* 2014; SATPUTE; PLAZA; BANPURKAR, 2017; SINGH; PATIL; RALE, 2018; ARAUJO *et al*., 2019; PELE *et al*, 2019).

Um destes recursos é o açúcar VHP (*very high polarization*), um açúcar bruto, obtido por fabricação direta nas usinas brasileiras a partir do caldo de cana-de-açúcar, e utilizado como matéria-prima nas refinarias para a produção de açúcar refinado e outros processos de industrialização, como também destinado à exportação (PAPADAKI *et al,* 2018; BOVIATSI *et al*, 2019; MAINA

et al, 2019). No Brasil, o açúcar de cana é utilizado na bioprodução dos ácidos lático e cítrico, pelas empresas Purac Sínteses Indústria Comércio Ltda, Campos dos Goytacazes, RJ e Tate & Lyle Brasil SA, Santa Rosa de Viterbo, SP, respectivamente. O presente estudo é inédito quanto ao uso do açúcar VHP, como única fonte de carbono e energia, para a produção de biossurfactante pela linhagem brasileira de *Bacillus subtilis* LFB 732. Particularmente, o uso do VHP na elaboração do meio para a produção de BS, além de contribuir para a redução de custos visa reduzir o intensivo uso de derivados de petróleo para a síntese de produtos químicos, consolidando o conceito de biorrefinaria. Este estudo também fez uso de ferramentas estatísticas para definição de macronutrientes e micronutrientes de relevância para a síntese microbiana do BS, haja vista a variedade de sais que compõem os meios indicados pela literatura científica para este fim (GHOJAVAND *et al*, 2008; AL-BAHRY *et al*, 2013; FERNANDES *et al*, 2016) e o ônus devido à suplementação nutricional. Por outro lado, as impurezas normalmente constituintes de produtos de origem natural, como o VHP, podem contribuir, nem que seja parcialmente, para compor um meio nutricionalmente balanceado para o adequado metabolismo da bactéria. Por fim, o caldo fermentado contendo o BS (surfactina) produzido em biorreator na condição nutricional ideal, tão somente centrifugado para a remoção de células, foi avaliado diretamente para a recuperação avançada de petróleo em rocha-reservatório (arenito), em duas permeabilidades distintas, visando uma aplicação industrial de interesse.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como meta formular um meio economicamente próprio para produção industrial de lipopeptídeo, a fim de viabilizar a sua aplicação na recuperação de petróleo. Para tanto, foi avaliado o emprego do açúcar VHP (*very high polarization sugar*) de modo a contemplar as fontes de carbono e energia, bem como dos elementos químicos essenciais para a atividade da cepa isolada de *Bacillus subtilis* LFB 732.

Neste contexto, este trabalho abordou os objetivos específicos abaixo descritos.

2.2. Objetivos Específicos

- Selecionar os micronutrientes e os macronutrientes do meio de produção relevantes para a síntese de biossurfactante pelo microrganismo em estudo, empregando o planejamento experimental Plackett-Burman, tendo como variáveis respostas a tensão superficial e a concentração de biossurfactante produzido;
- Otimizar o meio para a produção do lipopeptídeo, em frascos agitados, através de planejamento Delineamento Composto Central Rotacional, tendo como variável resposta a concentração do biossurfactante;
- Avaliar a aplicabilidade da surfactina na recuperação avançada de óleo cru de rochas-reservatório arenitos, de duas diferentes permeabilidades.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Surfactante: Definição, estruturas moleculares, propriedades e aplicações

Termo derivado da contração da expressão em inglês ***surf**ace **act**ive **a**gent**s***, também referido como tensoativo, é a denominação dada às substancias orgânicas ou organometálicas, cuja estrutura molecular lhes confere particularmente a capacidade de modificar as propriedades de superfície de um líquido ou de interfaces líquido/líquido ou líquido/sólido (MANIASSO, 2001; GECOL, 2006; HIRSCH, 2015; SILVA *et al*, 2014). Isso se deve à estrutura química dos surfactantes composta de dois grupos funcionais com diferentes afinidades, isto é, a presença de pelo menos um grupo hidrofílico e de um hidrofóbico na mesma molécula (ROSEN, 2004; KARSA & PORTER, 2012; NAKAMA, 2017). Logo, são moléculas anfifílicas ou anfipáticas, embora nem todo composto anfifílico possua ação tensoativa (SALAGER, 2006). Para tanto, é necessário que a molécula apresente um certo equilíbrio entre a hidrofobicidade e a hifrofilicidade. A Figura 3.1 ilustra as partes polar (hidrofílica) e apolar (hidrofóbica) do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulfate*) ou lauril sulfato de sódio (SLS, do inglês *sodium lauryl sulfate*), comercialmente empregado em detergentes para uso doméstico, shampoos e cremes dentais (MYERS, 2005).

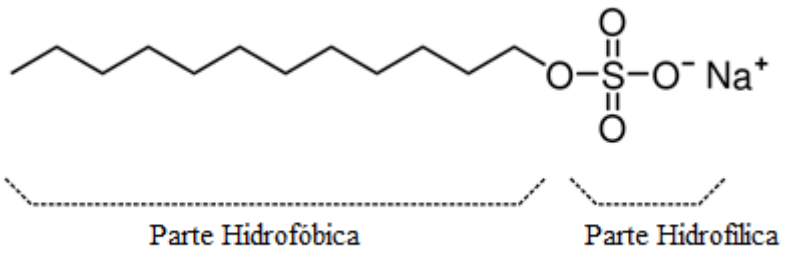


Figura 3.1: Estrutura molecular do surfactante dodecil sulfato de sódio (fórmula quimica $C_{12}H_{25}NaSO_4$). Fonte: ALVES (2019).

Estruturalmente, os surfactantes sintéticos podem apresentar regiões hidrofílicas diferenciando quanto a carga elétrica (NASCENTES *et al*, 2002; VAN

HAMME *et al*, 2006), o que permite classificá-los em iônicos e não iônicos, conforme Figura 3.2 (LICHTENBERG *et al,* 1983; NAKAMA, 2017).

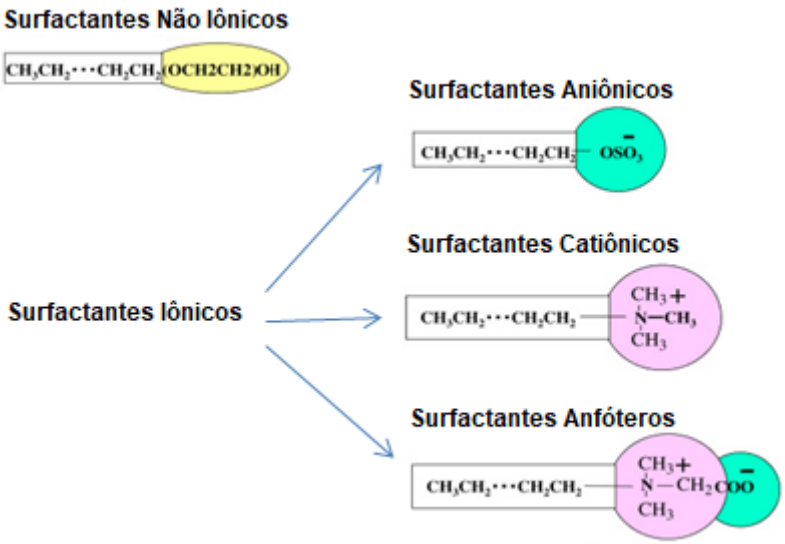


Figura 3.2: Classificação dos surfactantes em função do grupo hidrofílico. Fonte: NAKAMA (2017).

Os surfactantes não iônicos não se dissociam em solução aquosa, sendo distinguidos em função do tipo do grupo hidrofílico, como glicerol ou sorbitol, e normalmente polioxietileno (NAKAMA, 2017), enquanto os grupos hidrofílicos dos surfactantes iônicos são comumente: carboxilato ($RCOO^-$), sulfato ($ROSO_3^-$), sulfonato (RSO_3^-), carboxibetaína ($RC_5H_{10}N_2OCOO^-$), sulfobetaína ($RN(CH_3)_2C_3H_6SO_3-$), e quaternário de amônio ($-R_4N^+$). Por isso, quando em solução aquosa se dissociam, diferenciando-se em: (i) aniônicos (carga negativa), sendo exemplos, cloreto de cetilpiridino (CICP), Dodecil sulfato de sódio (SDS), e Dihexadecil fosfato (DHF); (ii) catiônicos (carga positiva), p.ex., Brometo de cetiltrimetil amônico (CTAB) e Brometo de dodeciltrimetil amônio (DTAB); e (iii) zwitteriônicos ou anfóteros (neutros, com ambas as cargas), p.ex., 3- (dodecildimetil amônico) propano 1-sulfato e 4-(dodecildimetil amônio) butirato (DALTIN, 2012; KULKARNI & SHAW, 2016); para estes irá prevalecer a carga da espécie química predominante, dependente da conformação estrutural e do pH da solução aquosa (HAIGH, 1996).

Em face da estrutura química, em geral, os surfactantes iônicos são consideradas moléculas hidrofílicas, enquanto que aqueles não iônicos podem ser hidrofílicos ou lipofílicos, uma vez que a solubilidade deles em água é dependente do balanço entre a capacidade do grupo hidrofílico de interagir com a fase aquosa e da interação do grupo lipofílico com a fase oleosa (ADAMSON & GAST, 1990; KULKARNI & SHAW, 2016). Assim, o balanço hidrofílico-lipofílico, representado por HLB (em inglês, *hydrophilic-lipophilic balance*), proposto por Griffin (1949), embora empírico, é um índice bastante usado para diferenciá-los quanto aos efeitos, tais como, atividade detergente, umectante, emulsificante e/ou antiespumante, dentre outros (Figura 3.3).

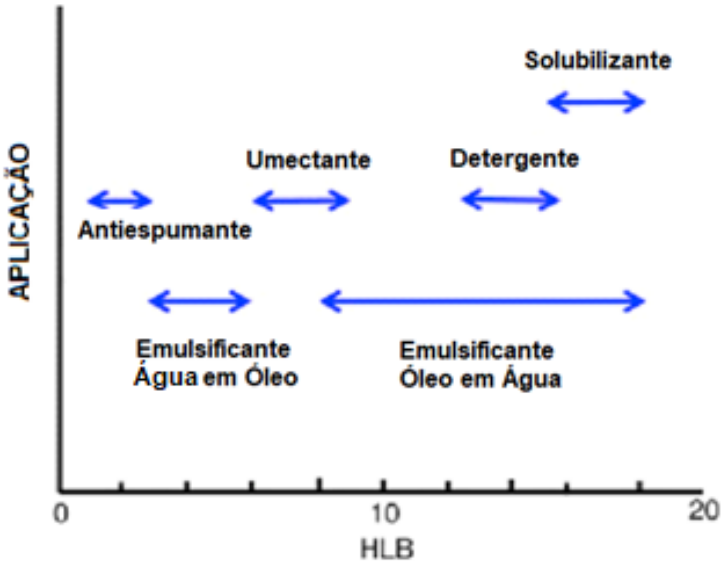


Figura 3.3: Aplicações dos surfactantes em função da relação hidrofilicidade e lipofilicidade (HLB, em inglês *hydrophilic-lipophilic balance*). Fonte: NAKAMA (2017).

Os surfactantes químicos podem também se diferenciar estruturalmente quanto à região hidrofóbica; normalmente composta de hidrocarbonetos de cadeias alifáticas (linear ou ramificada), com 8 a 22 átomos de carbono, grupos aromáticos ou policíclicos (LICHTENBERG *et al,* 1983; SCHRAMM *et al*, 2003; NAKAMA, 2017). Alguns exemplos típicos de grupos apolares presentes em surfactantes comercialmente disponíveis são: alquilbenzeno, alquil linear (saturado ou insaturado); alquil ramificado (saturado);

alquilfenil (ramificado); polioxipropileno; polisiloxano, dentre outros (SCHRAMM *et al*, 2003).

A natureza anfifílica dos surfactantes age no equilíbrio entre distintos tipos de interfaces, tais como superfícies sólido/gás e líquido/gás e interfaces sólido/líquido e líquido/líquido (PENFOLD, 2004; PARK & SEO, 2011). O balanço de energia nestas interfaces decorre do vetor resultante entre as forças intermoleculares (coesão e repulsão), como ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e ligações de Van der Waals, entre as moléculas adjacentes (NITSCHKE & COSTA, 2007; ELSHAFIE *et al,* 2015), o que converge para a redução da tensão superficial ou da tensão interfacial, a depender das interfaces (DALTIN, 2012).

A tensão superficial é um efeito físico resultante da interação das forças de coesão e repulsão das moléculas no interior do líquido, com aquelas na interface com a fase gasosa, na maioria das vezes o ar (Figura 3.4 A); também podendo ser aplicada a interface sólido/gás. Como ilustrado na Figura 3.4 A, no interior do líquido, qualquer molécula sofre forças de coesão e repulsão igualmente pelas moléculas circunvizinhas, com o equilíbrio das forças resultando em vetor nulo. No entanto, na interface líquido/ar (superfície do líquido) ocorre um desequilíbrio das forças uma vez que as moléculas posicionadas tangencialmente à superfície do líquido sofrem apenas interações com as moléculas posicionadas lateralmente e aquelas imersas no líquido, exibindo uma força atrativa mais forte sobre as moléculas vizinhas mais próximas na superfície (HEWITT, 2002). Portanto, a energia das moléculas é maior na superfície do líquido do que no seu interior, sendo, neste caso, a orientação do vetor resultante direcionado para o interior do líquido. Os líquidos tendem a adotar uma forma que minimize sua área de superfície em uma tentativa de manter as moléculas com um maior número possível de vizinhos semelhantes (HEWITT, 2002). Assim, a tensão superficial pode ser definida como o trabalho necessário para aumentar a área superficial em um processo isotérmico reversível, a qual é comumente expressa em mN/m, dina/cm ou mJ/m^2 (ADAMSON & GAST, 1990; POLING; PRAUSNITZ & O'CONNELL, 2001).

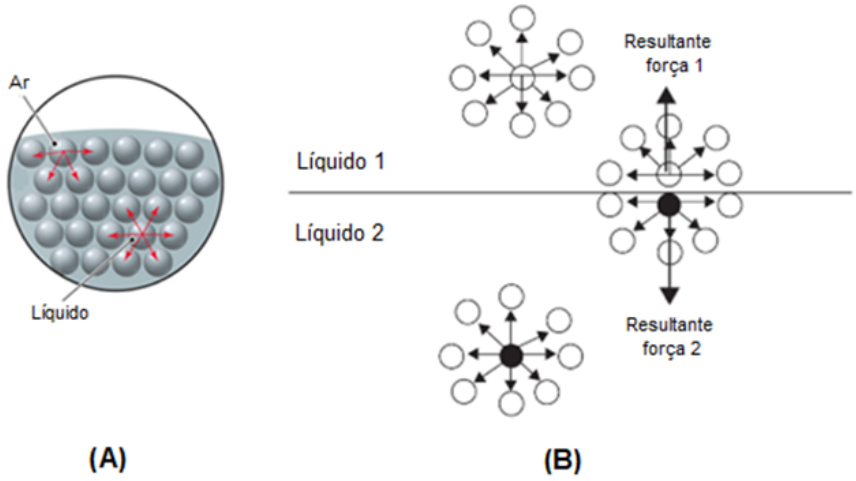


Figura 3.4: Exemplos de diferentes interfaces: líquido/ar (A) e líquido/líquido (B). Fonte: Adaptado de Adamson & Gast (1997); Ebnesajjad & Landrock (2009).

A tensão superficial de um líquido em contato com o ar depende da sua natureza e da temperatura (VARGAFTIK *et al*, 1983). Alguns valores de tensão superficial a 25 °C para líquidos são aproximadamente: água 72 mN/m; álcool etílico 22 mN/m; hexano 18 mN/m; heptano 19 mN/m (JASPER, 1972; GRIGORYEV *et al*, 1992; FU *et al*, 2000). A adição do surfactante dodecil sulfato de sódio à água, em concentrações de 8x 10^{-3} mol/L, promoveu o decaimento da tensão superficial da água para 31,2 mN/m (RANA *et al*, 2002).

O conceito de tensão superficial também se aplica a interfaces entre líquidos de diferentes polaridades, como óleo e água, onde as forças intermoleculares se encontram também em desequilíbrio (Figura 3.4B) (ADAMSON & GAST, 1990; COSGROVE, 2010). Este fenômeno é denominado tensão interfacial. Alguns valores de tensão interfacial a 25 °C para líquidos são: álcool etílico-água 28,5 mN/m; heptano-água 49,5 mN/m; hexano-água 50 mN/m (FU *et al*, 1986; VÁZQUEZ; ALVAREZ; NAVAZA, 1995). Saien *et al* (2014) determinaram redução da tensão interfacial em sistema hexano-água a 25 °C, de 50,7 mN/m para 42,4 mN/m, pela adição de 2 x 10^{-4} mol/L de dodecil sulfato de sódio.

Neste contexto, os surfactantes têm papel primordial posto que a natureza anfifílica promove um equilíbrio entre as forças intermoleculares, resultando em redução da tensão superficial ou interfacial entre diferentes

interfaces. Além da forte capacidade de alterar as propriedades de superfície, a estrutura singular dos surfactantes permite ainda sua auto-agregação, resultando na formação de micelas/vesículas. Deste modo, os surfactantes podem ser utilizados em uma ampla diversidade de aplicações industriais: Agroquímica, Cosméticos, Construção civil, Indústria de alimentos, Indústria têxtil, Indústria do petróleo, Mineração, Nanotecnologia, Fármacos, Sensores e Tratamento de esgoto (SCHRAMM; STASIUK; MARANGON, 2003; MYERS, 2006; PENFOLD, *et al* 2004; DALTIN, 2012; CASTRO *et al,* 2013; DERESZEWSK *et al*, 2015; BEHERA & MULABA-BAFUBIANDI, 2016; BRYCKI *et al*, 2017; NAKAMA, 2017). A Tabela 3.1 compreende exemplos particulares das aplicações dos surfactantes em função das suas propriedades.

Tabela 3.1: Principais propriedades dos surfactantes e respectivas funções e aplicações

Efeito	Função	Exemplo de aplicação
Emulsificante e dispersante	Favorecem a dispersão entre fases de diferentes polaridades formando emulsões estáveis.	Alimentos, cosméticos, tintas e biorremediação.
Solubilizante	A solubilidade dos surfactantes está diretamente relacionada à sua natureza anfifílica.	Produtos farmacêuticos e de higiene.
Umectante e molhabilidade	Capacidade de uma substância líquida de se espalhar sobre superfícies, função da redução da tensão interfacial	Produtos farmacêuticos, cosméticos, têxteis e tintas; recuperação de óleos de reservatórios (EOR)
Espumante	A formação de micelas na interface líquido/ar favorece a estabilidade da espuma, dificultando a coalescência das bolhas.	Alimentos, produtos de higiene, cosméticos; recuperação de metais de minérios em pó por flotação
Antiespumante	Atuam na estrutura da espuma, causando a perda da sua elasticidade.	Recuperação de óleos de reservatórios (EOR); bioprocessos industriais
Detergente	Possibilitam a remoção de partículas oleosas de uma superfície; efeito que depende de um conjunto de propriedades tais como, solubilidade, tensão interfacial, CMC, e efeitos umectante e espumante.	Produtos de limpeza, agricultura.

Espessante	Conferem consistência e a textura à produtos industriais.	Alimentos e tintas.
Formação de micelas/vesículas	Capacidade de auto agregação.	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas.
Biocida	Atuam em diversos processos metabólicos vitais de microrganismos.	Controle biológico de fitopatógenos.

Fonte: Adaptado da literatura (MANIASSO, 2001; NITSCHKE & PASTORE, 2002; SCHRAMM, 2005; MYERS, 2006; SALVINI *et al*, 2006; LOTFALLAH *et al,* 2015; ASTUTI; PURWASENA; PUTRI, 2018).

Dentre as indústrias que se beneficiam das diferentes propriedades dos surfactantes, a indústria do petróleo faz uso intensivo em vários estágios do processamento do óleo. Alguns exemplos da aplicação dos surfactantes na recuperação e produção de petróleo de reservatórios são: emulsificação e desemulsificação de óleo/água; dispersão de lodo nos tanques/vasos; formulação de fluidos de perfuração para poços (SCHRAMM & MARANGONIC, 2000), entre outros; mas, particularmente, para inversão da molhabilidade da rocha-reservatório para a recuperação avançada de petróleo (EOR, *Enhanced Oil Recovery*), conforme apontado pela literatura (AL-SULAIMANI *et al*, 2010; AL-WAHAIBI *et al*, 2014). Para uma abordagem detalhada sobre o tema recomenda-se o livro de autoria de Schramm & Marangonic (2000).

Apesar da importância para diferentes setores industriais e da crescente demanda industrial, os surfactantes químicos comercializados, por derivarem de hidrocarbonetos do petróleo, além de serem tóxicos para os seres humanos, podem se disseminar nos ambientes aquáticos e terrestres, neles persistindo (IKEHATA & EL-DIN, 2010; SACHDEV & CAMEOTRA, 2013). Estas substâncias são responsáveis pelas espumas em rios e em estações de tratamento, diminuindo a qualidade da água (ARSLAN *et al*, 2018).

Por isso, desde o século passado, tem sido proposta a substituição dos surfactantes químicos por produtos análogos naturais, cuja origem pode ser animal, vegetal e, sobretudo microbiana, uma vez que estes últimos apresentam propriedades similares ou mesmo melhor daqueles sintetizados por rotas químicas. No caso dos surfactantes de origem microbiana, denominados

biossurfactantes, a sua obtenção ainda permite atender o conceito de biorrefinaria, visto que podem ser produzidos a partir do emprego de fontes renováveis e biodegradáveis (CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2010), como será explanado adiante.

3.2. Biossurfactantes (BS)

Os surfactantes naturais, particularmente os de origem microbiana, têm atraído a atenção dos pesquisadores desde 1960 devido às inúmeras vantagens quando comparados aos surfactantes sintéticos, tais como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, estabilidade frente às variações ambientais, especificidade de aplicações, além de possibilidade de serem produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo, inclusive resíduos agroindustriais e da petroquímica (FRANCY *et al*, 1991; OLIVEIRA *et al*, 2013; SOURAV *et al*, 2015; DE *et al*, 2015). Portanto, são produtos considerados ecológicos, verdes e sustentáveis (DE *et al*, 2015).

A propriedade tensoativa dos biossurfactantes, como acontece com os surfactantes de origem sintética, se deve à natureza hidrofóbica/hidrofílica de suas moléculas. Assim, os biossurfactantes, do mesmo modo que os surfactantes de origem química podem ser definidos como (SANTOS *et al*, 2016; Da SILVA *et al*, 2018):

> "Moléculas anfipáticas compostas de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas que particionam preferencialmente na interface entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade ou ligações de hidrogênio, tais como interfaces óleo/água ou ar/água, o que permite que formem micelas ou se agreguem em tubos micelares, bicamadas micelares e vesículas".

A região hidrofóbica frequentemente compõe-se de hidrocarbonetos ou ácidos graxos, ambos podendo estar nas formas saturada ou insaturada, ou de seus derivados (NITSCHKE & COSTA, 2007); enquanto que aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, fosfatos, ácidos carboxílicos, álcoois, ésteres são normalmente constituintes da região hidrofílica (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999; SEKHON, KHANA & CAMEOTRA, 2012; USMAN *et al,*

2016). De modo que, analogamente aos surfactantes químicos, os biossurfactantes podem ser distinguidos quanto à carga elétrica, associada ao grupo hidrofílico, em: não-iônicos, aniônicos, catiônicos ou anfotéricos.

Biossurfactantes microbianos, de variadas estruturas químicas, podem ser produzidos por diferentes espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (ARAÚJO *et al*, 2011; USMAN *et al*, 2016). Várias espécies de bactérias, isoladas de solos e águas, já foram descritas quanto a efetiva capacidade de produzir surfactantes extracelularmente, incluindo-se linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (mono ou di-ramnolipídeos), *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* (lipopeptídeos), *Acinetobacter calcoaceticus* (biossurfactantes poliméricos) e também as actinobactérias *Arthrobacter paraffineus* (trealose- e sucrose-lipideos), e espécies de *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeo e glicolipídeos). De fato, as bactérias foram os microrganismos mais explorados para a produção de biossurfactantes (DA SILVA *et al*, 2018). Porém, existem várias publicações que demonstram serem os fungos também capazes de produzir tensoativos. Dentre as leveduras destacam-se *Torulopsis* spp. (soforolipídeos) e *Candida* spp. (liposan e fofolipídeos) (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002), sendo os fungos filamentosos representados por *Penicillium chrysogenum* SNP5 (lipopeptideo), *Aspergillus niger* (glicolipídeo), *Cunninghamella echinulata* (complexo carboidrato-proteína-lipídeo), *Fusarium* sp., *Aspergillus fumigatus, Rhizopus arrhizus* (GAUTAM *et al*, 2014, KANNAHI & SHERLEY, 2012; SILVA *et al*, 2014; QAZI *et al*, 2014; CASTIGLIONI; BERTOLIN; COSTA, 2009; PELE *et al*, 2019).

A diversidade estrutural, função da espécie microbiana e das condições de cultivo empregadas, aliada à elevada eficácia em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade permitem que os BS apresentem propriedades similares aos químicos e, inclusive, particulares (MAYER, 2000; MUKHERJEE *et al*, 2006; PERFUMO *et al*, 2017). De modo que existe a possibilidade dos BS serem aplicados quando os surfactantes químicos têm pouca eficácia, como por exemplo na EOR, posto que a maioria destes últimos não é estável em condições extremas (BOGNOLO, 1999)

3.2.1. Classificação

Os biossurfactantes (BS) são classificados conforme a composição química, massa molar, propriedades físico-químicas, modo de ação e origem microbiana (NITSCHKE & PASTORE, 2002; DE *et al*, 2015). Em relação à sua composição química e massa molar (MM), os biossurfactantes microbianos diferem-se em: (i) baixa MM: glicolipídeos, lipopeptídeos cíclicos e acíclicos e fosfolipídeos, e (ii) alta MM: polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas, poliméricos, vesículas, e células microbianas com atividade surfactante, que são referendadas como particulados (GHARAEI-FATHABAD, 2011). Segundo a literatura, os BS de baixa massa molar são eficientes na redução de tensões superficial e interfacial, enquanto os de alta MM são mais eficazes na estabilização de emulsões óleo/água (DESAI; BANAT, 1997; CALVO *et al*, 2009; RAJESH: SAMUNDEESWARI; ARCHANA, 2017). A Figura 3.5 mostra exemplos de estruturas químicas de biossurfactantes de origem microbiana.

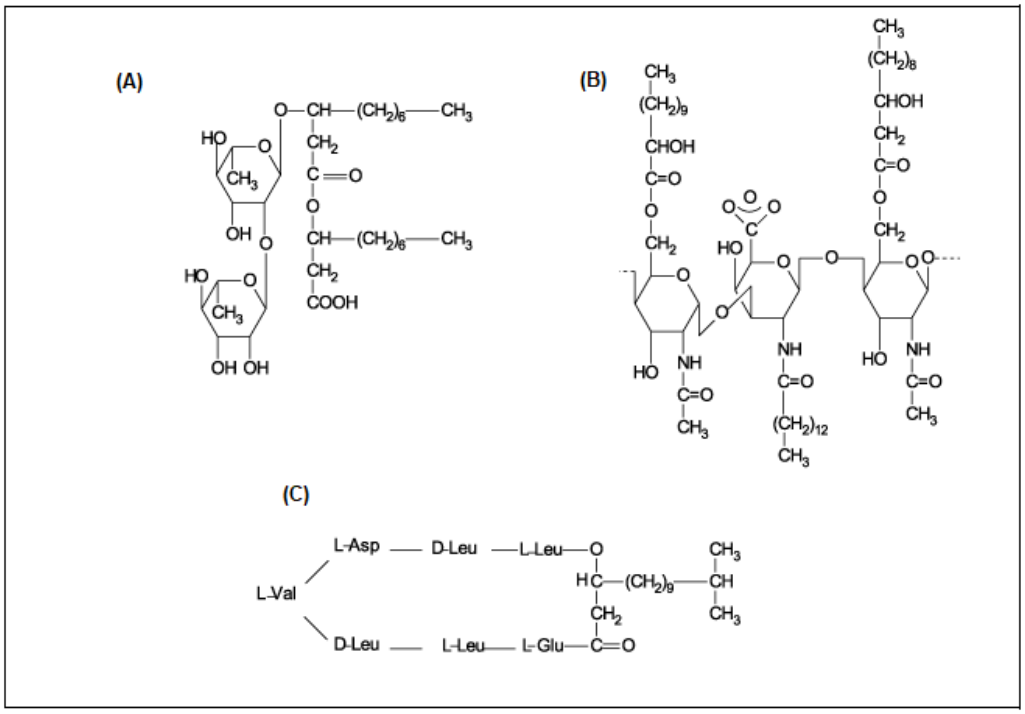


Figura 3.5: Estruturas moleculares de biossurfactantes: (A) glicolipídeo (Raminolipídeo); (B) Polimérico (Emulsan); (C) Lipopeptídeo (Surfactina) (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Neste trabalho, será dada ênfase tão somente aos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis.*

3.2.2. Funções Fisiológicas dos Biossurfactantes

As funções dos biossurfactantes para os microrganismos ainda não estão bem compreendidas. Segundo levantamento bibliográfico (LESUISSE; SCHANCK; COLSON, 1993; NITSCHKE & PASTORE, 2002; DAVEY; CAIAZZA; O'TOOLE, 2003; RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006; VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006; SINGH; PATIL; RALE, 2018), as hipóteses consideradas são:

- Emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos de petróleo e outros compostos insolúveis em água. Neste sentido, a produção de biossurfactantes seria a estratégia de alguns microrganismos para proliferar em ambientes altamente hidrofóbicos, uma vez que a formação de micelas permite o transporte de substratos hidrofóbicos para dentro das células. Porém, nem todos os microrganismos dependem de um substrato insolúvel em água como indutor. Por exemplo, as cepas de *Bacillus subtilis* são capazes de produzir BS também na presença tão somente de substratos hidrossolúveis (LIN, 1996). Além disso, alguns microrganismos são produtores de lipases extracelulares, que permitem a degradação de substâncias oleosas (LESUISSE; SCHANCK; COLSON, 1993; MAUTI *et al*, 2016). E ainda se sabe que muitos BS são produzidos após o crescimento celular, e não na fase *lag* ou no início da fase exponencial do crescimento, o que é um pré-requisito para assimilação dos hidrocarbonetos (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006).
- Adesão/Dessorção das células á/da superfície (molhabilidade): De acordo com Rodrigues *et al* (2006), a presença de estruturas anfifílicas nas paredes celulares dos microrganismos facilita a colonização microbiana de superfícies sólidas, com a formação de biofilmes (agregados de células inseridas em uma matriz polimérica). E, inclusive, pode facilitar a

interação de células com hospedeiros. Os BS também podem mediar o deslocamento das células de superfícies/biofilmes para a fase plantônica quando no local há limitação nutricional;

- Atividade antimicrobiana: Alguns BS, particularmente os lipopeptídios, já foram identificados pela ação antimicrobiana (LIN, 1996; NIELSEN *et al*, 2002). Neste caso, a excreção de BS pelo microrganismo produtor reduz a competição nutricional no ecossistema favorecendo a sua sobrevivência;
- Mediar o mecanismo de *quorum sensing* entre as células bacterianas, proporcionando a regulação de genes;
- Função quelante com metais para minimizar a sua toxicidade.

3.3. Produção de lipopetídeos por *Bacillus subtilis*

3.3.1*. Bacillus subtilis*

O gênero *Bacillus* compreende mais de 200 espécies, que podem ser isoladas dos mais diversos ambientes, como água, plantas, e principalmente de solos (CLAUS & BERKELEY, 1984; GHAFOOR & HASNAIN, 2009). Dentre as espécies, as células de *Bacillus subtilis* se apresentam como bastonetes Gram-positivos retos, de 0,7 a 0,8 µm por 2,0 a 3,0 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 & BERKELEY, 1984; CARBALLIDO-LOPEZ & FORMSTONE, 2007; PHE, 2015). As suas colônias se apresentam caracteristicamente com formato arredondado ou irregular, opaca, com coloração creme ou marrom. Segundo Rudner *et al* (1998), a morfologia macroscópica pode variar de acordo com alterações da composição do meio de cultura empregado.

São quimioheterotróficos, podendo metabolizar diferentes substratos orgânicos, inclusive macromoléculas como amido, pectina e caseína, face à capacidade de sintetizar e secretar hidrolases (CARVALHO *et al,* 2010). Em

alguns casos, o metabolismo de carboidratos envolve a geração de compostos orgânicos ácidos, o que pode ocasionar a redução do pH.

Esta bactéria é aeróbia facultativa, podendo crescer em anaerobiose a partir de nitrato como aceptor final de elétrons (CLAUS & BERKELEY, 1984; RAMOS *et al*, 2000; FRITZE, 2004). Se bem que o crescimento em condição de anaerobiose seja bem limitado.

Esta espécie apresenta crescimento em ampla faixa de temperatura, de 10 a 50˚C, estando a temperatura ótima situada entre 30 e 40˚C (KORSTEN & COOK, 1996; GHAFOOR & HASNAIN, 2009). Da mesma forma, podem crescer em faixa mais ampla de pH, de 5,5 a 8,5, sendo o valor ideal em torno da neutralidade.

3.3.2. Lipopetídeos produzidos por *Bacillus subtilis*

Tipicamente, os lipopeptídeos são particularmente produzidos por espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Aspergillus*, *Serratia, Actinoplanes, Agrobacterim, Thiobacillus e, sobretudo, Bacillus*, tais como *B. subtilis*, B. *licheniformis* e *B. polymyxa (*LIU *et al*, 2015). E, com base na sua estrutura química, os lipopetídeos podem ser distinguidos em cíclicos e lineares. Dos cerca de 90 lipopeptídeos identificados, pertencentes a 26 familias, a maioria é de cíclicos, correspondendo a 86 distribuídos entre 24 das famílias (LIU; YANG; MU, 2005).

As espécies de *Bacillus* são capazes de sintetizar e secretar diferentes tipos de lipopeptídeos cíclicos*,* destacando-se moléculas de baixa massa molar, que consistem de uma cadeia peptídica, cujo átomo de carbono terminal do aminoácido está unido por ligação lactona ao grupo funcional β-hydroxil de um ácido graxo de cadeia curta de comprimento variável, composto por 12 a 19 átomos de carbono (HAAS & DÉFAGO, 2005; BARROS *et al.*, 2007; ONGENA *et al*., 2007; AL-AJLANI *et al*, 2007; SEN, 2008; CARVALHO *et al*, 2010; RAAIJMAKERS & MAZZOLA, 2012). Estes metabólitos, além da propriedade tensoativa, são de interesse como bioativos, devido as já comprovadas propriedades antimicrobianas, antivirais e antitumorais (JACQUES, 2011).

Dentre os lipopeptídeos cíclicos, surfactina, liquenisina, iturina e fengicina foram os mais estudados. Estes se distiguem entre si pelo comprimento da cadeia carbônica e a sequência de aminoácidos. A biossíntese dos diferentes tipos de lipopeptídeos cíclicos está relacionada à cepa empregada no bioprocesso, à fase de crescimento das células utilizadas como inóculo, e às condições de cultivo, tanto nutricionais quanto ambientais.

A seguir breve descrição dos principais lipopeptídeos cíclicos produzidos por espécies de *Bacillus*:

- **<u>Surfactina</u>**

Um surfactante aniônico, cujo nome deve-se a sua excepcional atividade superficial, foi primeiramente reportado e nomeado em 1968 por Arima e colaboradores. Sua estrutura química, determinada por Kakinuma *e* colaboradores (1969) é composta por uma cadeia de sete α-aminoácidos, caracteristicamente, $_{L}$-Glu^{1}-$_{L}$-Leu^{2}-$_{D}$-Leu^{3}-$_{L}$-Val^{4}-$_{L}$-Asp^{5}-$_{D}$-Leu^{6}-$_{L}$-Leu^{7} (LIU; YANG; MU, 2005; MULLIGAN, 2005; SEYDLOVÁ *et al*, 2011). Entretanto, ocorrem diferenças na sequência de aminoácidos e no número de átomos de carbono da cadeia dos ácidos graxos, o que permite haver uma variedade de análogos estruturais (BONMATIN; LAPRÉVOTE; PEYPOUX, 2003; LIU; YANG; MU, 2005; LIU *et al,* 2015a). Baumgart e colaboradores (1991) evidenciaram mais dois análogos de surfactina produzidos por duas linhagens de *B. subtilis,* ATCC 21332 e OKB 105, onde o aminoácido $_{L}$-Leu^{7} foi substituído por Val e $_{L}$-ILe, repectivamente. Já Liu e colaboradores (2007) identificaram três tipos de surfactina em cultivo de *B. subtilis* HSO121, com diferentes cadeias peptidicas: (i) Asp-Leu-Leu-Val-Glu-Leu-Leu-AG; (ii) Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-AG; e (iii) cadeia peptídica esterificada. Também houve diversidade estrutural das cadeias de ácidos graxos.

Cabe ressaltar que diferentes linhagens bacterianas podem produzir moléculas de surfactina estruturalmente semelhantes (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999), enquanto que uma mesma linhagem pode sintetizar simultaneamente lipopeptídeos pertencendo a diferentes famílias, como surfactina, iturina e fengicina (JACQUES *et al*, 1999; ATHUKORALA;

FERNANDO; RASHID, 2009; KIM *et al*, 2010). Por sua vez, estas famílias podem ser subdivididas em isoformas, que diferem quanto à composição dos aminoácidos, e ainda podem apresentar subdivisões em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica (DELEU et al, 1999; VATER et al., 2002; ONGENA et al, 2007). A Figura 3.6 mostra esta subdivisão para as surfactinas.

