

9º CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS



9º CONGRESSO
Brasileiro de P&D em
PETRÓLEO E GÁS

Maceió, AL
de 09 a 11 de novembro
2017

Realização:



ABPG
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE P&D EM
PETRÓLEO E GÁS



TÍTULO DO TRABALHO:

Avaliação do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em um meio contendo algaroba na remediação de sedimentos arenosos contaminados por hidrocarbonetos

AUTORES:

Vanessa Nascimento dos Reis¹, Gabriela Fontes Deiró Ferreira², Jessyca Beatriz Alves Palmeira³, Andrea Farias de Almeida⁴, Luiz Carlos Lobato dos Santos⁵, Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato⁶

INSTITUIÇÃO:

^{1,6}Escola de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia de Informação, Universidade Salvador,^{2, 3,}

⁵Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, ⁴Departamento de Biotecnologia Universidade Federal da Paraíba.

Este Trabalho foi preparado para apresentação no 8º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás - 9º PDPETRO, realizado pela Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás - ABPG, no período de 09 a 11 de novembro de 2017, em Maceió/AL. Esse Trabalho foi selecionado pelo Comitê Científico do evento para apresentação, seguindo as informações contidas no documento submetido pelo(s) autor(es). O conteúdo do Trabalho, como apresentado, não foi revisado pela ABPG. Os organizadores não irão traduzir ou corrigir os textos recebidos. O material conforme, apresentado, não necessariamente reflete as opiniões da Associação Brasileira de P&D em Petróleo e Gás. O(s) autor(es) tem conhecimento e aprovação de que este Trabalho seja publicado nos Anais do 9º PDPETRO.

Avaliação do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em um meio contendo algaroba na remediação de sedimentos arenosos contaminados por hidrocarbonetos

Abstract

In view of the numerous accidents with oil spills and the harmful effects they can cause, it is necessary to identify techniques that promote a sediment remedy. In this work, the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 was carried out in a medium containing algaroba, proving the presence of surfactin, analyzing the surface tension as a function of temperature variation and ionic strength, and its effectiveness in the remediation of contaminated sandy sediments by hydrocarbons. The results confirmed the presence of surfactin in the medium and showed that the biosurfactant supported the variation of saline concentration in a range of 0 to 10% NaCl and remained stable when subjected to a temperature of 100 ° C and 135 ° C for 120 minutes. The remediation showed promising results, having a percentage of removal of the crude oil adsorbed in the sediment of 91.30%. In view of the results, it was possible to prove the importance of the biosurfactant in the remediation of sandy sediments contaminated by petroleum.

Introdução

Os acidentes com derramamento de óleo se tornaram numerosos e vêm causando muitos problemas ecológicos e sociais. Em ocorrência de vazamento com petroleiros são derramados enormes quantidades de petróleo, resultando em efeitos totalmente destrutivos para a fauna e flora marinha e terrestre, as quais são normalmente irreversíveis. No Brasil o problema não é diferente, uma vez que ocorre a produção do petróleo e seus derivados em águas marinhas e terrestre, além do avanço ao pré-sal, podendo ocasionar diversos acidentes como ruptura da junta de uma tubulação, explosão de navios cargueiros e tanques de óleo, fissuras no poço e rompimento do oleoduto (MONTEIRO, 2003).

O petróleo derramado flutua e segue as correntes de vento, alastrando-se progressivamente, formando as marés negras que possuem efeitos bastante nocivos, podendo ser por características ambientais (variação do pH, diminuição do oxigênio dissolvido e/ou indisponibilidade de nutrientes), físicas (abafamento e redução da luminosidade) e tóxica (GANDRA, 2005). Devido à movimentação das águas, uma parte da maré negra pode chegar às praias impregnando os sedimentos arenosos. Algumas praias podem causar impressão de que não foram contaminadas, uma vez que sofrem retiradas e reposição de areia causada pelo movimento das marés. Se o derramamento ocorrer na fase construtiva, o óleo pode ser soterrado, dando a ideia de praia limpa. Contudo, o óleo pode encontrar-se recoberto por areia e quando ocorrer à retirada de sedimento pela maré, o óleo tende a recontaminar o ambiente. Diversas técnicas físicas e químicas foram desenvolvidas para remover o óleo e/ou minimizar os danos causados ao ecossistema (CETESB, 2017; MONTEIRO, 2003), dentre elas está à utilização de agentes tensoativos ou surfactantes (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Os surfactantes pertencem a uma classe importante de compostos químicos bastante utilizados em diversos setores industriais, devido a sua característica tensoativa, capaz de remover do meio substâncias de polaridades diferentes com o auxílio da água através de um processo chamado emulsificação. A grande maioria dos surfactantes utilizados, atualmente, são sintéticos e derivados de petróleo. Porém, com o crescimento da preocupação com o meio ambiente juntamente com as leis de controle ambientais, faz-se necessário à busca por meios menos agressivos (BARROS *et al.*, 2007). O

