



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DANIEL TERESKA SANTOS**

**MODELAGEM E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO  
POR *Pseudomonas aeruginosa* EM MEIO DE CULTURA CONTENDO  
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

**Salvador**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DANIEL TERESKA SANTOS**

**MODELAGEM E PRODUÇÃO DE BIODERIVADO PRODUZIDO  
POR *Pseudomonas aeruginosa* EM MEIO DE CULTURA CONTENDO  
RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Josilene Borges Torres Lima Matos

Co-Orientador: Prof. Dr. Elias Ramos de Souza

**Salvador**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Santos, Daniel Tereska

Modelagem e produção de biossurfactante produzido  
por *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultura  
contendo resíduos da indústria do petróleo / Daniel  
Tereska Santos. -- Salvador, 2019.

99 f. : il

Orientadora: Josilene Borges Torres Lima Matos.

Coorientador: Elias Ramos de Souza.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia - PPGBiotec) -- Universidade Federal da  
Bahia, Universidade Federal da Bahia, 2019.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Rhamnolipídeo. 3.  
MEOR. 4. Resíduos petroquímicos. 5. Água produzida. I.  
Matos, Josilene Borges Torres Lima. II. Souza, Elias  
Ramos de. III. Título.

**DANIEL TERESKA SANTOS**

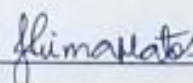
**"Modelagem e Produção de Biossurfactante Produzido por  
*Pseudomonas Aeruginosa* em Meio de Cultura Contendo  
Resíduos da Indústria do Petróleo"**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

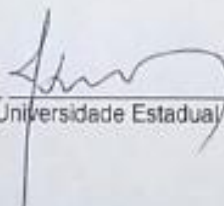
Aprovada em 29 de julho de 2019.

**BANCA EXAMINADORA:**

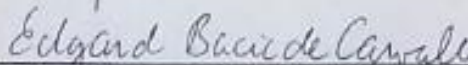
Josilene Borges Torres Lima Matos – Orientadora  
Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia,  
UFBA, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.



Dr. Paulo Fernando de Almeida  
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.



Edgard Bacic de Carvalho  
Doutor em Engenharia Química pela The Pennsylvania State University,  
PSU, Estados Unidos.  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano



Dedico este trabalho à minha mãe Rita e ao meu pai José, pelas orações e suporte que me fizeram chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me amparado e me sustentado até aqui;

À minha mãe Rita e ao meu pai José, por todo o apoio e compreensão. Por todo o cuidado, carinho e afeto durante todos esses anos, os quais fizeram de mim quem hoje sou;

Às minhas irmãs e irmão por todo cuidado familiar dado a mim;

Às amigas e amigos que fiz no curso de Biotecnologia, pelos momentos de prazer e alegria;

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Josilene Matos, pela grande atenção e paciência, pela sua forma de mãe de conduzir, e por ter me introduzido à docência de uma forma tão natural e tranquila;

Ao professor Dr. Paulo Almeida, por acreditar no meu trabalho e ter feito parte da minha orientação todos esses anos, me estimulando sempre a sair do mesmo;

Ao professor Dr. Fabio Chinalia, pela orientação e grande apoio, principalmente nas horas mais sombrias;

Ao professor Dr. Elias Ramos, pela preocupação com o andamento do trabalho, sempre me fazendo pensar e discutir sobre o tema e por ter intermediado a minha bolsa de pesquisa;

À família LABEM por ter aberto as portas para mim e ter me dado a oportunidade de crescer como profissional e como pessoa;

Às minhas *padawans* Luana e Hévllyn, por terem me permitido a troca de conhecimento, me fazendo ter prazer em aprender e ensinar cada dia mais. Espero que tenha contribuído na a formação de vocês, assim como vocês contribuíram na minha.

À família Moura Costa, por sempre ajudar quando precisei, quer fosse com um equipamento, reagente ou com minutos de gargalhadas;

À equipe MEOR/Petrogal/Pólo de inovação do IFBA, pela vivência multidisciplinar, onde eu pude discutir sobre meus conhecimentos e ao mesmo tempo incorporar outros conhecimentos das mais distintas áreas;

Ao laboratório Lablaser, em especial à Pâmela e João, que me auxiliaram em algumas análises de bom grado;

Ao programa de pós-graduação em biotecnologia (PPGBiotec-UFBA), por ter me concedido a oportunidade de trilhar mais uma etapa de vida, que foi o mestrado, e em especial à Dani e Jéssica, por todo o auxílio prestado da melhor forma.

A todas (os) as (os) mestras (es) que compartilharam seu conhecimento comigo e me ajudaram no crescimento profissional;

Aos amigos que, apesar da minha frequência afetiva, me compreendem e sempre estão prontos para demonstrações de amizade e carinho;

A todas (os) as (os) funcionárias (os) do ICS;

À Petrogal (grupo Galp) pela bolsa concedida e pelos recursos que foram de extrema importância ao desenvolvimento deste trabalho e da minha formação;

À ANP;

A todas (os) que direta ou indiretamente me ajudaram na vida acadêmica e/ou profissional;

Obrigado!

Meditai se só as nações fortes podem  
fazer ciência, ou se é a ciência que as  
torna fortes.  
Walter Osvaldo Cruz



SANTOS, Daniel Tereska. MODELAGEM E PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM MEIO DE CULTURA CONTENDO RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO. 99 f. il. 2019. Dissertação (Mestrado)– Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

## RESUMO

Os ramnolípídeos são biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, com propriedades de reduzir as tensões superficial e interfacial, além de conseguir emulsificar duas fases insolúveis. Tais bioativos apresentam vantagens aos surfactantes obtidos por via química por serem de mais fácil degradação no ambiente, apresentarem baixa toxicidade e poderem ser produzidos a partir de substratos renováveis. Apesar das diversas vantagens dos biossurfactantes em relação aos surfactantes de origem química, o uso do primeiro ainda não é muito praticado na indústria petroquímica, principalmente pelos altos custos de produção. Uma alternativa seria a utilização de resíduos industriais como a água produzida do petróleo e a glicerina bruta, ambos rejeitos da indústria petroquímica, o que não só baratearia os custos de produção, como se daria uma destinação ao resíduo, além de agregar valor a estes. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi produzir ramnolípídeo utilizando água produzida e glicerina bruta como substratos, viabilizando e otimizando o processo de produção deste bioativo. Para tal, se testou a água produzida de forma bruta e diluída, avaliou-se a influência da salinidade na produção de ramnolípídeo e por fim, otimizou-se o meio de produção em relação à fonte de nitrogênio (onde as fontes  $\text{NaNO}_3$  e extrato de levedura foram testadas em concentrações variadas) e à fonte de carbono (testando diversas concentrações de glicerina bruta). Como resultados, observou-se uma certa influência negativa da água produzida sobre a produção de ramnolípídeo, problema que pôde ser contornado com um pré-tratamento do resíduo. A salinidade também se mostrou influenciar negativamente na produção de ramnolípídeo, onde esta influência foi verificada logo a partir da concentração de 2% (p/v) de NaCl. Na avaliação das fontes de nitrogênio, não se verificou diferenças significativas entre as melhores concentrações de  $\text{NaNO}_3$  e o extrato de levedura, porém, se tratando das propriedades físico-químicas da molécula como tensão superficial e interfacial, o extrato de levedura mostrou-se como sendo a melhor opção, nos moldes do presente estudo. Quanto à fonte de carbono, a concentração de 25 ml/l de glicerina bruta propiciou produções de 9,33 G/L de ramnolípídeo, resultados

bastante satisfatórios em comparação à literatura. A caracterização da molécula por FT-IR e espectrometria de massas apresentou fortes semelhanças em relação às moléculas produzidas na literatura. Sendo assim, o emprego da dos resíduos petroquímicos água produzida e da glicerina bruta na produção de ramnolípídeo nas condições estudadas se mostrou uma forma satisfatória à utilização desses resíduos.

PALAVRAS CHAVE: Ramnolípídeo, Resíduos Petroquímicos, EOR, MEOR, Água produzida, glicerina bruta, *Pseudomonas aeruginosa*.

SANTOS, Daniel Tereska. MODELING AND PRODUCTION OF BIOSURFACTANT PRODUCED BY *Pseudomonas aeruginosa* IN CULTURE MEDIUM CONTAINING WASTE FROM OIL INDUSTRY. 99 pp. ill. 2019. Master Dissertation – Instituto de Ciência da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

Rhamnolipids are biosurfactants produced by *Pseudomonas* genus, with surface and interfacial tension reduction properties, besides being able to emulsify two insoluble phases. These bioactives present advantages to chemical surfactants because they are more easily degraded in the environment, have low toxicity and can be produced from renewable substrates. Despite the many advantages of biosurfactants over chemical surfactants, its use is not yet widely practiced in the petrochemical industry, especially due to its high production costs. An alternative would be the industrial waste use such as produced water and crude glycerin, both waste from the petrochemical industry, which would not only lower production costs, but would also give the waste a destination and add value to them. Thus, the aim of this work was to produce rhamnolipid using produced water and crude glycerin as substrates, enabling and optimizing the production process of this bioactive. For this purpose, the crude and diluted water was tested, the influence of salinity on rhamnolipid production was evaluated and finally, the production medium was optimized in relation to the nitrogen source (where  $\text{NaNO}_3$  sources and nitrogen extract yeast were tested at varying concentrations) and carbon source (testing various concentrations of crude glycerin). As a result, a certain negative influence of the produced water on rhamnolipid production was observed, a problem that could be circumvented with a residue pre-treatment. Salinity was also negatively influenced in rhamnolipid production, where this influence was verified from the 2% (w / v) NaCl concentration. In the nitrogen sources evaluation, there were no significant differences between the best  $\text{NaNO}_3$  concentrations and the yeast extract. However, considering the molecule physicochemical properties as surface and interfacial tension, the yeast extract was found to be the best option, along the lines of this study. Regarding the carbon source, the concentration of 25 ml / L crude glycerin provided yields of 9.33 g / L rhamnolipid, very satisfactory results compared to the literature. The characterization of the molecule by FT-IR and mass spectrometry showed strong similarities in relation to the molecules produced in the literature. Thus, the use of petrochemical residues

produced water and crude glycerin in rhamnolipid production under the studied conditions proved to be a satisfactory way to use these residues.