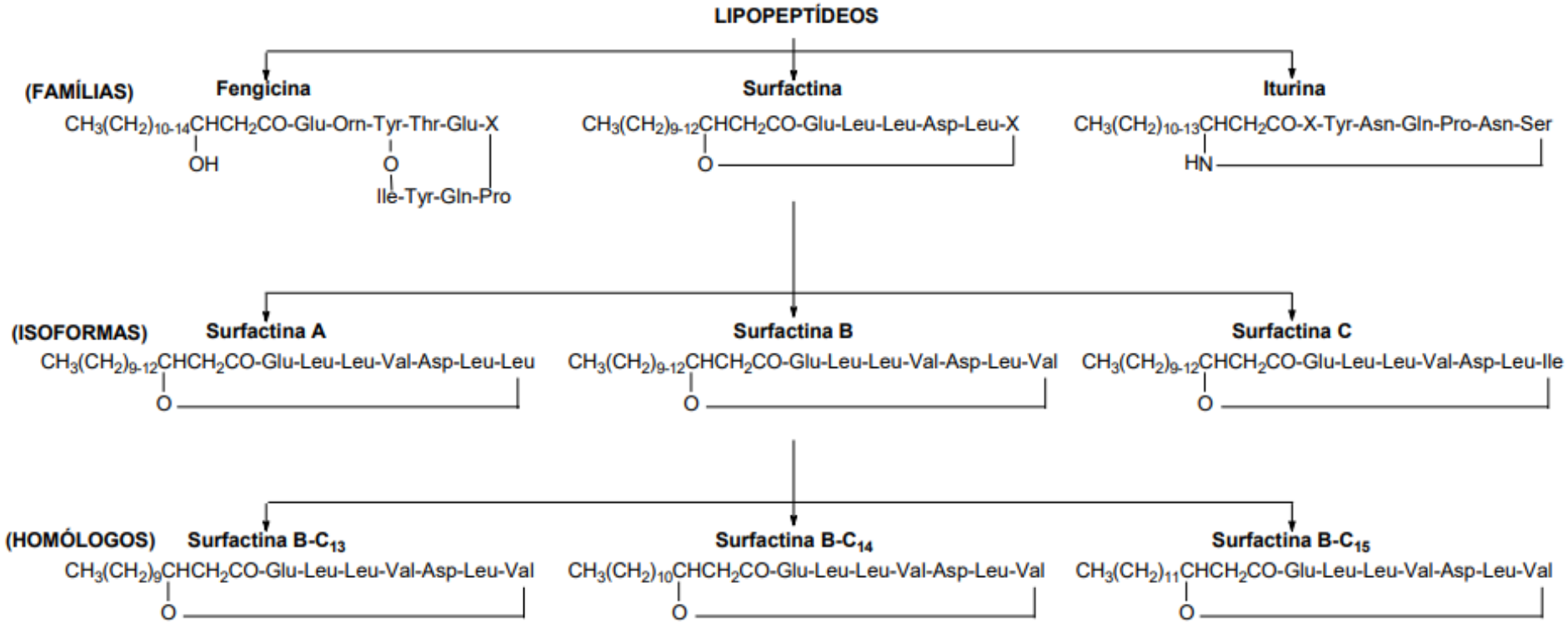


Figura 3.6: Lipopeptídios produzidos por *Bacillus subtilis*. Fonte: Bugay (2009).

Comparativamente, a surfatina é apontada como o biossurfactante mais potente, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m e a tensão interfacial da mistura hexadecano/água de 43 à 1 mN/m, em baixas concentrações (20 µM), conforme algumas publicações cientificas (SHALIGRAM & SINGHAL, 2010; LIU *et al*, 2015b). Ademais, a natureza anfifílica da surfactina permite que esta molécula se associe a camadas lipídicas, causando seu rompimento. Isto resulta na solubilização da bicamada lipídica de membranas biológicas, conferindo-lhe atividade antimicrobiana, antiviral e hemolítica (SOBERON-CHÁVEZ & MAIER, 2011). A capacidade hemolítica, quelação de metais, concentração micelar crítica (CMC) e atividade superficial estão relacionadas à sequência de aminoácidos que modificam a distribuição da relação polar/apolar e/ou a acessibilidade dos grupos carboxílicos (LANG, 2002; BARAKAT, 2010).

A morfologia das micelas de surfactina sofre influência das condições ambientais, tais como pH, temperatura, e íons metálicos. Por exemplo, Knoblich e colaboradores (1995) observaram formas esféricas, elipsoidais e cilíndricas de tamanhos heterogêneos para micelas de surfactina em valores de pH 7, 9,5 e 12.

Diferentemente de outros tipos de biossurfactantes, cuja produção é induzida quando um ou mais nutrientes se esgotam, diversos autores sugerem que a produção da surfactina esteja associada ao crescimento celular, sendo esta uma das razões dos baixos rendimentos obtidos no processo fermentativo (PEYPOUX; BONMTIN; WALLACH, 1999; ANDRADE, 2013). Por isso, o número crescente de estudos conduzidos com o intuito de aumentar a produtividade da surfactina microbiana, englobando a composição do meio de cultivo (fontes de carbono, nitrogênio e elementos traços, e relação de C:N), e taxa de oxigênio dissolvido (WEI & CHU, 1998; FONSECA *et al*, 2007).

A propriedade tensoativa e o caráter emulsificante permitem o uso da surfactina 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*, 2010). Alguns estudos também mostraram a eficácia da surfactina como antiviral, antitumoral, anticoagulante e inibidor de

enzimas (BARROS *et al.*, 2007; SEN, 2008). Porém, ainda é restrito o embasamento científico para estes tipos de aplicação.

- **Iturinas**

Lipopeptídeos com propriedades antifúngicas, sendo a Iturina A (Figura 3.6, X=Asn) o principal representante. São caracterizadas por um anel peptídico constituído de sete aminoácidos, como as surfactinas, ligados a uma cadeia de ácido graxo (C_{14} a C_{17}), finalizada por um β-aminoácido (FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Segundo Vater *et al* (2002), estes lipopeptídeos são sintetizados na fase estacionária.

Também possuem atividade tensoativa, porém são menos eficientes do que as surfactinas. Similarmente a estas, as iturinas atuam contra uma grande variedade de leveduras e fungos filamentosos patogênicos, por provocar a permeabilização de membranas (FILHO; FERRO; PINHO, 2010), sendo o mecanismo baseado na formação de canais iônicos, e não ao rompimento ou solubilização da membrana (ARANDA *et al*, 2005).

- **Fengicinas**

São compostos anfifílicos cíclicos constituídos de dez α-aminoácidos ligados a um ácido graxo β-hidroxilado, cujo comprimento varia de C14 a C18 (ONGENA *et al*., 2007). E, como as iturinas, são metabólitos produzidos na fase estacionária.

Assim como os lipopetídeos anteriormente descritos, as fengicinas apresentam propriedades tensoativas e antifúngicas, com ação restrita aos fungos filamentosos (FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

3.3.3. Fatores que influenciam a produção de biossurfactante

O tipo, qualidade e quantidade do biossurfatante produzido dependem das condições de cultivo do microrganismo produtor, quer sejam nutricionais (fontes de carbono e nitrogênio, e disponibilidade de sais minerais) quer

ambientais (temperatura, pH, agitação e aeração) (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011). Adicionalmente, para tornar o emprego dos biossurfactantes competitivo em relação aos surfactantes sintéticos, há que se priorizar a redução dos custos do bioprocesso, o que pode se dar pela utilização de fontes nutricionais alternativas. Assim, a reutilização de resíduos industriais ou agroindustriais torna-se uma estratégia que concorre ao mesmo tempo para reduzir os custos da produção e minimizar o descarte de poluentes no ambiente, ou a necessidade de tratamento para tal (FONTES *et al,* 2008).

Neste cenário, há necessidade de otimizar as condições de cultivo para cada alteração nutricional, de modo a formular um meio de cultura de baixo custo e que propicie a síntese de biossurfactante com as características de interesse, e máximos de rendimento e produtividade (LIMA, 2016).

- **Fontes de Carbono**

Como já mencionado, a síntese dos biossurfatantes geralmente acontece na presença de substâncias hidrofóbicas. Porém, observou-se que a produção deles por *Bacillus subtilis* pode também se dar a partir de fontes de carbono solúveis em água, principalmente carboidratos. Fox e Bala (2000) mostraram ser possível obter altos rendimentos pelo emprego de amido, de modo a contemplar o emprego de resíduos do processamento de batatas. No entanto, segundo alguns autores, o emprego de hidrocarbonetos ou óleos vegetais pode inibir a atividade do microrganismo produtor, com baixa produção de surfactina (ABUSHADY *et al,* 2005; KIM *et al,* 2010).

As fontes de carbono que apresentam um papel significativo no crescimento, bem como a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* são glicose, manitol e etanol. Podem-se utilizar ainda resíduos tais como, farelo de trigo, resíduos de amendoim, glicerina da síntese de biodiesel, extratos e resíduos de óleo vegetal, milhocina, soro de leite, subprodutos de destilarias, cascas de batata, água residual de mandioca, e palha de arroz (FOX & BALA, 2000; BALA *et al,* 2002; REIS *et al*, 2004; BARROS; PONESI; PASTORE, 2008; GARCÍA-BECERRA; ACOSTA; ALLEN, 2010; COLLA & COSTA, 2013).

- **Fonte de nitrogênio**

A fonte de nitrogênio também tem forte influência na quantidade e qualidade de biossurfatante sintetizado, pois é um elemento essencial para a produção de proteínas e enzimas, importantes no meio para induzir a produção de biossurfactantes (SOURAV *et al*, 2015).

Existem vários compostos que contêm nitrogênio e que podem ser utilizados. Dentre as alternativas, extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de amônio, peptona, nitrato de sódio, extratos de malte e de carne têm sido relatados e utilizados para a produção de biossurfactantes. Em particular, para a produção de surfactina são usados nitrato de amônio e nitrato de sódio (DAVIS *et al*, 1999; AL-AJLANI *et al*, 2007; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA, 2008), enquanto que extrato de levedura é normalmente empregado em baixas concentrações (ABBASI *et al*, 2013; JACKISCH-MATSUURA *et al*, 2014; SOURAV *et al,* 2015).

- **Sais minerais**

O rendimento da fermentação é influenciado não só pelas fontes de carbono e nitrogênio. A composição de outros nutrientes ao meio de cultura, como fósforo, ferro, manganês e magnésio também contribuem para a síntese do biossurfactante (FONTES *et al*, 2008). Traços de elementos como zinco, manganês, molibdênio, cobalto, cobre e cálcio, podem também ser requeridos pelos microrganismos para a síntese do bioproduto. O tipo e a concentração destes sais desempenham um papel fundamental durante a síntese dos biossurfatantes, pois, além de atuarem como cofatores enzimáticos participam do transporte de nutrientes através da membrana plasmática (DE *et al*, 2015).

Os meios de cultura normalmente empregados para produção de surfactina por *B. subtilis* são suplementados com vários micronutrientes e dentre os cátions suplementados (Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, B^{+3}, Mo^{+6}, Ca^{2+}, Zn^{2+}), o principal deles é o ferro. Esse elemento desempenha um importante papel na atividade de algumas enzimas, tais como catalase e succinil desidrogenase, além da atuação efetiva na respiração celular, como componente essencial dos

citocromos (MADIGAN *et al*, 2016). O manganês pode substituir o ferro na cadeia respiratória de alguns micro-organismos, porém a função celular primária do manganês é a de ativador enzimático (Wei *et al,* 2007; MADIGAN *et al*, 2016). Outro elemento traço com importante função é o cobalto, que é um constituinte da vitamina B12, a qual participa da síntese das desoxirriboses, constituintes do DNA (MADIGAN *et al*, 2016). O zinco é um metal traço associado à replicação do material genético, sendo também um ligante da enzima DNA polimerase e de outras proteínas de ligação ao DNA, necessárias para a manutenção e crescimento celular (Gu *et al,* 2005; MADIGAN *et al*, 2016). O cobre, quando em alta concentração no meio de cultura, exerce efeito tóxico para as células, mas esse elemento é essencial para o crescimento e manutenção microbiana uma vez que está associado a enzimas relacionadas à respiração celular, como a peróxido dismutase e a citocromo oxidase (COOPER *et al*, 1981; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA, 2008; MADIGAN *et al*, 2016).

O boro atua como auto-indutor de quórum-sensing (comunicação célula-célula) em bactérias e o molibdênio atua como cofatores de enzimas (MADIGAN *et al*, 2016). O magnésio é necessário para estabilização dos ribossomos, membranas e ácidos nucleicos, sendo também necessário à atividade de enzimas, tais como desidrogenases e quinases (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). O íon cálcio tem importância na integridade e estrutura das membranas celulares, impedindo a lise da célula no meio (NURFARAHIN MOHAMED & PHANG, 2018) e o potássio é necessário para a atividade de diversas enzimas (MADIGAN *et al*, 2016).

- **Temperatura e pH**

A temperatura pode influenciar no processo de produção e estabilização do biotensoativo, mesmo que pequenas variações ocorram. A maior parte dos biotensoativos relatados até agora em diferentes trabalhos foram produzidos na faixa de temperatura entre 25 a 30 °C (SOURAV *et al*., 2015).

Também foi observado o efeito do pH na produção de biossurfatante por *Bacillus subtilis*. Por exemplo, Abushady *et al* (2005) obtiveram baixo

rendimento de surfactina quando o pH do meio de produção foi ajustado a valores inferiores a 6,5, sendo a concentração máxima de surfactina atingida no pH 6,5-7.

- **Agitação e Aeração**

A relação aeração / agitação influencia diretamente a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase aquosa, e, por conseguinte, afeta a atividade metabólica dos microrganismos quer no crescimento celular quer na produção de biossurfactantes (SOURAV *et al*, 2015). Em geral, a produção de biossurfactante por *B. subtilis* é conduzida em aerobiose. Ghribi & Ellouze-Chaabouni (2011) confirmaram esta dependência ao observar que vazões de ar baixas ou muito vigorosas provocavam uma diminuição na síntese do biossurfactante pela linhagem *B. subtilis* SPB1, demonstrando que a transferência de oxigênio é um dos parâmetros-chave para a maximização do rendimento do bioprocesso. Contudo, Rienzo *et al* (2014) observaram ser maior a queda da tensão superficial do meio (70 mN/m) em anaerobiose, quando foi alcançado o valor de 28mN/m ao final do processo fermentativo. Também Willenbacher *et al* (2015), obtiveram taxa de produção específica de surfactina (0,005 g/g.h) e rendimento do produto por substrato consumido ($Y_{P/S}$) de 0,033 g/g em anaerobiose superiores aos valores obtidos no processo aerado. Segundo estes autores, isto se mostra uma alternativa para produzir um biossurfactante que supera os problemas devidos à intensa formação de espuma e a necessidade de configurações adicionais do biorreator.

Tem-se ainda que a agitação está diretamente relacionada à formação de espuma no biorreator, que por sua vez cria uma série de problemas, tais como redução do volume útil, redução na transferência de massa para as células e dificuldades na recuperação do bioproduto e das células do caldo fermentado. Foi constatado por Oliveira e colaboradores (2009) que o emprego de velocidades de agitação entre 150 a 220 rpm favorecem ligeiramente a produção de biossurfactante por linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* a partir do emprego de óleo de palma como única fonte de carbono, em ensaios em frascos agitados. Já para o cultivo de *P. aeruginosa* ATCC 10145 em biorreator, Borges

e colaboradores (2015) observaram efeito diferenciado da concentração de oxigênio dissolvido para quantidade de biossurfactante produzido e capacidade emulsificante; valores máximos, 4,9 g/L e 100% foram obtidos para taxas de aeração de 1,2-2,0 vvm e 0,8-1,4 vvm e velocidade de agitação de 600-1200 rpm e 550-850 rpm, respectivamente.

3.3.4. Uso de *Very High Polarization sugar (*VHP*)* como matéria-prima

Na produção de biossurfactantes diversas matérias-primas renováveis e de baixo custo, têm sido utilizados para o cultivo de microrganismos e produção de biossurfactantes (AMODU; NTWAMPE; OJUMU, 2013; MUKHERJEE & DAS, 2007; NITSCHKE & PASTORE, 2006; SOBRINHO *et al*, 2013; ZHU *et al*, 2012).

Todavia, o principal entrave ao uso de substratos alternativos é encontrar uma matéria-prima que tenha alto valor nutricional e que permita além do crescimento celular a acumulação do produto (MAKKAR & CAMEOTRA, 2002; NITSCHKE; COSTA; CONTIERO, 2005).

O açúcar VHP, do inglês, *Very High Polarization sugar*, é um açúcar bruto com uma polarização entre 99 e 99,3%, termo usado para descrever a porcentagem de sacarose presente em uma massa de açúcar bruto (KOREA *et al*, 2012), é utilizado para a produção de açúcar refinado ou em outros processos industrializados, a fim de transformá-lo em diferentes tipos de açúcar para o consumo. Para isso, a matéria-prima sofre processos adicionais de remoção de contaminantes químicos e microbianos (SUCDEN, 2017). Este açúcar é o tipo mais exportado pelo Brasil.

O açúcar VHP permanece em alta demanda, uma vez que é mais barato ($0,4/kg) que o açúcar refinado e é de fácil refino (MAINA, 2019), podendo também ser utilizado como matéria-prima em bioprocessos.

3.3.5. Publicações científicas da produção de surfactina por *Bacillus* spp.

A Tabela 3.2 apresenta uma compilação de dados concernentes à produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* nos últimos 10 anos, onde

constam as matérias-primas, as cepas utilizadas, condições operacionais, características e concentrações dos biossurfactantes obtidos.

Tabela 3.2: Matérias-primas, respectivos microrganismos, condições operacionais, características e concentrações dos biossurfactantes.

Fonte de carbono	Microrganismo	Condições operacionais	Características do biossurfactante	BS (mg/L)	Referências
4% glicose	*Bacillus subtilis* MSH1 (Biorreator)	30°C 100 rpm 55 horas 1vvm	-	226,2 (30 h)	MUBARAK *et al* (2017)
4% Melaço	*Bacillus subtilis* ANR 88	30°C 160 rpm 60 horas	TS= 27,92 mN/m	513	RANE *et al* (2017)
5% Glicerol	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	35°C 180 rpm 72 horas	TS= 39 mN/m	793	CRUZ *et al* (2017)
1% Diesel em meio mineral	*Bacillus* sp. SB2	30°C 120 rpm 24 horas	TS= 28,16 mN/m	-	JOY, RAHMAN; SHARMA (2017)
2% Glicose	*Bacillus subtilis* R1	30-45°C 150 rpm 96 horas	TS= 29 mN/m (24 h)	700	JHA; JOSHI; GEETHA (2016)
1% Glicerol + 1% óleo de soja	*Bacillus* sp. MTCC 5877	30°C 120 rpm 76 horas	TS= 30,06 mN/m	-	ANJUN *et al* (2016)
2% Glicerol	*B. subtilis* ATTC 6633	30°C 180 rpm 72 horas	TS= 31,5 mN/m (24 h) CMC= 71,9 mg/L	158,1	SOUZA *et al* (2014)
2% Glicose	*B. subtilis* B30	40°C 160 rpm 72 horas	TS= 25,6 mN/m TI= 3,6mN/m	500	AL-WAHAIBI *et al* (2014)

Tabela 3.2: Matérias-primas, respectivos microrganismos, condições operacionais, características e concentrações dos biossurfactantes (Continuação).

Fonte de carbono	Microrganismo	Condições operacionais	Características do biossurfactante	BS (mg/L)	Referências
2% Melaço de tâmara	*B. subtilis* B30	40°C 160 rpm 72 horas	TS= 26,3 mN/m TI= 3,6 mN/m	300	AL-WAHAIBI *et al* (2014)
Suco de caju (6% ART)	*B. subtilis* LAMI005	30°C 180 rpm 72 horas	TS= 30 mN/m (24 h) CMC= 63 mg/L	340	OLIVEIRA (2013)
4% Glicose	*B. subtilis* SPB1 (Biorreator)	37°C 200 rpm 24 horas	-	720	GHRIB & ELLOUZE-CHAABOUNI (2011)
2% Óleo de Palma	*B. subtilis* PT2	37°C 200 rpm 96 horas	TS= 26,4 mN/m	-	PORNSUNTHORNTAWEE *et al* (2008)
1% Sacarose	*B. subtilis* PTCC1696	42°C 250 rpm 48 horas	TS= 26,7 mN/m TI= 0,1mN/m	-	GHOJAVAND *et al* (2008)
2% Glicose	*B. subtilis* 20B (Biorreator)	30°C 160 rpm 72 horas	TS= 29,5-30 mN/m TI= 4,2-4,8mN/m	-	JOSHI; BHARUCHA; DESAI (2008)

Na Tabela 3.2, pode-se observer uma ampla variação nos valores de concentração de BS. Isto mostra que o microrganismo empregado, as condições nutricionais e operacionais e a matéria-prima utilizada, afetam diretamente a produção de BS.

3.4. Aplicações dos Biossurfactantes

O crescente interesse nas aplicações de compostos tensoativos microbianos é baseado em suas variadas propriedades funcionais, como emulsificação, desemulsificação, separação de fases, molhamento, formação de espumas, solubilização e redução de viscosidade de óleos pesados (NITSCHKE & PASTORE 2002; DALTIN, 2012, DE *et al*, 2015).

Assim, os biossurfactantes podem ser utilizados em várias atividades industriais que já envolvem o uso de surfactantes sintetizados quimicamente como: as indústrias de petróleo, farmacêutica, médica, de cosméticos, bem como na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos (textura), tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel, indústrias de tinta, de agentes emulsificantes e de floculação (SACHDEV & CAMEOTRA, 2013). A seguir, será detalhada apenas a aplicação do biossurfactante na recuperação de petróleo, por ser este o tema do trabalho.

3.4.1. Recuperação de petróleo

O petróleo deriva do acúmulo e decomposição de matéria orgânica (zooplâncton e fitoplâncton) em bacias sedimentares, denominadas rochas geradoras, em condições termodinâmicas adequadas de temperatura e de pressão elevadas e numa escala de tempo geológica (THOMAS *et al*, 2001, ROSA; CARVALHO; XAVIER, 2006).

Já a formação de uma jazida petrolífera depende que o petróleo gerado, nas chamadas rochas geradoras, tenha condições favoráveis de migrar para as chamadas rochas reservatório de porosidade e permeabilidade elevadas

e confinadas em algum tipo de armadilha geológica, ou seja, capeadas por uma rocha selante impermeável, que propicia a acumulação do petróleo nesta rocha reservatório, conforme reportado por vários autores (THOMAS *et al*, 2001, ROSA; CARVALHO; XAVIER, 2006; WALTERS, 2007), e ilustrado na Figura 3.7. Exemplos de rochas reservatórios são os arenitos, calcarenitos, rochas sedimentares permeáveis com porosidade intergranular e carbonatos naturalmente fraturados (THOMAS *et al*, 2001). Na parte superior dessa formação, tem-se a rocha não porosa e não permeável conhecida como rocha selante, capeadora ou *cap rock* (representada pela letra A na Figura 3.8) (THOMAS *et al*, 2001*)*. Dentre estas, as argilosas (folhelhos), que se constituem na maioria das rochas selantes nos reservatórios petrolíferos conhecidos, e as evaporíticas presentes em depósitos salinos (THOMAS *et al*, 2001).

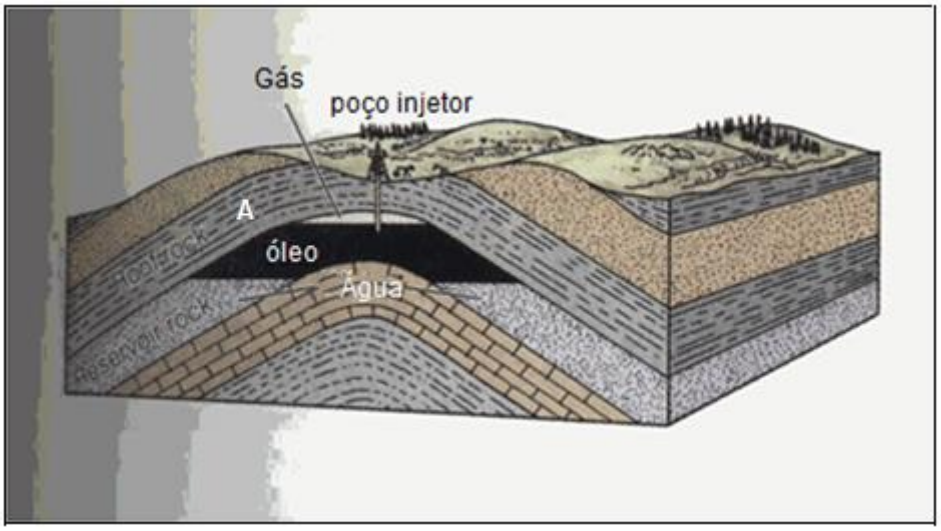


Figura 3.7: Esquema de um reservatório de petróleo. Fonte: Muskat (1982).

Em face da conformação de cada campo petrolífero, como tipo de rocha, tipo de óleo, geometria e condições termodinâmicas (temperatura e pressão), são adotadas estratégias para suplantar as barreiras técnicas e/ou econômicas que dificultam a produção de petróleo. Estas estratégias são traduzidas nos métodos de recuperação de petróleo divididos em primária, secundária e terciária, conforme ilustra a Figura 3.8.

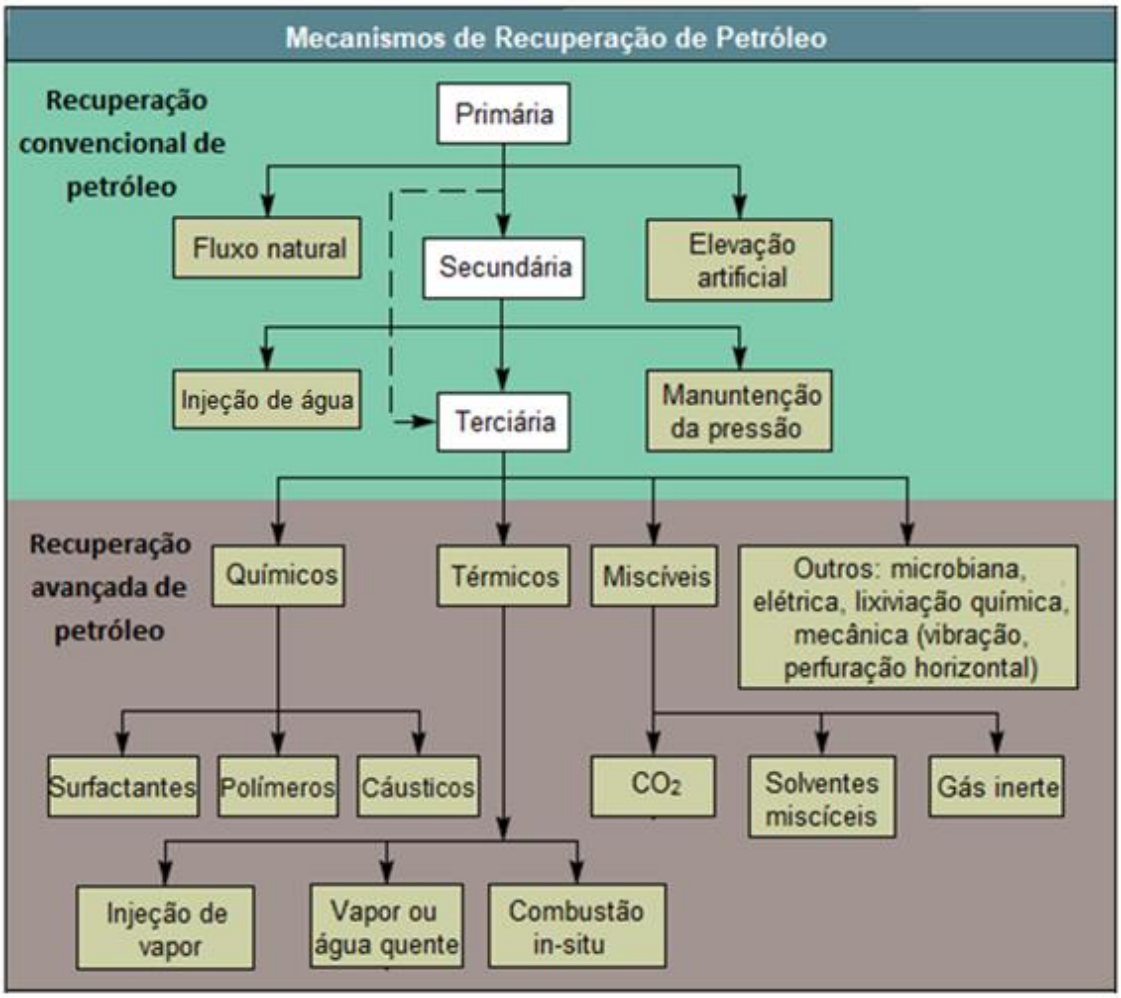


Figura 3.8: Métodos de recuperação de petróleo, Fonte: Lake *et al* (1992).

Cada um destes métodos de recuperação de petróleo, conforme breve abordagem a seguir, possui características técnicas e cronologia específicas:

(i) ***recuperação primária*** → quando o deslocamento do petróleo do meio poroso para os poços produtores é impulsionado pela pressão original do reservatório, isto é, vale-se de mecanismos naturais, tais como expansão pela capa do gás natural ou do gás em solução no petróleo bruto ou influxo da água de aquífero. Neste método são empregados apenas os poços produtores.

(ii) ***recuperação secundária*** → é empregada quando a pressão do reservatório se torna insuficiente para uma produção economicamente vantajosa. Isto ocorre devido aos efeitos de descompressão dos fluidos no reservatório, das forças capilares, forças gravitacionais e aumento da viscosidade (ROSA; CARVALHO; XAVIER, 2006). A pressão é restabelecida por

mecanismos artificiais como injeção de fluidos (água ou gases) ou reinjeção de água produzida ou gás de produção. Neste método são empregadas malhas alternadas de poços injetores e produtores conforme Figura 3.9, por onde são injetados os fluidos de injeção (água ou gás) e retirados os fluidos de produção (petróleo e água), respectivamente (THOMAS, 2001).

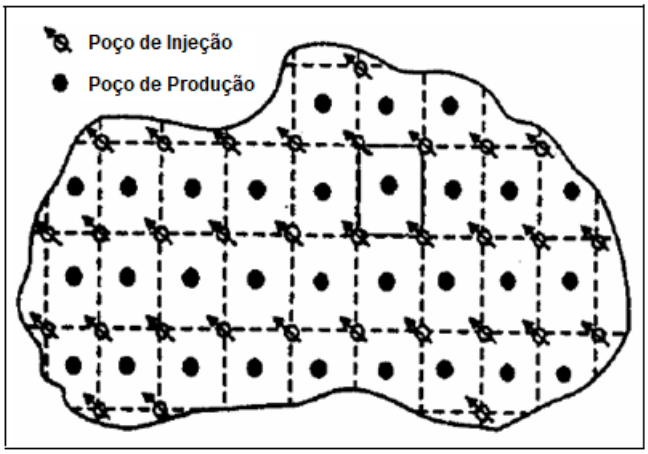


Figura 3.9: Malha de poços injetores/produtores. Fonte: THOMAS *et al* (2001).

Tem-se, porém, que o aumento do percentual de óleo recuperável na recuperação secundária apresenta limitações devido a dois aspectos: a viscosidade mais elevada do óleo presente no reservatório que faz com que o fluido injetado, menos viscoso, se desloque mais facilmente no meio poroso, não havendo propagação adequada no reservatório (forças viscosas); e a elevada tensão interfacial entre fluido injetado e óleo que reduz sua capacidade de retirar o óleo alojado nos poros para fora destes, deixando saturações residuais elevadas de óleo nas regiões já contatadas pelo fluido injetado (forças capilares) (ROSA; CARVALHO; XAVIER, 2006, LAKE *et al,* 1992).

(iii) ***recuperação terciária ou avançada ou melhorada*** $\rightarrow$ quando os métodos secundários não são mais suficientes para promover a recuperação do petróleo, mas a extração ainda é rentável, os reservatórios são submetidos aos métodos de recuperação terciária de petróleo, que se dividem em quatro grupos principais: térmicos, miscíveis, químicos e outros, sendo um deles por exemplo, os microbiológicos (Figura 3.9) (LAKE *et al*, 1992). O grupo dos térmicos, o mais antigo, tem o vapor como fluido principal, por isso seu alto custo, e por questões

de segurança, não pode ser aplicado em campos de mar (UWIERA-GARTNER *et al*, 2011). O grupo dos miscíveis, que tem como principal representante o CO_2, também tem alto custo e seu emprego só é possível para recuperação de óleos de baixa viscosidade (MORENO *et al*, 2014). O grupo dos químicos tem como principais representantes os polímeros (que atuam nas forças viscosas) e os tensoativos, (que atuam nas forças capilares) e é o que tem sido mais estudado nos últimos tempos (LAKE *et al*, 1992; DELSHAD, *et al*, 1998). Por fim, o grupo dos microbiológicos, no qual se destacam os bioprodutos como biopolímeros e biossurfactantes, que tem as mesmas características e funções técnicas dos produtos sintéticos, mas, diferentemente destes, são biodegradáveis. Os bioprodutos podem ser utilizados *ex situ* e *in situ*. Para diferenciar o emprego dos produtos sintéticos daqueles produzidos por via microbiana na recuperação melhorada, adotam-se os termos EOR (*Enhanced Oil Recovery*) e MEOR (*Microbial Enhanced Oil Recovery*). Três estratégias são conhecidas no processo de recuperação terciária (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000):

(i) EOR - *ex situ*: O bioproduto injetado de maneira convencional junto com alimentação de água no poço injetor;

(ii) MEOR - *in situ*: Injeção de microrganismos dentro do reservatório para que haja produção do tensoativo *in situ*, ou seja, na interface óleo-rocha;

(iii) MEOR - *in situ*: Injeção de nutrientes selecionados dentro do reservatório para estimular a produção de tensoativos por bactérias autóctones.

De acordo com Banat; Makkar; Cameotra (2010), a primeira estratégia é a mais explorada. Na prática um grande obstáculo para a produção *in situ* se deve à dificuldade de isolar cepas de microrganismos adaptadas às condições ambientais extremas que se encontram nos reservatórios.

Na prática, a capacidade de extração de óleo varia de caso para caso. As características específicas de cada método (primário, secundário e terciário) associado às características de cada reservatório (tipo de óleo, tipo de rocha, temperatura, pressão, etc) altera o Fator de Recuperação (FR) final de cada caso. A Figura 3.10 resume os métodos de recuperação de petróleo em reservatórios, e as faixas médias de seus respectivos FR. Fator de Recuperação (FR) do óleo é definido como a relação entre o volume de óleo recuperado e o

volume de óleo originalmente presente no reservatório (em inglês, *original oil in place* – OOIP). Logo, o OOIP corresponde ao volume de óleo presente na rocha no momento da descoberta do reservatório, ou seja, no início da sua vida produtiva. Assim, a unidade do FR é expressa em % OOIP (ROSA; CARVALHO; XAVIER 2006). A produção primária de petróleo normalmente recupera em média de 5 a 15% OOIP. Já o fator da recuperação secundária varia, em média, de 15 a 20 %OOIP. E, por fim, a recuperação terciária (melhorada ou especial) varia, em média de 4 a 11 %OOIP (GREEN & WILLHITE, 2018).

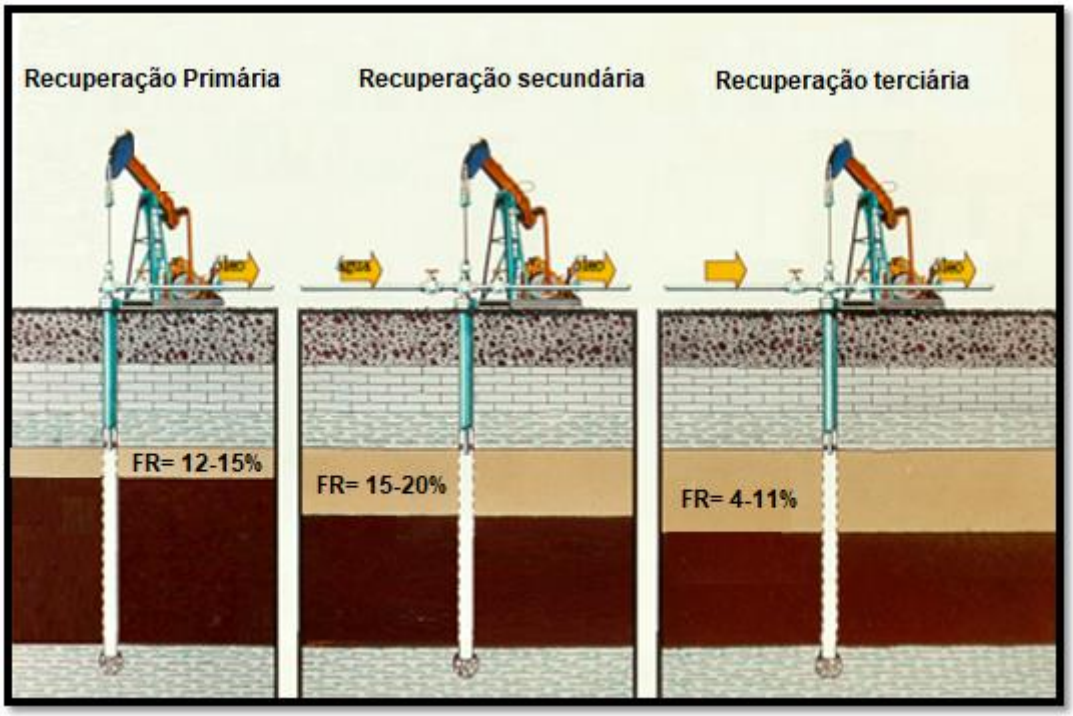


Figura 3.10: Métodos de recuperação de petróleo e as faixas média de seus respectivos fatores de recuperação. Fonte: GREEN & WILLHITE (2018).

Na recuperação terciária, as interações entre os fluidos e entre estes e a rocha reservatório (BENTO, 2015) favorecem a redução da tensão interfacial e a alteração da molhabilidade do reservatório, aumentando a área de contato com o óleo, causando o deslocamento deste. A molhabilidade é um fenômeno superficial definido como a tendência de um fluido se espalhar sobre uma superfície em presença de outros fluidos e é responsável pela localização, fluxo e distribuição dos fluidos no reservatório (ANDERSON, 1987; MORROW, 1990; YEFEI, *et al*, 2011). Por isso o aumento da recuperação em função da alteração

de molhabilidade tem sido intensamente estudado nos últimos 50 anos (YEFEI, *et al*, 2011). Por anos a engenharia de reservatório assumiu que os reservatórios de petróleo eram fortemente molháveis a água, porém hoje se sabe que esta molhabilidade pode variar desde molhável ao óleo até molhável à àgua (YEFEI, *et al*, 2011; KHALEDIALIDUSTI; KLEPPE; ENAYATPOUR, 2017), e que esta molhabilidade vai influenciar diretamente o FR (YEFEI, *et al*, 2011).

Assim, como a grande maioria dos campos inicia sua produção com a injeção de água (recuperação secundária) e devido: (1) à baixa eficiência de recuperação desta água deixando regiões não varridas e, (2) ao óleo trapeado nos poros, ou não produzido, nas regiões varridas, os métodos de recuperação terciária têm sido revistos e reavaliados na literatura como alternativa para aumentar o FR destes campos maduros. Dentre os métodos terciários o grupo dos químicos é o que tem sido mais estudado nos últimos tempos e, dentro dos químicos, os polímeros e os surfactantes têm sido os mais focados (LAKE *et al*, 1992, DELSHAD, *et al*, 1998).

De acordo com Delshad, *et al* (1998), os polímeros e os surfactantes deveriam ser injetados de forma conjunta uma vez que os seus mecanismos de atuação, nas forças viscosas e nas forças capilares respectivamente, são complementares. O FR final será uma função da interação destes produtos ou bioprodutos (polímeros e surfactantes) com o sitema reservatório (rocha/fluidos). O polímero vai atuar aumentando a viscosidade da água injetada e melhorando por consequência a eficiência de varrido (EV) desta água (fase deslocante) no reservatório. O tensoativo vai atuar reduzindo a tensão interfacial dos fluidos e alterando a molhabilidade destes fluidos com a rocha reservatório, e melhorando por consequência a eficiência de deslocamento (ED) desta água (fase deslocante) nas áreas varridas. A atuação destes dois mecanismos vai aumentar a recuperação de óleo (fase deslocada). Portanto, o FR é uma função destas duas eficiências da fase deslocante: a Eficiência de Varrido (EV), ligada às forças viscosas e a Eficiência de Deslocamento (ED) do óleo na área varrida, ligada às forças capilares (Equação 3.1). O maior FR é obtido com o uso conjunto do polímero e do tensoativo. Na Figura 3.11 isto é representado pela fase surfactante/polímero.