descarte incorreto desse composto pode ocasionar formação de espuma nos rios e alterações nas propriedades físico-químicas e biológicas dos solos (JESUS, 2016). Com o auxílio da biotecnologia, é possível a obtenção de bioprodutos, como, por exemplo, os biossurfactantes, sendo estes biodegradáveis e de baixa toxicidade, atendendo as novas exigências do mercado (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes consistem em subprodutos do metabolismo de bactérias, fungos e leveduras, são moléculas anfipáticas, resultando na interação entre a interface de dois fluidos com diferentes polaridades, reduzindo a tensão superficial e interfacial entre as fases imiscíveis. Essas propriedades fazem com que os biossurfactantes possam ser utilizados para uma vasta aplicação industrial envolvendo: emulsificação, detergência, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Ao comparar os surfactantes sintéticos aos biossurfactantes, estes apresentam vantagens, além de serem biodegradáveis e de baixa toxicidade, têm a possibilidade de serem produzidos a partir de substratos renováveis, permitindo o uso de resíduos agroindustriais ou subprodutos de indústrias de biocombustíveis (LOBATO, 2003; DAMIÃO, 2012).

Um dos maiores mercados para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou na formulação de óleos lubrificantes. Além dessas aplicações, tem-se a biorremediação de águas e solos, na qual o biossurfactante possui a capacidade de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água (CRAPEZ *et al.*, 2002); a limpeza de reservatórios de óleos, no qual o biossurfactante promove a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água (LIMA, 2003); e a recuperação melhorada do petróleo (*Microbial Enhanced Oil Recovery*), no qual o biossurfactante auxilia na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (PIROLLO, 2006).

A remoção de contaminantes oleosos do solo é uma tecnologia na qual a eficiência esta diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas do biossurfactante. Ao reduzir a tensão superficial e interfacial, ocorre o aumento da área de superfície de compostos insolúveis, conduzindo a uma mobilidade e biodisponibilidade dos óleos (CHAPRÃO, 2015).

Atualmente, os biossurfactantes vêm sendo bastante estudados devido as suas propriedades e ao seu baixo impacto ambiental, porém ainda não são muito utilizados em escala industrial, devido ao seu processo de produção ser relativamente caro quando comparado ao processo de produção dos surfactantes sintéticos. Os custos de processo estão concentrados, geralmente, nos substratos utilizados para a sua produção, bem como nos métodos ineficientes de recuperação do produto (NITSCHKE, 2004; COSTA, 2005).

A fonte de carbono, a concentração de nitrogênio, fosforo, manganês e ferro no meio, além das condições de cultivo, tais como o pH, temperatura e agitação, são fatores que influenciam na quantidade e qualidade dos biossurfactantes (BANAT, 1995). Com isso, para que o processo possa ser viável economicamente, deve-se selecionar cautelosamente o microrganismo produtor, além de utilizar meios de cultivo de baixo custo e um processo fermentativo adequado (LOBATO; ARAÚJO; MACEDO, 2003).

Dessa forma, é necessário buscar meios de cultivos alternativos que não afetem a qualidade do biossurfactante. Uma forma de viabilizar o meio de cultivo é utilizando resíduos agroindustriais ou espécies vegetais como fonte de carbono, por exemplo, algaroba e melaço (MUNIZ, 2009). Porém, a eficiência dos biossurfactantes é influenciada pelo processo fermentativo e as condições ao qual estão sendo expostos, sendo assim, de extrema importância a avaliação da capacidade de utilização desses biossurfactantes cultivados em meios alternativos (MULLIGAN, YONG, GIBBS, 2001).