KEYWORDS: Rhamnolipid, Petrochemical wastes, EOR, MEOR, Produced Water, Crude Glycerin, *Pseudomonas aeruginosa*.

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1: Estratégias EOR: aplicações, tecnologia utilizada e microrganismos produtores .....  | 24 |
| Tabela 2: Valores codificados e decodificados do planejamento experimental DCCR 2 <sup>2</sup> , com 5 repetições do ponto central. ....   | 39 |
| Tabela 3: Índice de emulsificação após 24 horas em tubo contendo querosene e caldo fermentado livre de células a partir de meio produzido com concentrações 0 a 10G/L de NaCl e água destilada. No tratamento DI foi utilizada água produzida dialisada e não houve adição de NaCl. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas de incubação e 30°C. .... | 51 |
| Tabela 4: Concentração das variáveis independentes fonte de carbono (glicerina bruta) e fonte de nitrogênio (extrato de levedura), indicadas a partir do DCCR, e valores de índice de emulsificação (IE24%), tensão superficial (com seus valores inversos) (mN/m) e produção de ramnolipídeo (G/L). ....  | 57 |
| Tabela 5: Resumo das fases de produção e consumo de ramnolipídeo nas fases da cinética em shaker e reator. ....  | 69 |
| Tabela 6: Valores de produção máxima de ramnolipídeo (PRL), biomassa (pX), coeficiente de crescimento específico ( $\mu_{esp}$ ), tempo em que houve a produção máxima do ramnolipídeo (T), índice produto / tempo ( $Y_p/t$ ), índice produto / biomassa ( $Y_p/X$ ) em shaker e em biorreator. ....  | 70 |

## LISTA DE EQUAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Equação 1: Fórmula para índice de emulsificação..... | 42 |
|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estruturas químicas das moléculas de HAA (ácido 3-(3-hidroxialcanolox)alcanoato) (A), mono-ramnolípido (B) e di-ramnolípido (C) Adaptado SOBERÓN-CHÁVEZ et al., (2005). .....29
- Figura 2: Produção de mono e di-ramnolípido, com os substratos e suas respectivas enzimas. Adaptado de SOBERÓN-CHÁVEZ et al., (2005). .....30
- Figura 3: Comportamento cinético da *Pseudomonas aeruginosa* em meio TSB, utilizado para propagação celular, no período de 48 horas.....44
- Figura 4: Produção de ramnolípido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio LABEM com variação na concentração de água produzida, sendo essa variação correspondente a utilização de 30, 50 e 100% (v/v) de água produzida, diluída em água destilada (AP03, e AP05 e AP10, respectivamente) e com o uso de meio LABEM contendo apenas água destilada e água produzida dialisada (AD e DI respectivamente).....45
- Figura 5: Índice de emulsificação após 24 horas, utilizando caldo livre de células obtido através de bioprocessamento durante 120 horas por *P. aeruginosa*. Nos presentes ensaios, a concentração de água produzida bruta foi variada, sendo essa variação correspondente a utilização de 30, 50 e 100% (v/v) de água produzida, diluída em água destilada (AP03, e AP05 e AP10, respectivamente) e com o uso de meio LABEM contendo apenas água destilada e água produzida dialisada (AD e DI respectivamente).....46
- Figura 6: Tensão superficial utilizando caldo livre de células obtido através de bioprocessamento durante 120 horas por *P. aeruginosa*. Nos presentes ensaios, a concentração de água produzida bruta foi variada, sendo essa variação correspondente a utilização de 30, 50 e 100% (v/v) de água produzida, diluída em água destilada (AP03, e AP05 e AP10, respectivamente) e com o uso de meio LABEM contendo apenas água destilada e água produzida dialisada (AD e DI respectivamente).....47
- Figura 7: Tensão interfacial utilizando caldo livre de células obtido através de bioprocessamento durante 120 horas por *P. aeruginosa*. Apresenta-se a água produzida bruta sem participação no bioprocessamento (C), o meio onde se utilizou apenas água destilada (AD) e o meio onde se utilizou apenas água dialisada (DI). .....48
- Figura 8: Concentração de ramnolípido produzido em meio com diferentes concentrações de salinidade (0 a 10G/L) em água destilada e em água produzida dialisada sem adição de NaCl (DI), incubado por 120 horas, a 30°C.....50
- Figura 9: Concentração de ramnolípidos produzidos em meios contendo NaNO<sub>3</sub> (nas concentrações de 2, 3 e 4G/L) e extrato de levedura (nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75G/L), utilizadas como fonte de nitrogênio. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C. ....52
- Figura 10: Índice de emulsificação após 24 horas utilizando querosene e caldo livre de células a partir de meio fermentado produzido com extrato de levedura (nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75G/L), utilizadas como fonte de nitrogênio. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C. ....53
- Figura 11: Medidas de tensão superficial obtidas a partir do caldo livre de células. As amostras foram preparadas em meios de cultura contendo 2, 3, 4G/L (amostras N2,

|   |    |
|---|----|
| N3 e N4 respectivamente) de NaNO <sub>3</sub> e 0,25; 0,5; e 0,75G/L (amostras Y25, Y50 e Y75 respectivamente) com água produzida pré-tratada.....  | 54 |
| Figura 12: Medidas de tensão interfacial obtidas a partir do caldo livre de células das melhores amostras. As amostras foram preparadas em meios de cultura contendo 2 e 4G/L (amostras N2 e N4 respectivamente) de NaNO <sub>3</sub> e 0,25 e 0,75G/L (amostras Y25 e Y75 respectivamente) com água produzida pré-tratada. Os valores de tensão interfacial do controle (C) foram obtidos através da medição da tensão em meio não bioprocessado, contendo água produzida..... | 55 |
| Figura 13: Gráfico de Pareto (A) e tabela ANOVA (B) na avaliação do índice de emulsificação (% IE24) testando as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio do meio de cultura.....   | 58 |
| Figura 14: Gráfico de Pareto na avaliação do inverso da tensão superficial (1-TS) (mN/m), testando as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio do meio de cultura. ....   | 59 |
| Figura 15: Gráfico de Pareto (A) e tabela ANOVA (B) na avaliação da concentração de ramnolipídeo (G/L), testando as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio do meio de cultura.....  | 60 |
| Figura 16: Produção de ramnolipídeo em meio LABEM, com água produzida, utilizando glicerina bruta nas concentrações de 0 a 30ml/l. ....   | 61 |
| Figura 17: Índice de emulsificação entre o querosene e o caldo livre de células, produzido a partir de meio contendo concentrações de 0 a 30ml/l de glicerina bruta, utilizada como fonte de carbono.....   | 62 |
| Figura 18: Cinética de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em shaker.....  | 64 |
| Figura 19: Cálculo do $\mu$ específico do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em shaker de 4 a 20 horas.....   | 64 |
| Figura 20: Cinética de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em reator. ....   | 65 |
| Figura 21: Cálculo do $\mu$ específico do crescimento em reator 0 a 20 horas.....   | 66 |
| Figura 22: Cinética de produção de ramnolipídeo em shaker. ....   | 66 |
| Figura 23: Taxas de produção e consumo de ramnolipídeo nas fases da cinética em shaker .....  | 67 |
| Figura 24: Cinética de produção de ramnolipídeo em biorreator.....  | 68 |
| Figura 25: Taxas de produção e consumo de ramnolipídeo nas fases da cinética em reator.....   | 68 |
| Figura 26: Concentração de ramnolipídeos produzidos em meios contendo água produzida de diferentes coletas (coleta 3, AP03; coleta 4, AP04 e coleta 5, AP05). O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C. ....   | 71 |
| Figura 27: Índice de emulsificação após 24 horas utilizando querosene e caldo livre de células a partir de meio fermentado produzido com água produzida de diferentes coletas (3, 4 e 5). O meio com água destilada (AD) foi tido como controle. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C. ....  | 72 |
| Figura 28: Medidas de tensão superficial obtidas a partir do caldo livre de células, obtido a partir de meio bioprocessado, produzido com água produzida de diferentes coletas (3, 4 e 5). O meio com água destilada (AD) foi tido como controle. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C. ....   | 73 |