FR = EV x ED (Eq. 3.1)

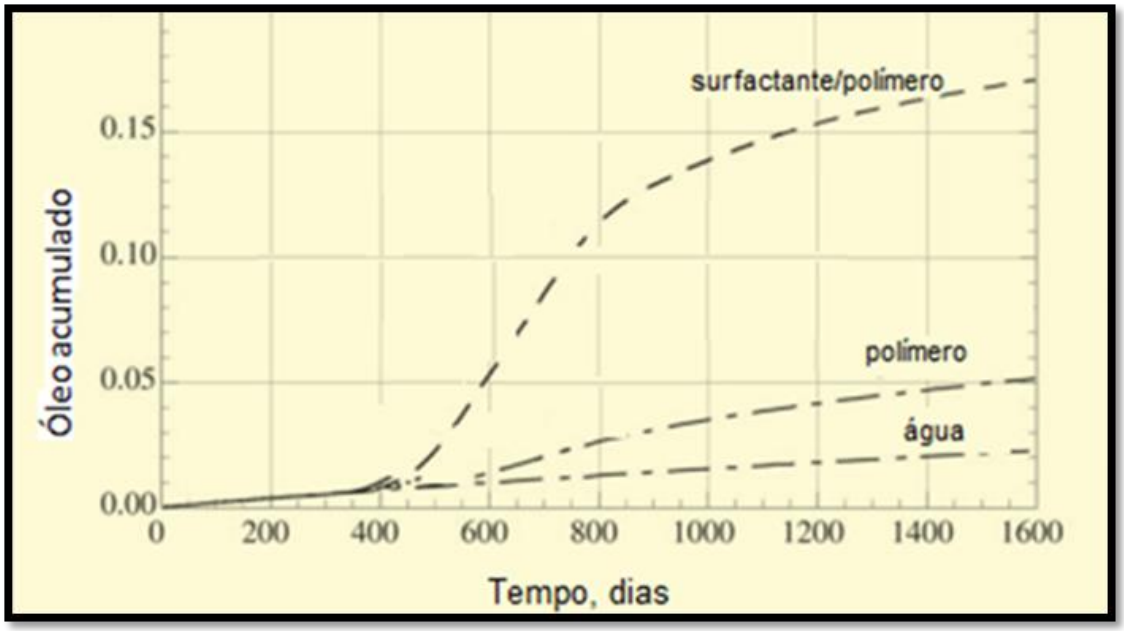


Figura 3.11: Métodos químicos de recuperação de petróleo. Fonte: DELSHAD, *et al* (1998).

Cabe destacar também que teoricamente existe uma ordem cronológica entre os métodos de recuperação do petróleo primária, secundária e terciária, mas esta ordem pode não ser seguida em todos os casos. Algumas vezes a fase primária é suprimida, havendo injeção de água desde o início da vida produtiva do reservatório para manter a pressão em níveis satisfatórios e, assim, permitir o deslocamento do óleo do reservatório em direção aos poços produtores, preservando razoavelmente as características dos fluidos e do fluxo (ROSA; CARVALHO; XAVIER 2006). Na maioria das vezes as injeções de soluções de polímeros e surfactantes, por exemplo, ocorrem como injeção terciária, isto é, após a recuperação secundária (injeção de água). Porém, algumas vezes, estas injeções podem ocorrer como recuperação secundária, isto é, no lugar da recuperação secundária com injeção de água pura.

A Figura 3.12 apresenta uma curva típica (teórica ou simulada) (linha preta) de produção de óleo obtida na injeção de água (recuperação secundária), onde se destaca um trecho inicial linear (quase vertical) seguido de um trecho

assintótico (quase horizontal - declínio do óleo). O trecho assintótico representa o final do potencial de recuperação da água de injeção. A partir daí só haverá aumento da produção, representada neste caso pelas curvas finais coloridas, com a injeção de aditivos, tais como polímeros e/ou surfactantes. Os primeiros para melhorar a eficiência de varrido enquanto os segundos para incrementar a eficiência de deslocamento.

De acordo com Green & Willhite (2018), para um mesmo sistema reservatório e para o mesmo surfactante, o FR final obtido a partir do método de recuperação secundária é maior que aquele obtido no método de recuperação terciária. Esta diferença é explicada pelo fato de na recuperação terciária o surfactante percorrer apenas os canais já varridos pela água e na recuperação secundária o surfactante contactar uma área maior, que corresponde à frente de avanço da água desde início do seu percurso. Essa curva típica descrita na Figura 3.13 é obtida, tanto em laboratório, nos simuladores físicos de teste de escoamento em meios porosos, quanto nos processos de campo.

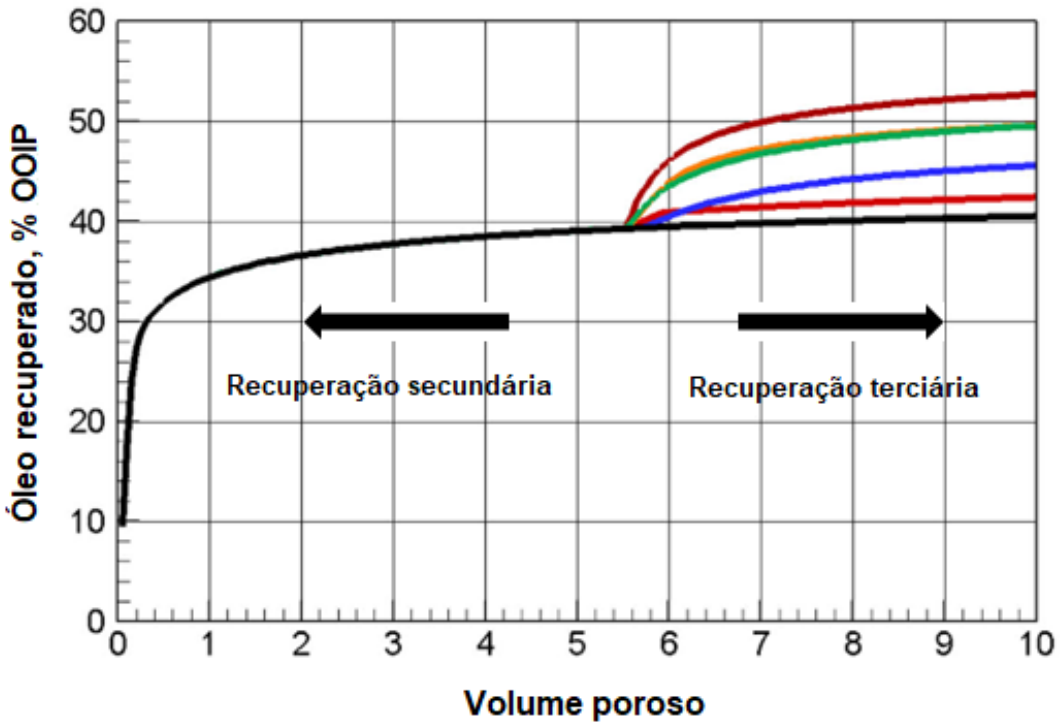


Figura 3.12: Curva típica de recuperação secundária (injeção de água – linha preta) seguida da recuperação terciária de petróleo por diferentes surfactantes (linhas coloridas). Fonte: KHALEDIALIDUSTI; KLEPPE; ENAYATPOUR, 2017).

3.5. Planejamentos Experimentais

O planejamento experimental é uma ferramenta para estudar o efeito conjunto de vários fatores sobre uma ou mais variáveis respostas de interesse (BEZERRA, 2012).

No planejamento de experimentos, devem-se determinar primeiramente qual objetivo a ser alcançado com os experimentos, o que determinará qual tipo de planejamento experimental deverá ser utilizado. Em seguida, é preciso definir quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Para a fase inicial do procedimento experimental, quando há necessidade de definir os fatores mais importantes ("*screening*") e estudar os efeitos sobre a variável resposta escolhida, o planejamento fatorial completo N^k (onde k é o número de fatores e N é o número de níveis de cada fator), é indicado. Porém, ensaios com número elevado de fatores, torna-se inviável o desenvolvimento experimental devido ao elevado número de experimentos. Com sete fatores e dois níveis, por exemplo, um planejamento completo iria exigir 128 ensaios e a informação necessária para descrever o processo pode ser obtida, normalmente, em um número menor de ensaios, através de delineamentos prévios com base em frações fatoriais (fatoriais fracionados e planejamento Plackett-Burman) (NETO, 2003; RODRIGUES & IEMMA, 2009).

Assim, para experimentos com o número elevado de fatores, pode ser utilizado o planejamento de Plackett-Burman (PB), o qual permite o estudo dos efeitos principais de cada variável de forma individual, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis. Em um planejamento Plackett-Burman com n ensaios pode-se estudar até n-1 fatores. Porém a literatura aconselha que um número menor seja estudado, para que as colunas não utilizadas façam o papel de variáveis inertes e possam ser utilizadas para estimar a incerteza dos valores calculados para os efeitos principais (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Para o planejamento Plackett-Burman é gerado um modelo polinomial de primeira ordem e os coeficientes do modelo são calculados como a diferença entre as respostas no nível alto (+1) e no nível baixo (-1) dividido pelo número de ensaios na condição – ou + para cada variável (RODRIGUES & IEMMA,

2005). A partir dos coeficientes do modelo, pode-se gerar o gráfico de Pareto, que consiste em um gráfico de barras que permite identificar quais parâmetros que mais influenciam a resposta de interesse.

No gráfico de Pareto, os valores absolutos de $t_{calculado}$ (coef. de efeito dividido pelo erro padrão), também denominados efeitos padronizados, fornecem as alturas das barras que por sua vez são dispostas de modo decrescente. O valor de $t_{tabelado}$ (n, α) (tabela de valores da distribuição "t" de Student) completa o gráfico de Pareto fornecendo o valor a partir do qual os efeitos são significativos (Figura 3.13) (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Onde: n é o grau de liberdade

α é o nível de significância (geralmente adota-se α= 0,05)

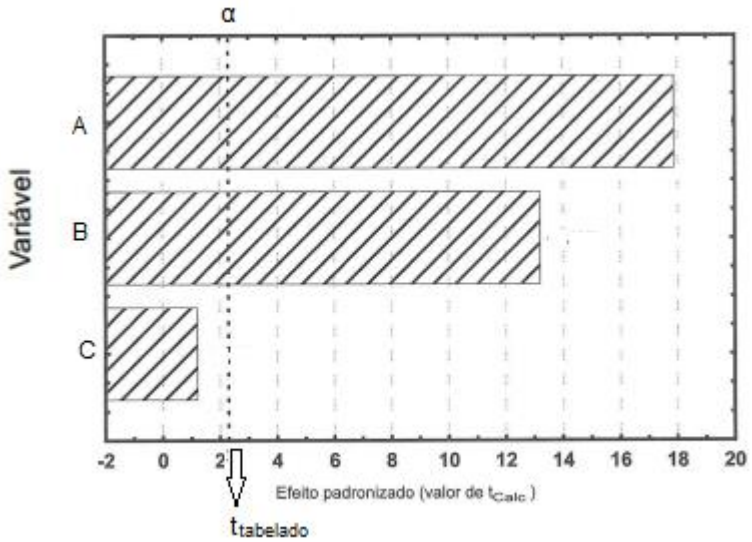


Figura 3.13: Exemplo de gráfico de Pareto. Fonte: RODRIGUES & IEMMA (2005).

No exemplo mostrado na figura 3.14, as variáveis A e B, representadas pelas 2 primeiras barras, seriam consideradas mais importantes.

Sendo: Erro padrão (ep)= $(ep(ef)*n^{1/2})/2$;

$ep(ef)=((U_1)^2 + (U_2)^2 + (U_3)^2 \ldots\ldots (U_q)^2)/q)^{1/2}$

$U_i = (\sum VI_i * Y)/n$ (Soma dos produtos dos elementos da coluna VI_i, pelos elementos da coluna resposta Y, dividida pelo número de ensaios).

VI (variáveis inertes) = Colunas do PB que restam após as utilizadas pelas variáveis de estudo.

q= número de variáveis inertes

n= número de ensaios.

Com o número de fatores cujas variações têm efeito significativo nas respostas analisadas já reduzido pela aplicação do planejamento de PB, é possível o desenvolvimento de planejamentos experimentais com mais níveis de estudo para cada variável, como é o caso do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que permite desenvolver um modelo polinomial completo de segunda ordem para o processo estudado e obter respostas com maior exatidão. O planejamento DCCR permite uma combinação das variáveis nos níveis pré-determinados, obtendo assim a análise da variável, em relação as demais e realizar estudos de otimização de processos para determinação de condições ótimas (BRUNS *et al*, 1995). Os coeficientes do modelo são determinados através da aplicação da regressão linear e a partir destes coeficientes, pode-se gerar uma superfície de resposta, que consiste em um gráfico que descreve o comportamento da resposta em função de fatores tomados dois a dois, permitindo analisar a forma com que os fatores afetam o sistema. Os valores dos dois fatores são apresentados nos eixos x e y, enquanto os valores da resposta são apresentados no eixo z (POLIDORO, 2016).

A Figura 3.14 mostra um gráfico de superfície, onde os maiores valores da resposta avaliada são encontrados onde x_1 e x_2 são ambos iguais a zero. À medida que x_1 e x_2 se afastam de zero, os valores da resposta diminuem.

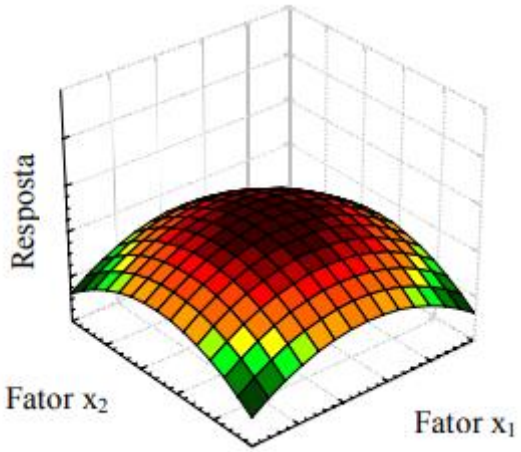


Figura 3.14: Exemplo de superfície de resposta. Fonte: Polidoro (2016).

Outro planejamento usado para otimização, porém com um menor número de experimentos, é o delineamento fatorial de Box-Behnken (BB), onde basicamente, se fixa uma das variáveis em zero e um fatorial 2^2 é executado com as outras duas variáveis, não tendo assim, testes nos quais todos os fatores possuem valores extremos (NOVAES *et al*, 2017). Esse planejamento permite a construção de um modelo polinomial de segunda ordem e os coeficientes do modelo são determinados através da aplicação da regressão linear e partir destes coeficientes, pode-se gerar uma superfície de resposta.

Este modelo inclui um nível intermediário (0) estabelecido para a condição de fatores. O número de experimentos necessários para o desenvolvimento do planejamento Box-Behnken é definido através da Equação 3.2, na qual N é o número de experimentos, K é o número de variáveis, e C0 é o número de pontos centrais (BOX & BEHNKEN, 1960).

$$N=2K(K-1) + C0 \qquad \text{(Eq. 3.2)}$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Foi empregada a cepa *Bacillus subtilis* LFB 732, identificada pela equipe do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ/RJ, e disponível na Coleção de Culturas de *Bacillus* e Gêneros Correlatos da Fiocruz, sob responsabilidade do curador Dr. Leon Rabinovitch.

4.1.1. Manutenção da cultura

Durante o desenvolvimento experimental, a cultura estoque foi preservada por repiques mensais em meio Agar Nutriente. Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 30±1°C, as culturas foram mantidas sob refrigeração a 4±1°C. A pureza das culturas, antes da preservação e antes da ativação, foi comprovada pela observação microscópica de preparações das células coradas pela técnica de coloração diferencial de Gram.

4.2. Açúcar VHP

Na formulação dos meios de produção foi empregado o açúcar VHP, proveniente da Indústria de cana de açúcar Cruz Alta (Guarani, São Paulo, Brasil) e gentilmente cedido pelo CENPES/Petrobras. Este açúcar, apesar da alta pureza em sacarose (>99%), apresenta diversos elementos químicos, tais como Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} e Zn^{2+}, que normalmente são constituintes da composição química de meios de cultura empregados para a produção de biossurfactante por espécies de *Bacillus* (AL-WAHAIBI *et al*, 2014; SANTOS *et al*, 2019).

4.3. Meios de cultura

4.3.1. Meio de crescimento

A propagação da cepa *Bacillus subtilis* foi feita em caldo nutriente, cuja composição é apresentada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição do meio de crescimento para o microrganismo *B. subtilis*.

Componentes	Composição (g/L)
Peptona de carne	5,0
Extrato de levedura	3,0
Glicose	9,0
NaCl	9,0

pH 7,0 (ajuste com NaOH 0,1 M)

O meio de crescimento foi esterilizado por autoclavação a 121 ˚C por 15 minutos.

4.3.2. Meio de produção

Para a produção de biossurfactante por *B. subtilis* LFB 732, foi utilizado inicialmente um meio basicamente mineral contendo açúcar VHP e os macronutrientes especificados na Tabela 4.2, acrescido ainda dos micronutrientes relacionados na Tabela 4.3 (RAMANA & KARANTH, 1989; NAZINA *et al*, 2005; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA, 2008; AL-BAHRY, *et al* 2013).

Tabela 4.2: Composição do meio de produção de biossurfactante por *B. subtilis*

Componentes	Composição (g/L)
Açúcar VHP	10,0
NH_4NO_3	4,0
KH_2PO_4	3,0
Na_2HPO_4	6,0
$MgSO_4$	0,2

pH 7,0 (ajuste com HCl 0,1M).

Tabela 4.3: Composição dos micronutrientes adicionados ao meio de produção de biossurfactante por *B. subtilis*.

Componentes	Composição (mg/L)
$FeSO_4.7H_2O$	5,0
H_3BO_3	10,0
$CoCl_2.6H_2O$	20,0
$CuSO_4.5H_2O$	0,5
$MnSO_4.H_2O$	0,5
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1,0
$ZnSO_4$	10,0
$CaCl_2$	10,0

pH 7,0 (ajuste com NaOH 0,1 M).

O meio de produção foi esterilizado por autoclavação a 121 ˚C por 15 minutos enquanto a solução de micronutrientes foi esterilizada por filtração em filtro Millipore usando membrana de ester de celulose de 0,22 µm de porosidade. O meio foi acrescido da solução de micronutrientes 24 h antes do uso, sendo incubada em estufa bacteriológica a 30±1 °C para garantir a esterilidade.

4.4. Detalhamento Experimental

A execução do presente trabalho abrangeu diferentes etapas, contemplando desde a elaboração de um meio de composição ideal de baixo custo para a síntese de um tensoativo “ambientalmente amigável” pela linhagem *Bacillus subtilis* LFB 732, até sua aplicação, seguindo o fluxograma Figura 4.1, cujo detalhamento vem logo adiante.

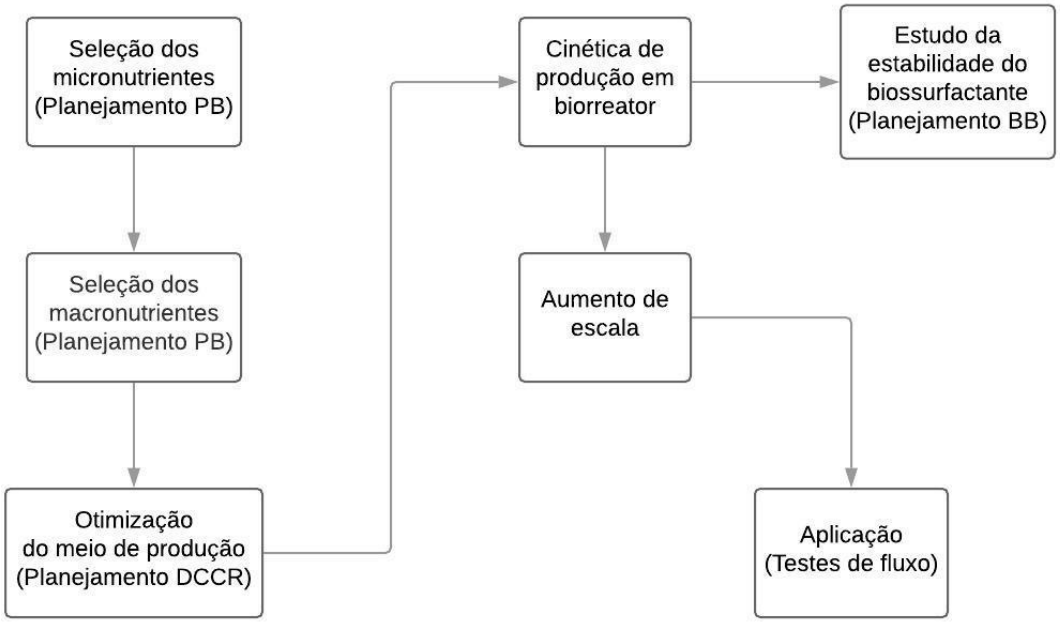


Figura 4.1: Fluxograma da obtenção até a aplicação do BS.

4.4.1. Caracterização elementar do VHP

Nesta etapa buscou-se definir os elementos químicos constituintes da matéria-prima, e respectivas quantidades, de modo a estabelecer a suplementação adequada de micronutrientes no meio reacional para atender uma plena atividade metabólica, e, por conseguinte, permitir maiores rendimento e produtividade com redução dos custos globais do processo.

A caracterização elementar do VHP foi realizada em espectrômetro de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado, marca Horiba Jobin Yvon, modelo Ultima 2, seguindo o protocolo descrito na norma ASTM-D1976 *Standard Test Method for Elements in Water by Inductively-Coupled Argon Plasma Atomic Emission Spectroscopy,* aplicável a amostras aquosas, em geral, empregando padrões (grau cromatográfico).

4.4.2. Produção do Biossurfactante

Este estudo compreendeu a formulação de meio com o propósito de emprego na recuperação avançada de petróleo. Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas experimentais:

- Seleção de micronutrientes e macronutrientes, otimização do meio de produção e caracterização dos biossurfactantes produzidos em frascos agitados;
- Delineamento dos perfis de crescimento celular e produção de BS, e determinação dos respectivos parâmetros cinéticos; Produção de mosto fermentado para aplicação e avaliação do BS bruto na recuperação de petróleo em rocha reservatório. Estas etapas de produção foram realizadas em biorreatores.

4.4.2.1. Em frascos *Erlenmeyers*

Nesta etapa, os ensaios foram conduzidos em frascos cônicos de 500 mL de capacidade contendo 100 mL de meio, os quais foram dispostos em agitador rotatório (CIENTEC - 712 rn), à 150 rpm e com controle de temperatura (30 ± 1 °C). Após a otimização do meio de produção, foram realizados ensaios em biorreator, para avaliação dos perfis cinéticos de crescimento celular, de consumo de substrato e de síntese do bioproduto, conforme detalhamento no item 4.4.2.2, bem como para obtenção do bioproduto para aplicação nos testes de fluxo em simulador, descrito no item 4.7.

Para a inoculação dos meios, foi empregada 10% de suspensão de células obtida a partir da ativação da cultura estoque em tubo inclinado, contendo meio Agar Nutriente por 24 horas a 30 ± 1 °C, seguida da transferência de duas alçadas para 100 mL para o meio de crescimento em frasco *Erlenmeyer*, por tempo suficiente para alcançar um intenso rendimento de células na fase metabolicamente ativa, isto é, na fase exponencial de crescimento, definido pela cinética de crescimento.

Para obtenção da curva de peso seco das células, o meio de crescimento, após 24 h de inóculo (30 ±1 ºC e 150 rpm), foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Em seguida as células foram lavadas com água destilada, e, então, ressuspendidas em 30 mL de água destilada (solução mãe). Amostras da suspensão celular (5 mL), em triplicata, foram filtradas a vácuo em membrana Millipore de 0,22 µm de porosidade e, o peso seco determinado por pesagem em balança de Infravermelho (MB23 - OHAUS) até massa constante. Também foram feitas diluições a partir da solução mãe, para as quais foram determinadas as respectivas absorvâncias no comprimento de onda de 600 nm. Os valores de absorvância e as respectivas massas secas foram plotadas em uma curva de calibração apresentada no item 5.1. Foi realizado o teste de Grubbs para as triplicatas de absorvância (n=3), adotando valor de α=0,05, para verificar a existência de um valor aberrante no conjunto de dados (GRUBBS, 1969). Para n=3 e α=0,05, o valor crítico tabelado é de 1.155. O teste de Cochran foi realizado para verificar a homocedasticidade dos dados (COCHRAN & COX, 1957), para 15 níveis de concentração e n=3, sendo o valor crítico tabelado de 0,335. Foi determinado o modelo através de regressão linear e construído o gráfico de resíduos para avaliar a distribuição aleatória em torno de zero, buscando um modelo mais preciso possível. O modelo é uma equação que pretende prever os resultados de y a partir de qualquer valor de x. Esse modelo é uma equação de primeiro grau, representada conforme Equação 4.1 (FILHO *et al*, 2011).

$$y = a + bx + \varepsilon \qquad \text{(Eq. 4.1)}$$

Na qual: a é definido como coeficiente linear;

b é definido como coeficiente angular ou inclinação da reta;

ε é definido como o erro do modelo.

Para a padronização do inóculo, foi feito o monitoramento da densidade óptica (D.O.), no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (DR 5000 - Hach). Para tanto, a cada 1 h no decorrer de 12 h, alíquotas de 2 mL, em triplicata, foram retiradas de três cultivos (30±1 ºC e 150 rpm) e feita a medição da D.O. Os resultados de absorvância foram expressos em concentração celular

(massa seca) por correlação com fator calculado pela curva de calibração. Esses dados foram plotados em gráfico para obtenção da cinética do crescimento (Apêndice 1).

4.4.2.1.1. Seleção dos micronutrientes essenciais para síntese de biossurfactante por *B. subtilis* LFB 732

Esta etapa teve como propósito identificar os micronutrientes essenciais para a produção de biossurfactante por *B. subtilis*, a partir dos elementos apresentados na Tabela 4.3.

Para tanto, foi adotado o delineamento experimental de Plackett-Burman (PB) utilizando como variáveis independentes - $FeSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$, H_3BO_3, $CoCl_2.6H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $ZnSO_4$ e $CaCl_2$ - nos valores mínimo e máximo indicados na Tabela 4.4.

Como variáveis dependentes foram determinados os valores de tensão superficial (TS) e concentração de biossurfactante (BS), para tempos de fermentação de 24 e 48 horas, com frascos de sacrifício. A quantificação do biossurfactante foi feita por análise cromatográfica, detalhada no item 4.6.1.

Tabela 4.4: Variáveis analisadas e respectivos níveis do Planejamento Plackett-Burman (PB).

Variáveis	Componentes	Níveis (k) (mg/L)	
		-1	1
x_1	$FeSO_4.7H_2O$	0	5,0
x_2	$MnSO_4.H_2O$	0	0,5
x_3	H_3BO_3	0	10,0
x_4	$CoCl_2.6H_2O$	0	20,0
x_5	$CuSO_4.5H_2O$	0	0,5
x_6	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0	1,0
x_7	$ZnSO_4$	0	10,0
x_8	$CaCl_2$	0	10,0

Na representação do ajuste dos valores de resposta foi utilizado o modelo polinomial de primeira ordem, contendo as variáveis estudadas, conforme Equação 4.2 (RODRIGUES & IEMMA, 2005):

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_6x_6 + b_7x_7 + b_8x_8 \quad \text{(Eq. 4.2)}$$

No qual, Y representa a estimativa da resposta;
x representa as variáveis;
b representa os coeficientes do modelo

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

4.4.2.1.2. Seleção dos macronutrientes do meio para produção de biossurfactante

Foi realizada a seleção dos componentes do meio de cultura, onde foram testadas diferentes composições de meio para a análise conjunta dos macronutrientes KH_2PO_4, Na_2HPO_4, e $MgSO_4$ e dos micronutrientes selecionados ($FeSO_4.7H_2O$ e $ZnSO_4$). Como ferramenta, foi utilizado o Planejamento de Experimentos Plackett-Burman (PB), sendo os valores máximos e mínimos das variáveis independentes apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Variáveis analisadas e respectivos níveis do Planejamento Plackett-Burman (PB).

Variáveis	Componentes	Níveis (k) (g/L)	
		-1	1
x_1	KH_2PO_4	0	3,00
x_2	Na_2HPO_4	0	6,00
x_3	$MgSO_4$	0	0,20
x_4	$FeSO_4.7H_2O$	0	0,005
x_5	$ZnSO_4$	0	0,01

Nesta etapa, não foram incorporadas as fontes de carbono (açúcar VHP) e de nitrogênio (NH_4NO_3) posto ser indispensável a presença deles em meios de cultura para permitir as funções vitais de microrganismos quimioheterotróficos, como é o caso. Portanto, em todos os experimentos foram acrescidos VHP e NH_4NO_3, em concentrações iniciais de 10 g/L e 4 g/L, respectivamente, de acordo com a literatura (GHOJAVAND *et al*, 2008; AL-SULAIMANI *et al*, 2011; AL-WAHAIBI *et al*, 2014).

Como variáveis dependentes foram determinados os valores de tensão superficial (TS) e da concentração de biossurfactante (BS) para cada um dos doze experimentos realizados. Na representação do ajuste dos valores de resposta foi utilizado o modelo polinomial de primeira ordem, contendo as variáveis estudadas, conforme Equação 4.3 (RODRIGUES & IEMMA, 2005):

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 \qquad \text{(Eq. 4.3)}$$

No qual, Y representa a estimativa da resposta;
x representa as variáveis;
b representa os coeficientes do modelo

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

4.4.2.1.3. Otimização do meio de produção

Em seguida foi feita a otimização do meio para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LFB 732, com o propósito de definir uma composição ideal à base de VHP com apenas os nutrientes mínimos requeridos pela linhagem bacteriana para biossíntese do BS. Assim sendo, foi realizada a análise da composição dos macronutrientes - VHP, NH_4NO_3 e Na_2HPO_4 - pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), cujos níveis máximo e mínimo encontram-se na Tabela 4.6, sendo a concentração do biossurfactante (BS) a única variável resposta. Todos os experimentos foram realizados com igual suplementação de $MgSO_4$ e $FeSO_4.7H_2O$, nas concentrações de 0,20 g/L e 5 mg/L, respectivamente.

Tabela 4.6: Variáveis analisadas e respectivos níveis do Planejamento Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Variáveis	**Componentes**	**Níveis (k) (g/L)**				
		-1,68	-1	0	1	1,68
x_1	Açúcar VHP	10,0	18,1	30,0	42,0	50,0
x_2	NH_4NO_3	3,0	4,4	6,5	8,6	10,0
x_3	Na_2HPO_4	3,0	3,8	5,0	6,2	7,0

Na representação do ajuste dos valores de resposta foi utilizado o modelo polinomial completo de segunda ordem (Equação 4.4), como usualmente usado neste tipo de planejamento (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

$$Y= b_0 + (b_1x_1) + (b_2x_2) + (b_3x_3) + (b_{12}x_1x_2) + (b_{13}x_1x_3) + (b_{23}x_2x_3) + (b_{11}x_1^2) + (b_{22}x_2^2) + (b_{33}x_3^2) + (b_{123}x_1x_2x_3) \quad \text{(Eq. 4.4)}$$

Sendo: Y representa a estimativa da resposta;
x representa as variáveis;
b representa os coeficientes do modelo

4.4.2.2. Em biorreatores

Inicialmente, foi realizada a fermentação do meio de produção definido pelo planejamento DCCR (item 4.4.2.1.2) em biorreator de bancada (Multigen, New Brunswick Scientific Co, EUA) com capacidade de 2 L, com 1L de meio de produção, dotado de controle de temperatura, sistema de aeração e agitação magnética. As condições operacionais foram 30±1 °C, 1,0 vvm e 300 rpm, tendo como base a literatura científica (YEH; WEI; CHANG, 2006; AMANI & MEHRNIA, 2010; JOSHI & DESAI, 2013).

Periodicamente, amostras do caldo fermentado foram coletadas assepticamente para as quantificações de células, biossurfactante e substrato; e feitas também as determinações de pH e de tensão superficial. Ao final do processo, amostras do caldo fermentado, isento de células, foram testadas

quanto à estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e salinidade (expressa em NaCl), cujo procedimento é descrito mais adiante (item 4.5).

Uma vez obtido o delineamento cinético e caracterizado o BS quanto à estabilidade, o bioprocesso foi realizado em biorreator de bancada (BIOSTAT@ E), desta vez, de 13 L de volume total, com 6 L de meio de produção, nas mesmas condições anteriormente descritas, por 10 h. O caldo fermentado isento de células foi avaliado em testes de fluxo para a recuperação avançada de óleo cru para duas amostras de rocha reservatório, como descrito mais adiante (item 4.7).

4.5. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido

A estabilidade do biossurfactante “cru”, isto é, do caldo fermentado, foi avaliada para diferentes valores de temperatura, pH e salinidade, segundo delineamento experimental de Box-Behnken (BB). Os níveis das variáveis independentes são apresentados na Tabela 4.7. Como variável dependente, foram determinados os valores de tensão superficial (TS), para tempos de contato de 1h, conforme indicado pela literatura (BORDOLOI & KONWAR, 2008; AL-BAHRY *et al*, 2013), considerando que a propriedade tensoativa da molécula está diretamente relacionada a sua estabilidade.

Tabela 4.7: Variáveis analisadas e respectivos níveis do Planejamento Box-Behnken.

Variáveis	**Fatores**	**Níveis (k)**		
		-1	0	1
x_1	Temperatura (°C)	30	55	80
x_2	pH	4	7	10
x_3	Salinidade (g/L)	30	90	150

Na representação do ajuste dos valores de resposta foi utilizado o modelo polinomial de segunda ordem (Equacão 4.5), e a análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do *software* Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

$$Y = b_0 + (b_1x_1) + (b_2x_2) + (b_3x_3) + (b_{12}x_1x_2) + (b_{13}x_1x_3) + (b_{23}x_2x_3) + (b_{11}x_1^2) + (b_{22}x_2^2) + (b_{33}x_3^2) \quad \text{(Eq. 4.5)}$$

Sendo: Y representa a estimativa da resposta;
x representa as variáveis;
b representa os coeficientes do modelo.

4.6. Métodos Analíticos

4.6.1. Quantificação da surfactina

O sobrenadante da centrifugação do meio de cultivo foi diluído em metanol (1:1 v/v) e a solução resultante foi filtrada em filtro de seringa 0,22 µm (nylon). O lipopeptídeo foi quantificado pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um cromatógrafo Shimadzu, equipado com os seguintes módulos: bomba LC 20AT, forno de coluna CTO-20A, injetor automáico SIL-20A HT, detector UV-vis SPD-M20A, e software Lab-solutions versão 3.60, nas condições cromatográficas, descritas por Wei & Chu, 1998 (Tabela 4.8). As análises de cromatografia foram realizadas no Laboratório de Análise Fitoquímica (NPPN/UFRJ).

Tabela 4.8: Condições utilizadas para quantificação do lipopeptídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Especificações do CLAE	
Coluna	Octadecilsilano (C18) (150 x 4, 6 mm)
Detector	UV
Fase Móvel	20% de ácido trifluoroacético (3,8 mM) e 80% de acetonitrila
Volume de injeção	20 µL (eluição isocrática)
Fluxo	1 mL/min
Absorbância	205 nm
Temperatura	30 °C

Os picos referentes às distintas isoformas da surfactina foram integrados e quantificados de acordo com a curva de calibração obtida com a surfactina padrão Sigma-Aldrich ≥ 98% (Ref: S3523) apresentada no item 5.1. Foi realizado o teste de Grubbs para as triplicatas de absorvância (n=3), adotando valor de α=0,05, para verificar a existência de um valor aberrante no conjunto de dados (GRUBBS, 1969). Para n=3 e α=0,05, o valor crítico tabelado é de 1.155. O teste de Cochran foi realizado para verificar a homocedasticidade dos dados (COCHRAN & COX, 1957), para 5 níveis de concentração e n=3, sendo o valor crítico tabelado de 0,684. Foi determinado o modelo através de regressão linear e construído o gráfico de resíduos para avaliar a distribuição aleatória em torno de zero, buscando um modelo mais preciso possível.

4.6.2. pH

As medidas de pH foram realizadas diretamente no meio fermentado isento de células, em potenciômetro digital modelo DMPH-1 (Digimed).

4.6.3. Tensão superficial (TS) e Tensão Interfacial (TI)

A tensão superficial (TS) e a tensão interfacial (TI) foram determinadas pelo método De Nouy ring (COOPER & ZAJIC, 1980) usando tensiômetro SIGMA 70 *Surface tension measurement report* (KSV Instruments Ltd). O equipamento é dotado de um anel de platina-iridium com 2,0 cm de diâmetro e 6,4 cm de altura, o qual é imerso no líquido a ser analisado, contido em um recipiente com 5,0 cm de diâmetro.

As medidas foram feitas no meio, antes e após a fermentação. Para as determinações da TS e da TI no meio fermentado, antes foi feita a centrifugação do meio a 10.000 x rpm por 10 min a 4 ºC para remoção das células. Os resultados foram expressos como uma média de 10 medidas de tensão superficial e interfacial para cada amostra.

4.6.4. Consumo de sacarose

O substrato foi quantificado pelo método do ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959), com a elaboração de uma curva de calibração de sacarose apresentada no item 5.1, para obtenção da equação da reta através da absorbância determinadas a 540 nm em espectrofotômetro Hach, modelo DR 5000, sendo o resultado expresso em g/L. Foi realizado o teste de Grubbs para as triplicatas de absorvância (n=3), adotando valor de α=0,05, para verificar a existência de um valor aberrante no conjunto de dados (GRUBBS, 1969). Para n=3 e α=0,05, o valor crítico tabelado é de 1.155. O teste de Cochran foi realizado para verificar a homocedasticidade dos dados (COCHRAN & COX, 1957), para 7 níveis de concentração e n=3, sendo o valor crítico tabelado de 0,561. Foi determinado o modelo através de regressão linear e construído o gráfico de resíduos para avaliar a distribuição aleatória em torno de zero, buscando um modelo mais preciso possível.

4.7. Recuperação do petróleo

O potencial do biotensoativo no aumento do fator de recuperação foi avaliado através de uma simulação física do reservatório (testes de fluxo em meios porosos) que engloba várias etapas conforme a seguir:

1. Escolha da rocha: foram escolhidas duas amostras de rocha de um reservatório da região Nordeste do Brasil, ambas arenito, uma de baixa e outra de média permeabilidade, em torno de 50 mD e de 500 mD, respectivamente.

2. Preparação das amostras da rocha para os ensaios: os testemunhos provenientes de poço do Nordeste brasileiro foram coletados e cedidos pela Petrobras/CENPES/PDEP/CRF. No laboratório de Caracterização de Rochas e Fluidos/Petrobras/CENPES, os testemunhos de rocha foram preparados seguindo a norma API RP 40 (1998), sendo submetidos a cortes para obtenção de amostras cilíndricas de 1,5 polegadas (3,8 cm) de diâmetro e comprimento que varia em função da sonda amostradora e da finalidade do teste. Quanto

maior o comprimento, maior o volume poroso e, portanto, maior é a precisão do teste de escoamento em meios porosos (Figura 4.2).