Metodologia

A etapa de produção do biossurfactante através do *Bacillus subtilis* em um meio contendo algaroba foi realizada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O caldo fermentado isento de células, oriundo do processo de produção de biossurfactantes a partir do substrato de algaroba, foi fornecido para o estudo da estabilidade e remediação de sedimentos arenosos contaminados por hidrocarbonetos. A concentração micelar crítica da solução contendo o biossurfactante foi determinada por Rocha *et al.* (2016), sendo este valor de 50 g/L. A espectroscopia em infravermelho, as análises de tensão superficial, estabilidade frente à temperatura e força iônica, remediação de sedimentos arenosos contaminados por petróleo e quantificação do óleo removido foram realizadas no laboratório de processos de separação da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Caracterização do biossurfactante

Uma alíquota do caldo fermentado isenta de células, oriundo do processo de produção de biossurfactantes a partir do substrato algaroba, foi submetido ao espectrômetro com transformada de Fourier (FTIR) modelo IR Prestige-21 (Shimadzu) e comparado com a surfactina padrão (Sigma Aldrich) a fim de comprovar a presença de surfactina na amostra.

Estudo de estabilidade do biossurfactante

Foram realizados testes submetendo o biossurfactante produzido frente a condições extremas de temperatura e força iônica, e avaliado seu poder tensoativo através de medidas da tensão superficial.

Determinação da tensão superficial: A análise da medida da tensão superficial, que é um método indireto para quantificação do biossurfactante, foi realizada em um tensiômetro modelo K20 (Kruss), pelo método do anel (Du Nouy) (LOBATO, 2003).

Estudo de estabilidade térmica: Alíquotas do sobrenadante contendo o biossurfactante na concentração micelar crítica foram adicionadas em frascos âmbar. Esses recipientes foram submetidos à ação da temperatura (100 °C e 135 °C) por diferentes intervalos de tempo (20, 40, 60, 90 e 120 minutos). Em seguida, as amostras foram reservadas até atingirem a temperatura ambiente para medição da tensão superficial (MAKKAR, CAMEOTRA, 1999).

Estudo de estabilidade frente à força iônica: A partir do sobrenadante na concentração micelar crítica foram preparadas diferentes amostras de forma que a concentração salina (NaCl) final ficasse em 2,5; 5; 10 e 20%. As amostras foram submetidas à temperatura ambiente durante 30 minutos e em seguida foram realizadas as medidas de tensão superficial (BARROS, QUADROS, PASTORE, 2008).

Remediação de sedimentos arenosos contaminados por hidrocarbonetos

A coleta da amostra de sedimento foi realizada na praia de Jardim Armação, localizada em Salvador-BA, visto que, trata-se de uma praia do tipo intermediária. O óleo, utilizado para impregnar o sedimento, é oriundo da bacia do Recôncavo, da estação Tangará, do poço satélite de Tangará, apresenta viscosidade de 3970,35 cp e um grau de API 12,81°, ambas a 25 °C, densidade de 0,9805 e ponto de fluidez 24 °C (MELO, 2016).

Tratamento do sedimento: Inicialmente secou-se o sedimento por 24 h *in natura*, para a remoção de uma parcela da umidade. Em seguida, pesou-se aproximadamente 5g do sedimento arenoso, utilizando a balança Shimadzu (AUY 220) e realizou a secagem na estufa por 3 h a 40 °C. Após a realização dessa etapa, reservou a amostra do sedimento em um dessecador.

Contaminação do sedimento: Retirou-se o sedimento do dessecador e pesou-se novamente, a fim de corrigir a massa, caso necessário. A uma porção, contendo 5 g do sedimento, foi realizada a impregnação com petróleo a uma taxa de 3% (0,15g) (MELO, 2016). Em seguida, a amostra foi homogeneizada com auxílio de uma espátula.

Remediação do sedimento através do biossurfactante: A etapa de remediação foi realizada em bancada à temperatura ambiente onde, ao sedimento impregnado adicionou o biossurfactante na concentração micelar crítica (CMC) com um determinado volume (10 e 20 mL), posteriormente, a amostra foi agitada magneticamente em diferentes intervalos de tempo (15, 30 e 60 minutos). Em seguida, realizou-se a centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos (CHAPRÃO, 2015) e fez-se uma filtração a vácuo para remover o sedimento remediado, adicionando 100 mL de água destilada para auxiliar na remoção do sedimento.