|  |    |
|--|----|
| Figura 29: Medidas de tensão interfacial obtidas a partir do caldo livre de células das amostras utilizando diferentes coletas de água produzida (3, 4 e 5). Os valores de tensão interfacial do controle (C3, C4 e C5) foram obtidos através da medição da tensão em meio não bioprocessado contendo água produzida. .... | 74 |
| Figura 30: Espectro FT-IR do ramnolipídeo produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio contendo água produzida e glicerina bruta.....   | 75 |
| Figura 31: Espectrometria de massa do ramnolipídeo produzido por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio contendo água produzida e glicerina bruta. ....   | 76 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD - Água Destilada  
AP - Água Produzida  
BRS - Bactérias Redutoras de Sulfato  
CA1 - Campo 1  
CEOR - Chemical Enhanced Oil Recovery  
CMC - Concentração Micelar Crítica  
cm<sup>-1</sup> – Número de onda  
C/N - Proporção Carbono Nitrogênio  
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente  
DI - Água Dialisada  
Eh - Potencial Redox  
EOR - Enhanced Oil Recovery  
EPS – Exopolissacarídeo  
FTIR- Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier  
GB - Glicerina Bruta  
G/L - Gramas por Litro  
H - Altura  
h(s) - hora(s)  
HAA - ácido 3-(3-hidroxi)alcanoico  
HFE - Altura da fase emulsionada  
IE24 - Índice de Emulsificação após 24 horas  
MEOR - Microbial Enhanced Oil Recovery  
MKO - Mango Kernel Oil  
mG/L - Miligramas por litro  
mL - Mililitro  
mN/m - Milinewtons por metro  
Mpa - Megapascal  
mV – Milivolt  
m/z – Razão massa sobre a carga  
nm – Nanômetros  
PBS - Tampão Fosfato Salino  
pH - Potencial de Hidrogênio

pRL – Produção máxima de ramnolípídeo  
pX – Produção máxima de biomassa  
RPM - Rotação Por Minuto  
T – Tempo  
TIF - Tensão Interfacial  
TSB - Tryptic soy broth  
USD - United States Dollar  
YpRL/pX – Índice produto / biomassa  
YpRL/t – Índice produto / tempo  
xg - RCF ou força G  
°C - Graus Celsius  
μesp – Coeficiente de crescimento específico  
μS/m - Microsimens por metro

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>   | <b>21</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>35</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GERAL  | 35        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 35        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b>  | <b>36</b> |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>  | <b>37</b> |
| 4.1      | EXPERIMENTAL  | 37        |
| 4.1.1    | Microrganismo   | 37        |
| 4.1.2    | Cinética de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio de propagação celular                                      | 37        |
| 4.1.3    | Preparação do pré-inóculo e inóculo   | 37        |
| 4.1.4    | Produção de ramnolípido em água produzida diluída e sem diluição  | 37        |
| 4.1.5    | Diálise da água produzida   | 38        |
| 4.1.6    | Influência da salinidade no crescimento microbiano e na produção e qualidade do bioproduto                                  | 38        |
| 4.1.7    | Teste de diferentes fontes de nitrogênio para compor o meio de cultura  | 39        |
| 4.1.8    | Otimização das condições nutricionais de carbono e nitrogênio através da metodologia de superfície de resposta              | 39        |
| 4.1.9    | Avaliação da concentração de glicerina bruta na produção de ramnolípido   | 40        |
| 4.1.10   | Modelagem cinética da produção de ramnolípido em meio com água produzida e glicerina bruta otimizado em shaker e biorreator | 40        |
| 4.1.11   | Avaliação da influência de diferentes coletas de água produzida para composição do meio de produção de ramnolípido          | 41        |
| 4.2      | ANALÍTICO   | 41        |
| 4.2.1    | Extração e quantificação do bioproduto  | 41        |
| 4.2.2    | Biomassa  | 42        |
| 4.2.3    | Índice de emulsificação   | 42        |
| 4.2.4    | Tensão superficial  | 42        |
| 4.2.5    | Tensão interfacial  | 42        |
| 4.2.6    | FT-IR   | 43        |
| 4.2.7    | Espectrometria de massa   | 43        |
| <b>5</b> | <b>RESULTADOS</b>   | <b>44</b> |
| 5.1      | CINÉTICA EM MEIO DE PROPAGAÇÃO CELULAR  | 44        |
| 5.2      | INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE ÁGUA PRODUZIDA BRUTA E DIALISADA:   | 45        |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 5.2.1 | Na quantificação de ramnolípídeo .....  | 45 |
| 5.2.2 | No índice de emulsificação.....   | 46 |
| 5.2.3 | Na tensão superficial.....  | 46 |
| 5.2.4 | Na tensão interfacial.....  | 47 |
| 5.3   | AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE .....   | 49 |
| 5.3.1 | Na quantificação de ramnolípídeo .....  | 49 |
| 5.3.2 | No índice de emulsificação do produto formado.....  | 50 |
| 5.4   | TESTE DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO<br>52  |    |
| 5.4.1 | Na quantificação de ramnolípídeo .....  | 52 |
| 5.4.2 | Índice de emulsificação do produto formado .....  | 52 |
| 5.4.3 | Tensão superficial .....  | 53 |
| 5.4.4 | Tensão interfacial .....  | 54 |
| 5.5   | OTIMIZAÇÃO ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE<br>RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS NITROGÊNIO E CARBONO ..... | 56 |
| 5.6   | AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA GLICERINA BRUTA COMO FONTE<br>DE CARBONO .....                                 | 61 |
| 5.6.1 | Na quantificação de ramnolípídeo .....  | 61 |
| 5.6.2 | No índice de emulsificação do produto formado.....  | 62 |
| 5.7   | MODELAGEM CINÉTICA DA PRODUÇÃO OTIMIZADA EM SHAKER E<br>BIORREATOR.....                                     | 63 |
| 5.8   | AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES COLETAS DE ÁGUA<br>PRODUZIDA NA FORMULAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....    | 71 |
| 5.8.1 | Na quantificação de ramnolípídeo .....  | 71 |
| 5.8.2 | No índice de emulsificação.....   | 72 |
| 5.8.3 | Na tensão superficial.....  | 72 |
| 5.8.4 | Na tensão interfacial.....  | 73 |
| 5.8.5 | FT-IR .....   | 75 |
| 5.8.6 | Espectrometria de massa .....   | 76 |
| 6     | CONCLUSÕES .....  | 78 |
| 7     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 80 |

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização humana, sempre precisou-se de combustíveis, fossem eles madeira, óleo de baleia ou mesmo óleos fósseis. Entre todos esses, os combustíveis fósseis desempenharam um papel fundamental na revolução industrial (SILVA et al., 2014). Principalmente a partir do último século, muitas novas tecnologias de energias renováveis foram sendo propostas e desenvolvidas para minimizar e/ou substituir a dependência por combustíveis fósseis. Pode-se citar estratégias como biocombustíveis (bioetanol, biodiesel, hidrogênio, etc.), energias solares e eólicas, combustíveis de células microbianas, e energias alternativas como as nucleares (GEETHA et al., 2018). Todavia, há questões a serem respondidas, sobretudo a respeito do quão seguro, prático e econômico são essas abordagens energéticas (principalmente se tratando de energia nuclear), uma vez que muitas dessas abordagens estão nos seus estágios iniciais (a exemplo do uso do bio-hidrogênio). Outro fator importante é que a infraestrutura da sociedade atual ainda se baseia no uso dos combustíveis fósseis (ELRAIES et al., 2012). Os combustíveis fósseis estão intimamente ligados à toda vida global. Por conta disso, o preço do óleo bruto interfere indiretamente nas relações políticas e de mercado pelo mundo (GEETHA et al., 2018). Contudo, a indústria do petróleo vem desenvolvendo aperfeiçoamentos e modernizações para garantir melhorias eficazes e econômicas. Entre estas tecnologias, estão ações relacionadas à recuperação avançada de óleo, denominada *Enhanced Oil Recovery* (EOR), desenvolvidas para melhorar os rendimentos de extração nos reservatórios petrolíferos (AL-SULAIMANI et al., 2011; KOKAL; AL-KAABI, 2010; STOSUR, 2003).

No primeiro estágio da extração de petróleo, o óleo é produzido com a pressão natural do reservatório (devido ao gás natural também presente). Nesta fase apenas 10-20% do óleo é recuperado. Com o passar do tempo, a produção do óleo é reduzida, por ação da diminuição da pressão natural do reservatório. Neste momento se faz necessária a recuperação secundária para aumentar o rendimento. A recuperação secundária consiste na injeção de fluidos (*water-flooding*), gás (como dióxido de carbono, nitrogênio ou gases naturais) ou vapor (manutenção da pressão), que quebram a barreira formada pelos hidrocarbonetos e melhoram o deslocamento do óleo (KRYACHKO, 2018; LAZAR et al., 2007), permitindo que este poço chegue a sua recuperação total (primária + secundária, constituindo o primeiro meio físico na

recuperação do reservatório) de 40-50% de óleo (SEN, 2008; BACHMANN et al., 2014; GAO et al., 2016; ELRAIES et al., 2012). Sendo assim, aproximadamente dois terços do total do óleo bruto permanecem presos nos reservatórios (ASHISH; DEBNATH (DAS), 2018).

As principais causas que levam a essa pequena recuperação são a baixa permeabilidade de alguns reservatórios, a alta viscosidade do óleo bruto e a elevada tensão interfacial entre o óleo bruto e a fase aquosa, o que acarreta em alta capilaridade, fazendo com que esse óleo fique preso a pequenos poros de rocha no reservatório (SEN, 2008; GUDIÑA et al., 2012; BROWN, 2010).

Com a necessidade de se explorar campos maduros (reservatórios que já passaram pela recuperação primária e secundária e apresentam baixa produtividade), nos últimos anos mais atenção foi voltada à técnicas de recuperação terciária, que ficaram conhecidas como EOR para a continuação da mobilidade do óleo nos reservatórios (SEN, 2008; YOUSSEF et al., 2009; BROWN, 2010).

A natureza das interações do petróleo com os elementos ao redor (neste caso, principalmente com as rochas dos reservatórios) é um dos principais desafios para a recuperação terciária. A alta permeabilidade das rochas pode levar a ocorrência de zonas mortas e caminhos preferenciais, o que torna o óleo inacessível à recuperação através de métodos tradicionais de *water-flooding*, por exemplo. A complexidade da recuperação acontece por conta das diferentes viscosidades e imiscibilidade entre os fluidos, combinados com as forças de interferência (PATEL et al., 2015; OKEKE; LANE, 2012; OHMS et al., 2010).