Figura 4.2: Amostras de rochas arenitos com 3,8 cm de diâmetro e comprimentos variados.

3. Caracterização geométrica e porosa: foram medidos o diâmetro (D) e o comprimento da rocha (L) com um paquímetro, a massa (M) com uma balança analítica e o volume poroso (Vp) com um Porosímetro-permeâmetro comercial da CoreLab. A partir destes valores calculou-se a área transversal (A) e o volume total (Vt) da amostra (Equação 4.6), a porosidade (φ) e a densidade de grãos (ρ) das amostras conforme Equações 4.7 e 4.8, respetivamente.

$$Vt = A \cdot L = \left(\frac{\pi \,.\, D^2}{4}\right) . L \qquad \text{(Eq. 4.6)}$$

$$\Phi = \frac{Vp}{Vt} \,.\, 100 \qquad \text{(Eq. 4.7)}$$

$$\rho = \frac{M}{Vt - Vp} \qquad \text{(Eq. 4.8)}$$

4. Determinação da permeabilidade ao gás (Kg): foi determinada a permeabilidade da amostra ao gás (Nitrogênio), seguindo a norma API RP 27

(1952) e usando o Porosímetro-permeâmetro comercial da CoreLabe aplicando a equação de Darcy para fluidos compressíveis.

5. Sistema de fluxo em meios porosos: foi utilizado o sistema experimental de fluxo, do laboratório de Caracterização de Rochas e Fluidos/Petrobras/CENPES (Figura 4.3), composto de uma bomba de vazão constante de alta precisão e jogo de válvulas, que regulam a injeção seletiva dos fluidos (óleo, água do reservatório e surfactina bruta) à vazão constante, seguindo a norma API RP 40 (1998).

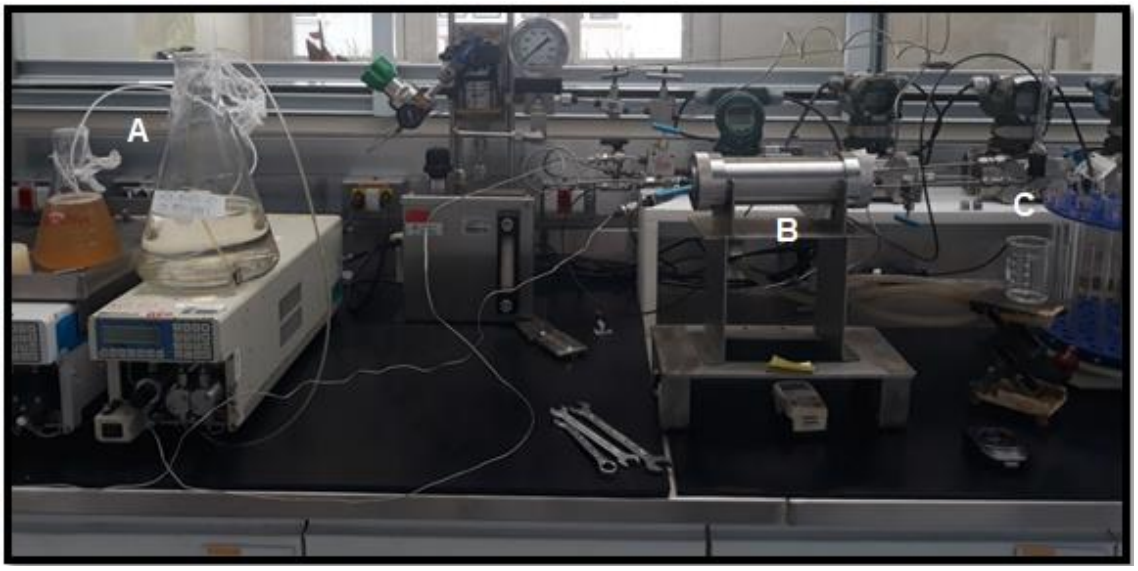


Figura 4.3: Simulador físico de teste de escoamento em meios porosos do laboratório de Caracterização de Rochas e Fluidos/CENPES/Petrobras [A: Sistema de injeção (bomba + fluido); B: Camisa metálica; e C: Sistema de coleta/ monitoramento e quantificação].

6. Confinamento da amostra: A amostra de rocha do reservatório foi circundada por camisa de borracha e inserida em um porta testemunho ou camisa metálica (*core holder)*. Nas Figuras 4.4 e 4.5 encontram-se as imagens do conjunto envolto por esta camisa de aço (*core holder*) e sua seção transversal, respectivamente. A amostra foi submetida a uma pressão de confinamento ao longo de seu comprimento, entre as camisas de aço e de borracha para vedar hidraulicamente a lateral da amostra e executar o teste de escoamento unidimensional.

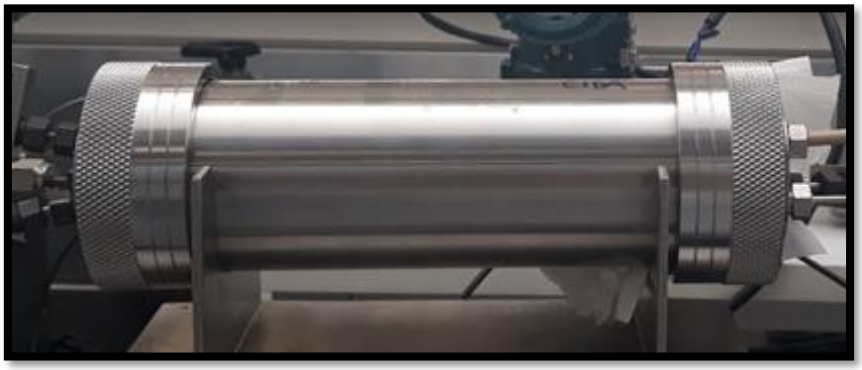


Figura 4.4: Camisa de aço (*core holder*) com e 4,6 cm de diâmetro e 22 cm de comprimento.

7. Saturação com água da formação (Swi): inicialmente foi aplicado vácuo no sistema experimental de modo a retirar todo o ar contido na amostra. Em seguida foi feita a injeção de um fluxo de água de formação para garantir saturação total (100%) (Figura 4.5).

Figura 4.5: Esquema do meio poroso acondicionado. Fonte: Melo *et al* (2008).

8. Determinação da permeabilidade absoluta à água *(*Kw*)*: após a saturação da amostra com água da formação, submetida ao fluxo contínuo de água até a completa estabilização da pressão, foi medida, então a permeabilidade absoluta à água usando a equação de Darcy, seguindo a norma API RP 27 (1952) (Equação 4.9).

$$Kw = \frac{\mu w..L}{A} \cdot \frac{Qw}{\Delta p} \qquad \text{(Eq. 4.9)}$$

9. Saturação com óleo (Soi): com a amostra já 100% saturada com água da formação iniciou-se a injeção de óleo. À medida que se injeta o óleo, este vai deslocando parte da água para fora da amostra e tomando o espaço desta água no meio poroso. Durante certo tempo, tem-se fluxos de água e óleo ocorrendo

simultaneamente, até que não sai mais água da amostra, ou seja, tenha apenas um fluxo contínuo de óleo. A partir deste ponto, a água que está dentro da amostra é chamada de água residual (Swr). Esta condição (saturação de água residual mais saturação de óleo inicial) representa ou simula o ponto de início da vida produtiva de um reservatório.

10. Determinação da permeabilidade efetiva ao óleo *(*Ko*)*: após a saturação da amostra com óleo, submetida ao fluxo contínuo de óleo até a completa estabilização da pressão, foi medida então, a permeabilidade efetiva ao óleo usando a equação de Darcy, seguindo a norma API RP 27 (1952) (Equação 4.10).

$$Ko = \frac{\mu o..L}{A} \cdot \frac{Qo}{\Delta p} \qquad \text{(Eq. 4.10)}$$

11. Verificação da lei de Darcy: de acordo com a lei de Darcy, para uma mesma amostra, existe uma relação linearmente proporcional entre a pressão e a vazão desta. Esta linearidade mostra que a vazão de injeção está dentro da validade da lei de Darcy (sem turbulência). Para confirmar, foi feita a medida de pressão em três diferentes vazões.

12. Recuperação com água (secundária): a recuperação de óleo com injeção de água ou recuperação secundária foi feita com a injeção contínua de água até o momento em que não se produz mais óleo, chamado de saturação de óleo residual (Sor). Este teste foi realizado para colocar o modelo físico de reservatório numa condição semelhante àquela dos campos maduros, ou seja, já submetidos à injeção de secundária, com uma alta produção de água e ainda com uma alta saturação de óleo remanescete no seu interior, o que torna este modelo físico um candidato à recuperação terciária. De acordo com O´BRIEN, *et al* (2016), mais de 70% da produção mundial vem de campos maduros.

13. Recuperação com surfactina (terciária ou avançada): a recuperação com o biosurfactante ou recuperação terciária foi feita com a injeção contínua do biosurfactante na Sor (após a injeção de água) até o momento em que não se produziu mais óleo.

14. Recuperação com surfactina (secundaria): a recuperação com o biosurfactante ou recuperação secundária foi feita com a injeção contínua do biosurfactante na Soi (antes da injeção de água) até o momento em que não se produziu mais óleo.

15. Cálculo do Número Capilar: São as forças viscosas e capilares que vão promover o aumento do FR. Na literatura, a modificação causada por estas duas forças no reservatório é traduzida por um número adimensional chamado de Número Capilar (Nc), que é definido como a relação entre as forças viscosas (Fv) e as forças capilares (Fc), conforme Equação 4.11. (MEZZONO &TEIXEIRA, 1982). As forças viscosas são definidas como o produto entre a velocidade intersticial (v) e a viscosidade da fase deslocante (μ), e as forças capilares são definidas como o produto entre a tensão interfacial entre as fases água/óleo e o cosseno do ângulo de contato. Como a maioria dos reservatórios é molhável à água, o ângulo de contato é zero e o cosseno de zero é um (MEZZONO e TEIXEIRA, 1982). Quanto maior o Nc, maior é o FR. Valores típicos de Nc para reservatório sob injeção de água oscilam de 10^{-6} a 10^{-7} (MEZZONO e TEIXEIRA, 1982). Autores relatam que aumento de uma ordem de magnitude no Nc já resulta em aumento do Fator de Recuperação (HERNANDEZ, 2018).

$$Nc = \frac{Fv}{Fc} = \frac{\upsilon . \mu}{\gamma . \cos\phi} = \frac{\upsilon . \mu}{\gamma} \qquad \text{(Eq. 4.11)}$$

16. Fluidos usados: nas etapas de saturação da rocha, permeabilidade à àgua e recuperação secundária (com água), foi usada uma água sintética com salinidade de aproximadamente 36.400 ppm, que simula a salinidade da água do mar. O óleo utilizado em todas as etapas foi o mineral incolor Emcaplus (FISPQ Oxiteno 2019) com viscosidade em torno de 20 cP (25 ^{o}C). O óleo Emca é muito usado em testes de laboratório para simular o comportamento do petróleo (MEZA, 2015) em testes de recuperação de petróleo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curvas de calibração

Foram construídas as curvas de calibração e gráficos de resíduos para concentração celular (Figura 5.1), concentração de surfactina (Figura 5.2) e concentração de sacarose (Figura 5.3) e feito os testes de Grubbs e de Cochran para validação do modelo gerado. Os valores das concentrações usadas e das medições encontram-se no Apêndice 2.

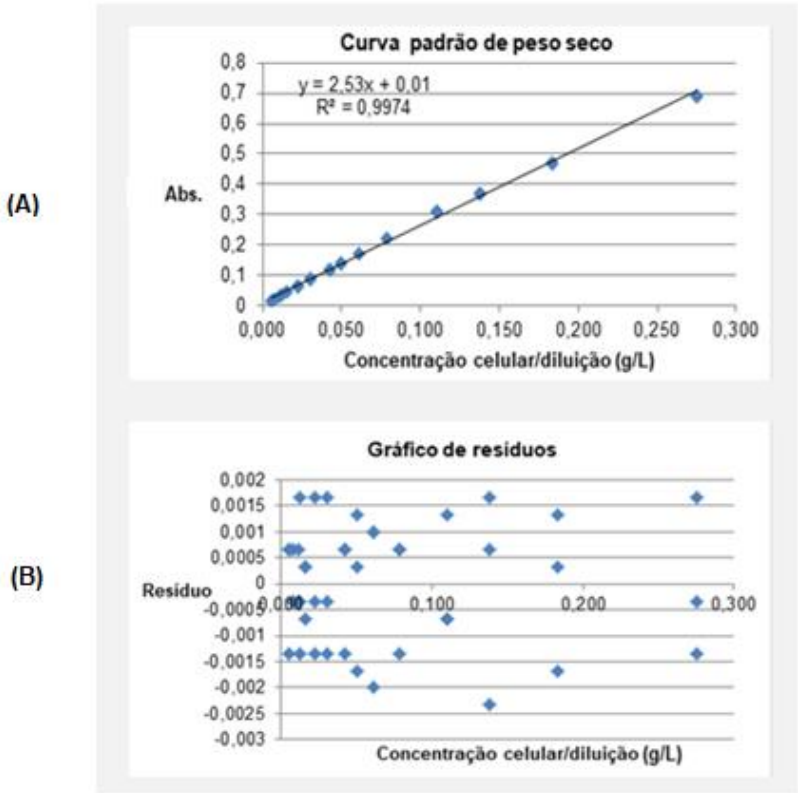


Figura 5.1: Curva de calibração (A) e gráfico de resíduos (B) para concentração celular.

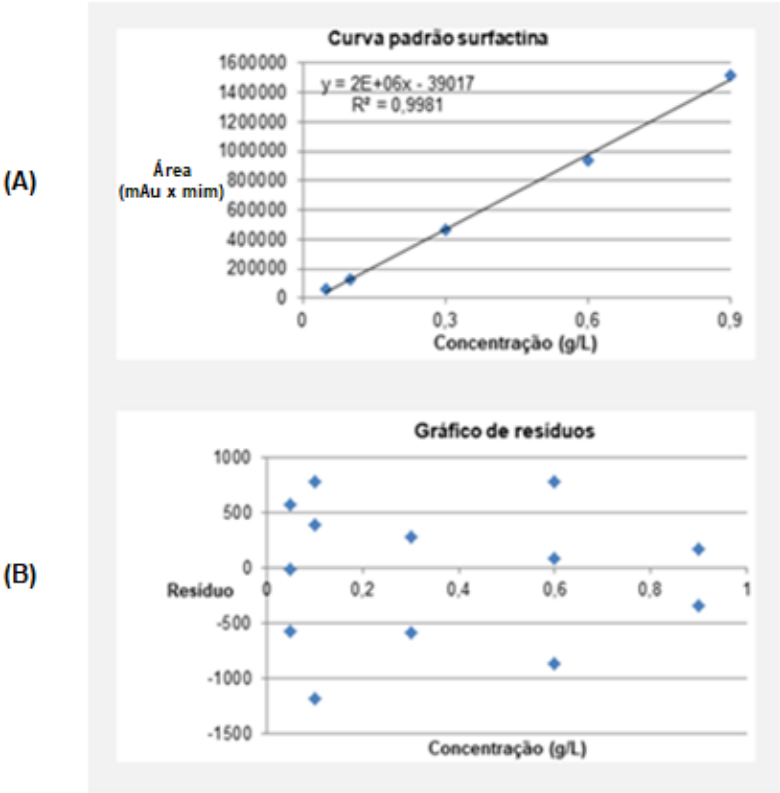


Figura 5.2: Curva de calibração (A) e gráfico de resíduos (B) para surfactina.

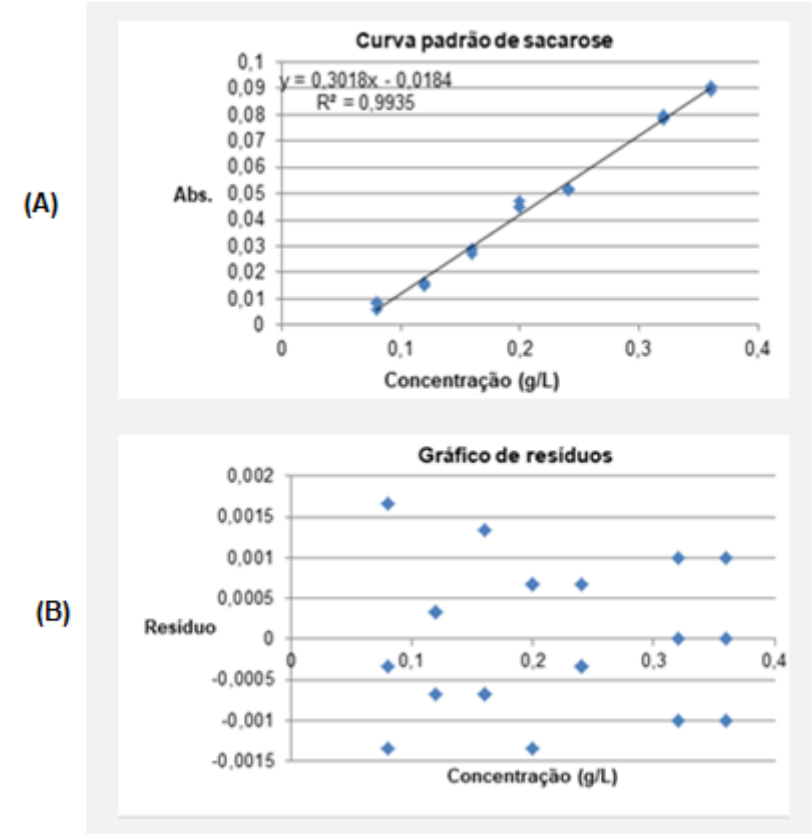


Figura 5.3: Curva de calibração (A) e gráfico de resíduos (B) para sacarose.

Para o teste de Grubbs, os resultados de $G_{calculado}$ para as curvas de concentração celular e de sacarose foram menores que $G_{crítico}$, em todas as concentrações estudadas; portanto, não há valores discrepantes para os dados analisados. Desta forma, todos os valores foram usados. Porém, os resultados de $G_{calculado}$ para a curva de concentração de surfactina mostraram dois valores aberrantes (nas concentrações de 0,3 g/L e 0,9 g/l), sendo estes então, retirados da curva. Após o teste de Grubbs, foi realizado o teste de Cochran e os resultados de $C_{calculado}$ foram menores que $C_{crítico}$ (Apêndice 2), em todos os casos estudados e, portanto, as variâncias dos resultados são homogêneas, mostrando a homocedasticidade entre os dados. Os resultados de $G_{calculado}$ e $C_{calculado}$ de cada caso são apresentados no Apêndice 2.

A análise dos gráficos de resíduos permite concluir que a variabilidade, em todos os casos, se apresenta distribuída aleatoriamente em torno de zero, reforçando a premissa de que o modelo demonstra qualidade e confiabilidade dos dados analíticos, podendo ser utilizados para os cálculos da concentração celular, concentração de sacarose e concentração de surfactina no presente estudo.

5.2. Caracterização elementar do açúcar VHP

A composição dos elementos químicos presentes no açúcar VHP, usado como única fonte de carbono e energia para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* LBF 732, é apresentada na Tabela 5.1. Nota-se que a matéria-prima contém a maioria dos elementos químicos normalmente adicionados aos meios de produção conforme reportado na literatura (RAMANA & KARANTH, 1989; NAZINA *et al*, 2005; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA, 2008; GHOJAVAND *et al*, 2008; AL- SULAIMANI *et al*, 2011; AL-BAHRY *et al*, 2013).

Tabela 5.1: Quantificação dos elementos contidos no açúcar VHP

Componente	Concentração (mg/L)	
	VHP*[1]	**Meio de produção*[2]**
Ca	0,34	0,003-0,27
Mg	0,14	40-120
K	0,52	0,36-1723
Mn	<0,005	0,001-0,5
Fe	0,008	0,002-1,0
Co	<0,005	0,05-0,9
Cu	<0,005	0,01-0,1
Zn	0,002	0,006-2,3

*[1] Concentração inicial de 10 g/L

*[2] Referências: ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFA; HASSOUNA (2008); GHRIBI & ELLOUZE-CHAABOUNI (2011); AL-BAHRY *et al* (2013); SOUSA *et al* (2014)

Nota-se que as concentrações de alguns elementos químicos se encontram abaixo das utilizadas nos meios para a produção de surfactina por *B. Subtilis* (Tabela 5.1). Devido a isto, foi realizado um estudo para determinar se as concentrações encontradas no açúcar VHP são suficientes para atender as exigências nutricionais para a plena atividade do microrganismo, podendo assim, estar sendo utilizadas em excesso no meio, aumentando o custo de produção.

5.3. Seleção dos micronutrientes do meio de cultura para produção de BS por *Bacillus subtilis* LFB 732

Na Tabela 5.2 é apresentada a matriz do planejamento PB para a seleção dos micronutrientes normalmente contidos em meios para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*. Nesta tabela estão compilados também os dados referentes às análises de tensão superficial e da concentração de biossurfactante, para tempos de 24 e 48 horas de fermentação. Também foram inseridos na tabela 5.2 os valores calculados de produtividade para análise comparativa.

Tabela 5.2: Matriz do planejamento Plackett-Burman com os valores codificados das variáveis: $FeSO_4.7H_2O$ (x_1), $MnSO_4$. 4 H_2O (x_2), H_3BO_3 (x_3), $CuSO_4$ (x_4),$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (x_5), $CoCl_2$ (x_6), $ZnSO_4$ (x_7), $CaCl_2$ (x_8) e valores de tensão superficial (T.S.), concentração de BS e produtividade (Q_p) correspondentes, em 24 e 48 horas de processo.

Ensaios	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	x_6	x_7	x_8	T.S. 24h (mN/m)	T.S. 48h (mN/m)	BS_{24h} (mg/L)	BS_{48h} (mg/L)	Q_{p24h} (mg/L.h)	Q_{p48h} (mg/L.h)
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	29,1	29,6	137,3	223,0	5,7	4,6
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	28,8	29,7	137,5	171,5	5,7	3,6
3	-1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	29,7	30,0	88,1	125,4	3,7	2,6
4	1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	29,0	29,8	128,6	184,5	5,4	3,8
5	1	1	-1	1	-1	1	1	-1	28,7	29,6	163,0	224,0	6,8	4,7
6	1	1	1	1	1	-1	-1	1	29,3	29,8	107,2	173,6	4,5	3,6
7	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	28,5	29,5	117,1	132,2	4,9	2,8
8	-1	-1	1	1	-1	1	1	1	28,9	29,7	100,0	147,3	4,2	3,1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	28,7	29,0	104,9	146,8	4,4	3,1
10	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	29,0	30,0	138,8	184,5	5,8	3,8
11	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1	28,8	30,1	155,1	197,1	6,5	4,1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	28,7	29,6	119,3	128,1	5,0	2,7

Valor da tensão superficial inicial (63 ± 1 mN/m)

Analisando a Tabela 5.2, pode-se observar que houve redução da tensão superficial inicial dos diferentes mostos (62 a 64 mN/m), para 28,5 a 29,7 mN/m decorridas 24 h de fermentação. Trabalhos na literatura reportam que valores de tensão superficial menores do que 35-40 mN/m são indicativos de microrganismos potencialmente produtores de tensoativos (MULLIGAN, 2005; BARROS *et al*, 2007; AL-BAHRY *et al*, 2013; AL-WAHAIBI, 2014; FERNANDES *et al*, 2016). No caso da produção de biossurfactante por linhagem de *B. subtilis*, a literatura consultada apresenta valores de tensão superficial de 25,6 mN/m a 31,5 mN/m para mostos após fermentação de diferentes tipos e concentrações de fontes de carbono (AL-WAHAIBI *et al*, 2014; PORNSUNTHORNTAWEE *et al,* 2008; GHOJAVAND *et al*, 2008; JOSHI *et al*, 2008; ANJUN *et al,* 2016; SOUSA *et al,* 2014; RANE *et al*, 2017). Portanto, pode-se inferir que nas diferentes condições nutricionais testadas, a linhagem de *Bacillus subtilis* LFB 732 foi capaz de produzir biossurfactante, mesmo na ausência dos micronutrientes normalmente incorporados ao meio de cultivo visando a sua produção (ensaio 12); ou seja, com o suporte apenas dos elementos químicos presentes no VHP.

Ainda, observando a Tabela 5.2, nota-se que os valores de tensão superficial se mantiveram praticamente inalterados de 24 a 48 horas. Os pequenos aumentos de tensão superficial observados podem ser decorrentes das amostragens visto que os experimentos foram realizados em frascos de sacrifício. Além disso, sabe-se que atingido o valor mínimo de tensão superficial, não há mais variação deste parâmetro com o aumento da concentração do tensoativo (DALTIN, 2012).

De fato, as concentrações de B.S. nos mostos fermentados de 24 horas variaram de 88 mg/L (ensaio 3) a 163 mg/L (ensaio 5), com aumentos de 42 % e 38 %, respectivamente, decorridos 48 horas de processo. Para os 12 ensaios realizados, o aumento percentual variou de 7 % (ensaio 12) a 62 % (ensaio 1), decorridos 48 horas de processo, sendo o valor máximo de 224 mg/L obtido no ensaio 5. Estes valores são interessantes comparados aos dados da literatura obtidos para cultivos em frascos agitados de diferentes linhagens de *B. subitilis* em distintas fontes de carbono, a saber: 158 mg/L (SOUZA *et al*, 2014) a 340 mg/L (OLIVEIRA, 2013); particularmente, se comparados os tempos de

fermentação de 72 horas para esses experimentos e 24 horas para o presente trabalho. Entretanto, concentrações maiores, de aproximadamente 800 mg/L, foram reportadas por Cruz *et al* (2017), pelo emprego de 5% de glicerol e a linhagem *B. subtilis* ATCC 6633; apesar da tensão superficial do mosto fermentado ser 39 mN/m. Isto sugere que a estrutura molecular do surfactante obtido pelos autores apresenta propriedades tensoativas inferiores às obtidas por outros autores e neste trabalho.

Adicionalmente, foi comparado os perfis cromatográficos da amostra de surfactina padrão, adquirida pela Sigma-Aldrich (Figura 5.4 A) ao da amostra do mosto fermentado em 24 horas (ensaio 5), Figura 5.4 B. Como a surfactina possui vários homólogos e/ou isoformas, sua quantificação é um pouco mais complexa. Foram escolhidos então, quatro picos de calibração (indicados pelas setas nas Figuras 5.4 A e 5.4 B) para representar a surfactina. Esses picos também apareceram na surfactina padrão, o que indica que ambos os tensoativos são constituídos de diferentes isoformas e/ou homólogos, com quantidades relativas distintas de cada homólogo e/ou isoforma para as duas amostras.

No entanto, independentemente da condição nutricional testada, os cromatogramas das 12 amostras (Apêndice 3) apresentaram os mesmos quatro picos, em tempos de retenção bastante semelhantes, apesar da variação da quantidade produzida ter sido dependente da composição nutricional.

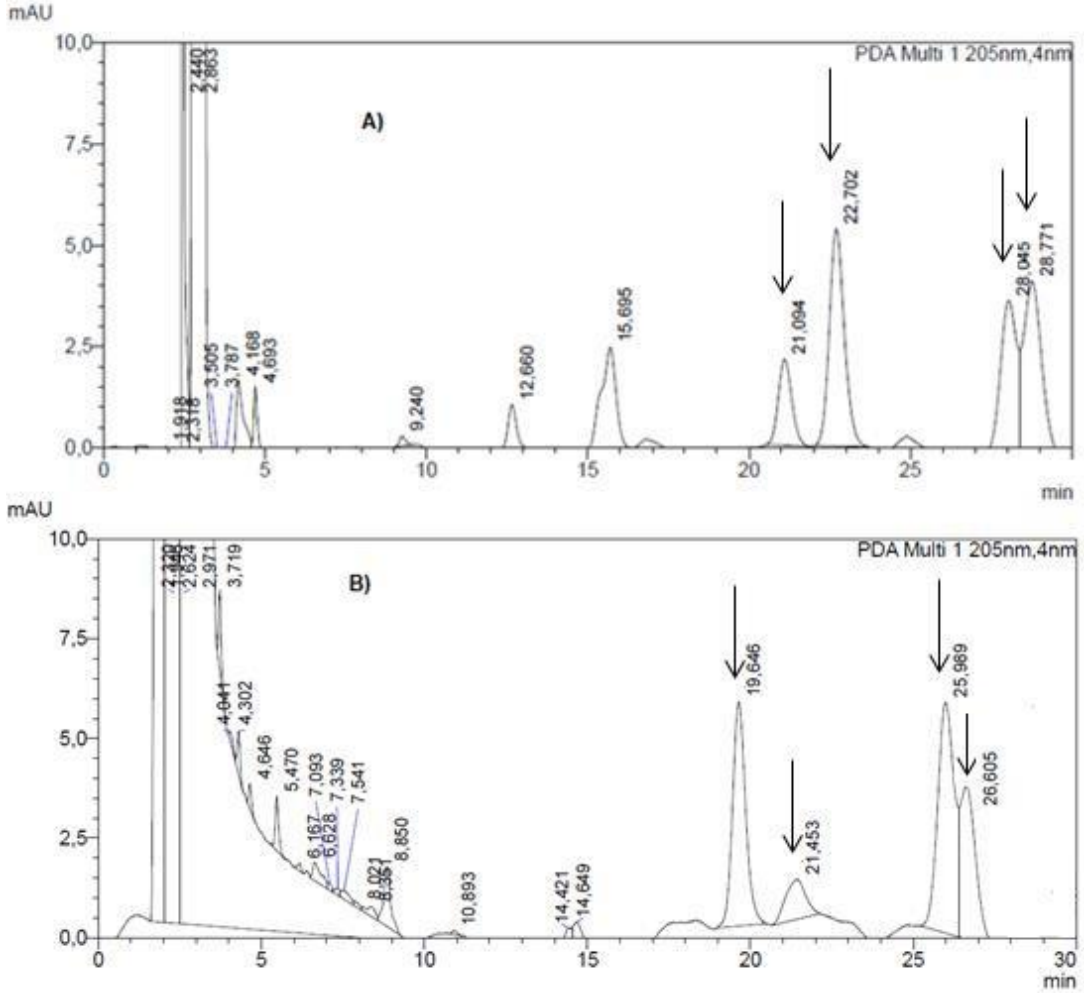


Figura 5.4: Perfis cromatográficos A) surfactina (Sigma-Aldrich) B) Surfactina produzida por *B. subtilis*

Considerando o aumento da produção de surfactina com o decorrer do tempo de fermentação, foram calculadas as produtividades para os dois diferentes tempos estudados, cujos valores se encontram na Tabela 5.2. Em todas as condições nutricionais, houve decaimento da produtividade (Q_p) de 24 para 48 horas. Por isso, foi feita uma análise estatística para avaliação do efeito dos micronutrientes na produção de surfactina por *B. subtilis* LFB 732 apenas para tempo de fermentação de 24 horas. Mesmo porque, quanto menor o tempo de processo, menor o custo relativo.

A partir dos resultados obtidos no planejamento PB12 (Tabela 5.2) foram gerados os modelos estatísticos para tensão superficial e concentração de BS em 24 horas de cultivo (Eq. 5.1 e 5.2), respectivamente:

$$Y_{T.S.24h} = 28,9 + 0,1\, x_1 + 6 \times 10^{-2}\, x_2 + 0,3\, x_3 + 0,2 x_4 - 0,1\, x_5 - 0,4\, x_6 - 0,2 x_7 + 3,3 \times 10^{-3}\, x_8 \quad \text{(Eq. 5.1)}$$

$$Y_{B.S.24h} = 124,7 + 21,3\, x_1 + 6,5\, x_2 - 23,4\, x_3 - 15,5\, x_4 + 1,1\, x_5 + 0,9\, x_6 + 21,0\, x_7 - 2,2\, x_8 \quad \text{(Eq. 5.2)}$$

Quanto maior o valor do coeficiente, maior será o impacto da mudança do nível da variável, na resposta avaliada. Portanto, para o modelo de tensão superficial, o sinal negativo das variáveis, significa que quando estas passam do nível -1 para o nível +1 favorece a redução da tensão superficial. Neste caso, pode-se verificar visualmente que, para o tempo selecionado de 24 horas a variável que mais influenciou na redução da tensão superficial, mesmo que de forma sutil, foi o $CoCl_2$ (x_6).

Entretanto, a partir do modelo gerado para concentração de BS, pode-se verificar que as variáveis que mais influenciaram a produção de surfactina foram H_3BO_3 (x_3), $FeSO_4.7H_2O$ (x_1) e $ZnSO_4$ (x_7). Contudo, os valores associados aos componentes apresentam sinais diferenciados. Os sinais positivos das variáveis indicam que ao passar do nível -1 para o nível +1 tem-se aumento da produção de surfactina. Por isso as variáveis que mais influenciaram no aumento da síntese de surfactina foram $FeSO_4.7H_2O$ e $ZnSO_4$.

Distintamente, o H_3BO_3 apresentou efeito negativo, o que significa que esta variável quando passa do nível -1 para o nível +1 leva à redução da resposta (concentração de surfactina). Isto indica que este e todos os outros compostos que tiveram valores dos coeficientes negativos, podem estar presentes em suas menores quantidades. Já os demais compostos químicos podem ser considerados pouco significativos para a produção de surfactina pela linhagem empregada, uma vez que os valores dos respectivos coeficientes apresentam pouca significância.

Os resultados obtidos estão de acordo com Wei *et al* (2007) que estudaram a influência dos elementos traços manganês e ferro no meio mineral com 4% de glicose para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Segundo eles, a presença de apenas um dos dois elementos quimicos é suficiente para uma eficiente produção de surfactina. Gu *et al* (2005) também concluíram que $FeSO_4$ e $ZnSO_4$ foram variáveis significativas para a produção de lipopeptídeos, sendo o ferro um cofator comum para enzimas microbianas e proteínas e, portanto, um nutriente mineral essencial para microorganismos (BATISTA *et al*, 2010) e a adição do $ZnSO_4$ favorável ao crescimento do *B. Subtilis* (COOPER *et al*, 1981).

De acordo com Nurfarahin, Mohamed e Phang (2018), zinco, cobre, boro, molibdênio, e cobalto são os elementos traço mais relevantes na produção de biossurfactantes. Em contrapartida, Cooper *et al*, (1981) e Abdel-Mawgoud; Aboulwafa; Hassouna, (2008) demonstraram ser o Cobre inibidor do crescimento celular e da produção de surfactina. Mas, deve-se considerar que as necessidades de elementos traço dependem da linhagem microbiana empregada, conforme reportado por Nurfarahin, Mohamed e Phang (2018). Cabe lembrar que neste estudo, à exceção do boro e molibdênio, os demais elementos podem ser disponibilizados indiretamente com as fontes nutricionais empregadas, em particular o VHP.

A relevância dos elementos químicos definido pelo modelo estatístico (Eq. 5.1 e 5.2) pode ser ainda creditada pela construção dos gráficos de Pareto para tensão superficial e concentração de BS, Figuras 5.5 e 5.6, respectivamente. Para ambos os gráficos são mostrados os efeitos padronizados das variáveis (valores de *t*) na probabilidade de significância do teste (p = 0,1).

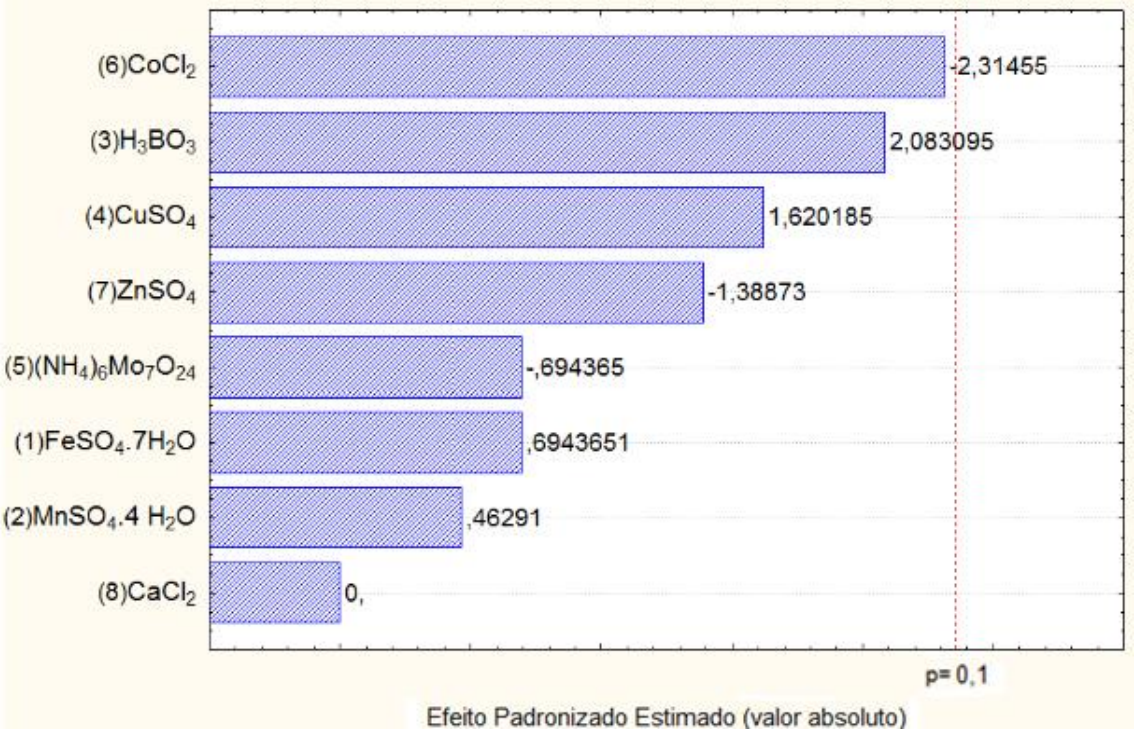


Figura 5.5: Gráfico de Pareto para valores de tensão superficial obtidos para seleção de micronutrientes.