O sedimento foi reservado na capela por 24 horas, em seguida secou-se na estufa por 3 h a 40 °C e pesou, posteriormente, lavou-se a amostra com 100 mL de hexano, reservou-a até que a areia estivesse seca e pesou-se novamente, a fim de quantificar o petróleo não remediado (Equação 1).

$$OR = \frac{OC - ONR}{OC} \times 100$$

Equação 1

sendo: OC (g) equivalente à massa total de óleo impregnado no sedimento; ONR (g) a diferença entre a massa seca de areia remediada com o biossurfactante menos a massa da areia final após a lavagem com hexano, ou seja, o óleo que não foi removido; e OR (%) é a porcentagem de óleo removido.

Resultados e Discussão

Caracterização do biossurfactante

A caracterização do biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 foi realizada mediante Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR). A Figura 1 apresenta o resultado obtido na frequência de 4000 a 400 cm⁻¹.

Analisando o espectro vibracional na Figura 1, verificou-se bandas características de peptídeos, indicando as seguintes ligações: N-H, C-O, C-N e canais alifáticos, indicando que esse composto é um lipopeptídeo, podendo assim, confirmar que possui a surfactina no meio quando comparado a surfactina padrão (sigma Aldrich) (OLIVEIRA, 2014).

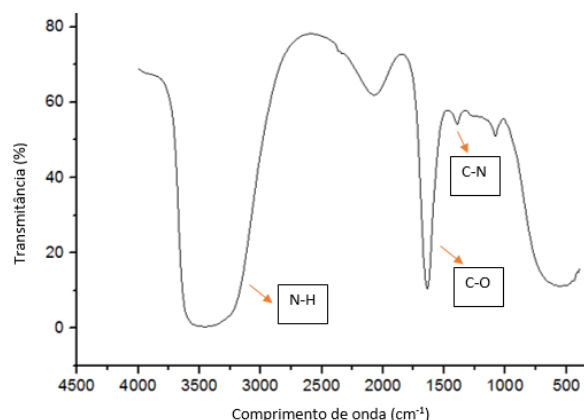


Figura 1. FTIR para surfactina produzida pela *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 em um meio contendo algaroba.

Estudo de estabilidade do biossurfactante

Para a maioria das aplicações do biossurfactante é necessário que haja estabilidade e manutenção de suas propriedades em condições adversas, a fim de manter o seu comportamento e eficiência durante o processo.

Estudo de estabilidade térmica: Foi possível notar na Figura 2 que com o aumento da temperatura de 100 °C para 135 °C houve pouca variação na tensão superficial, e, além disso, o biossurfactante manteve-se estável quando exposto à atividade térmica por até 120 minutos.

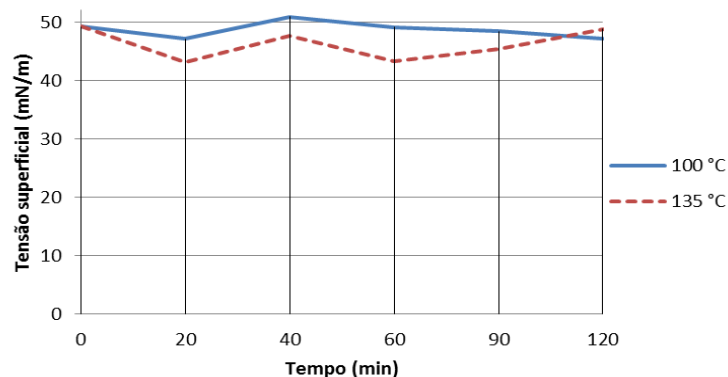


Figura 2. Gráfico de tensão superficial versus tempo.

Barros *et al.* (2008) relatam que em seu experimento com *Bacillus subtilis* LB5a cultivado em manipueira (resíduo da industrialização da mandioca), realizado a 100 °C numa faixa de 0 a 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos, não houve mudanças significativas na tensão superficial, mantendo um comportamento estável.