Segundo ZHAO et al., (2017), a EOR (quando da utilização de moléculas químicas, chamado de CEOR, do inglês *Chemical Enhanced Oil Recovery*) é uma tecnologia avançada que objetiva a recuperação do máximo de óleo ainda preso nos reservatórios.

No processo de CEOR, moléculas químicas como dispersantes, solventes, ácidos, polímeros, emulsificantes e surfactantes são utilizados juntamente com técnicas de recuperação secundária para uma retomada de produção em campos de óleo abandonados ou com baixa produção (maduros) (PATEL et al., 2015).

Visto que esses químicos muitas vezes utilizam moléculas tóxicas na sua produção (como a utilização de óxido de etileno na produção de surfactantes não iônicos) (LYNCH et al., 1984; DESBÈNE et al., 1987), a utilização destes trazem diversos riscos, não só ambientais (especialmente quando presentes com óleo, uma

vez que deixa resíduos que são de difícil descarte sem afetar de modo danoso o meio ambiente), mas também econômicos (RICO-MARTÍNEZ et al., 2013; MULLIGAN et al., 2001; GUDIÑA et al., 2012).

Ainda assim, tecnologias baseadas em químicos para a recuperação terciária ainda são mais utilizadas devido à fácil aplicação e disponibilidade de uma gama desses produtos. Contudo, as tecnologias baseadas em microrganismos (MEOR - *Microbial Enhanced Oil Recovery*) vêm ganhando espaço, devido a sua natureza *eco-friendly*, baixa toxicidade, biodegradabilidade, melhor segurança em sua aplicação e custos de aplicação competitivos (GUDIÑA et al., 2012; AL-SULAIMANI et al., 2011; LAZAR et al., 2007). Ademais, as biofábricas celulares necessitam de um baixo aporte de energia e a aplicação do bioprocessos, e não depende diretamente do preço global do óleo bruto (SEN, 2008).

Em alternativa à CEOR, a MEOR é considerada uma importante [bio]tecnologia de recuperação terciária de óleo, que representa um melhor custo efetivo. Nesta abordagem tecnológica, os bioprodutos podem ser produzidos a partir de matéria prima barata (utilizando até mesmo resíduos no bioprocessos), onde se lança mão de microrganismos selecionados ou dos bioprodutos produzidos por estes, análogos aos já utilizados pela CEOR para a recuperação de óleo residual (PATEL et al., 2015; GUDIÑA et al., 2012; SEN, 2008). Esse tipo de tecnologia é utilizado quando a injeção de água (recuperação secundária) não é mais economicamente viável, e apresenta a possibilidade de prolongar a exploração deste reservatório (SEN, 2008; GEETHA et al., 2018). Por conta dessa tecnologia ser menos danosa ao meio ambiente, apresentar largo potencial e implementação simples, é esperado que a MEOR se torne a principal tecnologia de recuperação avançada de petróleo no futuro (ZHAO et al., 2017).

A definição da utilização de microrganismos na EOR foi primeiramente vista em 1926 por Beckman, sendo seguido por alguns outros estudos iniciais no campo da MEOR até os anos 1940 (LAZAR et al., 2007). Até que Zobell iniciou aplicações com a MEOR (utilizando bactérias redutoras de sulfato para aumentar a recuperação de óleo em 1946 – (PATEL et al., 2015) e explicou o mecanismo responsável por esta tecnologia, além de patenteá-la (Zobell, 1946). Em 1954, foi presenciado o primeiro ensaio de campo utilizando a abordagem MEOR nos campos de Lisboa e de cidades dos Estados Unidos (No Condado de Union e no estado do Arkansas) (GEETHA et al., 2018). Desde então, seguiram-se várias pesquisas nesse tema e muitos trabalhos



abordando ensaios em campo foram publicados (CHAI et al., 2015; MAUDGALYA et al., 2007).

A recuperação terciária através da MEOR se utiliza de mecanismos como: (i) aumento da pressão e diminuição da viscosidade do óleo a partir de formação de biogases; (ii) degradação de rochas de calcário e carbonato através da produção de ácidos orgânicos e biossolventes (SEN, 2008; LAZAR et al., 2007); (iii) obstrução das zonas porosas de alta permeabilidade, causando mudança na direção da água de injeção para as zonas com óleo por acúmulo de biomassa (PATEL et al., 2015) ou formação de biopolímeros (estes últimos também responsáveis pelo aumento da viscosidade da água de injeção) (PATEL et al., 2015; SEN, 2008); (iv) formação de óleo a partir da degradação de grandes moléculas orgânicas, o que resulta em diminuição da viscosidade do óleo (AL-SULAIMANI et al., 2011); e por fim, (v) redução da tensão interfacial do sistema água-óleo-rocha e da viscosidade do óleo, com a utilização de surfactantes (PATEL et al., 2015; SEN, 2008; GEETHA et al., 2018).

Tabela 1: Estratégias EOR: aplicações, tecnologia utilizada e microrganismos produtores

| <b>Bioproduto</b> | <b>Ação</b>  | <b>Utilizada na MEOR/CEOR</b> | <b>Alguns Microrganismos Produtores</b>                   |
|-------------------|--|-------------------------------|---|
| Biomassa          | Obstrução seletiva, alteração na permeabilidade                          | Somente na MEOR               | <i>Bacillus, Leuconostoc, Xantomonas</i>                  |
| Surfactantes      | Diminuição da TIF, emulsificação, diminuição da viscosidade              | MEOR/CEOR                     | <i>Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Pseudomonas</i> |
| Polímeros         | Obstrução seletiva, alteração na viscosidade                             | MEOR/CEOR                     | <i>Bacillus, Brevibacterium, Leuconostoc, Xantomonas</i>  |
| Solventes         | Redução da viscosidade e aumento da permeabilidade                       | MEOR/CEOR                     | <i>Clostridium, Zymomonas, Klebsiella</i>                 |
| Ácidos            | Aumento da permeabilidade, emulsificação                                 | MEOR/CEOR                     | <i>Clostridium, Enterobacter</i>                          |
| Gases             | Expansão do óleo, diminuição da viscosidade e da TIF, aumento na pressão | MEOR/CEOR                     | <i>Clostridium, Enterobacter, Methanobacterium</i>        |

Com relação à aplicação da tecnologia MEOR, os países que contam com as maiores áreas de utilização são: Estados Unidos, Venezuela, China, Indonésia e parte da Índia (PATEL et al., 2015; GEETHA et al., 2018). Também há relatos de estudos pilotos na região noroeste do Peru (MAURE et al., 2005).

Uma vez que as condições apropriadas na utilização da MEOR irão variar de acordo com as características do reservatório estudado, algumas propriedades inerentes ao reservatório deverão ser levadas em consideração, como: formação geológica do reservatório, pH, temperatura, pressão, salinidade, nutrientes e microbiota endógena (BANAT, 1995).

Duas diferentes estratégias podem ser adotadas na MEOR: estratégia *in situ* ou *ex situ*. No modelo *in situ*, os microrganismos podem ser adicionados ao reservatório, ou há a possibilidade de se estimular microrganismos do próprio reservatório através da injeção de nutrientes. Nesta abordagem, há um fechamento temporário do poço, com injeção de água em sequência. No período de fechamento do poço, os microrganismos irão produzir diferentes bioprodutos utilizados para a EOR (GEETHA et al., 2018).

Na estratégia *ex situ*, os bioprodutos são produzidos pelos microrganismos aerobicamente, fora do poço, e injetados diretamente nos reservatórios para a EOR (ZHAO et al., 2017; AL-BAHRY et al., 2013; AL-SULAIMANI et al., 2011).

Segundo alguns autores, a estratégia *in situ* é mais favorável economicamente, porém necessita de microrganismos capazes de produzir quantidades suficientes de biossurfactantes dentro do reservatório (GUDIÑA et al., 2012). Para outros autores, a exemplo de PATEL et al., (2015), a estratégia *ex situ* é mais adequada, uma vez que permite maior controle sobre a condição do reservatório, como composição específica de bioativos, já que os compostos podem ser selecionados previamente e injetados.

Alguns outros pontos devem ser listados sobre a abordagem *in situ*:

- (i) Os nutrientes são injetados no reservatório, seguido por uma injeção de água e fechamento do reservatório por 1 a 6 meses, onde depois há nova injeção de água e só então há a avaliação da recuperação (GEETHA et al., 2018);
- (ii) Não é completamente possível o controle de microrganismos prejudiciais, já presentes nos reservatórios (como Bactérias Redutoras de Sulfato – BRSs, que se estimuladas, podem gerar prejuízos financeiros -como equipamentos danificados- e ambientais) (BAO et al., 2009);
- (iii) A quantidade de biossurfactante produzido não pode ser controlada;
- (iv) São possíveis apenas aplicações limitadas, já que os microrganismos devem crescer em diferentes condições, se há o interesse dessa

- aplicação em diferentes reservatórios (SEN, 2008), (BACHMANN et al., 2014);
- (v) Apenas microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos podem ser utilizados nos reservatórios, já que há muito pouca concentração ou até ausência de oxigênio nos reservatórios (GEETHA et al., 2018);
  - (vi) Apenas alguns poucos parâmetros ambientais podem ser manipulados nos reservatórios (temperatura, pH e pressão devem ser levados em consideração, porém, ainda assim, são parâmetros difíceis de serem manipulados) (ZHAO et al., 2017), limitando assim o número de reservatórios que podem ser colonizados pelos microrganismos (PATEL et al., 2015; GUDIÑA et al., 2012);
  - (vii) Embora se acredite que os microrganismos crescidos em laboratório irão competir bem com os microrganismos autóctones, já aclimatados às condições adversas do poço, nem sempre esse pensamento é assertivo, pois os microrganismos ali injetados ainda precisam ultrapassar diversos obstáculos para se estabelecerem e produzirem nesse lugar hostil (SEN, 2008);
  - (viii) Outros problemas como a ocorrência de depósitos de parafinas e asfaltenos também podem ser citados (PATEL et al., 2015).