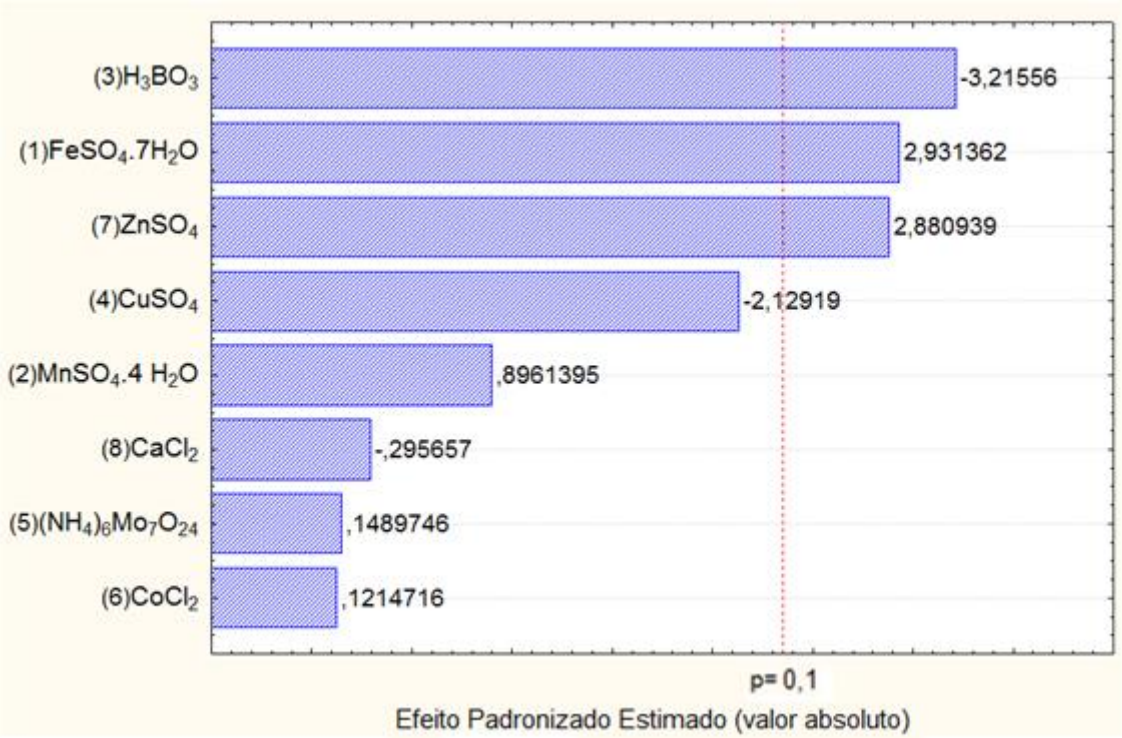


Figura 5.6: Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina obtidos para seleção de micronutrientes.

Neste contexto, cobre, manganês, cálcio, molibdênio e cobalto podem ser ou não incorporados ao meio de acordo com o nível de interesse, ou seja, um balanço econômico deverá ser atendido, caso a caso. Assim, para a continuidade do trabalho foi avaliado o efeito do meio de produção constituído do açúcar VHP, NH_4NO_3, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, e $MgSO_4$ acrescido tão somente dos micronutrientes $ZnSO_4$ e $FeSO_4.7H_2O$, uma vez que o presente trabalho teve como premissa elaborar meio a baixo custo.

5.4. Seleção dos macronutrientes do meio para produção de surfactina

Na Tabela 5.3 tem-se a matriz do planejamento experimental PB utilizado, na qual constam os resultados de tensão superficial e da concentração de biossurfactante para cada um dos ensaios realizados, em 24 h de processo.

Tabela 5.3: Matriz do planejamento PB com os valores codificados das variáveis: KH_2PO_4 (x_1), Na_2HPO_4 (x_2), $MgSO_4$ (x_3), $FeSO_4.7H_2O$ (x_4) e $ZnSO_4$ (x_5) e valores de tensão superficial (TS) e concentração de BS correspondentes, em 24 horas de cultivo.

Ensaios	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	T.S. (mN/m)	BS (mg/L)
1	1	-1	1	-1	-1	59,2	<L.D.
2	1	1	-1	-1	-1	28,9	99,0
3	-1	1	1	1	-1	29,1	149,3
4	1	-1	1	-1	1	58,3	<L.D.
5	1	1	-1	1	-1	28,9	91,5
6	1	1	1	1	1	29,2	140,3
7	-1	1	1	-1	1	29,1	129,7
8	-1	-1	1	1	-1	53,8	<L.D.
9	-1	-1	-1	1	1	49,8	<L.D.
10	1	-1	-1	1	1	62,4	<L.D.
11	-1	1	-1	-1	1	45,5	<L.D.
12	-1	-1	-1	-1	-1	61,0	<L.D.

Valor da tensão superficial inicial (63 ± 1 mN/m); L.D. = limite de detecção da análise cromatográfica.

Analisando a Tabela 5.3, pode-se observar uma ampla variação da concentração de biossurfactante, que variou de valores abaixo do limite de detecção até 149,3 mg/L. Por conseguinte, foram determinados valores distintos de tensão superficial dos mostos fermentados. Em alguns casos, como por exemplo os ensaios 10 e 12, a tensão superficial praticamente não sofreu alteração, mantendo-se próxima ao valor do mosto não inoculado (em torno de 63 mN/m); corroborando os resultados de concentração de BS determinados. Em outros, a quantidade de BS produzida também não pôde ser quantificada, embora tenha sido observada uma redução da tensão superficial (ensaios 9 e 11). Entretanto, valores de tensão superficial superiores à 40 mN/m não condizem com produtos que tenham propriedades tensoativas, segundo a literatura (FERNANDES *et al*, 2016)

A concentração máxima de BS nos mostos fermentados de 24 horas foi de 149 mg/L (ensaio 3). Esta quantidade foi cerca de 8% inferior ao valor máximo obtido com o meio constituído de todos os macronutrientes e alguns dos micronutrientes ($FeSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.4H_2O$, $CuSO_4$, $CoCl_2$, $ZnSO_4$) (item 5.2.1). Note-se porém que este experimento só teve a suplementação do $FeSO_4.7H_2O$, Na_2HPO_4 e $MgSO_4$.

A partir dos resultados obtidos no planejamento PB12 (Tabela 5.3) foram gerados os modelos estatísticos para tensão superficial e concentração de BS em 24 horas de cultivo (Eq. 5.3 e 5.4):

$$Y_{T.S.} = 44,5 - 8 \times 10^{-2} x_1 – 25,4 x_2 – 2,8 x_3 – 4,6 x_4 + 2,4 x_5 \quad \text{(Eq. 5.3)}$$

$$Y_{B.S.} = 50,8 + 8,6 x_1 + 101,6 x_2 + 38,2 x_3 + 25,4 x_4 – 11,6 x_5 \quad \text{(Eq. 5.4)}$$

A partir do modelo gerado para tensão superfical, pode-se verificar visualmente que, para o tempo selecionado de 24 horas, a variável que mais influenciou na redução da tensão superficial foi o Na_2HPO_4 (x_2). O sinal negativo significa que esta variável quando passa do nível -1 para o nível +1 intensifica a redução da tensão superficial, ou seja, maiores concentrações de Na_2HPO_4 são mais interessantes para o bioprocesso.

Como era de se prever, também a concentração de Na_2HPO_4 (x_2) teve destaque na produção de surfactina por *B. subtilis* LFB 732, enquanto $MgSO_4$

(x_3) e $FeSO_4$ (x_4) tiveram valores de coeficiente aproximadamente 3 e 4 vezes menores que o valor do coeficiente do Na_2HPO_4, respectivamente. Por outro lado, somando os valores dos coeficientes do $MgSO_4$ e $FeSO_4$, obtém-se valor de 63,6, que significa que a adição destes dois componentes favorece, em média, a produção de BS em 63,6 mg/L, que é uma concentração bastante relevante. Sabe-se também que, tanto o $MgSO_4$ quanto o $FeSO_4$ são importantes para as funções vitais de microrganismos, principalmente os aeróbios. O ânion sulfato é importante na síntese de alguns aminoácidos e de algumas vitaminas, essenciais como constituintes de proteínas e cofatores de enzimas, respectivamente (MADIGAN *et al*, 2016). E, conforme anteriormante reportado, a atividade de algumas enzimas importantes na via glicolítica depende da presença do magnésio (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002), enquanto que o ferro é essencial sobretudo na fosforilação oxidativa, como componente de citocromos e proteínas ferro-enxofre (GOTTSCHALK, 1979).

Dentre os macronutrientes, o fosfato é fundamental para o metabolismo microbiano na síntese de compostos essenciais, relacionados à geração de energia e a reprodução celular (ARAÚJO; NUNES; PANOSSO, 2012). Mas, singularmente, o sal de sódio foi estatisticamente significativo, ao contrário do sal de potássio, já que o potássio é cofator de algumas enzimas, enquanto do sódio depende apenas o transporte ativo por intermédio da bomba sódio-potássio e da atividade de microrganismos halofílicos. Isto provavelmente se deve à presença do potássio na composição do açúcar VHP.

Ainda analisando o modelo estatístico para concentração de BS (Eq. 5.4), pode-se observar que o $ZnSO_4$ (x_5) apresentou valor de coeficiente negativo, diferentemente do planejamento PB anterior (Eq. 5.2), onde o coeficiente se apresenta positivo e significativo para a produção de BS. Estudo realizado por Vandenberghe *et al* (1999), mostrou ser a produção de ácido cítrico por linhagem de *Arpergillus* favorecida pelo zinco quando ao meio foi adicionado KH_2PO_4. Logo, provavelmente, o efeito negativo do zinco evidenciado nesta etapa pode ser devido à ausência do fosfato inorgânico em alguns dos experimentos.

Os resultados inferidos através dos modelos estatísticos (Eq. 5.3 e 5.4) podem ser corroborados pelos gráficos de Pareto para tensão superficial e concentração de BS, Figuras 5.7 e 5.8, respectivamente. Para ambos os gráficos são mostrados os efeitos padronizados das variáveis (valores de *t*) na probabilidade de significância do teste (p = 0,1).

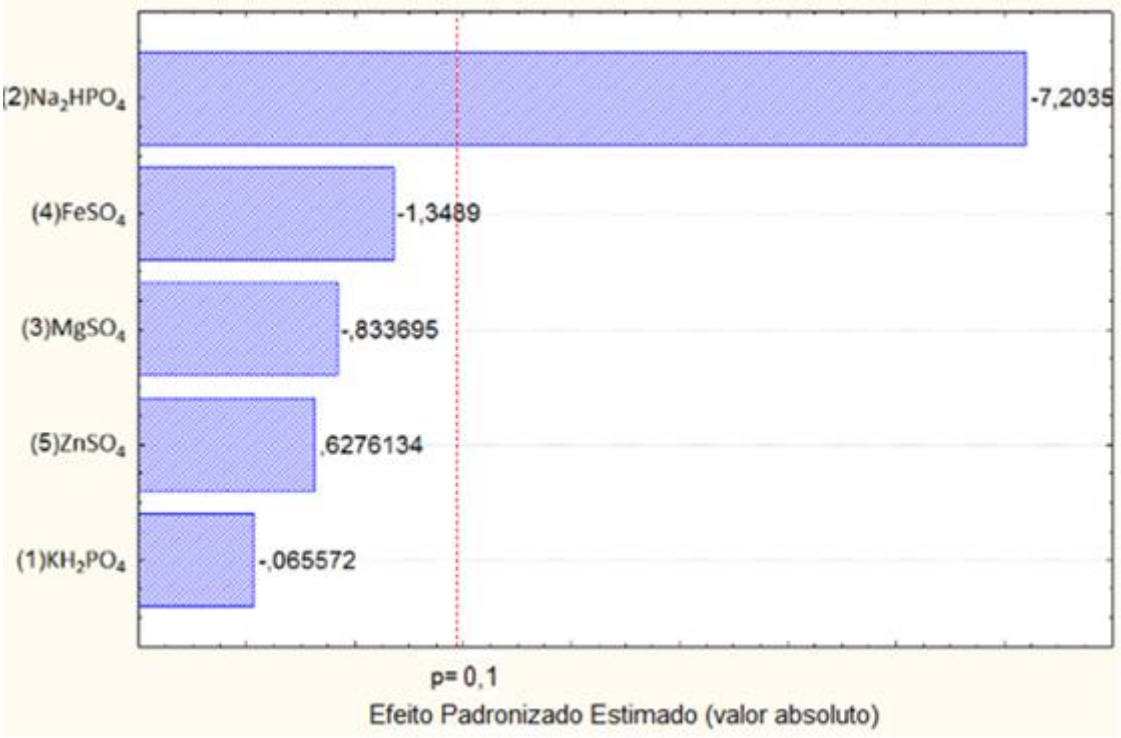


Figura 5.7: Gráfico de Pareto para valores de tensão superficial obtidos para seleção de macro e micronutrientes.

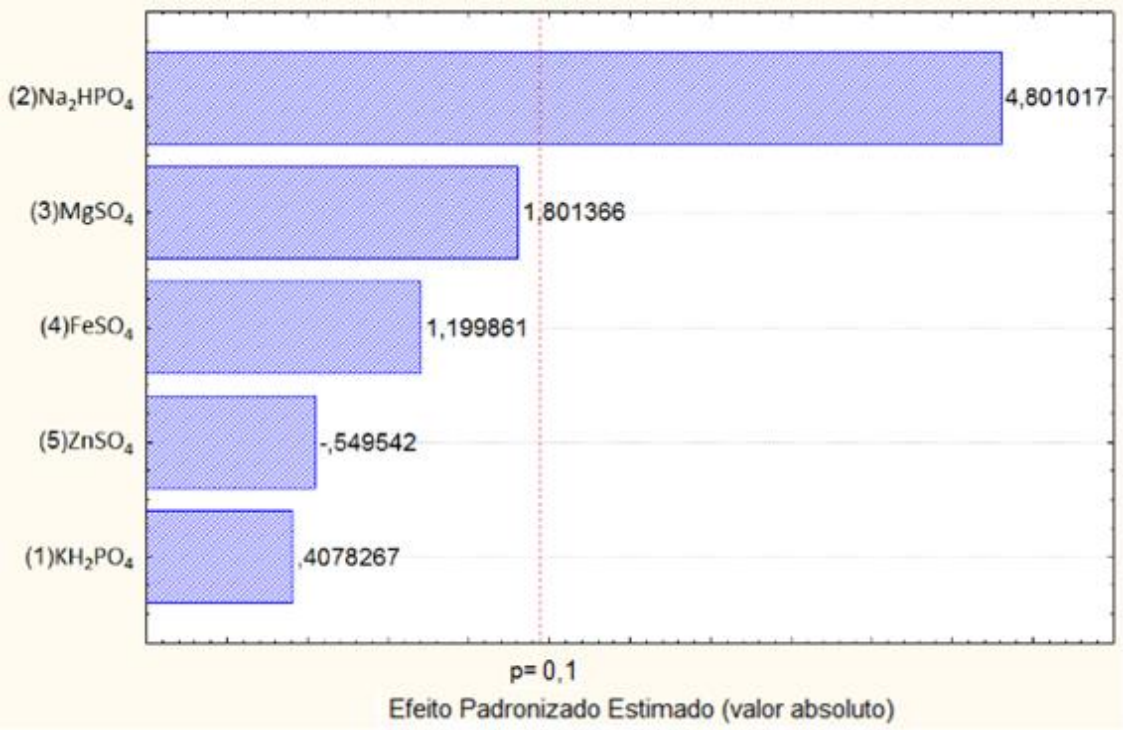


Figura 5.8: Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina obtidos para seleção de macro e micronutrientes.

Desta forma, para a otimização do meio de cultura à base de VHP, foi avaliada a interação do açúcar com NH_4NO_3 e Na_2HPO_4 em diferentes proporções, mantendo fixas as concentrações de $MgSO_4$ e $FeSO_4.7H_2O$ em 0,2 g/L e 5 mg/L, respectivamente. Isto porque o intuito era elaborar meio de baixo custo adequado para obtenção de um bioproduto com propriedades tensoativas para aplicação na EOR.

5.5. Otimização do meio de produção

As concentrações de BS obtidas segundo a matriz do planejamento são apresentadas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Matriz do planejamento DCCR com os valores codificados das variáveis: Açúcar VHP (x_1), NH_4NO_3 (x_2) e Na_2HPO_4 (x_3) e valores de concentração de BS correspondentes, em 24 horas de cultivo.

Ensaios	x_1	x_2	x_3	BS (mg/L)
1	-1	-1	-1	141,1
2	1	-1	-1	184,4
3	-1	1	-1	115,3
4	1	1	-1	122,5
5	-1	-1	1	86,2
6	1	-1	1	108,4
7	-1	1	1	83,5
8	1	1	1	96,7
9	-1,68	0	0	91,4
10	1,68	0	0	114,1
11	0	-1,68	0	108,4
12	0	1,68	0	85,0
13	0	0	-1,68	161,7
14	0	0	1,68	91,7
15	0	0	0	103,6
16	0	0	0	93,7
17	0	0	0	95,3

Foram utilizadas em todos os ensaios concentrações fixas de $MgSO_4$ e $FeSO_4.7H_2O$, nas concentrações de 0,20 g/L e 5 mg/L, respectivamente.

Analisando a Tabela 5.4, evidencia-se uma ampla variação nos valores de concentração de BS nos mostos fermentados em 24 horas de processo, variando de 83,5 mg/L (ensaio 7) a 184,4 mg/L (ensaio 3). Isto mostra que diferentes proporções dos macronutrientes afetam diretamente a produção de BS. Por exemplo, aumentos da concentração de Na_2HPO_4 levaram à redução da quantidade de BS (ensaios 2 e 6; 3 e 7; 13 e 14). No entanto, independentemente da concentração da fonte de fósforo foram alcançadas produções máximas de BS para altas concentrações iniciais de carbono e altas relações C:N. Por outro

lado, ao utilizar valores menores de substrato inicial e altas de C:N (ensaios 13 a 17) foi constatado aumento da produção de BS inversamente proporcional ao teor de Na_2HPO_4.

Assim sendo, pode-se inferir que o aumento da relação C:N, juntamente com baixas concentrações de Na_2HPO_4 favorecem a produção de BS pela linhagem LFB 732, nas condições nutricionais e ambientais testadas. Logo, para obtenção de valores máximos de BS deve-se utilizar meio com alta relação C:N, a exemplo do que é indicado para a produção da maioria dos biopolímeros microbianos (FARINA *et al*, 1998; KIM *et al*, 2002).

Ghribi & Ellouze-Chaabouni (2011) constataram que aumentos da fonte de carbono (glicose) de 15 a 40 g/L, mantendo-se fixa a concentração de nitrogênio, favoreceu a produção de surfactina. Na condição de valor máximo de glicose foi obtido 720 mg/L de BS em 24 horas de fermentação. Porém esses autores identificaram decréscimos da produção de BS, ao utilizar maiores valores de glicose. Outro estudo realizado por Rane *et al* (2017) empregando melaço como fonte de carbono demonstrou ser máxima a produção de BS (513 mg/L) em 60 horas de fermentação, para meio constituído de 4% do substrato. Entretanto, esses autores ao contrário dos anteriores não constataram aumentos significativos na concentração de BS quando o meio foi suplementado com maiores proporções de melaço.

A partir dos resultados obtidos no planejamento DCCR (Tabela 5.4) foi gerado o modelo estatístico para a concentração de BS em 24 horas de cultivo (Eq. 5.5) e construídas as 5 superfícies de resposta, em função da concentração de açúcar VHP e NH_4NO_3, mantendo fixa a concentração de Na_2HPO_4, nos 5 níveis usados para fazer o DCCR. Serão apresentadas as superfícies de resposta em 3 D (Figura 5.9) e 2 D (Figura 5.10) que mostram o melhor resultado de produção de BS. As demais superfícies de respotas (Na_2HPO_4 em -1, 0, 1 e 1,68) são mostradas no Apêndice 4.

$$Y_{B.S.} = 97{,}0 + 9{,}1x_1 - 10{,}4x_2 - 22{,}4x_3 - 5{,}6x_1x_2 - 1{,}9x_1x_3 + 9{,}2x_2x_3 + 3{,}6x_1^2 + 1{,}5x_2^2 + 12{,}1x_3^2 + 3{,}4x_1x_2x_3 \quad \text{(Eq. 5.5)}$$

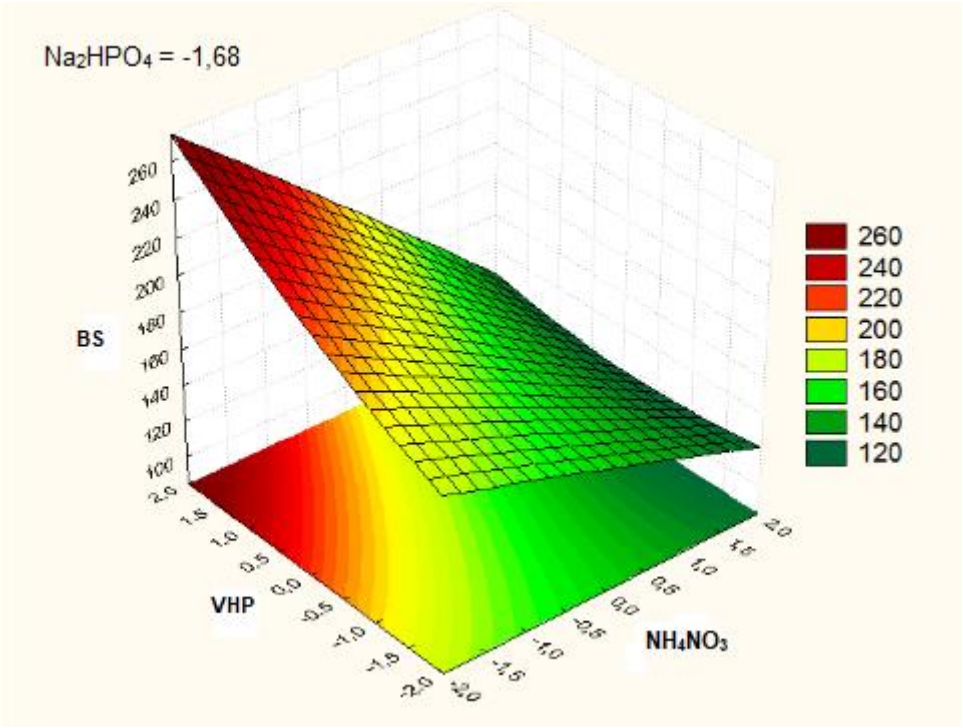


Figura 5.9: Superfície de resposta (3 D) para concentração de surfactina em função da concentração de açúcar VHP e NH_4NO_3.

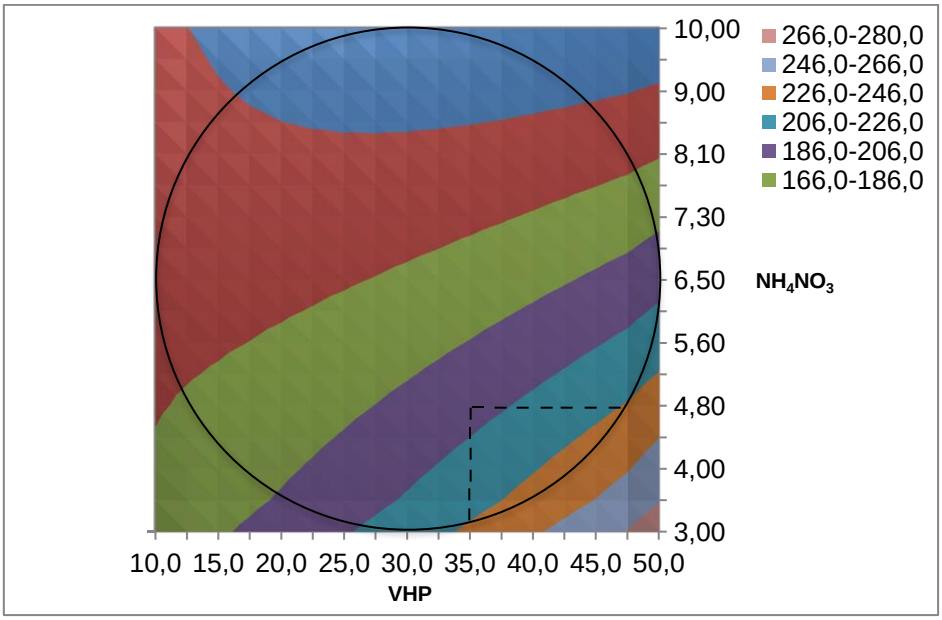


Figura 5.10: Superfície de resposta (2 D) para concentração de surfactina em função da concentração de açúcar VHP e NH_4NO_3 para Na_2HPO_4 no nível -1,68.

A Figura 5.9 mostra que, como dito anteriormente, aumentando a concentração de açúcar VHP e diminuindo a concentração de NH_4NO_3, obtém-se melhores resultados de produção, e na Figura 5.10 pode ser observado que,

por ser um planejamento esférico, a região demarcada pela linha pontilhada dentro do círculo representa a região ótima de trabalho, que é de aproximadamente 35,0 a 47,5 g/L de açúcar VHP e 3,0 a 4,8 g/L de NH_4NO_3, dentro do círculo. Porém, altas concentrações de nutrientes representam um custo maior de produção, sendo necessário manter suas concentrações baixas, sem, entretanto, comprometer o desempenho do microrganismo, a fim de viabilizar economicamente o processo.

Com o intuito de validar o modelo gerado, foi realizada uma cinética de produção de surfactina utilizando as seguintes concentrações de meio: Na_2HPO_4 (3 g/L), NH_4NO_3 (3 g/L), açúcar VHP (35 g/L), $MgSO_4$ (0,2 g/L) e $FeSO_4$ (5 mg/L).

5.6. Validação da produção de surfactina

Com o intuito de validar o modelo gerado, a produção de BS pela linhagem de *B. subtilis* foi conduzida em biorreator de bancada de 2 L de capacidade, contendo meio de produção, cuja composição foi definida no item anterior. Os parâmetros cinéticos correspondentes à atividade de *Bacillus subtilis* são mostrados nas Figuras 5.11 e 5.12.

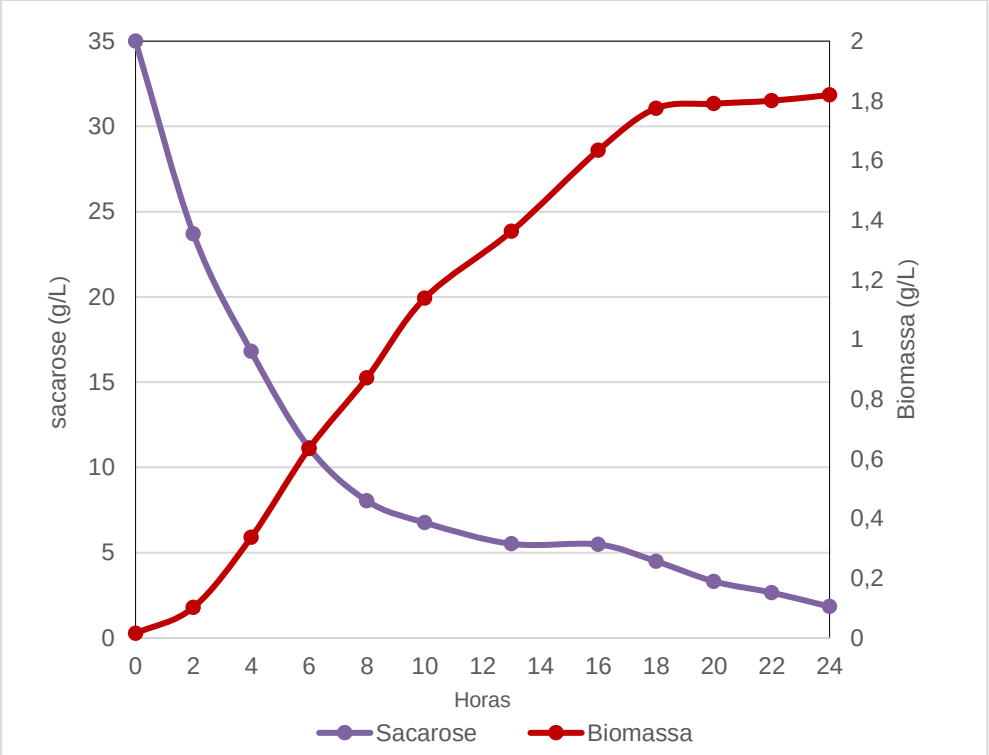


Figura 5.11: Parâmentros cinéticos referentes ao consumo de sacarose, crescimento celular pela atividade de *Bacillus subtilis* LFB 732 em meio definido pelo planejamento DCCR.

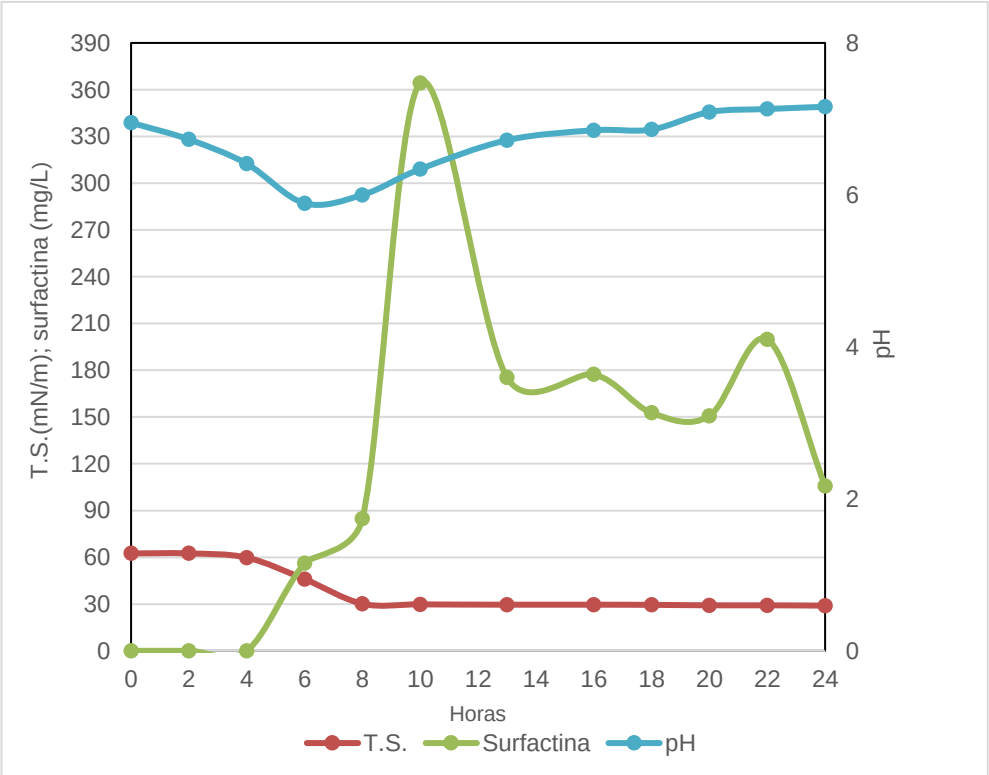


Figura 5.12: Parâmentros cinéticos referentes à concentração de surfactina, TS e pH pela atividade de *Bacillus subtilis* LFB 732 em meio definido pelo planejamento DCCR.

Em relação ao crescimento celular (Figura 5.11), é possível constatar que não houve fase de adaptação, e o início da fase estacionária foi alcançada em aproximadamente 18 horas, quando a produção de biomassa atingiu o valor máximo de 1,8 g de massa seca/L. A velocidade específica de crescimento (μ) avaliada para o perfil cinético foi de 0,146 h^{-1}, correspondente a um tempo de duplicação de 4,6 h.

Como sabido, o crescimento celular sofre intensa influência de parâmetros quer nutricionais quer ambientais, sendo a fonte de carbono e a relação C:N, dentre os parâmetros fermentativos, os de maior relevância, inclusive para a biossíntese de BS (HOFVENDAHL & HAHN-HÄGERDAL, 2000; WASCHINA *et al*, 2016; NURFARAHIN; MOHAMED & PHANG, 2018). A maioria dos autores indica ser a sacarose a melhor fonte de carbono para a produção de biossurfactante por diferentes microrganismos, e em particular para espécies do gênero *Bacillus* (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997; RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006; HERIANY & PUTRA, 2017). Contudo, há que se ater na interação da fonte de carbono com as demais fontes nutricionais constituintes do meio, ou seja, os macronutrientes e micronutrientes, e suas proporções, mesmo porque, em geral, as matérias-primas agregam diferentes elementos químicos em reduzidas quantidades disponibilizando-os para as células microbianas.

Agarry *et al* (2015) indicam ser o crescimento celular e a produção de BS favorecida quando ao meio mineral acrescido de 30 g/L de glicose, é feita a incorporação de extrato de lêvedo ou de nitrato de sódio. Os autores reportam valores máximos de crescimento celular variando de 1,45 a 3,2 g/L para todas as fontes de nitrogênio por eles testadas, inclusive as acima mencionadas, decorridas 120 h de processo. De acordo com os resultados apresentados, o valor máximo foi obtido no meio com extrato de levedo. Por sua vez Rane *et al* (2017), utilizando 40 g/L de melaço e *B. subtilis* ANR 88, determinaram uma menor variação do crescimento celular, de 2,9 a 4,2 g/L, em função da fonte de nitrogênio empregada; onde o citrato férrico amoniacal se mostrou o mais favorável. No entanto, a maior parte das fontes de nitrogênio por eles estudadas (peptona, extrato de levedo, ureia, nitrato de potássio, sulfato de amônio e cloreto de amônio) resultaram em quantidades de biomassa de 3,5±0,1 g/L. Por outro

lado, Makkar & Cameotra (1997) verificaram comportamentos diferenciados para duas linhagens de *B. subtilis* cultivadas em meio mineral, contendo 20 g/L de melaço e nitrato de potássio. A linhagem MTCC 2423 atingiu o início da fase estacionária ao redor de 24 h, com 2,5 g/L de biomassa gerada, enquanto a concentração máxima da linhagem MTCC 1427 foi superior cerca de 60%, em 48 h; apesar de que em 24 h, a concentração celular tenha sido bem similar ao da primeira.

Além do resíduo da agroindústria, outras matérias-primas já foram testadas a fim de demonstrar a possibilidade do seu emprego para a síntese de BS por linhagens de *B. subtilis (*AL-BAHRY *et al*, 2013; SANTOS *et al*, 2018; FELIX *et al*, 2019). Por exemplo, o emprego de glicerol (5%), uma fonte de carbono hidrossolúvel e prontamente fermentescível, resultou em concentração celular de 1,7 g/L para *B. subtilis* ATCC 6633 (SOUZA *et al*, 2014).

Neste cenário, pode-se inferir que o meio empregado no presente trabalho apresenta formulação adequada para a atividade metabólica da linhagem microbiana em pauta. Inclusive, corroborado pelos valores de μ reportados para linhagens de *B. subtilis* por alguns autores de 0,1170 a 0,4 h^{-1} (CHEN; BAKER; DARTON, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2013; SOUZA *et al*, 2014) em meios elaborados para a produção de biossurfactante. Deve-se enfatizar que os valores de μ não correspondem à condição ideal de cultivo desta espécie microbiana, quando a composição do meio é ideal para a síntese de material celular. Isto pode ser comprovado pelo perfil de crescimento em meio rico que pode ser observado no Apêndice 1. Neste caso foi estimado μ de 0,9 h^{-1}, o que corresponde a um tempo de duplicação de cerca 45 min. Valores semelhantes são apresentados na literatura científica (KIM *et al*, 2005; WU et al, 2012).

Analisando as Figuras 5.11 e 5.12, tem-se que a síntese da surfactina ocorreu de modo associado ao crescimento celular, embora a síntese de material celular tenha continuado mesmo com acúmulo de BS ocorrido em 10 h, ou seja, ainda na fase exponencial de crescimento. Este perfil está de acordo com Yeh *et al* (2006), Ghribi & Ellouze-Chaabouni (2011) e Mubarak *et al* (2017). Contudo, outros autores relatam ser a biossíntese do tensoativo semi-associada (AGARRY *et al*, 2015; SOUZA; MELO; RODRIGUES, 2012) ou não associada

(RON & ROSENBERG, 2001; VATER *et al*, 2002) ao crescimento celular. Ainda conforme indica a Figura 5.11, é possível estabelecer que o consumo de sacarose foi de 50 % nas primeiras 4 h. Entre 4 h e 10 h, o consumo total foi de cerca 80 %, e posteriormente o substrato residual (6,7 g/L) foi direcionado novamente para o crescimento celular. Observa-se ainda na Figura 5.12, que houve redução da concentração de BS, sugerindo sua parcial metabolização, ao contrário do observado nos ensaios em frascos agitados.

Em 10 horas de fermentação, a concentação de BS atingiu seu máximo, aproximadamente 364,3 mg/L, correspondendo a uma produtividade de 36,4 mg/L.h (Figura 5.12). Interessante notar que a concentração foi superior àquela obtida em frascos agitados. Isto pode ser explicado, pois, diferentemente dos ensaios em frascos agitados, o experimento em biorreator foi dotado de 1 vvm de aeração e maior agitação magnética (300 rpm), favorecendo o crescimento celular e a produção de BS. Adicionalmente, deve-se ressaltar que o experimento no biorreator não contemplou as condições ideais de operação, tais como aeração e agitação; nem mesmo de pH, uma vez que após 4 h, ou seja, inicio da produção de BS, houve ligeira queda do pH até aproximadamente 6, seguindo-se um aumento até sete a partir de 10 h, quando se deu o pico de produção do tensoativo.

Na literatura encontram-se valores bem variados de surfactina, por exemplo, de 71 mg/L a 4,8 g/L, comumente devido as espécie de *Bacillus* e mesmo a linhagem produtora e condições de cultivo (GUDINA *et al*, 2015; AGARRY *et al*, 2015; ANDRADE *et al*, 2017; FELIX *et al*, 2019). Há que se considerar ainda, que muitos autores empregam meios ricos, condições ambientais previamente selecionadas, bem como estendem o tempo de processo. Por exemplo, em muitos dos estudos, o tempo de fermentação ultrapassa 72 h (AL-WAHAIBI *et al*, 2014; GUDINA *et al*, 2015; CRUZ *et al*; 2018), chegando à 96 h (JHA; JOSHI; GEETHA, 2016), e até mesmo à 120 h (VARADAVENKATESAN & MURTY, 2013; AGARRY *et al*, 2015). Tem-se ainda que colocar que a molécula de BS produzida nem sempre tem capacidade tensoativa ou emulsificante, não sendo capaz de reduzir efetivamente a tensão superficial ou interfacial, em baixas concentrações.

Segundo Nurfarahin; Mohamed; Phang (2018), os biossurfactantes podem reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 22 mN/m. Em geral, para a surfactina são descritos valores mínimos de TS de 27 a 29 mN/m (SANTOS *et al*, 2018; FELIX *et al*, 2019; VESHAREH *et al*, 2019). No caso do presente trabalho, a surfactina mesmo em baixas concentrações, visto ter sido usada amostra coletada diretamente do caldo fermentado centrifugado tão somente para remoção das células, foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio de cultura de 63 ± 1 mN/m para 28-29 mN/m e a tensão interfacial de 51,51mN/m para 5,71 mN/m, assim demonstrando a sua efetividade como agente tensoativo. Resultados similares, 25,6 mN/m e 3,6 mN/m, respectivamente, foram obtidos por Al-Wahaibi *et al* (2014), utilizando meio mineral acrescido de 20 g/L de glicose em 10 h de fermentação.

Por fim, cabe ainda salientar que inicialmente foram realizados experimentos preliminares com extrato de lêvedo como única fonte de nitrogênio pretendendo-se usar a biomassa residual da indústria cervejeira como fonte nutricional; se possível contemplando a maior parte das fontes de carbono e nitrogênio para a produção de BS, com vistas à redução dos custos. No entanto, em nenhuma das condições testadas foi detectada síntese de BS pela linhagem FLB 732 pelo método cromatográfico, tampouco houve redução da tensão superficial do meio de cultura. Embora tenha havido indução do crescimento celular. Logo, aparentemente, foi favorecida a produção de biomassa em detrimento do biossurfactante.