Estudo de estabilidade frente à força iônica: O biossurfactante, produzido pela *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 em um meio contendo algaroba, apresentou uma leve redução na tensão superficial quando submetido às variações de concentração salina numa faixa de 0 a 10% de NaCl. Ao submeter o biossurfactante a 20% de NaCl a tensão superficial tendeu a voltar a estado inicial, como mostra a Figura 3.

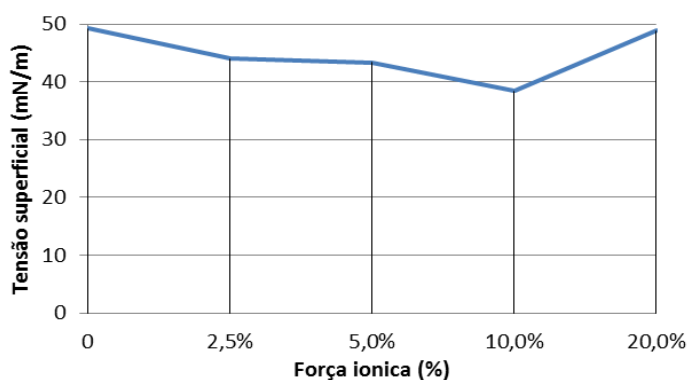


Figura 3. Gráfico de tensão superficial versus força iônica.

Segundo Bongolo (1999) os biossurfactantes são capazes de suportar concentrações de até 10% de NaCl, enquanto que 2% de NaCl é capaz de inativar os surfactantes sintéticos, tornando a remediação com esse biossurfactante em ambientes com maior quantidade de sais possível.

Remediação de sedimentos arenosos contaminados por hidrocarbonetos

Nos testes de remediação o biossurfactante, produzido pela *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 em um meio contendo algaroba, foi capaz de remover até 91,30% do óleo impregnado no sedimento. Além disso, notou-se que a remediação sofre maior influencia com o tempo de contato do que com o volume de biossurfactante, ou seja, com uma menor quantidade de biossurfactante é possível atingir um alto percentual de remediação com um tempo de contato maior, como mostra a Figura 4.

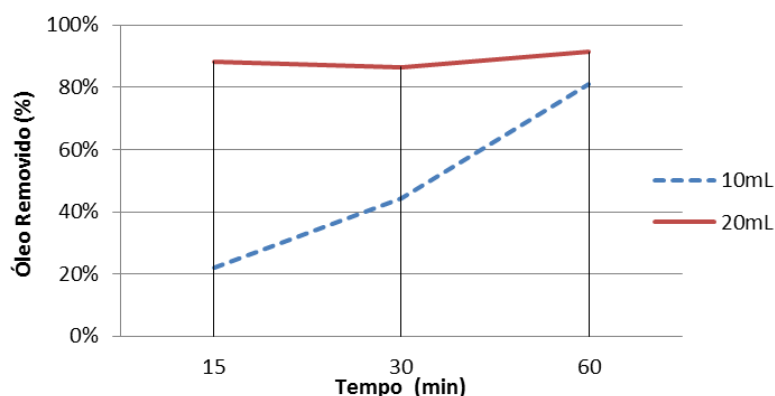


Figura 4. Gráfico da porcentagem de óleo removido versus tempo.

De acordo com Luna *et al.* (2012), em seu experimento com *Candida sphaerica* UCP 0995, cultivado em um meio contendo água destilada suplementada com 9% de resíduo de refinação e 9% de licor de milho por 144 h, o sobrenadante bruto (40 mL) conseguiu remover 95% do óleo derramado na areia após 24h. Comparando com surfactantes sintéticos, em Millioli (2009) foi realizado o experimento com 100 mL contendo JBR 210 e Tween-80 para a lavagem do sedimento contaminado por petróleo, na qual os surfactantes removeram 71% do óleo após 1 h.

Conclusões

Mediante os acidentes envolvendo a contaminação de solos por petróleo e as suas consequências para o ecossistema, este trabalho buscou avaliar a utilização do biossurfactante produzido pela *Bacillus subtilis* UFPEDA 16 em um meio contendo algaroba como alternativa para remediar sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, a fim de reduzir o impacto ambiental.