SEN, (2008) ainda pontua que para que possa ocorrer viabilidade na MEOR *in situ*, há a necessidade da utilização de microrganismos que consigam sobreviver e produzir bioativos em temperaturas superiores a 85°C, e pressão superior a 17,23 MPa, além de alto pH e salinidade.

Biossurfactantes se apresentam como um dos métodos mais promissores na recuperação de óleo bruto residual nos campos maduros através da MEOR (SIMPSON et al., 2011). Diversos trabalhos apontam a alta eficiência dos biossurfactantes no que diz respeito à retirada de óleo em sistemas *sand-pack* (sistema de areia empacotada) ou *core-flood* (sistema por inundação de núcleo). Esta recuperação foi de 10 a 95% do óleo retido, o que torna essa abordagem bastante promissora (ZHAO et al., 2016; PATEL et al., 2015; FERNANDES et al., 2016). Com a utilização de biossurfactantes através da MEOR *ex situ*, podem ser citadas diversas vantagens, a saber: (i) há a possibilidade do uso de substrato de baixo custo como os resíduos agro-industriais; (ii) o processo pode ser aeróbio, tornando a produção mais

rápida; (iii) o procedimento conta com altas chances de sucesso, em virtude da possibilidade de testar e estudar melhor o produto em laboratório antes da sua devida aplicação, incluindo estudos de estabilidade; e por fim, (iv) o fato de não haver a necessidade de modificação no local de aplicação do biossurfactante, uma vez que a infraestrutura/aparato utilizado em técnicas já bastante estabelecidas (como a CEOR) podem ser utilizadas. Os biossurfactantes produzidos *ex situ* podem ser injetados nos poços seguidos de fluido de injeção ou podem ser dissolvidos no próprio fluido, sem a necessidade do fechamento do poço por nenhum período (GEETHA et al., 2018).

Biossurfactantes compõem uma classe de surfactantes produzidos intra ou extracelularmente a partir de organismos vivos (SOUSA, DE et al., 2011). Estas biomoléculas são superfícies ativas produzidas por uma grande variedade de bactérias, fungos e leveduras e podem ser classificados em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoaminoácidos, lipoproteínas, lipopolissacarídeos, ácidos graxos, complexos polissacarídeos-proteínas, peptídeos, fosfolipídios, lipídios neutros, mono e diglicerídeos (SILVA et al., 2010; DEEPIKA et al., 2016).

Os mecanismos pelos quais os biossurfactantes conseguem deslocar o óleo preso nos reservatórios são: (i) através da redução da tensão interfacial entre óleo-rocha e óleo-água, melhorando o fluxo do óleo, (ii) através do aumento da interação da rocha com a água, em reservatórios molhados, o que faz com que a rocha se ligue preferencialmente à água em detrimento ao óleo, emulsionando este óleo e tornando o fluxo deste mais livre, e também (iii) através da redução da tensão interfacial entre água e óleo, fazendo com que menos pressão hidrostática seja necessária no poço para mover o óleo preso nos poros, vencendo assim os efeitos da capilaridade (AMANI, 2015; ASHISH; DEBNATH (DAS), 2018). Outros autores ainda citam a capacidade do ramnolipídeo diminuir a viscosidade do óleo bruto (ASHISH; DEBNATH (DAS), 2018).

Boas propriedades podem ser também encontradas com a utilização de gases imiscíveis nos reservatórios, onde os biossurfactantes auxiliam na emulsificação das bolhas de gás e o óleo bruto preso, aumentando a recuperação pelo gás (KRYACHKO, 2018). Em alguns casos, há ainda a adição conjunta dos biossurfactantes e íons metálicos, por conta de interações polares entre essas duas substâncias, o que acarreta em melhores propriedades surfactantes (PATEL et al., 2015). Segundo KRYACHKO, (2018), a utilização de biossurfactantes é bastante

promissora, uma vez que há a necessidade de baixas concentrações da molécula para se atingir a sua concentração micelar crítica (CMC).

Contudo, uma aplicação eficiente dos biossurfactantes na MEOR depende de características presentes nas moléculas como estabilidade a condições extremas de temperatura, salinidade e pH (EL-SHESHTAWY et al., 2015), além de propriedades como boa solubilidade, alta atividade interfacial e alto índice de emulsificação, sendo preferível que essas boas propriedades se manifestem ainda em baixa concentração da molécula (baixo CMC) (PATEL et al., 2015).

O estudo para a aplicação *ex situ* de biossurfactantes na MEOR é dividido em três fases: a primeira fase consiste em (i) procura, isolamento e identificação de microrganismos produtores de biossurfactantes (desejável nessa fase microrganismos aeróbios, já que a produção dos biossurfactantes acontecerá em biorreatores e não no poço), (ii) otimização do meio de cultura e do processo com o uso de substratos de baixo valor (iii) análises das propriedades físico-químicas do(s) biossurfactante(s) produzido(s), através de parâmetros como análises das tensões superficiais e interfaciais, além das propriedades de emulsificação, caracterização do(s) biossurfactante(s) produzido(s), estabilidade da(s) molécula(s) em diferentes temperaturas, salinidades, pH, pressão, estudos de adsorção utilizando diferentes plugs de rochas e (iv) estudos em modelos *sand-pack* ou *core-flood*, usando diferentes concentrações de biossurfactantes.

A segunda fase compreende os processos de (i) coletar e cruzar dados do reservatório a ser recuperado e o biossurfactante produzido, afim de se realizar simulações computacionais e estabelecimento de modelos matemáticos, (ii) aumento de escala na produção do biossurfactante e (iii) aplicação em escala piloto em um ou mais poços para o estabelecimento da administração da solução de biossurfactante (se concentrado ou diluído, baseado na mineralogia do poço – de arenito ou carbonático) ou se este será dissolvido na água de injeção e (iv) análise dos dados de recuperação (%OR), não necessitando do fechamento do poço por longo tempo (GEETHA et al., 2018).

Com o intuito de tornar a utilização de biossurfactante mais viável economicamente na abordagem *ex situ*, GEETHA et al. (2018) sugerem a utilização de matéria prima barata, uso do biossurfactante na sua forma bruta, sem nenhuma purificação nem mesmo a realização da retirada das células bacterianas.

Diversas classes de biossurfactantes podem ser utilizados na estratégia da MEOR como lipopeptídeos, como surfactinas e liquenisininas; e complexos lipopilissacarídicos, como emulsano. A classe mais utilizada é a dos glicolipídeos, que são extensivamente utilizados nos experimentos (SEN, 2008).

Ramnolipídeo é uma classe de glicolipídeo aniônico (MÜLLER et al., 2012) de baixo peso molecular, produzida principalmente pelo gênero *Pseudomonas* (WEI et al., 2005; WU et al., 2008), a qual também promove sua excreção para o meio extracelular (MÜLLER et al., 2012). Sendo composto em sua parte hidrofílica por um (mono-ramnolipídeo) ou dois (di-ramnolipídeo) açúcares de L-raminose (WOŹNIAK-KARCZEWSKA et al., 2017), e na sua parte hidrofóbica possuindo unidades de ácido 3-(3-hidroxi)alcanoico (HAA) (DÉZIEL et al., 2000).

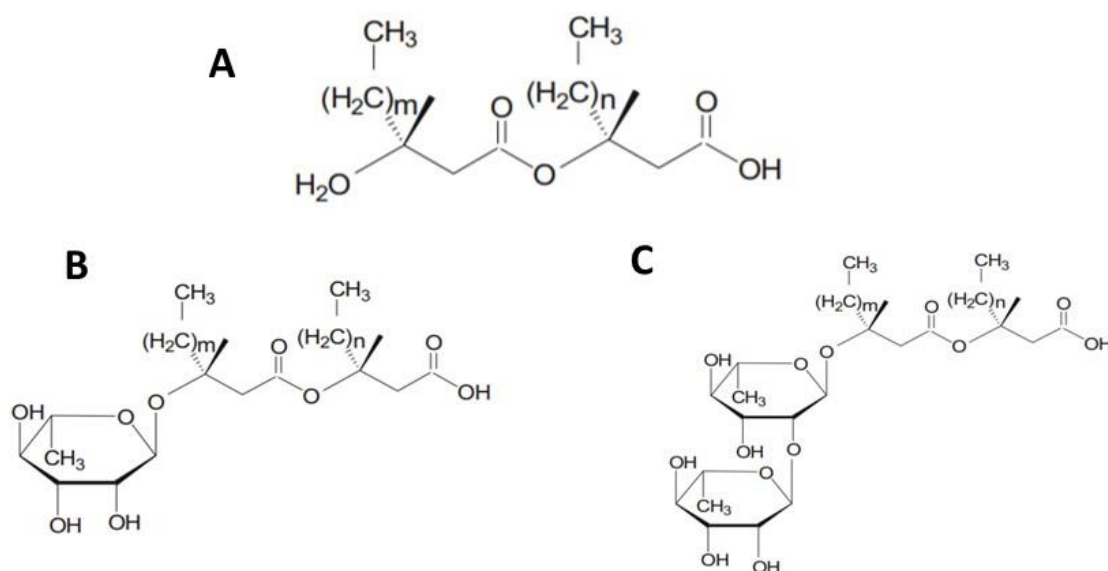


Figura 1: Estruturas químicas das moléculas de HAA (ácido 3-(3-hidróxi)alcanoico) (A), mono-ramnolipídeo (B) e di-ramnolipídeo (C) Adaptado SOBERÓN-CHÁVEZ et al., (2005).