5.7. Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido

Como anteriormente mencionado, a ação dos biossurfactantes pode ser influenciada pela variação de fatores físicos e químicos, tais como pH, temperatura e salinidade (KHOPADE *et al*, 2012; NEGIN; ALI; XIE, 2017). Portanto, é fundamental avaliar a estabilidade do BS produzido em função do tipo de aplicação, particularmente quando o foco é empregar o BS para maximizar o fator de recuperação de óleo (BELHAJ *et al*, 2019; PURWASENA *et al*, 2019). Segundo Belhaj (2019), a salinidade, a temperatura e pH, são os

principais fatores que influenciam a adsorção do surfactante, químico ou biológico, as rochas dos reservatórios.

Nesse contexto, o mosto fermentado oriundo do biorreator, isto é, o BS não purificado produzido em meio à base de VHP, com baixo requerimento nutricional (item 5.6) e, portanto, com relação custo-benefício mais vantajosa, foi avaliado quanto a estabilidade em condições de pH, temperatura e salinidade segundo às propriedades do reservatório (PURWASENA *et al*, 2019; ASTUTI *et al*, 2019). O estudo foi realizado com o mosto fermentado, uma vez que a aplicação em reservatório de óleo não requer o emprego do biosurfactante na forma purificada, ao contrário do que ocorre nas indústrias de alimentos e fármacos, entre outras (TABATABAEE *et al*, 2005; PURWASENA *et al*, 2019).

A avaliação da estabilidade física e química foi realizada com emprego do planejamento experimental Box-Behnken, tendo em vista reduzir o número de experimentos. Esta metodologia já foi escolhida por outros autores para realização de testes de estabilidade (BERTRAND *et al*, 2018; ASTUTI *et al*, 2019).

Na Tabela 5.5 tem-se a matriz do planejamento, onde se encontram compiladas as variáveis independentes, com seus níveis máximo e mínimo, bem como os resultados de tensão superficial do mosto fermentado, para tempo de contato de 1 hora. A análise estatística levou em consideração apenas a tensão superficial como variável resposta, já que este parâmetro está diretamente relacionado ao desempenho *in situ* do bioproduto.

Tabela 5.5: Matriz do planejamento Box Behnken com os valores codificados das variáveis: Temperatura (x_1), pH (x_2) e salinidade (x_3) e valores de tensão superficial (TS) correspondentes, para tempo de contato de 1 hora.

Ensaios	x_1	x_2	x_3	TS (mN/m)
1	-1	-1	0	35,9
2	1	-1	0	39,6
3	-1	1	0	31,2
4	1	1	0	31,0
5	-1	0	-1	28,8
6	1	0	-1	28,9
7	-1	0	1	38,0
8	1	0	1	40,2
9	0	-1	-1	40,2
10	0	1	-1	29,5
11	0	-1	1	44,8
12	0	1	1	40,5
13	0	0	0	29,7
14	0	0	0	30,4
15	0	0	0	30,2

Tensão superficial inicial: 29 mN/m

Analisando a Tabela 5.5, pode-se observar que a tensão superficial apresentou aumento em algumas das condições ambientais testadas, embora mesmo assim, tenha se mantido dentro limite máximo preconizado para a efetiva propriedade tensoativa (AL-WAHAIBI, 2014; FERNANDES *et al*, 2016). A única exceção foi observado para o ensaio 11, quando o BS foi aplicado em nas condições mais adversas de salinidade e pH (150 g/L de NaCl e pH 4).

Com o intuito de obter uma melhor visualização do efeito das variáveis independentes sobre a tensão superficial, foi gerado o modelo (Eq. 5.6), as respectivas superfícies de resposta (3 D) e as curvas de contorno (2 D), em função da temperatura (30 °C, 55 °C e 80 °C), que são ilustradas nas Figuras 5.13, 5.14 e 5.15, respectivamente.

A Equação 5.6 apresenta o modelo estatístico ($p < 0,05$) para tensão superficial:

$$Y_{T.S.} = 34,6 + 1,5\, x_1 - 6,9\, x_2 + 9,4\, x_3 + 0,2\, x_1^2 - 4,5\, x_2^2 - 4,1\, x_3^2 - 1,9\, x_1x_2 + 1,0\, x_1x_3 + 3,2\, x_2x_3 \quad \text{(Eq. 5.6)}$$

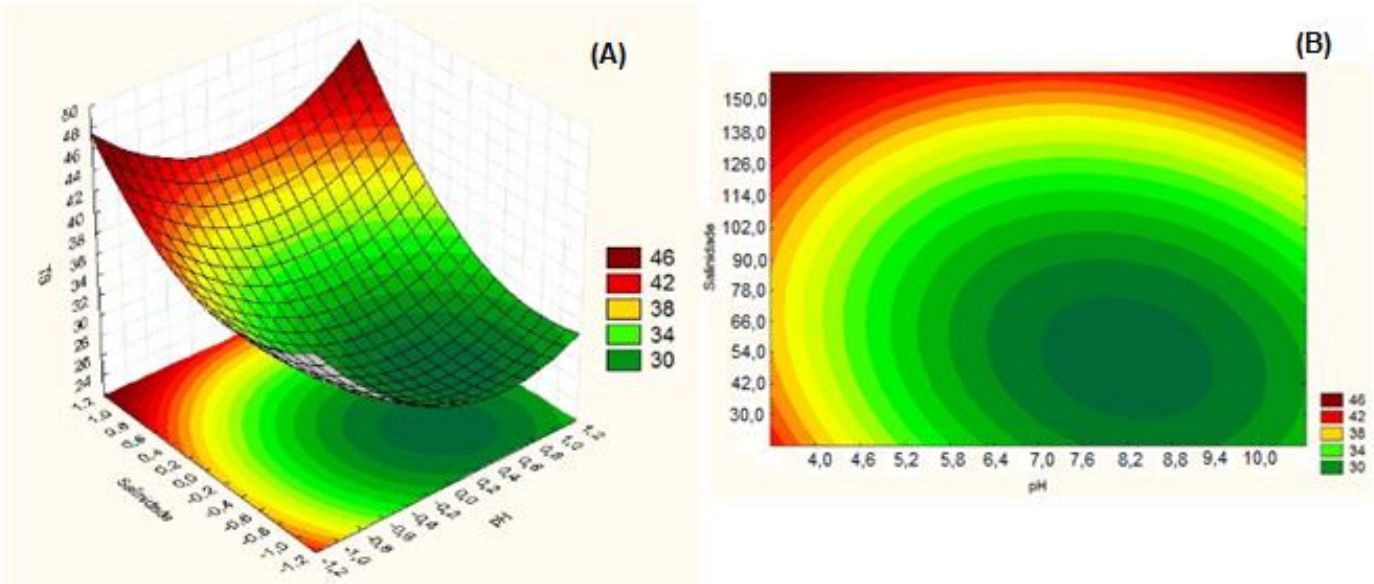


Figura 5.13: Superfície de resposta (A) e Gráfico de contorno (B) para T= 30 °C

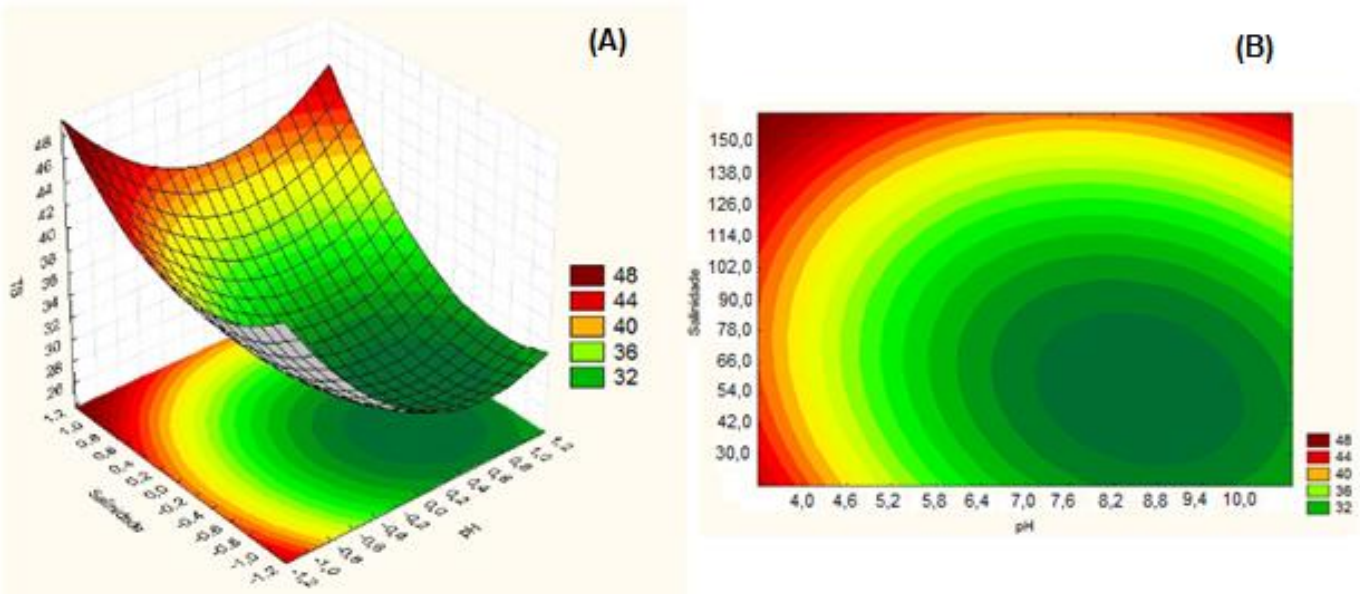


Figura 5.14: Superfície de resposta (A) e Gráfico de contorno (B) para T= 55 °C

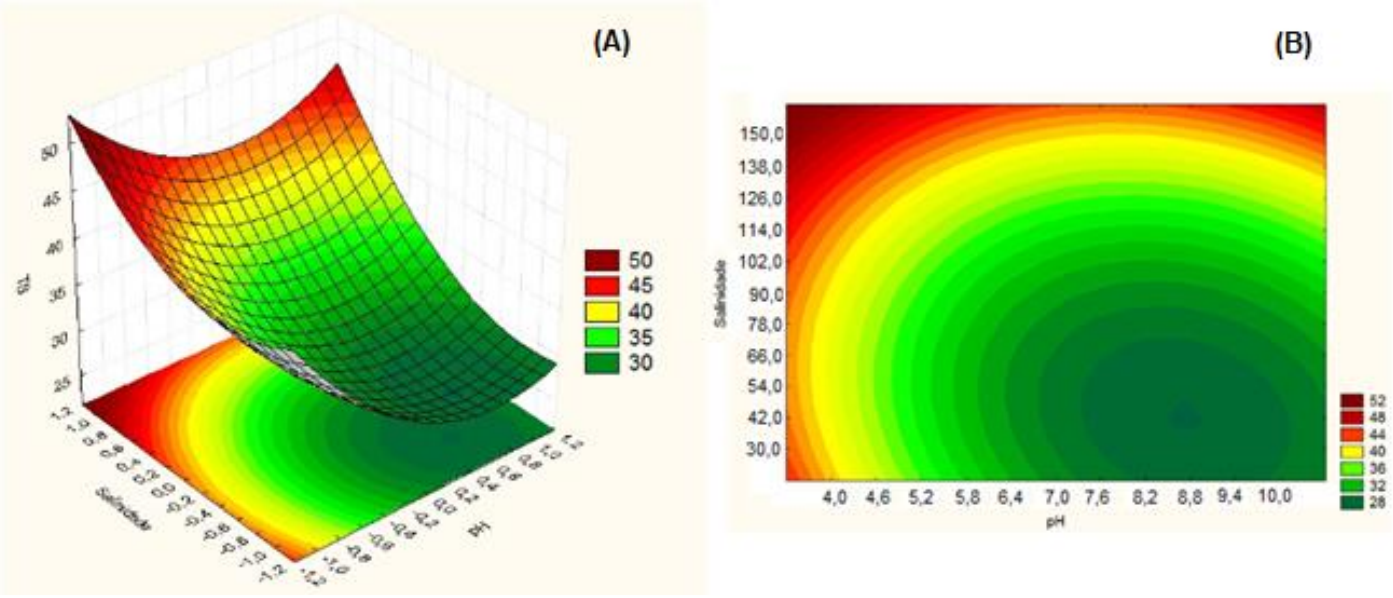


Figura 5.15: Superfície de resposta (A) e Gráfico de contorno (B) para T= 80 °C

A análise comparativa das três figuras permite evidenciar alto grau de similaridade entre as superfícies de resposta independentemente da temperatura (Figuras 5.13, 5.14 e 5.15). Portanto, o biossurfactante apresenta estabilidade térmica até 80 °C, para concentrações de NaCl até aproximadamente 126 g/L e faixa ampla de pH, de aproximadamente de 4,5 a 10. Esses resultados estão condizentes com os reportados para surfactina por outros autores (DARVISHI *et al*, 2011; AL-WAHAIBI *et al,* 2014).

Portanto, o biossurfactante produzido apresenta estabilidade satisfatória em valores de pH, de salinidade e sobretudo de temperaturas inerentes a maioria dos reservatórios de petróleo. Por isto, existe a possibilidade do emprego do biossurfactante produzido na recuperação avançada de petróleo.

5.8. Recuperação de petróleo

O mosto fermentado livre de células contendo a surfactina produzido no biorreator de 13 L por *Bacillus subtilis* LFB 732 em 10 horas de fermentação, foi avaliado na recuperação avançada de petróleo em simulador físico de teste de escoamento em meios porosos no laboratório de Caracterização de Rochas e Fluidos/CENPES/Petrobras.

Inicialmente, foi calculado o número capilar (Tabela 5.6) que é um parâmetro adimensional que traduz a modificação feita nos modelos físicos reduzidos de laboratório pela surfactina em relação à água sob o ponto de vista das forças viscosas e capilares. Na prática o que se busca é o aumento do Nc.

Tabela 5.6: Características físico-químicas e cálculo do número capilar da água e da surfactina

	Parâmetros	**Amostra A**	**Amostra B**
ÁGUA	Velocidade Intersticial (v) (cm/h)	34	29
	Viscosidade (μ) 20°C (cp)	1,0895	1,0895
	Tensão superficial (mN/m)	72	72
	Tensão interfacial água/óleo (ɣ) (mN/m)	51,51	51,51
	Número Capilar	$2,0\ E^{-6}$	$1,7\ E^{-6}$
SURFACTINA	Velocidade Intersticial (v) (cm/h)	34	29
	Viscosidade (μ) 20°C (cp)	1,3885	1,3885
	Tensão superficial (mN/m)	29,2	29,2
	Tensão interfacial (ɣ) surf./óleo (mN/m)	5,71	5,71
	Número Capilar	$1,8\ E^{-5}$	$2,0\ E^{-5}$

Como pode ser visto na Tabela 5.6, o número capilar para a água é de 2×10^{-6} e $1,7 \times 10^{-6}$, para as amostras A e B, respectivamente conforme previsto por Mezzomo & Teixeira, 1982. A surfactina fez uma mudança de uma ordem de magnitude, ou seja, para $1,8 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5}$, para as amostras A e B, respectivamente, e conforme Hernandez (2018) é suficiente para causar

aumento no F.R. Os testes a seguir foram feitos para verificar se este aumento no F.R. em função da surfactina realmente ocorrerá e, se ocorrer qual a magnitude deste aumento.

Assim, foram realizados seis testes em modelos físicos de geometria linear que é diferente dos campos onde a geometria é radial. Porém, estes testes na geometria linear são importantes para avaliar a eficiência relativa dos produtos em relação à recuperação convencional com injeção de água. Foram realizados seis testes em duas amostras, uma menos permeável (permeabilidade de 50 mD – Amostra A) e outra mais permeável (permeabilidade de B-500 mD – Amostra B). As características das amostras A e B são mostradas na Tabela 5.7. Inicialmente as duas amostras foram submetidas à recuperação de água convencional para referência (Testes T1-A e T1-B), e seguida da recuperação com o biotensoativo na Sor (saturação de óleo residual) (Testes T2-A e T2-B), simulando a recuperação terciária. Após limpeza e restauração das saturações, as amostras foram submetidas à recuperação direto com surfactina, simulando a recuperação secundária (Testes T3-A e T3-B).

Tabela 5.7: Características das rochas A e B

Rocha reservatório (arenito)				
Modelo físico	**Amostra A**		**Amostra B**	
	T1 e T2- A	T3-A	T1 e T2-B	T3-B
Diâmetro (D) (cm)	3,71	3,71	3,72	3,72
Comprimento (L) (cm)	6,61	6,61	6,44	6,44
Massa (M) (g)	153,41	153,41	144,62	144,62
Área Total (At) (cm^2)	10,81	10,81	10,87	10,87
Volume total (Vt) (cm^3)	71,42	71,42	69,99	69,99
Porosidade efetiva (Ø) (%)	16,20	15,70	18,80	18,40
Densidade da rocha (þr) (g/cm^3)	2,63	2,63	2,64	2,64
Permeabilidade absoluta ao ar (kar) (mD)	52,70	29,30	409	381

Área porosa (Ap) (cm^2)	1,75	1,70	2,04	2,00
Volume poroso (Vp) (cm^3)	11,55	10,86	12,71	12,33
Saturação água total (Swt) (%VP)	100	100	100	100
Permeabilidade absoluta à água (kw) (mD)	52,70	-	409	-
Permeabilidade efetiva ao óleo (Ko) (mD)	47,83	21,00	409	409

Na primeira fase dos testes T1-A e T1-B foram realizadas a reconstituição do modelo físico reduzido de reservatório. Nesta reconstrução foram determinadas inicialmente as geometrias das amostras e as porosidades e a permeabilidades ao gás num permo-porosímetro a gás. Em seguida, já no sistema de fluxo, foram feitas as saturações com água de formação (Swi) e as permeabilidades absolutas à água. Na sequência, as amostras foram saturadas com óleo Enca até alcançar a saturação de óleo inicial (Soi), que está associada a uma saturação de água residual (Swr). Neste momento foi medida a permeabilidade efetiva ao óleo (ko) que é a última etapa da reconstituição do modelo físico do reservatório. Todas as permeabilidades foram determinadas usando a lei de Darcy (item 4.7). Por fim, a Figura 5.16 apresenta a verificação da lei de Darcy que diz que, para uma mesma amostra (mesma rocha e mesmas dimensões), existe uma relação de linearidade entre as pressões e as vazões. Como pode ser observado, a lei de Darcy foi confirmada pela linearidade de três pontos de Ko, o que mostrou que as amostras estavam adequadas para os testes de recuperação. A não linearidade, quando ocorre, pode estar ligada a fatores como inchamento da rocha, deslocamento de finos, rachaduras internas, etc. e invalidam a amostra para testes de fluxo com objetivos quantitativos.

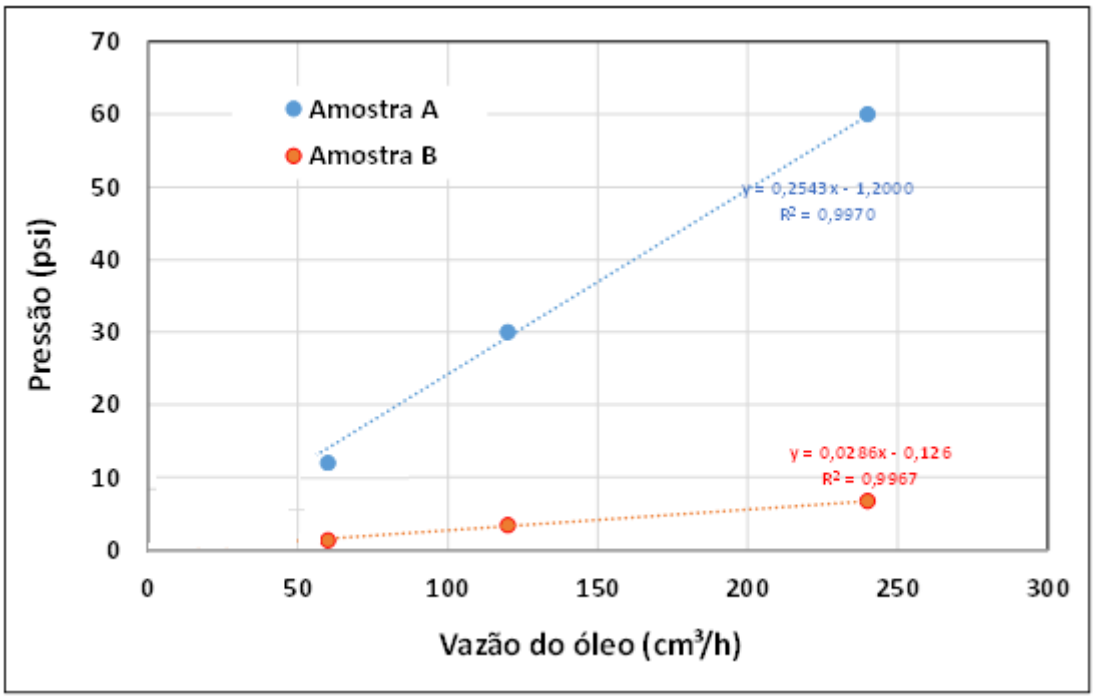


Figura 5.16: Relação linear entre as vazões e pressões do óleo.

Verificada então a lei de Darcy, as amostras foram submetidas à recuperação secundária ou injeção de água.

<u>Testes T1-A e T1-B</u>:

A Tabela 5.8 apresenta os resultados dos testes T1-A e T1-B e as Figuras 5.17 e 5.18 apresentam o fator de recuperação (FR) e pressão geradas em relação ao volume de água injetado nos testes T1-A T1-B.

Tabela 5.8 :Resultados dos testes de recuperação secundária para as amostras A e B

	Testes	
	T1-A	**T1-B**
Método de recuperação	**Secundária**	**Secundária**
Fluido de injeção	Água	Água
Salinidade da água (g/L)	36,35	36,35
Condição da rocha	Soi	Soi
Temperatura de laboratório (°C)	25	25
Vazão (cm^3/h)	60	60
Volume de óleo inicial (Voi) (cm^3)	9,39	11,21
Volume de água inicial (Vwi) (cm^3)	2,16	1,5
Volume de óleo recuperado (cm^3)	5,28	6,69
Fator de recuperação do óleo (%OOIP)	**56,3**	**59,7**

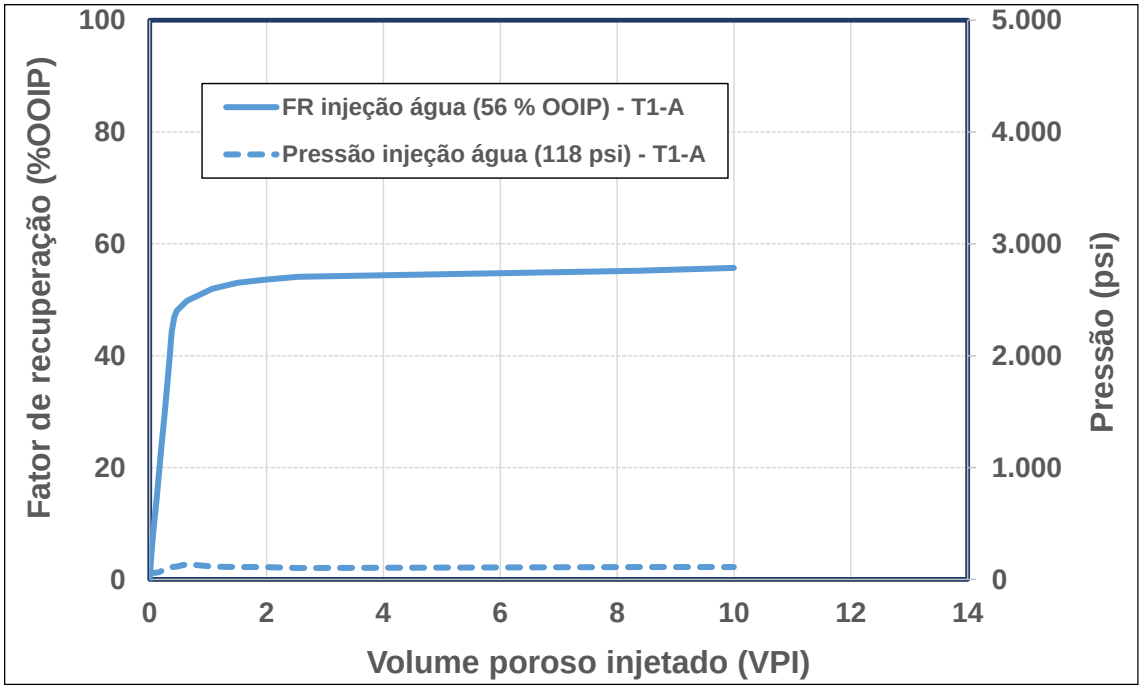


Figura 5.17: Curvas de recuperação e pressão geradas no teste de recuperação secundária (injeção de água) na amostra A (T1-A).

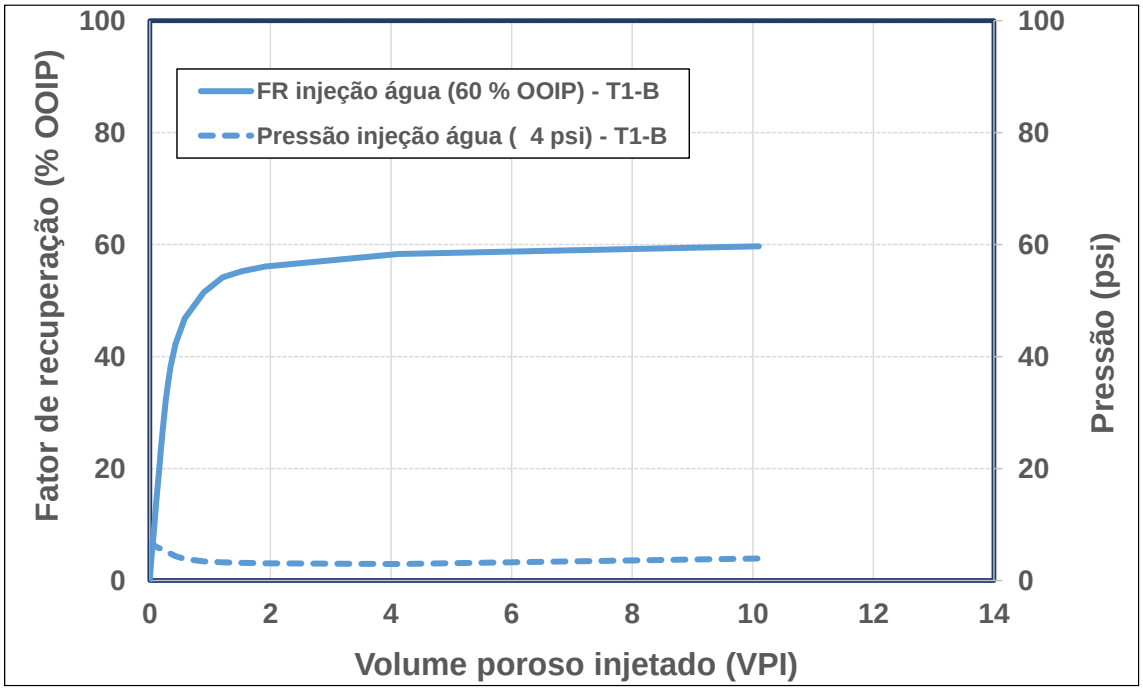


Figura 5.18: Curvas de recuperação e pressão geradas no teste de recuperação secundária (injeção de água) na amostra B (T1-B).

Pode-se observar na Tabela 5.8, que foi obtido na recuperação secundária (recuperação com água) fatores de recuperação de óleo de 56,3 %OOIP e 59,7 %OOIP, para as amostras A e B, respectivamente.

Hernandez (2018) realizou testes similares usando modelo físico composto de arenito da formação Botucatu, com permeabilidade absoluta à água de 435,32mD, e um óleo composto de uma mistura de petróleo com 28% de querosene com viscosidade em torno de 18,5 cP. Ele submeteu a amostra à recuperação secundária com injeção água, onde encontrou fator de recuperação (FR) de 49,95 % OOIP, valores estes razoavelmente próximos aos encontrados neste trabalho.

Testes T2-A e T2-B:

Após a recuperação secundária (com água) ter esgotado todo seu potencial de recuperação nas amostras A e B, ou seja, as amostras estarem na saturação de óleo residual (Sor), foi feita uma injeção de surfactina na mesma vazão da recuperação secundária. Neste teste as amostras tiveram

comportamentos distintos. A Tabela 5.9 apresenta os resultados dos testes T2-A e T2-B.

Tabela 5.9: Resultados dos testes de recuperação terciária para as amostras A e B

	Testes	
	T2-A	**T2-B**
Método de recuperação	**Terciária**	**Terciária**
Fluido de injeção	Surfactina	Surfactina
Condição da rocha	Sor	Sor
Temperatura de laboratório (°C)	25	25
Vazão (cm^3/h)	60	60
Volume de óleo inicial (Voi) (cm^3)	4,11	4,52
Volume de água inicial (Vwi) (cm^3)	7,44	8,19
Volume de óleo recuperado (cm^3)	2,85	0,45
Fator de recuperação do óleo (%OOIP)	**30,4**	**4,0**

Pode-se observar na Tabela 5.9 que a injeção da surfactina proporcionou uma recuperação adicional de óleo de 30,4 %OOIP e 4,0 %OOIP, resultando numa recuperação de óleo total (recuperação secundária + recuperação terciária) de 87 %OOIP e 64 %OOIP, para as amostras A e B, respectivamente.

Na amostra A, menos permeável (50 mD), a surfactina, que não foi filtrada, causou um aumento de pressão do fluxo nos locais em que passou inicialmente. Uma hipótese é que este aumento de pressão tenha redirecionado a surfactina para zonas ainda não varridas, causando a recuperação do óleo nestas zonas. Neste teste a surfactina causou um aumento da eficiência de varrido (EV) nestas zonas ainda preservadas ou com óleo inicial, atuando como se fosse uma recuperação com polímero (efeito tamponante) e paralelamente aumentou a eficiência de deslocamento (ED) aumentando a recuperação das zonas varridas. Na amostra B, que é mais permeável (500 mD), a surfactina, mesmo não sendo filtrada, não causou nenhum bloqueio do fluxo nos locais em que passou inicialmente. Neste teste a surfactina recuperou um óleo adicional nas zonas já lavadas pela água, ou seja, melhorando a eficiência de

deslocamento (ED) destas zonas, e aumentando a recuperação das zonas varridas atuando apenas como tensoativo. Normalmente os fluidos injetados nos reservatórios são filtrados para evitar problemas de redução da injetividade ou da capacidade de injeção do fluido principalmente em função: (1) da maior retenção do fluido no entorno dos poços onde existe uma alta vazão causada pela geometria radial e (2) dos longos tempos de injeção. Esta perda de injetividade causa um aumento de pressão que pode, em alguns casos atingir a pressão de fratura e causar dano ao reservatório. Porém, neste trabalho optou-se por não filtrar o BS por se tratar de uma pesquisa com um produto ainda em desenvolvimento.

As Figuras 5.19 e 5.20 apresentam o fator de recuperação (FR) e pressão geradas em relação ao volume de surfactina injetada nos testes T2-A T2-B.

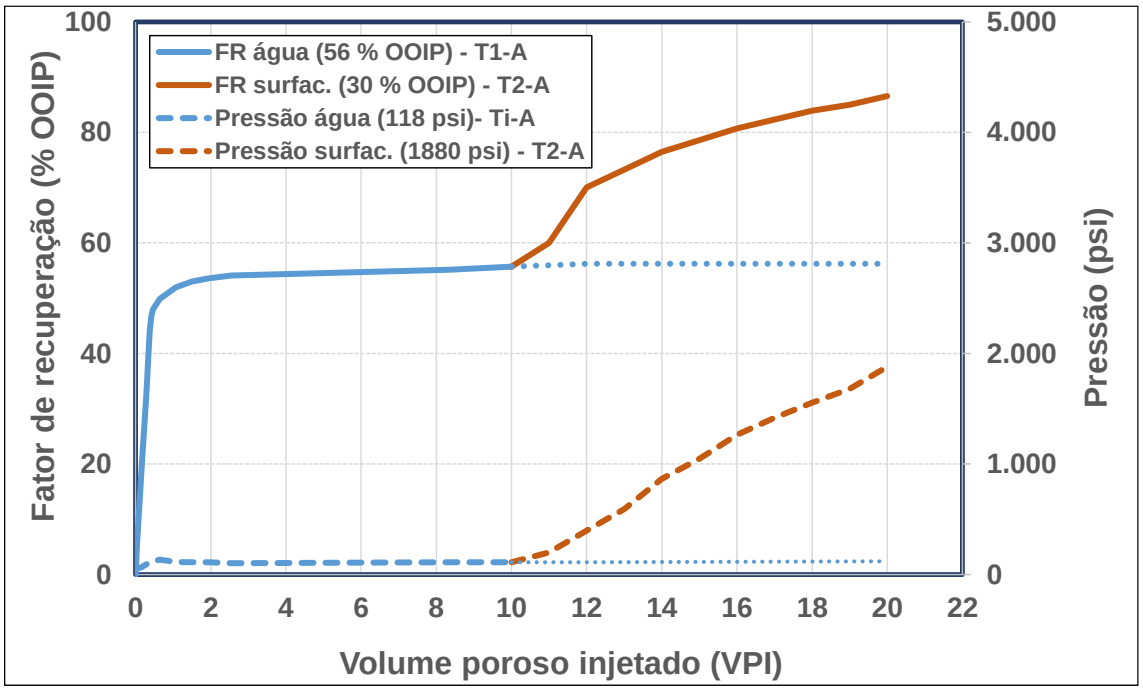


Figura 5.19: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (inj. de água) e terciária (inj. de surfactina) na amostra A (T1 e T2-A).

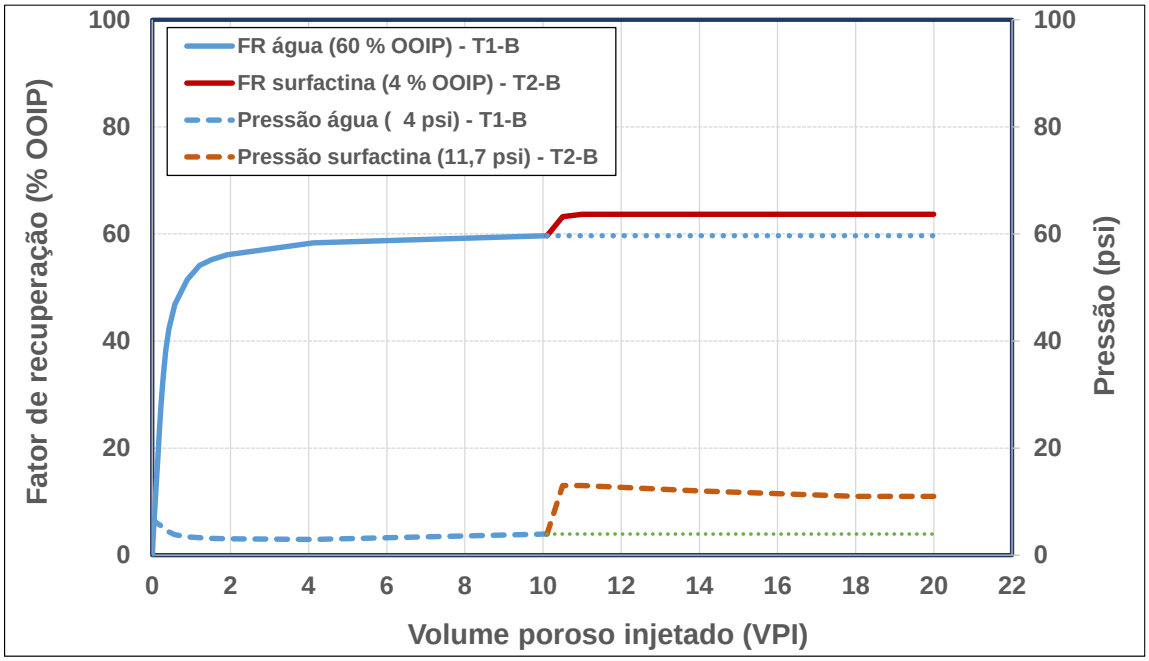


Figura 5.20: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (inj. de água) e terciária (inj. de surfactina) na amostra B (T1 e T2-B).

Hernandez (2018) realizou o teste de recuperação terciária, injetando uma mistura de polímero (2000 mg/L HPAM), com o objetivo de melhorar a eficiência de varrido e um tensoativo (5000 mg/L de SDS) para melhorar a eficiência de deslocamento numa amostra com permeabilidade absoluta à água de 435,32 mD. Neste teste, Hernandez (2018) encontrou um fator de recuperação (FR) de 8,5 %OOIP.

Suthar *et al* (2008), El-Sheshtawy et al (2015) e Astuti *et al* (2019), utilizaram biossurfactantes produzido por *Bacillus licheniformis* K125, *Bacillus licheniformis* e *Pseudoxanthomonas* sp. G3, respectivamente, para a recuperação terciária de um óleo leve em uma coluna preenchida com areia e obtiveram um FR de 20 %, 16,6 % e 43.1 ± 3.3 %, respectivamente.

Golabi *et al* (2012) realizaram o teste de recuperação terciária, injetando o biossurfactante em um modelo físico, com permeabilidade absoluta à água de 56 mD, para a recuperação de óleo pesado e encontraram um fator de recuperação (FR) de 15 %OOIP. Al-Bahry *et al* (2013) realizaram o teste de recuperação terciária, injetando o biossurfactante em uma rocha arenito, com permeabilidade absoluta à água de 300 mD, para a recuperação de óleo leve e encontraram um fator de recuperação (FR) de 9,7 %OOIP.

Isso mostra os excelentes resultados de FR encontrados neste trabalho, onde se injetou aproximadamente 360 mg/L do biossurfactante produzido pela linhagem de *Bacillus subtilis* em meio não convencional e de baixo custo.

Testes T3-A e T3-B:

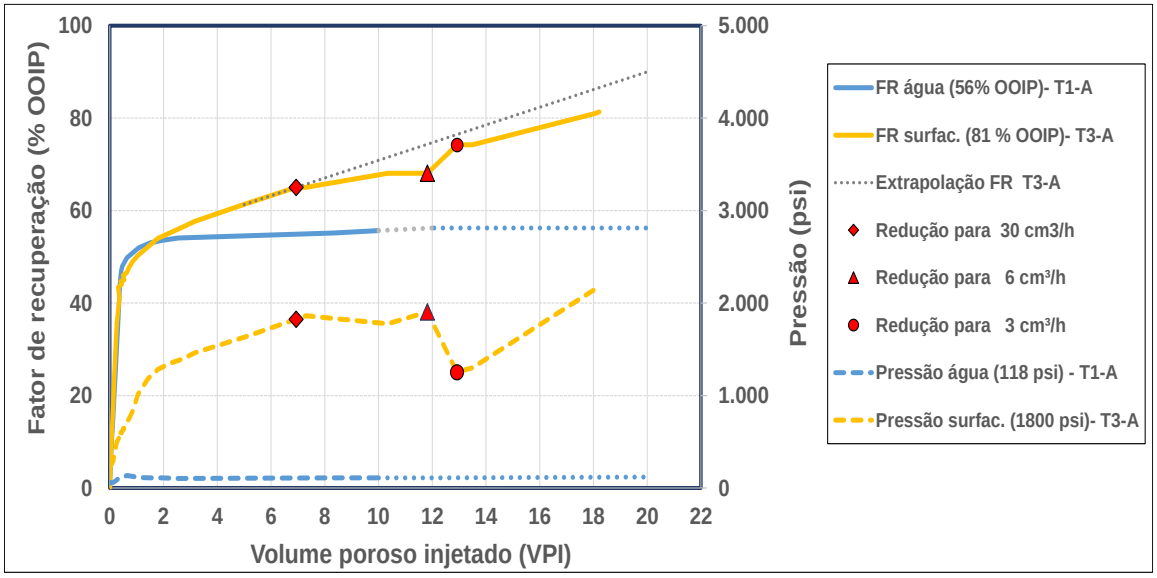
Após os testes de recuperação secundária (injeção de água no Soi) seguida da recuperação terciária (injeção de surfactina no Sor) as amostras foram limpas e restauradas às condições de reservatório. Nos testes T3-A e T3-B as amostras não foram submetidas à injeção de água. Foram realizadas injeções de surfactina diretamente na condição inicial das amostras de Soi simulando a recuperação secundária com surfactina. A Tabela 5.10 apresenta os resultados dos testes T3-A e T3-B.