A partir dos resultados obtidos dos testes de estabilidade, observa-se que o biossurfactante testado apresenta resultados satisfatórios frente às variações de temperatura e de força iônica. A remediação mostrou resultados promissores, tendo um percentual de remoção do óleo bruto adsorvido no sedimento de 91,30%.

Por conseguinte, o biossurfactante mostrou-se eficiente na remediação de sedimentos arenosos contaminados por petróleo. Tornando-se uma alternativa promissora para solucionar tal adversidade.

Agradecimentos

Agradecimentos são prestados à Universidade Salvador, Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal da Bahia pela disponibilização dos laboratórios e materiais utilizados. À Fapesb e ANP/PRH-52 pelo fomento a pesquisa.

Referências Bibliográficas

BANAT, I.M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BARROS F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicações em Alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P. de; PASTORE, G.M, Propriedades Emulsificantes e Estabilidade do Biossurfactante por *Bacillus subtilis* em Manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.

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

CETESB. Fatores que influenciam no grau de impacto. São Paulo. Disponível em: <<http://emergenciasquimicas.cetesb.sp.gov.br/tipos-de-acidentes/vazamentos-de-oleo/impactos-ambientais/fatores-que-influem-no-grau-de-impacto/>>, acesso em 17 de março de 2017.

CHAPRÃO, M. J. Aplicação de biossurfactantes na remediação de areia contaminada com hidrocarbonetos. 139f. Dissertação de mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, Recife/PE, 2015.

COSTA, G.A.N. Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações. 101f. Dissertação de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de ciências de alimentos, Campinas/SP, 2005.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.

DAMIÃO, A. O. Produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa* e a bioprospecção de genes relacionados com raminolipídeos. 74f. Dissertação de mestrado, Universidade Federal da Bahia, Departamento de Biointeração, Salvador/BA, 2012.

GANDRA, M. S. Efeitos do petróleo sobre a associação de macroinvertebrados betônicos de praias arenosas do extremo sul do Brasil. 86f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul/RS, 2005.

JESUS, J. F. Gestão de processos para redução de surfactantes aniônicos de efluente industrial: Estudo de caso. 51p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2016.

LIMA, T. M. S. Produção de biossurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa. 69f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2003.

LOBATO, A. K. C. L. Estudo da produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de poços de petróleo. 148f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN, 2003.

LOBATO, A. K. C. L.; ARAÚJO, M. M. S.; MACEDO, G. R. Acompanhamento do Crescimento da Biomassa e Síntese de Biosurfactantes por Microrganismos Isolados de Poços de Petróleo. 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. 2003.

LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; TAKAKI, G.M.C.; SARUBBO, L.A. Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida Sphaerica* Cultivated in Low-Cost Substrates. **Chemical Engineering**. v. 27, p. 12525-12528, 2012.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources – a review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.

MELO, F. O. Uso de sistema microemulsionado para remediação de sedimento de praia contaminado por petróleo. 50f. Dissertação de graduação. Universidade Federal da Bahia, Departamento de ciência e tecnologia dos materiais, Salvador/BA, 2016.

MILLIOLI, V.S. Avaliação da potencialidade da utilização de surfactantes na biorremediação de solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo. 200f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, 2009.

MONTEIRO, A.G. Metodologia de avaliação de custos ambientais provocados por vazamento de óleo. O estudo de caso do complexo REDUC-DTSE. 293p. Tese (Doutorado em Planejamento Energético e Ambiental), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2003.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**. n. 60, p. 371-380, 2001.

MUNIZ, M.B. Processamento das Vagens de Algaroba (*Prosopis juliflora*) Para a Produção de Bioprodutos. 179f. Tese de doutorado, Universidade Federal de Campina Grande, Departamento de Desenvolvimento de Processos, Campina Grande/PB, 2009.

NITSCHKE, M. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manípueira como substrato. 99p. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciências de Alimentos, Campinas/SP, 2004.

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

OLIVEIRA, D. W. F. Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil). 162f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PIROLLO, M. P. S. Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos. 2006. 73p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Rio Claro/SP.

ROCHA, M. B. Avaliação da estabilidade e das propriedades emulsificantes do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em meio contendo algaroba. Trabalho de final de cursos. Universidade Salvador, Escola de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia de informação, Salvador/BA, 2016.