Os ramnolipídeos têm a propriedade de mudar características físicas e químicas do óleo bruto, além de estimular a interação óleo-água-rocha, o que irá aumentar significativamente a recuperação do óleo (AMANI, 2015). O objetivo primário da utilização de biossurfactantes na MEOR é a diminuição da tensão interfacial entre o óleo bruto dentro do reservatório e a água injetada no mesmo, além de outros propósitos já citados (AMANI et al., 2010; HÖRMANN et al., 2010).

As propriedades e o tipo do surfactante são influenciadas pela composição do meio, a cepa microbiana usada e as condições de fermentação como a fonte de carbono (SATHI REDDY et al., 2016; SILVA et al., 2010). Essas moléculas podem

reduzir a tensão superficial da água de 72 para valores abaixo de 30 mN/m, sua tensão interfacial em relação ao óleo de 43 mN/m a valores próximos a 1 mN/m, com uma concentração micelar crítica de 27-54 mG/L (COSTA et al., 2010).

Para a síntese do ramnolípido, o glicosil é transferido enzimaticamente por um doador de ramnose (timidina-difósforo-ramnose) para um lipídio precursor (beta-hidróxidecanoil-beta-hidróxidecanoato), reação catalisada por três principais ramnotransferases (MAIER e SOBERON-CHAVEZ, 2000; LANG e WULLBRANDT, 1999): RhIA, RhIB e RhIC, onde RhIA irá primeiramente sintetizar HAA, RhIB irá permitir a formação de monoramnolípido através da ligação da ramnose com o HAA e o RhIC irá mediar a adição de outra unidade de ramnose, no caso da formação de um diramnolípido (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010) (Figura 01).

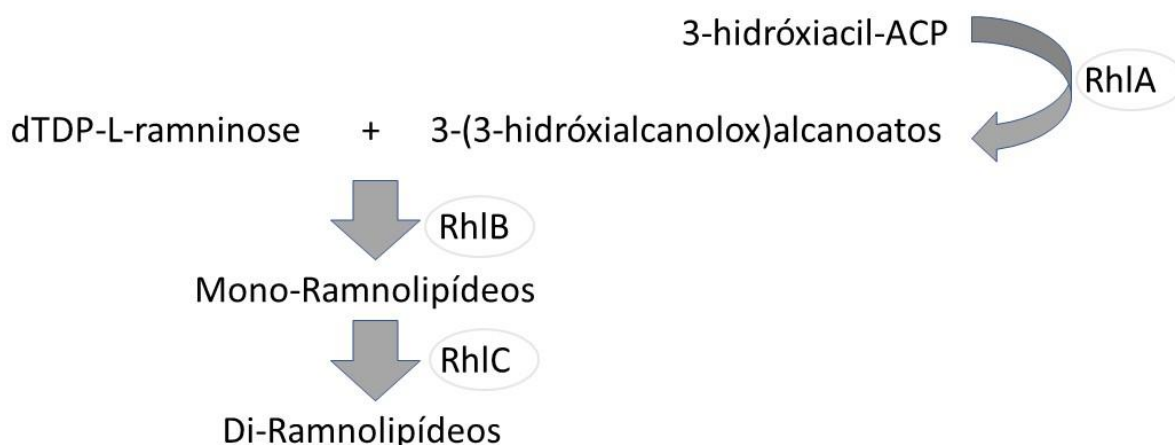


Figura 2: Produção de mono e di-ramnolípido, com os substratos e suas respectivas enzimas. Adaptado de SOBERÓN-CHÁVEZ et al., (2005).

Os biossurfactantes podem ser empregados em áreas bastante variadas como: ambiental, indústrias farmacêutica, de cosméticos, química e de alimentos, assim como na já citada indústria do petróleo (SILVA et al., 2010). Estas moléculas apresentam grandes vantagens em relação aos produzidos por via química, uma vez que são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade e podem ser produzidos através de substratos renováveis (BENINCASA, 2007; SÁNCHEZ et al., 2007).

O mercado mundial dos biossurfactantes movimentou 2 bilhões de dólares em 2016 (6,45% do mercado de surfactantes) e a previsão é que em 2022 esse mercado chegue a movimentar USD 2,67 bilhões, sendo que é esperado um crescimento anual de 3,1% no mercado de surfactantes de modo geral (ZION MARKET RESEARCH, 2017). Em se tratando do tipo do biossurfactante, os glicolípido são os que chamam mais a atenção do mercado devido a sua larga utilização em diversos setores

industriais, ambientais e médicos. Ao contrário do que acontece com o surfactante de modo geral, as regiões que mais movimentam o mercado são a América do Norte e a Europa, devido a políticas sustentáveis favoráveis aos biossurfactantes e à promoção do consumo de bioprodutos. Contudo, espera-se que a Ásia pacífica (maior consumidora de surfactantes) ainda seja uma grande consumidora de biossurfactantes devido à conscientização do controle da poluição da água e do aumento da promoção do consumo de bioprodutos (ZION MARKET RESEARCH, 2017; MORDOR, 2017).

Embora o uso dos biossurfactantes ofereça muitas vantagens em relação aos surfactantes químicos, ainda há muitos entraves na produção destas biomoléculas como os altos custos de produção (COSTA et al., 2010; SATHI REDDY et al., 2016) devido principalmente aos substratos (REILING et al., 1986; LAN et al., 2015), a falta de métodos eficientes para recuperação do produto (SOUSA, DE et al., 2011), baixa produtividade (WU et al., 2008; WEI et al., 2005) e a patogenicidade encontrada na maioria das bactérias produtoras (LAN et al., 2015).

A descoberta de novas cepas promissoras, o melhoramento e utilização de microrganismos de alta produtividade (MUKHERJEE et al., 2006), o conhecimento dos mecanismos de regulação do microrganismo utilizado (PANSIRIPAT et al., 2010), e melhorias operacionais no processo *downstream* (MÜLLER et al., 2012) são ótimos pontos a serem considerados para a diminuição do valor do custo de produção dos biossurfactantes. Outro ponto de extrema importância na redução de custos do processo é a escolha da matéria prima (BAGHERI LOTFABAD et al., 2017), onde o uso de fontes alternativas de nutrientes de fácil acesso, custo baixo e que permitam altas produções de biossurfactante apresentam-se como uma escolha bastante promissora principalmente para produção em larga escala (SOUSA, DE et al., 2011). Nesta perspectiva, o uso de resíduos agro-industriais como fonte de carbono se apresenta como uma estratégia de baixo custo, onde a utilização do rejeito irá não só diminuir os custos de produção, mas também agregar valor a essa fonte (WISJNUPRAPTO et al., 2011; NITSCHKE et al., 2005; GUDIÑA et al., 2015).

O gênero *Pseudomonas* pode se nutrir de uma extensa gama de fontes de carbono (SOUSA, DE et al., 2011). Com isso, alguns autores testaram diversos resíduos industriais como substrato. SATHI REDDY et al., (2016) utilizando óleo de caroço de manga (MKO) como fonte única de carbono conseguiram uma produtividade de 1,81 G/L depois de 72 horas de bioprocessamento, usando *P. aeruginosa*



DR1 como microrganismo produtor. COSTA et al., (2010), conseguiram a produção de ramnolípídeo através do uso da água residual de mandioca e resíduo de óleo de fritura, o que possibilitou uma redução da tensão superficial a 30 mN/m e uma concentração micelar crítica (CMC) de 30 mG/L usando hexadecano como comparativo, além da molécula produzida também apresentar atividade antimicrobiana.

SOUSA, DE et al., (2011) conseguiram uma produção de 354,63 mG/L de ramnolípídeo com o uso da glicerina bruta obtida através da transesterificação para obtenção do biodiesel como fonte de carbono.

Outros resíduos podem ser encontrados na literatura como óleo de fritura (HABA et al., 2000), resíduos da refinaria (KOCH et al., 1988), soro de leite (SUDHAKAR BABU et al., 1996), melação (PATEL; DESAI, 1997), casca de laranja (GEORGE; JAYACHANDRAN, 2009), bolo de óleo de mahua, borra de refino de óleo de soja e óleo de peixe (PRIETO et al., 2008), restos de destilaria e substrato de batata (MAKKAR; CAMEOTRA, 1999), óleo de palma (RADZUAN et al., 2016), resíduos da refinaria de óleo de girassol (BENINCASA; ACCORSINI, 2008), águas residuais de mandioca, produzidas pela indústria de farinha (COSTA et al., 2010), entre outros.

Ainda observa-se a capacidade de degradação de hidrocarbonetos por *Pseudomonas aeruginosa*, onde esta bactéria é utilizada no processo de biorremediação de solos contaminados por esses poluentes, já que além de utilizar o composto como fonte de carbono, produz surfactantes que irão aumentar a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos no solo (MA et al., 2016; ZHANG et al., 2012).

Nesta perspectiva, a utilização da água produzida gerada na atividade de exploração do petróleo se apresenta como uma alternativa viável para a produção de ramnolípídeo a baixo custo.