Tabela 5.10: Resultados dos testes de recuperação secundária para as amostras A e B

	Testes	
	T3-A	**T3-B**
Método de recuperação	**Secundária**	**Secundária**
Fluido de injeção	Surfactina	Surfactina
Condição da rocha	Soi	Soi
Temperatura de laboratório (°C)	25	25
Vazão (cm^3/h)	60	60
Volume de óleo inicial (Voi) (cm^3)	8,15	8,84
Volume de água inicial (Vwi) (cm^3)	2,71	3,49
Volume de óleo recuperado (cm^3)	6,63	7,10
Fator de recuperação do óleo (%OOIP)	**81,4**	**80,3**

Como pode ser observado na Tabela 5.10, foram alcaçados Fatores de recuperação de 81,4 % OOIP e 80,3 % OOIP, para as amostras A e B, respectivamente. No teste T3-A, a surfactina apresentou um comportamento

semelhante àquela do teste T2-A quando ela causa um efeito divergente, ou seja, aumenta a pressão das regiões varridas e direciona o fluxo para as regiões não varridas. Na prática este aumento de pressão causou um problema operacional, pois a pressão alcançou a pressão limite do medidor de pressão, que era de 2000 psi, muito rápido. Para não interromper e dar continuidade ao teste, a vazão que era de 60 cm^3/h foi reduzida inicialmente para 30 cm^3/h e depois para 6 e 3 cm^3/h. No teste T3-B, a surfactina apresentou um comportamento semelhante àquela do teste T2-B (após a injeção de água) quando não aumentou a pressão nas áreas varridas. Os testes T3-A e T3-B tiveram valores de FR expressivamente alto para um teste de recuperação avançada de petróleo em laboratório. As Figuras 5.21 e 5.22 apresentam o fator de recuperação (FR) e pressão geradas em relação ao volume de água injetado



nos testes T3-A T3-B.

Figura 5.21: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), e secundária (surfactina) na amostra A (T1 e T3-A).

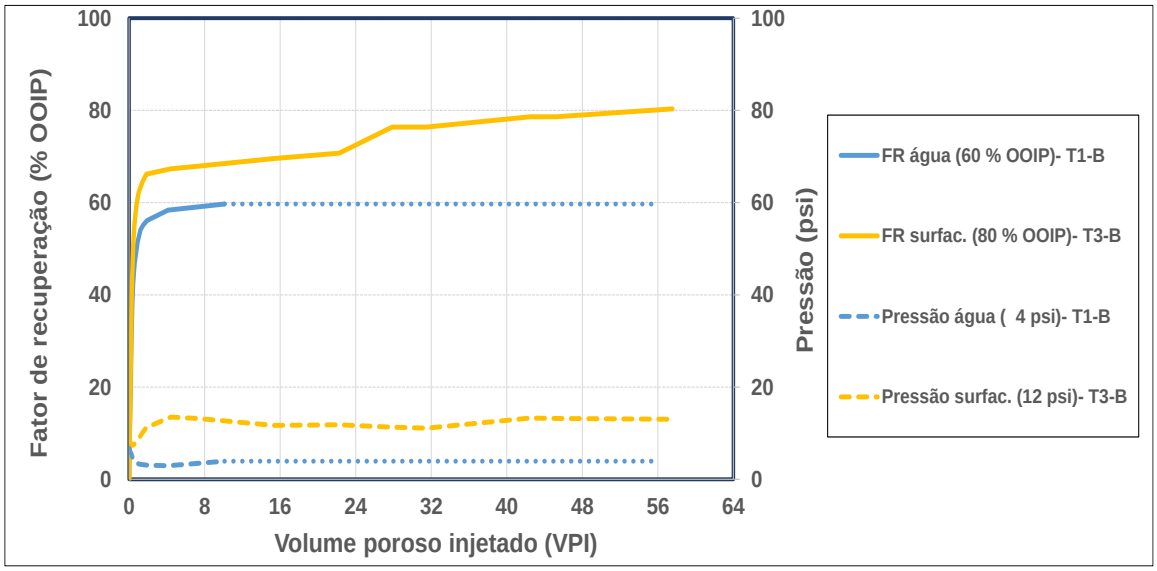


Figura 5.22: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), e secundária (surfactina) na amostra B (T1 e T3-B).

Hernandez (2018) realizou um teste de recuperação secundária com uma mistura polímero (2000 mg/L HPAM) e tensoativo (0,5% em peso de SDS) diretamente na condição inicial da amostra de Soi, usando modelo físico composto de arenito da formação Botucatu, com permeabilidade absoluta à água de 534,52mD. Neste teste, Hernandez (2018) encontrou um fator de recuperação (FR) de 75 % OOIP que é um valor abaixo dos encontrados neste trabalho onde foi injetado apenas o biossurfactante, mostrando a excelente capacidade deste na eficiência de deslocamento.

As Figuras 5.23 e 5.24 apresentam um resumo geral dos testes em cada uma das amostras. Nas duas amostras, tanto na modalidade de recuperação terciária (após a injeção de água), quanto na modalidade de recuperação secundária (injeção no Soi), as recuperações com a surfactina foram maiores que aquelas correspondentes à injeção de água.

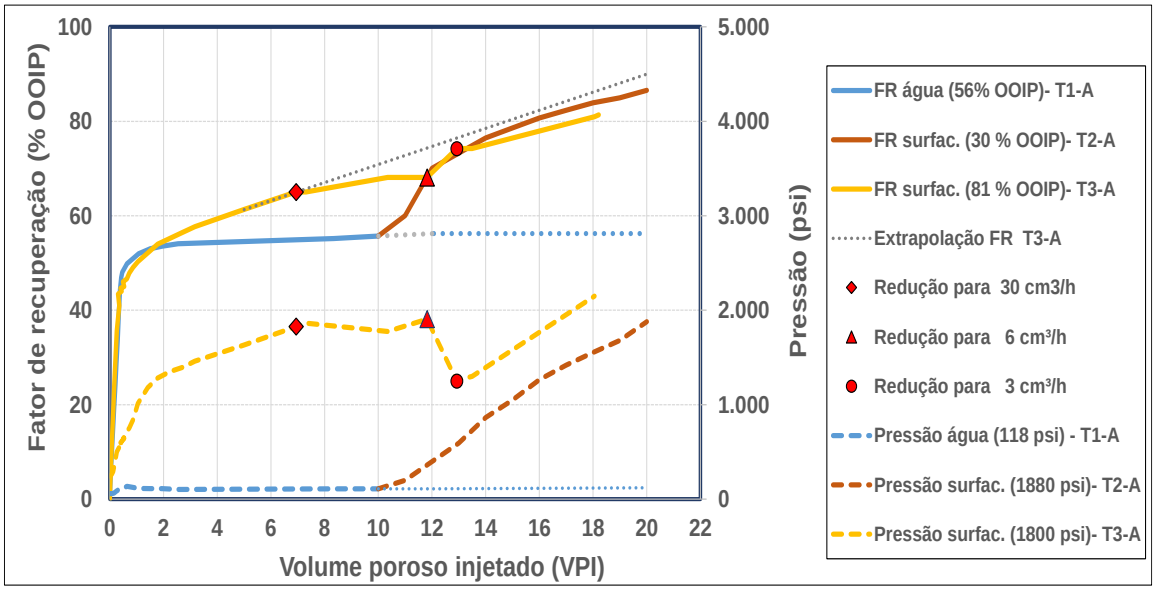


Figura 5.23: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), terciária (surfactina) e secundária (surfactina) na amostra A (T1, T2 e T3-A).

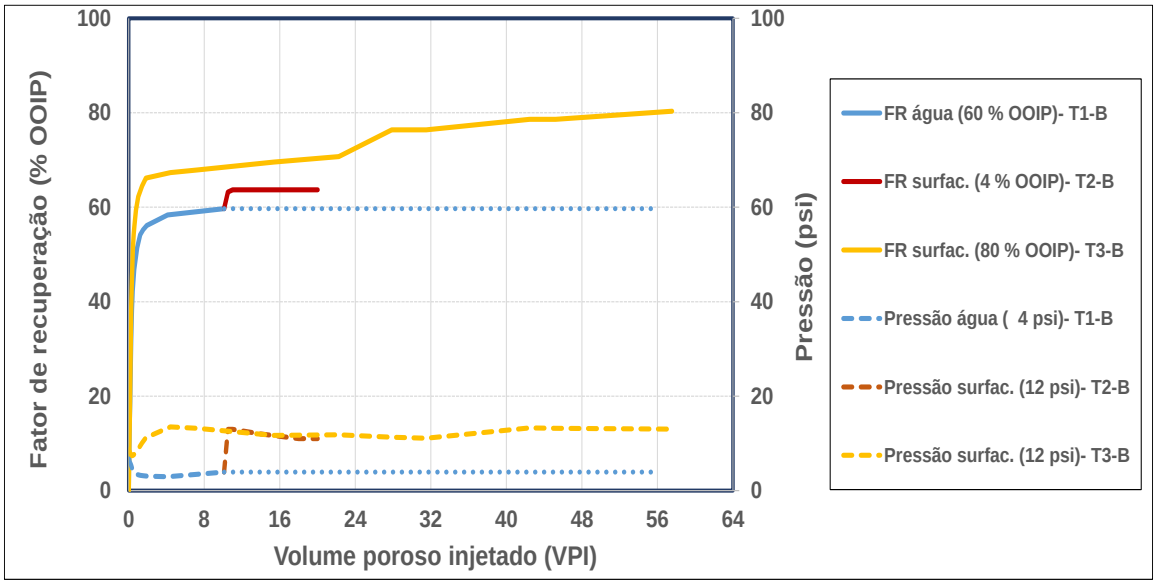


Figura 5.24: Curvas de recuperação e pressão geradas nos testes de recuperação secundária (água), terciária (surfactina) e secundária (surfactina) na amostra B (T1, T2 e T3-B).

Conclusões

- Os planejamentos Plackett-Burman realizados permitiram reduzir significativamente os nutrientes convencionalmente adicionados ao meio de produção de surfactina, possibilitando redução dos custos do processo;

- Nas diferentes condições nutricionais testadas, os biossurfactantes produzidos e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), apresentaram composição química semelhante entre si, independentemente das quantidades adicionadas ao meio;

- A partir da otimização das condições nutricionais em ensaios de bancada (frascos agitados) pode-se indicar um meio de composição em g/L de: açúcar VHP (35), NH_4NO_3 (3), e Na_2HPO_4 (3);

- A partir da cinética de produção na condição nutricional otimizada, foi possível observar o máximo de produção de surfactina de 364,3 mg/L em 10 horas de fermentação, permitindo a redução do tempo de fermentação;

- Os testes de fluxo realizados em amostras de 50 mD e 500 mD de permeabilidade apresentaram fatores de recuperação de aproximadamente 87 e 64 % OOIP respectivamente, ou seja, demonstrou ser o biossurfactante produzido eficaz na recuperação avançada de petróleo.

Perspectivas Futuras

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, alguns pontos tornam-se importantes para trabalhos futuros:

- Avaliar a produção de surfactina a partir de resíduos industriais como fonte de carbono;
- Avaliar as condições ideais de operação, tais como aeração e agitação em biorreator;
- Determinar a estrutura dos homólogos e isoformas da surfactina produzida utilizando espectrometria de massas (CG-massas);
- Realizar os testes de recuperação de óleo em valores de pH, salinidade e temperatura, encontrados na maioria dos reservatórios de petróleo.

Referências Bibliográficas

ABBASI, H. L.; HAMEDI, M. M; LOTFABAD, T. B; ZAHIRI, H. S; SHARAFI, H. MASOOMI, F.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A; ORTIZ, A.; AMANLOU, M.; NOGHABI, K. A. Biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: Physicochemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 113, n. 2, p. 211–219, 2013.

ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAFA, M.M.; HASSOUNA, N.A.H. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 150, p. 305–325, 2008.

ABUSHADY, H.M.; BASHANDY, A.S.; AZIZ, N.H.; IBRAHIM, H.M.M. Molecular characterization of *Bacillus subtilis* surfactin producing strain and de factors affecting its production. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.7, n.3, p. 337-344, 2005.

ADAMSON A.W.; GAST, A.P. Physical chemistry of surfaces. 6ª ed., New York: John Wiley and Sons Inc, 1990.

ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. Adsorption of gases and vapors on solids, in: Physical chemistry of surface, John Wiley & Sons, New York, 1997.

AGARRY, S. E.; SALAM, K. K.; ARINKOOLA, A.; AREMU, M. O. Biosurfactant production by indigeneous *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from auto-mechanic soil environment towards microbial enhanced oil recovery. **European Journal of Engineering and Technology**. v. 3, n. 6, p. 27-39, 2015.

AL-AJLANI, M. M.; SHEIKH, M. A., AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. **Microbial Cell Factories**. v. 6, n. 17, p. 1475-2859, 2007.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; AL-MAKHMARI, H. S.; AL-SULAIMANI, H. S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 1-6, 2013.

ALLIED MARKET RESEARCH. Surfactants Market by Type (Cationic, Anionic, Nonionic, Amphoteric, and Others) and Application (Household Detergent, Personal Care, Industrial & Institutional Cleaner, Oilfield Chemical, Agricultural Chemical, Food Processing, Paint & Coating, Adhesive, Plastic, Textile, and Others) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2018-2025 Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/surfactant-market>. Acesso em: 7/08/2019.

AL-SULAIMANI, H. S.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A. S.; JOSHI, S. J.; ZARGARI, S. Experimental Investigation of

Biosurfactants Produced by *Bacillus* Species and their Potential for MEOR in Omani Oil Field. **Society of Petroleum Engineers**. p, 1-9, 2010.

ALVES, A. A. S. Surfactantes à base de Açúcares: síntese, caracterização e desenvolvimento de novas biomoléculas para aplicação industrial. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", 2019.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 114, p. 324-333, 2014.

AMANI, H.; MEHRNIA, M. R.; Sarrafzadeh, M. H.; Haghighi, M.; SOUDI, M. R. Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 162, p. 510–523, 2010.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. **API RP 27**. Recommended practice for determining permeability of porus media. First edition, 1952.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE. **API RP 40.** Recommended practices for core analysis. Second edition, 1998.

AMODU, O. S.; NTWAMPE, S. K. O.; OJUMU, T. V. Bioavailability of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons using renewable resources, in: M. Petre (Ed.) **Environmental Biotechnology** - New Approaches and Prospective Applications, InTech,2013.

AMODU, O. S, NTWAMPE, S. K. O.; OJUMU, T. V. Optimization of Biosurfactant Production by *Bacillus licheniformis* STK 01 Grown Exclusively on Beta vulgaris Waste using Response Surface Methodology. **BioResources.** v. 9, n. 3, p, 5045-5065, 2014.

ANDRADE, C. J. Bioprodução de biossurfactantes, enzimas e aromas, associada à utilização de resíduos agroindustriais. **Revista Citino**. v. 3, n. 1, 2013.

ANDERSON, W.G. Effects of Wettability on Waterflooding. **Journal of Petroleum Technology**. p. 1605–1622, 1987.

ANDRADE, C. J.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, L. M.; MENDES, A. M.; JAUREGI, P.; PASTORE, G. M. Comparative study: bench-scale surfactin production from *Bacillus subtilis* using analytical grade and concentrated glycerol from the biodiesel industry. **International Journal of Scientific World**. v. 5, n. 1, p. 28-37, 2017.

ANJUM, F., GAUTAM, G., EDGARD, G., NEGI, S. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource Technology.** v. 213, p. 262-269, 2016.

ARANDA, FJ.; TERUEL, JA.; ORTIZ A. Futher aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptídeo iturin A. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**. v. 1713, n.1, p. 51-56, 2005.

ARAÚJO, L. V.; ABREU, F.; LINS, U.; ANNA, L. M. M. S. NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and a surfactin inhibit Listeria monocytogenes adhesion. **Food Resource International**. v. 44, p. 481-488, 2011.

ARAÚJO, M. F. F.; NUNES, M. C. M.; PANOSSO, R. F. Metabolismo da Vida Microscópica. Editora da UFRN, 2ª Edição, 2012.

ARAÚJO H. W. C; ANDRADE R. F. S; MONTERO-RODRÍGUEZ D.; RUBIO-RIBEAUX D.; SILVA, C. A. A.; CAMPOS-TAKAKI GM. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**. v. 18, n. 2, p. 1-13, 2019.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 31, p. 488–494, 1968.

ARSLAN, A.; TOPKAYA, E.; BINGOL, D.; VELI, S. Removal of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate from aqueous solutions by O3/UV/H2O2 advanced oxidation process: Process optimization with response surface methodology approach. **Sustainable Environment Research**. v. 28 p. 65-71, 2018.

ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I, A.; PUTRI, F. Z. Potential of Biosurfactant as an Alternative Biocide to Control Biofilm Associated Biocorrosion. **Journal of Environmental Science and Technology**. v. 11, n. 2, p. 104-111, 2018.

ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I. A.; PUTRI, R. E.; AMANIYAH, M.; SUGAI, Y. Screening and characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. G3 and its applicability for enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**. v. 9, p. 2279–2289, 2019.

ATHUKORALA, S.N. P.; FERNANDO, W. G. D.; RASHID, K. Y. Identification of antifungal antibiotics of B*acillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and maldi-tof mass spectrometry. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 55, n. 9, p. 1021-1032, 2009.

BABAJANZADEH B, SHERIZADEH S, RANJI H. Detergents and surfactants: a brief review. **Open Access Journal of Science**. v. 3, n.3, p. 94–99, 2019.

BALA, G.A.; BRUHN, D.F.; FOX, S.L.; NOAH, K.S.; THOMPSON, D.N. Microbiological production of surfactant from agricultural residuals for IOR application. SPE/DOE Thirteenth Symposium on Improved Oil Recovery. 2002.

BANAT, I. M; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.87, n.2, p.427-444, 2010.

BARAKAT, M.A. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. **Arabian Journal of Chemistry**. v.4, p. 361-377, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria. Editora da Unicamp, Campinas/SP. p. 401, 2001.

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

BARROS, F.F.C.; PONEZI, A.; PASTORE, G. 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, 2008.

BATISTA, R. M.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SOUZA, J. E. G.; SARUBBO, L. A. Effect of Medium Components on the Production of a Biosurfactant from Candida tropicalis Applied to the Removal of Hydrophobic Contaminants in Soil. **Water Environment Research**. V. 82, n. 5, p. 418-425, 2010.

BAUMGART, F.; KLUGE, B.; ULLRICH, C.; VATER, J.; ZIESSOW, D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v. 177, p. 998-1005, 1991.

BEHERA, S. K.; MULABA, BAFUBIANDI, A. F. Microbes assisted mineral flotation a future prospective for mineral processing industries: A Review. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**, p, 1- 42, 2016.

BELHAJ, A. F., ELRAIES, K. A., MAHMOOD, S. M., ZULKIFLI, N. N., AKBARI, S., HUSSIEN, O. S. E. The effect of surfactant concentration, salinity, temperature, and pH onsurfactant adsorption for chemical enhanced oil recovery: a review. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, 2019.

BENTO, H. L. I. Recuperação avançada de óleo viscoso por injeção de polímero em diferentes temperaturas. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2015.

BENVEGNU, T.; PLUSQUELLEC, D.; LEMIÈGRE, L. Surfactants from renewable sources: Synthesis and applications. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable** Resources. p.153-178, 2008.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry, 5th ed.; W. H. Freeman: New York, 2002.

BERTRAND, B.; MARTÍNEZ-MORALES, F.; ROSAS-GALVÁN, N. S.; MORALES-GUZMÁN, D.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Statistical Design, a Powerful Tool for Optimizing Biosurfactant Production: A Review. **Colloids and Interfaces**. v. 2, n. 36, p. 1-18, 2018.

BEZERRA, M. S. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosas* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte, 2012.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces.** v. 152, p. 41-52, 1999.

BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity Among Microbial Cyclic Lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to Design New Bioactive Agents. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**. v. 6, p. 541-556, 2003.

BORDOLOI, N. K.; KONWAR, B. K. Microbial surfactant-enhanced mineral oil recoveryunder laboratory conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 63 p. 73–82, 2008.

BORGES, W. S.; MOURA, A. A. O.; FILHO, U. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the operating conditions for rhamnolipid production using slaughterhouse-generated industrial float as substrate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.32, n. 2, p. 357-365, 2015.

BOVIATSI, E.; PAPADAKI, A.; EFTHYMIOU, M.-N.; NYCHAS, G.-J. E.; PAPANIKOLAOU, S.; DA SILVA, J. A. C.; KOUTINAS, A. Valorisation of sugarcane molasses for the production of microbial lipids via fermentation of two Rhodosporidium strains for enzymatic synthesis of polyol esters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. p. 1-6, 2019.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new Three level Design for the Study of quantitative Variable. Tecnometrics, v. 1, p. 445-476, 1960.

BRUNS, R.E, BARROS NETO, B., SCARMÍNIO, I.S. Planejamento e Otimização de experimentos. Editora UNICAMP, 1995.

BRYCKI, B. E.; KOWALCZYK, I. H.; SZULC, A.; KACZEREWSKA, O.; PAKIET, M. Multifunctional Gemini Surfactants: Structure, Synthesis, Properties and Applications. **Intech Open**. Chapter 4. p, 97-155, 2017.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, L.; GONZALEZ LOPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes: future prospects. **Science of theTotalEnvironment**. v. 407, p. 3634–3640, 2009.

CAO, X. H.; LIAO, Z. Y.; WANG, C. L.; YANG, W. Y LU, M. F. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from bacillus natto TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.40, p. 373-379, 2009.

CARBALLIDO-LÓPEZ, R.; FORMSTONE, A. Shape determination in *Bacillus subtilis*. **Current Opinion in Microbiology**.v.10, p. 611–616. 2007.

CARVALHO, A.L.U.; OLIVEIRA, F.H.P.; MARIANO, R.L.R.; GOUVEIA, E.R. SOUTO-MAIOR, A.N. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v.53, n.3, p. 643-652, 2010.

CASTIGLIONI, L.G; BERTOLIN, T.E; COSTA, J.A. Produção de biossurfactantes por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v.32, n.2, p.292-295, 2009.

CASTRO, M. J. L.; OJEDA, C.; CIRELLI, A. F. Surfactants in Agriculture. Chapter 7, p. 287-334, 2013.

CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, Química Verde no Brasil 2010- 2030. p. 1-431, 2010.

CHEN, C. Y.; BAKER, S. C.; DARTON, R. C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 81, p. 1923-1931, 2006.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field estudies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, p. 915-929, 2002.

CHOU, T.H. Current application of lipid and surfactant-based vesicles for cosmeceuticals: a review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.16, p.1035-1044, 2015.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. Genus *Bacillus* Cohn 1872. **In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**.v 2, p. 1104 –1331, 1984.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. Experimental designs. 2th ed. Singapure: John Wiley & Sons, 1957.

COLLA, L.M.; COSTA, J. A.V. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. **Revista Vetor**. v.13, p.85-103, 2013.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface compounds from microorganisms. **Advances inApplied Microbiology**. v. 26, p. 229-256, 1980.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 42, n.3, p. 408- 412. 1981.

COSGROVE, T. Colloid Science Principles, methods and applications. Second edition. Chapter 4, Wiley, 2010.

CRUZ, J. M., HUGHES, C., QUILTY, B., MONTAGNOLLI, R. N., BIDOIA, E. D. Agricultural feedstock supplemented with manganese for biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Waste Biomass Valorization**. v. 9, n. 4, p. 613-618, 2017.

DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações. Editora Edgard Blücher Ltda., 2012.

DARVISH, P.; AYATOLLAHI, S.; MOWLA, D.; NIAZI, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by anefficient microbial consortium, ERCPPI-2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 84, p. 292–300, 2011.

DAVEY, M.E.; CAIAZZA, N.C.; O'TOOLE, G.O. Ramnolipid surfactant production affects biofilm architecture. **Journal of Bacteriology**, v.185, p.1027-1036, 2003.

DAVIS, M. A.; WRAGE, K. J.; REICH, P. B.; TJOELKER, M. G.; SCHAEER, T.; MUERMANN, C. Survival, growth, and photosynthesis of tree seedlings competing with herbaceous vegetation along a water-light-nitrogen gradient. **Plant Ecology**. v. 145, p. 341-350, 1999.

Da ROSA, K. R. S. A.; BEZERRA, M. C. M.; PONZIO, E. A.; ROCHA, A. A. Recuperação avançada de petróleo: potencialidades da injeção WAG (Water Alternating Gas). Revista Virtual de Química. v. 8, n. 3, p. 723-738, 2016.

Da SILVA, A. C. S.; Dos SANTOS, P. N.; SILVA, T. A. L.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Agriculture Microbiology**. v. 85, p. 1-12, 2018.

DE, S.; MALIK, S.; GHOSH, A.; SAHA, R; SAHA, B. A review on natural surfactants. **The Royal Society of Chemistry.** v. 5, p. 65757–65767, 2015.

De ALMEIDA, D. G.; DA SILVA, R.C. F. S; LUNA. J. M.; RUFINO. R. D.; SANTOS. V. A.; BANAT. I. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1-14, 2016.

DELEU, M.; RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; JACQUES, P.; THONARTD, P.; PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from B*acillus subtilis.* **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 152, n. 1-2, p. 3-10, 1999.

DELSHAD, M.; HAN, W.; POPE, G.A.; WU, W.; YANG R.; ZHAO, L. Alkaline/Surfactant/Polymer Flood Predictions for the Karamay Oil Field. SPE/DOE Improved Oil Recovery Symposium, 1998.

DERESZEWSKA, A.; CYTAWA, S.; TOMCZAK-WANDZEL, R.; MEDRZYCKA, K. The Effect of Anionic Surfactant Concentration on Activated Sludge Condition and Phosphate Release in Biological Treatment Plant. **Polish Journal of Environmental Studies.** v. 24, n. 1, p. 83-91, 2015.

DESAI, J. D. AND BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. v. 61, 47-64, 1997.

EBNESAJJAD, S.; LANDROCK, A. H. Adhesives Technology Handbook. Third Edition. Elsevier, 2009.

ELSHAFIE A. E., JOSHI S. J., AL-WAHAIBI Y. M., AL-BEMANI A. S., AL-BAHRY S. N., AL-MAQBALI D., BANAT, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Fronties in Microbiology***.v.6, n. 1324, p*. 1-11, 2015.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**. v. 24, n. 2, p. 155-162, 2015.

FALK, N. A. Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity. **Journal of Surfactants and Detergents**. p. 1-9, 2019.

FARIÑA, J. I.; SIÑERIZ, F.; MOLINA, O. E.; PEROTTI, N. I. High scleroglucan production by Sclerotium rolfsii: Influence of medium composition. Biotechnology Letters, Dordrecht, v. 20, n. 9, p. 825-831, 1998.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**. v. 39, n. 3, p. 228-236, 2017.

FELIX, A. K. N; MARTINS, J. J. L.; ALMEIDA, J. G. L.; GIRO, M. E. A.; CAVALCANTE, K. F.; MELO, V. M. M.; PESSOA, O. D. L.; ROCHA, M .V. P.; GONÇALVES, L. R. B.; AGUIAR, R. A. S. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. v. 175, p. 256-263, 2019.

FERNANDES, P.L.; RODRIGUES, E.M.; PAIVA, F.R.; AYUPE, B.A.L.; MCINERNEY, M.J.; TÓTOLA, M.R. Biosurfactant, solventes and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. **Fuel**. v. 180, p. 551-557, 2016.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas.**v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

FILHO, O. B.; PRADA, P. R.; MENEGHESSO C.; LANÇAS, F. M. Desvandando as medições nos ensaios químicos: 1. A curva analítica ou de calibração. **Scientia Chromatographica**. v. 3, n. 3, p. 251-261, 2011.

FINETEX G. Sugar. Diponível em: http://www.finetexgroup.com/sugar.html. Acesso em 14/05/19.

FONSENCA, R. R; SILVA, A. J. R; FRANÇA, F. P; CARDOSO, V. L; SERVOLO, E. F. L. Optimizing Carbon/Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus subtilis* Strain. **Humana Press Inc.**, v.136-140, p. 471–486, 2007.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactantes por levedura. **Química Nova**. v. 31, n. 8, p. 2091-2098, 2008.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**. v. 75, p. 235–240, 2000.

FRANCY, D. S.; THOMAS; J. S.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbons by biosurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 8, n. 4, p. 237-245, 1991.

FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 1646, p. 1-9, 2016.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**. v. 94, p.1245– 1248, 2004.

FU, J.-F.; LI, B.-Q.; WANG, Z.-H. Estimation of Fluid-Fluid Interfacial Tensions of Multi-Component Mixtures. **Chemical Engineering Science**. v. 41, n. 10, p. 2673, 1986.

FU, D.; LU, J. F.; BAO, T. Z.; LI, Y. G. Investigation of Surface Tension and Interfacial Tension in Surfactant Solutions by SAFT. **Journal of Industry and Engineering Chemistry**. p. 320-327, 2000.

GARCÍA-BECERRA, F. Y.; ACOSTA, E. J.; ALLEN, D. G. Alkaline extractionof wastewater activated sludge biosolids. **Bioresource Technology.** v. 101, n. 18, p. 6983–6991, 2010.

GARCÍA-REYES, S.; YAÑEZ-OCAMPO, G. Microbial biosurfactants: methods for their isolation and characterization. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**.v. 6, n. 1, p. 641-648, 2016.

GAUTAM, G.; MISHRA, V.; VERMA, P.; PANDEY, A.K.; NEGI, S. A cost effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v.4, n.6, p.1-7, 2014.

GECOL, H. Chemistry and Technology of Surfactants. Blackwell Publishing Ltd. Chapter 2. p, 24-43, 2006.

GHAFOOR, A; HASMAIN, S. Production dynamics of *Bacillus subtilis* strain AG-1 and EAG-2, producing moderately alkaline proteases. **African Journal microbiology**. v. 3, n. 5, p. 258-263, 2009.

GHARAEI-FATHABAD, E. Biosurfactants in pharmaceutical industry a mini-review. **American Journal of Drug Discovery and Development**. p. 1-11, 2011.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptídeo biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. **Biotechnology Research International**. v. 2011, p. 653-654, 2011.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 324, p. 172–176, 2008.

GOLABI, E.; SOGH, S. R. M. P.; HOSSEINI, S. N.; GHOLAMZADEH, M. A. Biosurfactant Production by Microorganism for Enhanced Oil Recovery. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 3, n. 7, p. 1-6, 2012.

GOTTSCHALK, G. Bacterial metabolism. Springer, Berlin Heidelberg, New York, p. 179–180, 1979.

GREEN, D. W.; WILLHITE, G. P. "Enhanced Oil Recovery." 2nd Ed. Society of Petroleum Engineering, 2018.

GRIFFIN, W.C. Classification of surface-active agents by HLB. **Journal of Society of Cosmetic Chemists**. v. 1, p. 311–326, 1949.

GRIGORYEV, B.A.; NEMZER, B. V; KURUMOV, D. S.; SENGERS J. V. Surface tension of normal pentane, hexane, heptane, and octane. **International Journal of Thermophysics**. v. 13, n. 3, p. 453-464,1992.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. Technometrics, v. 11, n. 1, 1969.

GU, X.B.; ZHENG, Z. M.; YU, H. Q.; WANG, J.; LIANG, F. L.; LIU, R. L. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3196–3201, 2005.

GUDIÑA, E.J.; FERNANDES, E.C.; RODRIGUES, A.I.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, p. 1-7, 2015.

HAAS, D; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonas*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, p. 307-319, 2005.

HAIGH, S.D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. **Science of The Total Environment**. v.185, p.161-170, 1996.

HERYANI, H.; PUTRA, M. D. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using Bacillus sp. **Eletronic Journal of Biotechnology**. v. 27, p. 49-54, 2017.

HERNÁNDEZ, F. A. T. Surfactant-polymer flooding in sandstones evaluated by computed tomography. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, 2018.

HEWITT, P. G. Física Conceitual, 9ª edição. Editora Bookman, 2002.

HIRSCH, M. https://knowledge.ulprospector.com/3106/pc-surface-active-agents-surfactants/, 2015. Acesso em 17/06/2019.

HOFVENDAHL, K.; HAHN–HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, p. 87–107, 2000.

IKEHATA, K.; EL-DIN, M. G. Degradation of recalcitrante surfactants in watewater by ozonation and advanced oxidation processes: a review. **Journal of the International Ozone Association**. p, 327-343, 2010.

JACKISCH-MATSUURA, A. B.; SANTOS, L.S.; EBERLIN, M. N.; FARIA, A. F.; GROSSMAN, M. J.; DURRANT, L. R. Production and characterization of surface-active compounds from Gordonia amicalis. **Brazilian Archives Biology Technology**. v. 57, p. 138-144, 2014.

JACQUES, P.; HBID, C.; DESTAIN, J.; RAZAFINDRALAMBO, H.; PAQUOT, M.; PAUW, E.; THONART, P. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**.v. 77-79, p. 223-233, 1999.

JACQUES, P. Biosurfactants from genes to applications. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. Microbiology Monographs. Ed. Springer, 2011.

JASPER, J. J. The Surface Tension of Pure Liquid Compounds. **Journal of chemical Physics***. v. 1, n.* 4, p. 841, 1972.

JHA, S. S.; JOSHI, S. J.; GEETHA, S. J. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. **Brazilian Journal of microbiology**. v. 47, p. 955-964, 2016.

JOSHI, S; BHARUCHA, C; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 4603-4608, 2008.

JOSHI, S; DESAI, A. J. Bench-Scale Production of Biosurfactants and their Potential in Ex-Situ MEOR Application. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal.** v. 22, p. 701–715, 2013.

JOY, S., RAHMAN, P. K. S. M., SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**. v. 317, p. 232-241, 2017.

KAKINUMA, A., HORI, M., ISONO, M., TAMURA, G., ARIMA, K. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, p. 971–997, 1969.

KANNAHI, M.; SHERLEY, M. Biosurfactant production by *Pseudomonas putida* and *Aspergillus níger* from oil contaminated site. **International Journal Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n.4, p.37-43, 2012.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current Science**. v. 77, n. 1, p. 116-126, 1999.

KARSA, D. R. Coming clean: the world market for surfactants. **Chemistry & Industry**. v. 9, p. 685-691, 1998.

KARSA, D. R.; PORTER, M.R. Biodegradability of Surfactants. Springer, 2012.

KHALEDIALIDUSTI, R.; KLEPPE, J.; ENAYATPOUR, S. Evaluation of surfactant flooding using interwell tracer analysis. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**. v.7, p. 853-872, 2017.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biossurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. Desalination. v. 285, p. 198-204, 2012.

KIM, S.W., HWANG, H.J., XU, C.P., NA, Y.S., SONG, S.K., YUN, J.W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exo-polysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 34, p. 389–393, 2002.

KIM, J. K.; PARK, K. J.; CHO, K. S.; NAM, S. W.; PARK, T. J.; BAJPAI, R. Aerobic nitrification–denitrification by heterotrophic Bacillus strains. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1897–1906, 2005.

KIM, P.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. Y. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of Colletotrichum gloeosporioides. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KNOBLICH, A.; MATSUMOTO, M.; ISHIGURO, R.; MURATA, K.; FUJIYOSHI, Y.; ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M. Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**. v. 5, n. 1-2, p. 43-48, 1995.

KOREA, K. T.; SULEIMAN, K.; MOHAMMED, A. Y.; ELOBEID, O. A. Investigation into the filterability of raw sugars from different geographical regions of the world. **Gezira Journal of Engineering and Applied Sciences**. v. 7, n.2, 2012.

KORSTEN, L.; COOK, N. Optimizing Culturing Conditions for *Bacillus subtilis*, **SouthAfrican Avocado Growers' Association Yearbook**. v.19, p. 54-58, 1996.

KULKARNI, V. S.; SHAW, C. Surfactants, Lipids, and Surface Chemistry. Chapter 2. **Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages**, p. 5–19, 2016.

LAKE, L. W.; SCHMIDT, R. L.; VENUTO, P. B. A niche for enhancedoil recovery in the 1990s.**Oilfield Review**.p. 55-61, 1992.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 7, n. 1–2, p. 12-20, 2002.

LESUISSE, E; SCHANCK, K; COLSON; C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **European Journal of Biochemistry**. v. 216, p. 155-160, 1993.

LICHTENBERG, D.; ROBSON, R.J.; DENNIS, E.A. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. **Biochimica and Biophysica Acta**.v.737, n.2, p.285-304, 1983.

LIDUINO, V. S.; SERVULO, E. F. C.; OLIVEIRA, F. J. S. Biosurfactant-assisted phytoremediation of multicontaminated industrial soil using sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Journal of Environmental Science and Health**. p. 1-8, 2018.

LIMA, J. M. S. Avaliação do potencial de produção de biossurfactantes por micro-organismos endofíticos e epifíticos de macrófitas aquáticas coletadas em afluentes do rio negro contaminados por petróleo. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Amazonas. Manaus, 2016.

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

LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Journal of Peptide Science**. v. 14, p. 864-875, 2005.

LIU, X. Y.; HADDAD, N. I. A.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121. **Protein and Peptide Letters**. v. 14, p. 766-773, 2007.

LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**. v. 93, p. 31–37, 2015a.

LIU, J. F.; MBADINGA, S. M.; YANG, S. Z.; GU, J. D; MU, B. Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. International Journal of Molecular Sciences. v. 16, p. 4814-4837, 2015b.

LOTFALLAH, A. H.; BURGUETE, M. I.; ALFONSO, I.; LUIS, S. V. Highly stable oil-in-water emulsions with a gemini amphiphilic pseudopeptide. **Royal Society of Chemistry**. v. 5, p. 36890–36893, 2015.

LOURITH, N; KANLAYAVATTANAKUL, M. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. **International Journal of cosmetic Science**. v. 31, p. 255-261, 2009.

LU, J. R.; MARROCO, A.; SU, T. J.; THOMAS, R. K.; PENFOLD, J. Adsorption of dodecyl sulfate surfactants with monovalent metal counterions at the air-water interface studied by neutron reflection and surface tension. **Journal of Colloids and Interface Science**. v. 158, p. 303-316, 1993.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; CAMPOS-TAKAKIA, G. M.; SARUBBO, L. A. properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. **Chemical Engineering Transactions**. v. 27, p. 67-72, 2012.

MADIGAN M. T; MARTINKO J.M; BENDER K. S.; BLUCKEY D.H.; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock, 14º Ed. **Artmed**. Capítulo 3. p.73-84, 2016.