A água produzida é um rejeito associado com a extração de petróleo, onde a sua produção acontece nos mesmos reservatórios subterrâneos de onde se extrai o óleo (também chamada de água de formação), ou até mesmo através do mecanismo de injeção de água, utilizado para aumentar a pressão do reservatório, aumentando a recuperação de óleo. Após a retirada do teor de água no óleo produzido (que corresponde a cerca de 5-10% do volume do óleo), tem-se um subproduto indesejável, que contém hidrocarbonetos dispersos e dissolvidos e outros contaminantes tais como sais minerais dissolvidos, sólidos originados de corrosões, graxas e asfaltenos,

substâncias químicas utilizadas na prevenção e/ou tratamento de problemas operacionais e gases dissolvidos, tais como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S (NARAGHI et al., 2015).

Segundo STEPHENSON, (1992), a composição da água produzida vai depender de fatores como tipo de campo, profundidades e características intrínsecas ao campo produtor do óleo, histórico de produção, origem e qualidade do óleo e o procedimento utilizado na extração do óleo.

Esses fatores presentes na água produzida, como alta salinidade, metais pesados, influência de orgânicos solúveis e insolúveis e influência dos compostos químicos utilizados no campo de petróleo podem acarretar em sérios efeitos nocivos ao meio ambiente, dependendo de que forma ocorrerá o descarte desse rejeito (HENDERSON et al., 1999).

Sendo assim, é de extrema importância a remoção dos contaminantes presentes na água produzida antes do seu descarte no ambiente, atendendo às determinações impostas pela Resolução CONAMA N° 20, assim como à Lei Sobre Crimes Ambientais (RAMOS, 2011).

Diversos estudos ainda mostram que a fonte de nitrogênio também desempenha um papel fundamental na produção do ramnolípido (JEONG et al., 2004). A produção de ramnolípido pode se manter utilizando-se como fontes de nitrogênio substâncias inorgânicas como sulfato de amônia (ROBERT et al., 1989) e nitrato de amônia, e orgânicas como ureia (MÜLLER et al., 2012) e peptona (SOUSA, DE et al., 2011). Contudo, grande maioria dos autores conseguiram melhores resultados na produção do biossurfactante com o uso da fonte inorgânica nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) (SILVA et al., 2010; ROBERT et al., 1989; SOUSA, DE et al., 2011; LAN et al., 2015; MÜLLER et al., 2012)

ATHUKORALA et al., (2006) reportaram que fontes orgânicas de nitrogênio podem ajudar no crescimento celular, porém não são favoráveis à produção de biossurfactante. BENINCASA et al., (2002) ainda apontaram a existência de um estímulo mais eficiente no acúmulo de biossurfactante quando o microrganismo está sob condições limitantes de nitrogênio, o que também foi verificado por DEEPIKA et al., (2016). Sendo assim, a escolha pelo nitrato de sódio em detrimento às outras fontes de nitrogênio pode ser devido à lenta assimilação deste composto em comparação à outras fontes, o que gera uma condição nutricional limitante (PRIETO et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Outro fator que deve ser levado em conta é a proporção Carbono/Nitrogênio (C/N). Segundo ROBERT et al. (1991), proporções de C/N maiores favorecem a produção de metabólitos e limitam o crescimento bacteriano, enquanto o contrário direciona o metabolismo microbiano para a síntese de material celular, dificultando o acúmulo de produto. Porém, autores como SILVA et al., (2010) e HABA et al., (2000) verificaram que com o aumento da proporção C/N acontecia um decréscimo na produção de biossurfactante, sendo que as melhores proporções foram de 12, 24 e 8 respectivamente. Mas ainda assim, a maioria dos autores obtiveram maiores produções com proporções C/N mais elevadas (WU et al., 2008, 26 usando glicose e 52 usando glicerol; SANTOS et al., 2002, 60; PRIETO et al., (2008).

Outros fatores nutricionais que influenciam fortemente o gênero *Pseudomonas* e que devem ser considerados são: Concentração de fósforo (GUERRA-SANTOS et al., 1984; SYLDATK et al., 1985; MULLIGAN; MULLIGAN et al., 1989), íons multivalentes como Ca, Fe e Mg (LAN et al., 2015), K e Na (GUERRA-SANTOS et al., 1984).

Uma vez que o custo de produção dos biossurfactantes seja equivalente ou até mesmo inferior ao dos surfactantes químicos, empresas petrolíferas e diversas outras que fazem uso destes compostos em seus processos, poderão realizar a troca de surfactantes produzidos quimicamente pelos biológicos, já que estes últimos contribuirão com suas políticas ambientais e melhora do processo industrial (BAGHERI LOTFABAD et al., 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar estratégias biotecnológicas para aproveitamento de resíduos da indústria do petróleo e de biocombustíveis na produção de biossurfactante de importância industrial, otimizando e modelando o processo de produção deste bioativo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Viabilizar o uso da água produzida na produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa*;
- Definir a melhor fonte de nitrogênio, para a composição do meio de cultura composto por resíduos como água produzida e glicerina bruta para produção de ramnolipídeos;
- Definir a concentração ótima de fonte de nitrogênio, e fonte de carbono, na composição do meio de produção;
- Descrever e modelar o processo de produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* em shaker e biorreator, utilizando água produzida na formulação do meio de produção;
- Quantificar e caracterizar o biossurfactante produzido.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os surfactantes oriundos de via biológica (caso dos ramnolipídeos) não são competitivos economicamente com os produzidos por via química, sendo estes últimos, porém, danosos ao meio ambiente, principalmente no enfoque da tecnologia de recuperação avançada de petróleo. Por isso, faz-se necessária a manipulação e controle do processo de produção biológica dos biosurfactantes, como por exemplo, a utilização de resíduos industriais (como a água produzida da indústria de petróleo e da glicerina bruta, gerados nas próprias indústrias do petróleo e de biocombustíveis) na formulação do seu meio de produção, como também a modelagem deste bioprocessos. A utilização de resíduos em processos industriais como um todo, não só favorece a redução de custos de produção, como contribui com questões ambientais, além de agregar valor econômico ao resíduo. Por fim, o presente projeto tem caráter inovador, uma vez que não há na literatura trabalhos que reportem a utilização de água produzida e glicerina bruta no processo de produção de ramnolipídeo isolado.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 EXPERIMENTAL

#### 4.1.1 Microrganismo

A cepa de a CCMICS 109 utilizada no estudo foi proveniente da coleção de culturas do LABEM (Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismos). A cepa foi conservada em meio Hogness a base de 20% (v/v) de glicerol como agente crioprotetor, armazenada à -70 °C em um ultrafreezer da marca Thermo (2006), para preservar a cultura e diminuir o risco de alteração no perfil genético.

#### 4.1.2 Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de propagação celular

Primeiramente o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* foi ativado em Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml de meio TSB por 24 horas (30°C e 120 RPM) e logo depois retirou-se uma alíquota de 5mL (9,1%) que foi transferido para um novo Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml meio TSB, onde o bioprocessamento aconteceu nas mesmas condições do processo anterior de ativação. A cinética durou 48 horas, onde alíquotas de 2ml do meio em bioprocessamento foram retiradas a cada 2 horas durante 24 horas, depois retirou-se alíquotas de 12 em 12 horas até o tempo estabelecido. As alíquotas foram centrifugadas a 10000xg por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e a massa celular ressuspensa em PBS 1x até volume original (2ml). As amostras foram então lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600nm. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.1.3 Preparação do pré-inóculo e inóculo

O pré inóculo foi preparado em Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml meio TSB e incubado em shaker orbital a 120RPM, 30°C por 24 horas. Para o inóculo, retirou-se uma alíquota de 5mL (9,1%) da cultura ativada, que foi transferido para um novo meio TSB, onde o bioprocessamento aconteceu nas mesmas condições do processo anterior de ativação, só que nessa etapa, pelo tempo de 12 a 16 horas.

#### 4.1.4 Produção de ramnolipídeo em água produzida diluída e sem diluição

O objetivo do ensaio foi verificar a influência da água produzida na produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa*. Para tanto, utilizou-se 50ml do meio de cultura LABEM em Erlenmeyer de 250ml, o qual é composto por K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5G/L),

Citrato de sódio (1G/L), Extrato de levedura (0,5G/L) e Glicerina Bruta (20ml/l). O meio foi preparado com água produzida do campo 1, coleta 3 (CA01-3), na concentração de 30, 50 e 100%, diluída em água destilada. Também se testou um meio com água produzida pré-tratada (dialisada) e outro meio formulado com água destilada foi utilizado como controle. O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 0,2$ ). Seguiu-se então a pasteurização do meio em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio e as condições de incubação foram 180 RPM a 30°C, por 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.1.5 Diálise da água produzida**

Para realização da retirada de sais interferentes na produção de ramnolipídeo, adotou-se um processo de diálise na água produzida, o qual foi realizado em membrana de colágeno reconstituído, onde a membrana com a água ficou submersa em água de torneira durante um período de 72 horas, ou até atingir condutividade (medida por condutivímetro) menor que 500  $\mu\text{S/m}$ . Passado o tempo, a água dialisada foi retirada da membrana, colocada em recipiente de vidro e acondicionada a 4°C até sua utilização.