MADSEN, J.K.; PIHL, R.; MOLLER, A.H.; MADSEN, A.T. The anionic biosurfactant rhamnolipid does not denature industrial enzymes. **Frontiers in Microbiology.** v. 6, 1-13, 2015.

MAINA, S.; STYLIANOUA, E.; VOGIATZIA, E.; VLYSIDISB, A.; MALLOUCHOSA, A.; NYCHASA, G. J. E.; DE CASTRO, A. M. DHESKALID, E.; KOOKOSD, I. K. KOUTINASA, A. Improvement on bioprocess economics for 2,3-butanediol production fromvery high polarity cane sugar via optimisation of bioreactor operation. **Bioresource Technology**. v. 74, p. 343-352, 2019.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of Molasses for Biosurfactant Production by Two Bacillus Strains at Thermophilic Conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 74, n. 7, 887-889, 1997.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update of the use of unconvencional substrates for biosurfactant production and their new applications, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable resources. **Journal Science Technolology**. v. 27, p.675-683, 2005.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova.** v.24, n.1, p. 87-93, 2001.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 558-565, 2012a.

MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**. v.34, n.9, p. 1597–1605, 2012b.

MAUTI G. O.; ONGUSO J.; KOWANGA D. K.; MAUTI E. M. Biodegradation activity of Aspergillus niger Lipase isolates from a Tropical Country Garage. **Journal of Scientific and Innovative Research**. v. 5, n. 1, p. 15–18, 2016.

MAYER, R. M.; SOBERON-CHAVES, G. *Pseudomonas aeruginosas* rhamnolipids: biosynthese and potencial applications. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v. 54, p. 625-633, 2000.

MELO, M. A.; LUCAS, E. F.; SILVA, I. P. G.; AGUIAR, A. A.; PRATES, V. R.; DICKSTEIN, F. Avaliação de traçador para caracterização de reservatórios de petróleo. **Boletim técnico da Produção de Petróleo**, v. 3, n. 1, p. 9-27, 2008.

MEZA, A. N. Avaliação da eficiência de varrido de óleo, por injeção de água e ede solução polimérica, utilizando célula Hele-Shaw. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2015.

MEZZOMO, R. F.; TEIXEIRA, P. W. Recuperação terciária do petróleo pela injeção de soluções polímeros/micelares. Setor de Tecnologia de Reservatórios, Divisão de Explotação, Centro de Pesquisas da Petrobras, 1982.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIYAKE, M; YAMASHITA, Y. Molecular structure and phase behavior of surfactants. Chapter 24. **Cosmetic Science and Technology**. p. 389-414, 2017.

MORENO, J.; GURPINAR, O.; LIU, Y. EOR Advisor System: A Comprehensive Approach to EOR Selection. **International Petroleum Technology Conference**. p. 1-15, 2014.

MORROW, N.R. Wettability and its effects on oil recovery. **Journal of Petroleum Technology**. v. 42, p. 1476–1484, 1990.

MUBARAK, M. Q. E.; JUFRI, S. H. M.; ZAHAR, S. M. S. N. S.; KALIL, M. S.; HAMID, A. A.; ISA, M. H. M. Kinetics of surfactin production by *Bacillus subtilis* in a 5 L stirred-tank bioreactor. **Sains Malaysiana**. v. 46, n. 9, p. 1541–1548, 2017.

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

MUKHERJEE, S.; DAS, P. 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, n.8, p. 1191-1199, 2007.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**.v.133, p.183-198, 2005.

MULLIGAN, C.N; SANJA, Y K.; MUDHOO, S.A. Biosurfactants Research Trends and Applications. Boca Raton: CRC Press, p. 1-325, 2014

MUSKAT, M. The flow of homogeneous fluids through porous media, 1982.

MYERS, D. Surfactant Science and Technology. 3° ed. New Jersey: Wiley-Interscience. 2006.

NAKAMA, Y. Surfactants. Fundamental resources for cosmetics. Chapter 15, 2017.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA, A.Z.; MANIASSO, N. Experimentos didáticos em química analítica envolvendo separação de fases e pre-concentração. **Química Nova**. v. 25, n.3, p.483-489, 2002.

NAYARISSERI, A.; SINGH, P.; SINGH, S. K. Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing Bacillus subtilis strain ANSKLAB03. **Bioinformation**. v. 14, n. 6, p. 304-314, 2018.

NAZINA, T.N., SOKOLOVA, D., SHESTAKOVA, N.M., GRIGORYAN, A.A., MIKHAILOVA, E.M., BABICH, A., LYSENKO, A.M., TOUROVA, T.P., POLTARAUS, A.B., QINGXIAN, F., FANGTIAN, N., BELYAEV, S. The phylogenetic diversity of aerobic organotrophic bacteria from the Daquang high-temperature oil field. **Microbiology**. v.74, p. 343-351, 2005.

NEGIN, C.; ALI, S.; XIE, Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. **Petroleum**. v. 3, p. 197-211, 2017.

NETO, B.B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos, pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Unicamp, 2003.

NIELSEN, T. H; SORENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J. B.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SORENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent Pseudomonas spp. from the sugar beet rhizosphere. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68, p. 3416–3423, 2002.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: an update of the general aspects of these remarkable biomolecules. **BiotechnologyProgress**. v. 21, p. 1593-1600, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactant in food industry. **Trends in Food Science & Technology**. v. 18, n. 5, p. 252-259, 2007.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**. v. 97, n. 2, p.336-341, 2006.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies De Resposta - Parte I: Variáveis de Processo. Revista Virtual de Química. v. 9, n. 3, p. 1-32, 2017.

NURFARAHIN, A. H.; MOHAMED, M. S.; PHANG, L. Y. Culture Medium Development for microbial-derived surfactants production - an overview. **Molecules**. v. 23, p. 1-26, 2018.

O´BRIEN J.; SAYAVEDRA, L.; MOGOLLON, J. L.; LOKHANDWALA, T.; HALLIBURTON, R. L. Maximizing mature field production – A novel approach to

screening mature fields revitalization options. **Society of Petroleum Engineers**. p. 1-11, 2016.

OLIVEIRA, F. J. S., VAZQUEZ, L., DE CAMPOS, N. P., DE FRANÇA, F. P. Production of rhamnolipids by a *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Process Biochemistry**. v. 44, n. 4, p.383–389, 2009.

OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N; MARTINS, J. J. L.; GIRO, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointefaces**. v. 101, n.1, p. 34-43, 2013.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J.- L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v. 9, p.1084-1090, 2007.

PAPADAKI, A.; PAPAPOSTOLOU, H.; ALEXANDRI, M.; KOPSAHELIS, N.; PAPANIKOLAOU, S.; DE CASTRO; A. M.; KOUTINAS, A. A. (2018). Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 35960-35970, 2018.

PARK, S. J.; SEO, M. K. Interface Science and Composites. **Interface Science and Technology**, 2011.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**. v. 25, p. 91-95, 1997.

PELE, M.A.; RIBEAUX, D.R.; VIEIRA, E. R.; SOUZA, A. F.; LUNA, M. A. C.; MONTERO-RODRIGUEZ, D; ANDRADE, R.F.S; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; BERGTER, E. B.; SANTIAGO, A.L.C.M.A; CAMPOS-TAKAK, G.M. Conversion of renewable substrates for biosurfactant production by Rhizopus arrhizus UCP 1607 and enhancing the removal of diesel oil from marine soil. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 38, p. 40-48, 2019.

PENFOLD, J.; TUCKER, I.; STAPLES. E.; THOMAS, R. K. Manipulation of the adsorption of ionic surfactants onto hydrophilic silica using polyelectrolytes. **LANGMUIR,** v. 20, n. 17, p. 7177-7182, 2004.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M. MARCHANT, R. Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. **Trends in Biotechnology**. p.1-13, 2017.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 553- 563, 1999.

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.

PIISPANEN, P. S. Synthesis and Characterization of Surfactants Based on Natural Products. Kungl Tekniska Högskolan, Stockholm, 2002.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**. v. 4, p. 305-325, 1946.

POLIDORO, A. S. otimização por superfície de resposta do processo de pirólise de resíduo oriundo do torrador de café (silverskin) para a produção de bio-óleo e caracterização química por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas quadrupolar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

POLING, B. E.; PRAUSNITZ, J. M.; O'CONNELL, J. P. Pressure – volume – temperature relationship of pure gases and liquids, The Properties of Gases and Liquids, McGraw Hill Book Co., New York, 2001.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. 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, 2008.

PURWASENA, I. A.; ASTUTI, D. A.; SYUKRON, M.; AMANIYAH, M.; SUGAI, Y. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for meor. **Journal of Petroleum Science and Engineering.** v. 183, p. 1-9, 2019.

QAZI, M.A.; KANWA, T.; JADOON, M.; AHMED, S.; FATIMA, N. Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil. **Biotechnology Progress**, v.30, n.5, p.1065-1075, 2014.

RAAIJMAKERS J. M., MAZZOLA M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**. v.50, p. 403–424, 2012.

RAJESH, M.; SAMUNDEESWARI, M.; ARCHANA, B. Isolation of biosurfactant producing bacteria from garbage soil. **Journal Applied & Environmental Microbiology**. v.5, n.2, p. 74-78, 2017.

RAMANA, V. K.; KARANTH, N. G. Production of biosurfactant by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. **Biotechnology Letters.**v. 11, n. 6, p. 437-442, 1989.

RAMOS, H.C.; HOFFMANN, T.; MARINO, M.; NEDJARI, H.; PRESECAN-SIEDEL, E.; DREESEN, O.; GLASER, P.; JAHN, D. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. **Journal of bacteriology**.v.182, n.11, p.3072–3080, 2000.

RANA, D.; NEALE, G. H.; HORNOF, V. Surface tension of mixed surfactant systems: lignossulfonate and sodium dodecyl sulfate. **Colloid polymer Science**. v. 280, p. 775-778, 2002.

RANE, A. N., BAIKAR, V. V., KUMAR, V. R., DEOPURKAR, R. L. Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by Bacillus subtilis ANR 88 and Its Application in Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 492, p. 1-12, 2017.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C., DE FRANÇA, F. P. Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on Low-Cost raw materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113-116, p. 899-912, 2004.

RIENZO, M. D. RANSON, I. U.; DORTA, B. Biosurfactant Production in Aerobic and Anaerobic Conditions by Different Species of the Genus *Pseudomonas*. **Journal of Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 201-210, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Ed. Casa do pão, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Cárita Editora, 2009.

RODRIGUES, L. R.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactantproduction by probiotic. **Biochemical Engineering Journal**. v. 32, p.135–142, 2006.

RON, E.Z., ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**. v. 3, p. 229–236, 2001.

ROSA, A. J.; CARVALHO, R. S.; XAVIER, J.A.D. Engenharia de Reservatórios de Petróleo, 1ª ed. Editora Interciência, 2006.

ROSEN, M.J. Surfactants and interfacial phenomena. 3ª ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 2004.

RUDNER, R.; MARTSINKEVICH, O.; LEUNG, W.; JARVIS, E. D. Classification and genetic characterization of pattern-forming *Bacilli*. **Molecular Microbiology**. v. 27, p. 687–703, 1998.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 97, n. 3, p. 1005-1016, 2013.

SAHARAN, B. S.; SAHU, R. K.; SHARMA, D. A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**. p. 1-39, 2011.

SAIEN, J.; POUR, A. R.; ASADABADI, S. Interfacial Tension of the n-Hexane−Water System under the Influence of Magnetite Nanoparticles and Sodium Dodecyl Sulfate Assembly at Different Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering**. v. 59, p. 1835-1842, 2014.

SALAGER, J. L. Emulsion Phase Inversion Phenomena. In: SJÖBLOM, J. Emulsion and Emulsion Stability. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, **2006**.

SALVINI, V.R.; GARCIA, J.R.; OLIVEIRA, I.R, PANDOLFELLI, V.C. Agente espumante e seus efeitos nas propriedades físicas de alumina porosa. **Revista Cerâmica**. v.52, p.57-62, 2006.

SANTOS, D. K. F; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; LEONIE A. SARUBBO, L.A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules ofthe 21st century. **International Journal of Molecular Sciences.**v. 17, p. 1-31, 2016.

SANTOS, B. F.; SIMIQUELI, A. P. R.; PONEZI, A. N.; PASTORE, G. M.; FILETI, A. M. F. Monitoring of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using beet peel as culture medium via the development of a neural soft-sensor in an electronic spreadsheet. Brazilian Journal of Chemical Engineering. v.35, n.4, p. 1355 - 1367, 2018.

SANTOS, E. C. L.; MIRANDA, D. A. R.; SILVA, A. S.; LÓPEZ, A. M. Q. Production by *Bacillus* strains isolated from sugar cane mill wastewaters. **Environmental Sciences**. v. 62, p. 1-12, 2019.

SATPUTE, S. K.; PŁAZA, G. A.; BANPURKAR, A. G. Biosurfactants production from renewable natural resources: example of innovativeand smart technology in circular bioeconomy introduction. **Management Systems in Production Engineering**. v. 1, n. 25, p 46-54, 2017.

SCHRAMM, L.L.; MARANGONI, D.G. Surfactants and their solutions: Basic principles. In: Surfactants: Fundamentals and applications in the petroleum industry, Schramm, L.L. chapter 1. Cambridge: Cambridge University Press, p. 3-50, 2000.

SCHRAMM, L.L.; STASIUK, E.N.; MARANGONI, D.G. Surfactants and their applications. **Annual Reports on the Progress of Chemistry**. v. 99, p.3–48, 2003.

SCHRAMM, L.L. Emulsions, foams, and suspensions. Fundamentals and applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH& Co, KGaA, 2005.

SCHRAMM, L. L. Surfactants: Fundamentals and applications in the petroleum industry. Petroleum Recovery Institute, 2010.

SEKHON, K. K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. **Journal of Petroleum & J Environmental Biotechnology**. v. 3, n. 7, p. 1-10, 2012.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science.** n. 34, p. 714– 724, 2008.

SEYDLOVÁ, G.; CABALA, R.; SVOBODOVÁ, J. Surfactin – Novel solutions for global issues. Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, 2011.

SHAH, S. K.; BHATTARAI, A.; CHATTERJEE, S. K. Applications of surfactants in modernscience and technology. **Modern Trends in Science and Technology**. p.147-158, 2013.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **Food Technology and. Biotechnology**. v. 48, n. 2, p. 119–134, 2010.

SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. **Environmental Science and Technology**.v, 45, n. 14, 2015.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**. v.126, p. 2-13, 2018.

SILVA, N.R.A.; LUNA, M.A.; SANTIAGO, A.L.; FRANCO, L.O.; SILVA, G.K.; DE SOUZA, P.M.; OKADA, K.; ALBUQUERQUE, C.D.; DA SILVA, C.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising *Cunninghamella echinulata* isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.9, p. 15377-15395, 2014.

SILVA, A. C. S.; SANTOS, P. N.; SILVA, T. A. L.; ANDRADE, R. F. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. Arquivos do Instituto Biológico. v. 85, p. 1-12, 2018.

SOBERON-CHÁVEZ, G. Biosurfactants: from genes to applications. Microbiology Monographs, v. 20, 2011.

SOBERON-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a general overview. In Biosurfactants, Soberon-Chávez, G., Ed. Springer-Verlag: Berlim, Germany, p. 1-11, 2011.

SOBRINHO, H. B. D. S; LUNA, J. M. D; RUFINO, R. D.; A.L.F. PORTO, A. L. F; SARUBBO, L. A. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.16, n. 4, p. 4-4, 2013.

SOURAV, D., SUSANTA, M., GHOSH, A., SAHA, R., SAHA, B. A. A review on natural surfactants. **Royal Society of Chemistry**. v. 5, p. 65757–65767, 2015.

SOUSA, M.; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. Bioprocess Biosystems Engineering. v. 35, p. 897–906, 2012.

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

SUCDEN. Process flowcharts, 2017. Disponível em: https://www.sucden.com/en/products-andservices/sugar/process-flowcharts/. Acesso em 14/03/18.

SUTHAR H, HINGURAO K, DESAI A, NERURKAR A. Evaluation of bioemulsifier mediated microbial enhanced oil recovery using sand pack column. Journal of Microbiology Methods. v. 75, n. 2, p. 225–230, 2008.

SYLDATK, C; HAUSMANN, R. Microbial Biosurfactants.**European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 112, n. 6, p. 615-616, 2010.

TABATABAEE, A; ASSADI, M. M.; NOOHI, A. A.; SAJADIAN, V. A. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. **Journal of Environmental Health Science & Engineering.** v. 2, n. 1, p. 6-12, 2005.

THOMAS, J. E.; TRIGGIA, A. A.; CORREIA, C. A.; VEROTI, C.; SOUZA, J. E.; PAULA, J. L.; ROSSI, N. C.; PITOMBO, N. E.; GOUVÊA, P. C.; CARVALHO, E.; BARRAGAN, R. V. Fundamentos de Engenharia de Petróleo. Editora Interciência: Rio de Janeiro. v. 7, p. 169- 174, 2001.

USMAN, M. M.; DADRASNIA, A.; LIM, K. T.; MAHMUD, A. F.; ISMAIL, S. Application of biosurfactants in environmental biotechnology; remediation of oil and heavy metal. **Bioengineering**. v. 3, n. 3, p. 289-304, 2016.

UWIERA-GARTNER, M.M.E; CARLSON, M. R.; WALTERS, D. Geomechanical simulation of caprock performance for a proposed, low pressure, steam- assisted gravity drainage pilot project. Canada Society for Unconventional Gas.p. 1-14, 2011.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Microbial Production of Citric Acid. **Enzime and Microbial Technology**. v. 22, p. 392-397, 1999.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. 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, 2006.

VARADAVENKATESAN, T.; MURTY, V. R. Production of a lipopeptide biosurfactant by a novel *Bacillus* sp. and its applicability to enhanced oil recovery. **ISRN Microbiology**. p, 1-8, 2013.

VARGAFTIK, N. B., VOLKOV, B. N.; VOLJAK, L. D. International Tables of the Surface Tension of Water.**Journal of Physical.Chemistry**.v.12, n. 3, p.317-320, 1983.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**. v. 232, p. 389-397, 2017.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA N.; CAMEOTRA, S. S. Matrix-assisted laser desorbtion 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 Environment Microbiology***.* v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.

VÁZQUEZ, G.; ALVAREZ, E.; NAVAZA. J. M. Surface Tension of Alcohol + Water from 20 to 50 °C. **Journal of Chemical Engineering**. v. 40, p. 611—614, 1995.

VESHAREH, M. J.; AZAD, E. G.; DEIHIMI, T.; NIAZI, A.; AYATOLLAHI, S. Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting efect on carbonate surfaces. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**. v. 9, p. 233–245, 2019.

YEFEI, W., HUAIMIN, X. WEIZHAO, Y., BAOJUN, B., XINWANG, S., JICHAO, Z. Surfactant induced reservoir wettabilityalteration: Recent theoretical and experimental advances in enhanced oil recovery. **Petroleum Science**. v. 8, p. 463-476, 2011.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 8, p. 1799-1805, 2006.

YU, Y.; ZHAO, J.; BAYLY, A. E. Development of Surfactants and Builders in Detergent Formulations. **Chinese Journal of Chemical Engineering.** v. 16, n, 4, p. 517-527, 2008.

ZHU, Z; ZHANG, G.; LUO, Y.; RAN, W.; SHEN, Q.; Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. **Bioresource Technology**. v. 112 p. 254-260, 2012

WALTERS, C. C. The origin of petroleum. **ExxonMobil Research & Engineering Company**.p. 79-101, 2007.

WASCHINA, S.; D'SOUZA, G.; KOST, C.; KALETA, C. Metabolic network architecture and carbon source determine metabolite production costs. **FEBS Journal**. v. 283, p. 2149-2163, 2016.

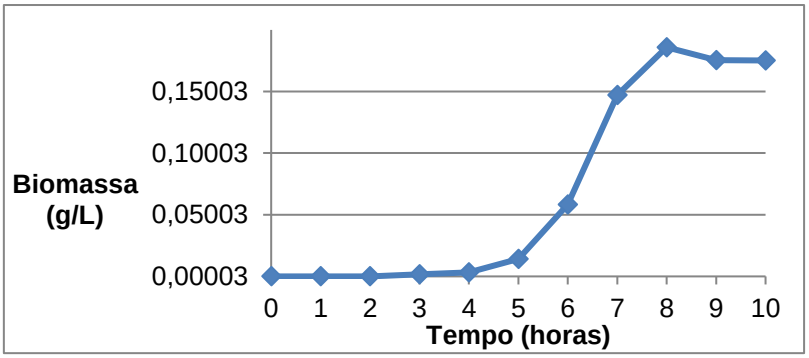
WEI, Y.-H.; CHU, I.-M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, n.8, p. 724-728, 1998.

WEI, Y.M.; LAI, C.C.; CHANG J.S. 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, 2007.

WILLENBACHER, J.; RAU, J. T.; ROGALLA, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Foam-free production of surfactin via anaerobic fermentation of *Bacillus subtilis* dsm 10^T. **AMB express**. p. 5-21, 2015.

WU, Z. X. ; FENG, X.; XIE, L. L. ; PENG, X. Y. ; YUAN, J.; CHEN, X. X. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, Ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora. **Journal of Applied Ichthyology**. 28 (2012), 721–727

APÊNDICES



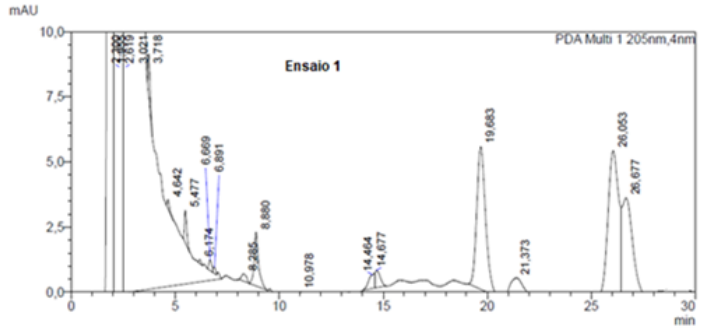
APÊNDICE 1 - CURVA DE CRESCIMENTO PARA A LINHAGEM DE *BACILLUS SUBTILIS* NO MEIO PARA PREPARO DO INÓCULO (CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CÉLULAS: 0,001 G/L, EXPRESSA EM MASSA SECA).

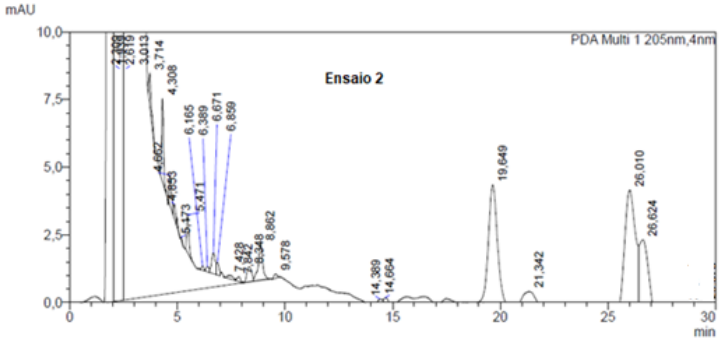
Conc. Surfactina	Area	média	Resíduo	desvio padrão	Gcalc	Gtab	1,155	variância	Ccalc	Ctab	0,684
0,05	60464		577,33		1,007	ok			0,413		
0,05	61611	61041,3	-569,7	573,54	-0,993	ok		328946,33			
0,05	61049		-7,667								
0,10	131898		778,33		0,753	ok					
0,10	133850	132676	-1174	1034,31	-1,135	ok		1069792,33			
0,10	132281		395,33								
0,30	464807		434,5		0,707	ok					
0,30	465676	465242	-434,5	614,48	-0,707	ok		377580,50			
0,60	935019		85,667								
0,60	935972	935105	-867,3	827,83	-1,048	ok		685304,33			
0,60	934323		781,67		0,944	ok					
0,90	1513131		253,5		0,707	ok					
0,90	1513638	1513385	-253,5	358,50	-0,707	ok		128524,50			
								2590148,00			

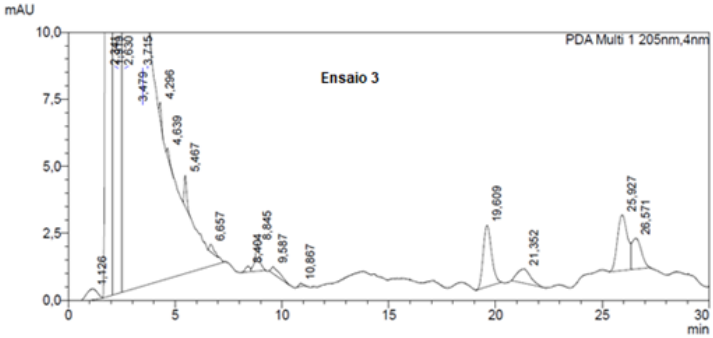
conc. sacarose	abs	média	Resíduo	Desvio padrão	Gcalc	Gtab	1,155	variância	Ccalc	0,561
0,08	0,006		0,0017		1,091	ok			0,1304	
0,08	0,009	0,008	-0,0013	0,002	-0,873	ok		2,33E-06		
0,08	0,008		-0,0003							
0,12	0,016		-0,0007		-1,155	ok				
0,12	0,015	0,015	0,0003	0,001				3,33E-07		
0,12	0,015		0,0003							
0,16	0,029		-0,0007							
0,16	0,027	0,028	0,0013	0,001	1,155	ok		1,33E-06		
0,16	0,029		-0,0007							
0,20	0,047		-0,0013		-1,155	ok				
0,20	0,045	0,046	0,0007	0,001				1,33E-06		
0,20	0,045		0,0007							
0,24	0,052		-0,0003							
0,24	0,052	0,052	-0,0003	0,001				3,33E-07		
0,24	0,051		0,0007		1,155	ok				
0,32	0,079		0							
0,32	0,08	0,079	-0,001	0,001	-1,000	ok		1,00E-06		
0,32	0,078		0,001		1,000	ok				
0,36	0,09		0							
0,36	0,091	0,090	-0,001	0,001	-1,000	ok		1,00E-06		
0,36	0,089		0,001		1,000	ok				
								7,67E-06		

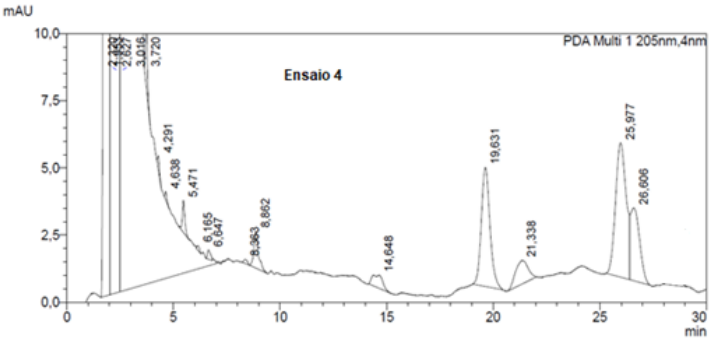
Conc. celular/diluição	abs.	média	Resíduo	desvio padrão	Gcalc	G tab	1,155	variância	Ccalc	0,335
0,006	0,014		0,001						0,157	
0,006	0,016	0,015	-0,001	0,001	-1,155	ok		1,33E-06		
0,006	0,014		0,001							
0,007	0,020		0,001		1,155	ok				
0,007	0,021	0,021	0,000	0,001				3,33E-07		
0,007	0,021		0,000							
0,011	0,031		0,000							
0,011	0,030	0,031	0,001	0,001	1,155	ok		3,33E-07		
0,011	0,031		0,000							
0,012	0,036		0,000							
0,012	0,034	0,036	0,002	0,002	1,091	ok		2,33E-06		
0,012	0,037		-0,001		-0,873	ok				
0,016	0,045		-0,001		-1,155	ok				
0,016	0,044	0,044	0,000	0,001				3,33E-07		
0,016	0,044		0,000							
0,022	0,065		0,000							
0,022	0,063	0,065	0,002	0,002	1,091	ok		2,33E-06		
0,022	0,066		-0,001		-0,873	ok				
0,031	0,089		-0,001		-0,873	ok				
0,031	0,086	0,088	0,002	0,002	1,091	ok		2,33E-06		
0,031	0,088		0,000							
0,042	0,119		-0,001		-1,155	ok				
0,042	0,117	0,118	0,001	0,001				1,33E-06		
0,042	0,117		0,001							
0,050	0,141		-0,002		-1,091	ok				
0,050	0,139	0,139	0,000	0,002				2,33E-06		
0,050	0,138		0,001		0,873	ok				
0,061	0,169		0,001							
0,061	0,172	0,170	-0,002	0,002	-1,155	ok		3,00E-06		
0,061	0,169		0,001							
0,079	0,221		0,001							
0,079	0,223	0,222	-0,001	0,001	-1,155	ok		1,33E-06		
0,079	0,221		0,001							
0,110	0,311		-0,001							
0,110	0,309	0,310	0,001	0,001	1,155	ok		1,33E-06		
0,110	0,311		-0,001							
0,138	0,369		0,001							
0,138	0,372	0,370	-0,002	0,002	-1,121	ok		4,33E-06		
0,138	0,368		0,002		0,801	ok				
0,183	0,469		0,000							
0,183	0,471	0,469	-0,002	0,002	-1,091	ok		2,33E-06		
0,183	0,468		0,001		0,873	ok				
0,275	0,688		0,002		1,091	ok				
0,275	0,691	0,690	-0,001	0,002	-0,873	ok		2,33E-06		
0,275	0,69		0,000							
								2,77E-05		

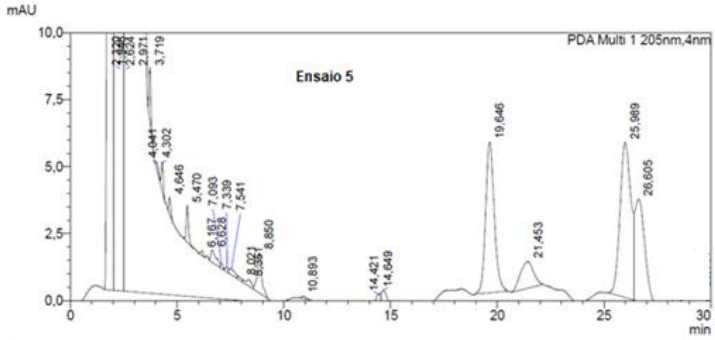
APÊNDICE 2 - RESULTADOS DE C_{CALC} E G_{CALC} PARA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA, CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE E CONCENTRAÇÃO CELULAR RESPECTIVAMENTE.

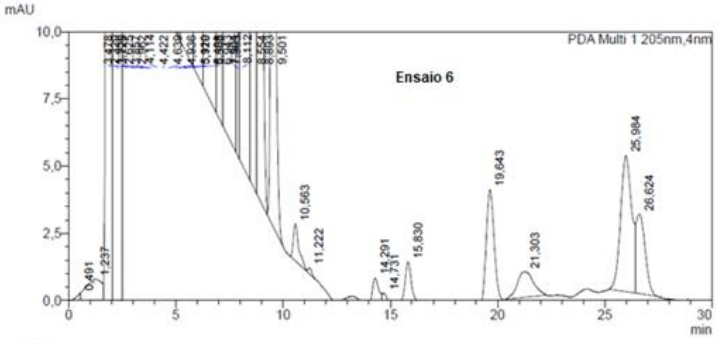

mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 1
min

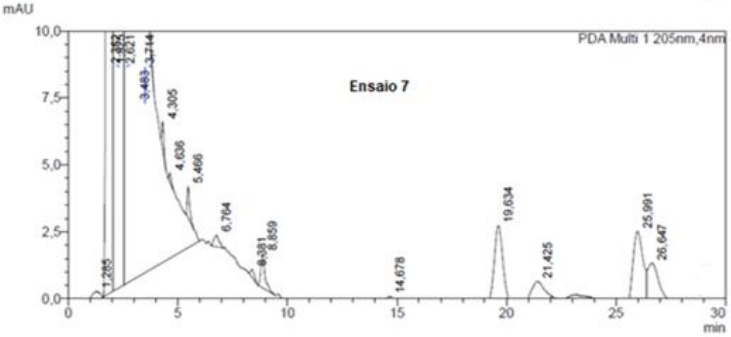

mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 2
min

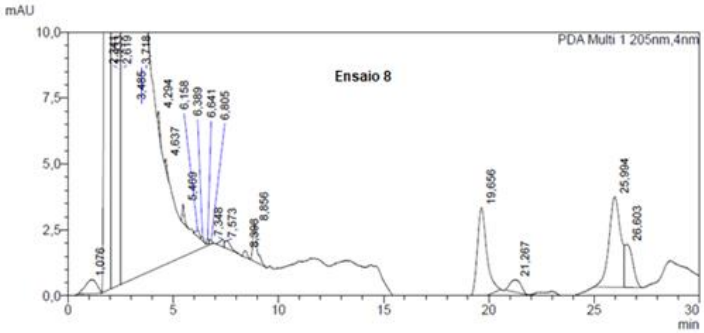

mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 3
min

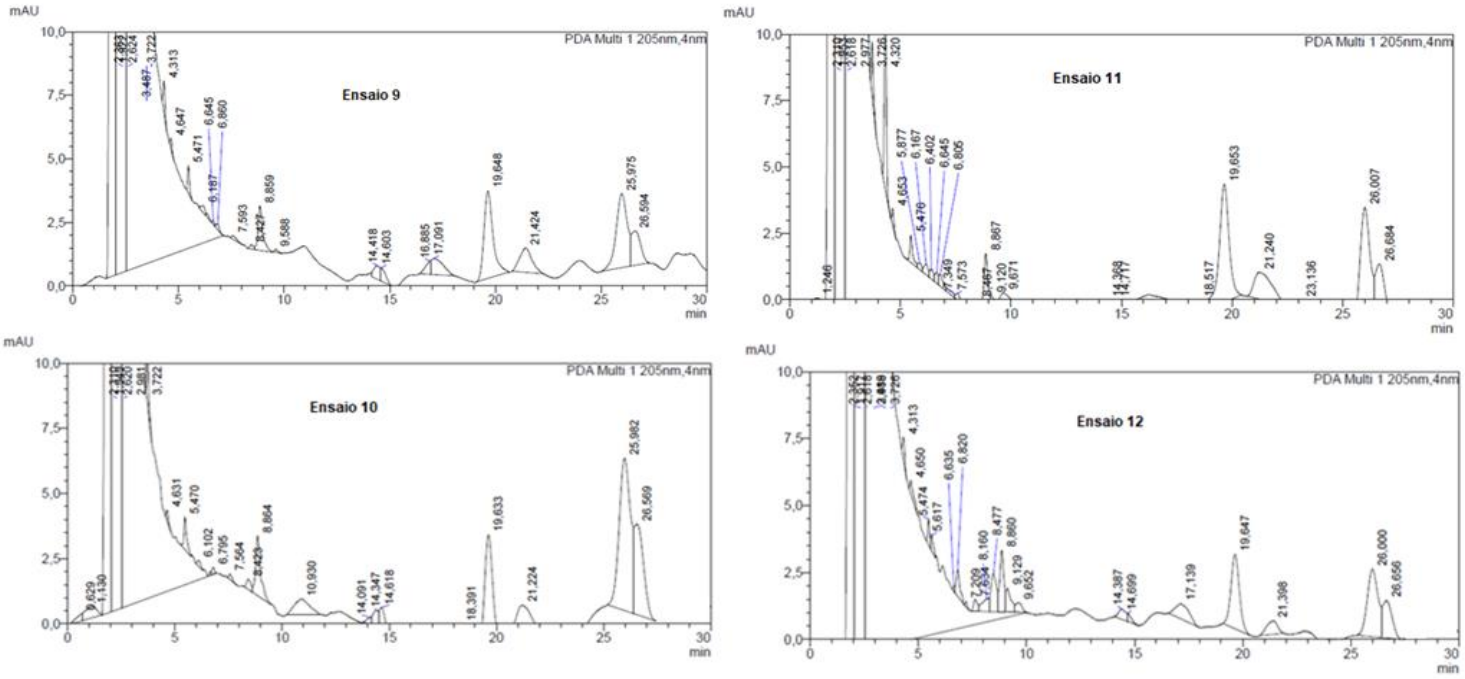

mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 4
min


mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 5
min

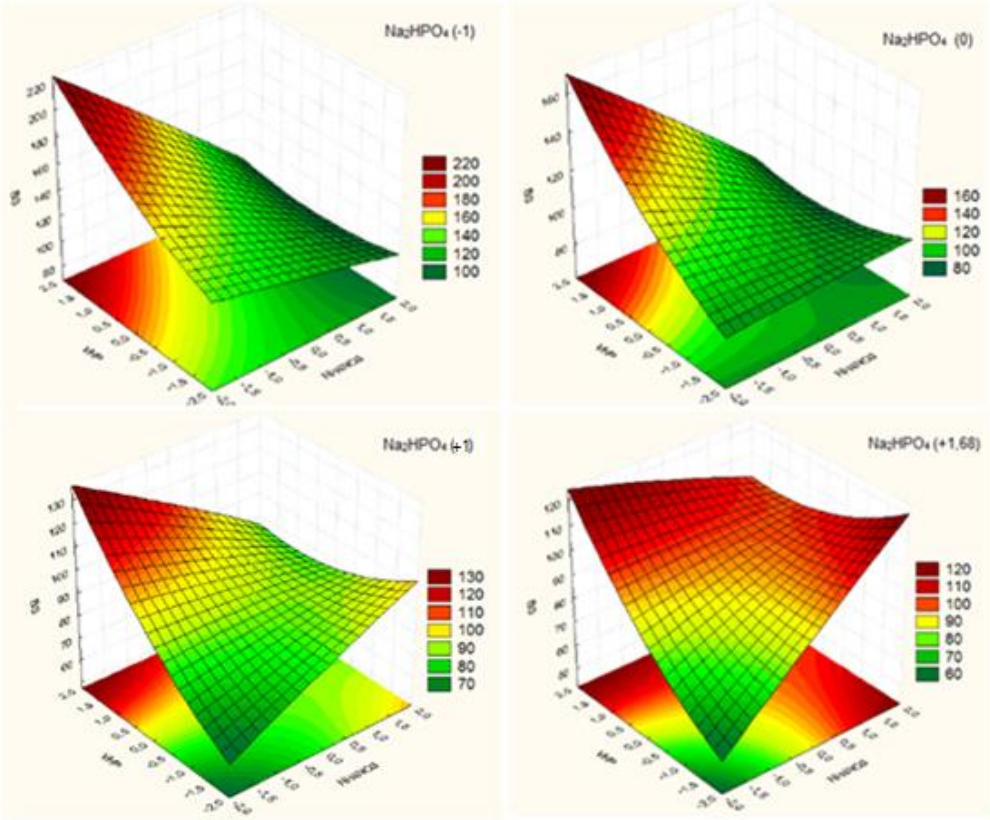

mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 6
min


mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 7
min


mAU
PDA Multi 1 205nm,4nm
Ensaio 8
min



APÊNDICE 3 - CROMATOGRAMAS DA SURFACTINA PRODUZIDA POR *BACILLUS SUBTILIS* EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS POR 24 HORAS.



APÊNDICE 4 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA 3 D E 2 D PARA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTINA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR VHP E NH_4NO_3 EM DIFERENTES NÍVEIS DE NA_2HPO_4.