#### **4.1.6 Influência da salinidade no crescimento microbiano e na produção e qualidade do bioproduto**

Neste ensaio, utilizou-se 50ml do meio de cultura LABEM em Erlenmeyer de 250ml, composto por  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (5G/L), Citrato de sódio (1G/L), Sacarose (25G/L), Extrato de levedura (0,5G/L) e Glicerina Bruta (20ml/l). O meio foi preparado com água destilada, onde adicionou-se ainda NaCl nas concentrações de 0, 2, 4, 6, 8 e 10G/L, e com água produzida dialisada (tratamento identificado por "DI"). O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 0,2$ ). Seguiu-se então a pasteurização do meio em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio e as condições de incubação foram 180RPM a 30°C, por 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.1.7 Teste de diferentes fontes de nitrogênio para compor o meio de cultura**

Nesta etapa, utilizou-se 50ml do meio de cultura LABEM modificado, em Erlenmeyer de 250ml, composto por  $K_2HPO_4$  (5G/L), Citrato de sódio (1G/L) e Glicerina Bruta (20ml/l), variando a fonte de nitrogênio. O meio foi preparado com água produzida dialisada do campo 1, coleta 3 (CA-1-3), onde adicionou-se ainda  $NaNO_3$  nas concentrações de 2, 3 e 4G/L, e outra parte com extrato de levedura nas concentrações de 0,25; 0,5 e 0,75G/L (ambas as faixas observadas na literatura e em experimentos anteriores). O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 0,2$ ). Seguiu-se então a pasteurização do meio em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio e as condições de incubação foram 180RPM a 30°C, por 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.1.8 Otimização das condições nutricionais de carbono e nitrogênio através da metodologia de superfície de resposta**

A metodologia de superfície de resposta (MSR) tem por objetivo modelar e otimizar uma dada resposta que é influenciada por uma ou mais variáveis, indicando o ponto ótimo da relação entre essas variáveis na melhor resposta possível (Montgomery e Runger, 2008).

Sendo assim, tal metodologia foi utilizada para avaliar a influência da concentração de carbono (glicerina bruta) e nitrogênio (extrato de levedura) nas variáveis resposta concentração de ramnolípídeo, índice de emulsificação e tensão superficial.

A metodologia utilizada foi o delineamento experimental composto central rotacionado (DCCR), fatorial completo para 2 variáveis ( $2^2$ ), contendo 4 ensaios nas condições axiais, 4 condições nas condições fatoriais e 5 repetições do ponto central.

O planejamento experimental e a análise dos dados foram feitas no programa STATISTICA 8.0 e seguiu-se conforme tabela 2, que apresenta os valores reais (decodificados) e codificados do planejamento.

Tabela 2: Valores codificados e decodificados do planejamento experimental DCCR  $2^2$ , com 5 repetições do ponto central.



| Corridas | Fonte de carbono codificado | Fonte de carbono decodificado | Fonte de nitrogênio codificado | Fonte de nitrogênio decodificado |
|----------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1        | -1,00000                    | 10,00000                      | -1,00000                       | 0,214500                         |
| 2        | -1,00000                    | 10,00000                      | 1,00000                        | 1,250000                         |
| 3        | 1,00000                     | 30,00000                      | -1,00000                       | 0,214500                         |
| 4        | 1,00000                     | 30,00000                      | 1,00000                        | 1,250000                         |
| 5        | -1,41421                    | 5,85786                       | 0,00000                        | 0,732300                         |
| 6        | 1,41421                     | 34,14214                      | 0,00000                        | 0,732300                         |
| 7        | 0,00000                     | 20,00000                      | -1,41421                       | 0,000091                         |
| 8        | 0,00000                     | 20,00000                      | 1,41421                        | 1,464509                         |
| 9 (C)    | 0,00000                     | 20,00000                      | 0,00000                        | 0,732300                         |
| 10 (C)   | 0,00000                     | 20,00000                      | 0,00000                        | 0,732300                         |
| 11 (C)   | 0,00000                     | 20,00000                      | 0,00000                        | 0,732300                         |
| 12 (C)   | 0,00000                     | 20,00000                      | 0,00000                        | 0,732300                         |
| 13 (C)   | 0,00000                     | 20,00000                      | 0,00000                        | 0,732300                         |

50ml do meio de cultura LABEM modificado foi utilizado nesta etapa em Erlenmeyer de 250ml, o meio foi composto por  $K_2HPO_4$  (5G/L), Citrato de sódio (1G/L), acrescido de água produzida dialisada do campo 1, coleta 4 (CA-1-4), onde adicionou-se ainda glicerina bruta (ml/l) e extrato de levedura (G/L) conforme planejamento experimental da tabela 2. O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 2$ ). Seguiu-se então a pasteurização dos meios em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio e as condições de incubação foram 180RPM a 30°C, por 120 horas.

#### **4.1.9 Avaliação da concentração de glicerina bruta na produção de ramnolipídeo**

Nesta etapa, utilizou-se 50ml do meio de cultura LABEM modificado, em Erlenmeyer de 250ml, composto por  $K_2HPO_4$  (5G/L), Citrato de sódio (1G/L),  $NaNO_3$  (2G/L). O meio foi preparado com água produzida dialisada do campo 1, coleta 2 (CA-1-2), onde adicionou-se ainda glicerina bruta nas concentrações de 0, 10, 15, 20, 25 e 30ml/l (faixa observada na literatura). O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 2$ ). Seguiu-se então a pasteurização dos meios em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio e as condições de incubação foram 180RPM a 30°C, por 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.1.10 Modelagem cinética da produção de ramnolipídeo em meio com água produzida e glicerina bruta otimizado em shaker e biorreator**

Este experimento consistiu na produção de ramnolipídeo em shaker orbital e biorreator, para a modelagem e avaliação dos parâmetros cinéticos. O meio utilizado foi o LABEM modificado, composto por  $K_2HPO_4$  (5G/L), Citrato de sódio (1G/L), Glicerina Bruta (25ml/l) e Extrato de levedura (0,75G/L). O meio foi preparado com água produzida dialisada do campo 1, coleta 4 (CA-1-4). O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 0,2$ ). Seguiu-se então a pasteurização do meio em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio.

As condições de incubação no shaker foram 180RPM e 30°C. Os ensaios ocorreram em Erlenmeyer de 250ml com 50ml de meio.

Já no reator, as condições de incubação foram 200 RPM de rotação, 0,5 vvm de aeração, 30°C.

O bioprocesso ocorreu por 144 horas e as amostras eram retiradas de tempo em tempo.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.1.11 Avaliação da influência de diferentes coletas de água produzida para composição do meio de produção de ramnolipídeo**

Para estes ensaios, 3 diferentes coletas de água produzida do campo 1 foram avaliadas (coletas 3, 4 e 5). O meio utilizado foi o LABEM modificado (50ml em Erlenmeyer de 250ml), composto por  $K_2HPO_4$  (5G/L), Citrato de sódio (1G/L), Glicerina Bruta (20ml/l) e Extrato de levedura (0,5G/L). O pH do meio foi ajustado para 6,8 ( $\pm 0,2$ ). Seguiu-se então a pasteurização do meio em banho maria, a 65°C, durante 30 minutos. 10% (v/v) de inóculo foi adicionado ao meio e as condições de incubação foram 180RPM a 30°C, por 120 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

## **4.2 ANALÍTICO**

### **4.2.1 Extração e quantificação do bioproduto**

Para quantificação do ramnolipídeo, primeiramente foi realizada uma extração orgânica, onde o caldo livre de células teve seu pH reduzido a 2,0 e foi deixado overnight a 4°C. Decorrido o tempo, foi realizada a extração orgânica com acetato de etila 1:1, sendo o processo repetido mais duas vezes. A fase orgânica foi retirada e logo após tal procedimento, o solvente foi retirado utilizando-se um rotaevaporador.

O ramnolipídeo foi quantificado através da metodologia do orcinol sulfúrico, onde adiciona-se 0,9ml de solução de orcinol sulfúrico a 0,1ml de amostra. Logo após,

a amostra é aquecida a 80°C durante 30 minutos, resfriada em temperatura ambiente e lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 421nm (PHAM et al., 2004).

#### 4.2.2 Biomassa

A biomassa foi analisada através do peso seco, onde o caldo foi centrifugado a 4000 RPM por 20 minutos. O caldo livre de células foi retirado e a biomassa foi lavada mais 3x com solução tween 0,2% (v/v) para retirada de resíduos. Por fim, a biomassa foi seca em estufa a 50°C até atingir peso constante.

#### 4.2.3 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi conduzido segundo (COOPER; GOLDENBERG, 1987), onde 2ml de querosene foi adicionado a 2ml do meio de cultura livre de células. A mistura foi agitada em agitador tipo vortex por 2 minutos e o índice de emulsificação foi determinado a partir da equação 1, proposta por (WEI et al., 2005), após 24 horas.

Equação 1: Fórmula para índice de emulsificação

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{total}} \times 100$$

Sendo  $H_{FE}$  a altura da fase emulsionada.

#### 4.2.4 Tensão superficial

A tensão superficial das amostras foi avaliada em tensiômetro SIGMA®, modelo 702, através da metodologia do anel de du Nöuy. As amostras extraídas foram diluídas em água destilada e lidas no equipamento à temperatura ambiente (25°C). O fator de correção foi calculado pelo próprio equipamento, através do método de Huh-Mason.

#### 4.2.5 Tensão interfacial

As medidas da tensão interfacial (IFT) foram realizadas em um tensiômetro DataPhysics®, modelo Oca 15 plus, calibrado com água destilada e ar na temperatura de  $60^{\circ}\text{C} \pm 2$ , por meio de acessório acoplado a um banho termostaticado. Através do método da gota pendente e das equações de Young e Laplace, as medidas de tensão interfacial foram obtidas. A avaliação da superfície da gota foi efetuada pelo sistema de imagem de vídeo automática pelo próprio programa do equipamento. Utilizou-se o caldo livre de células contendo o ramnolipídeo como a fase pesada, contra petróleo bruto do campo 1, como a fase leve. Amostras de água produzida das coletas 3, 4 e 5 foram utilizadas como controle.

#### **4.2.6 FT-IR**

As amostras de ramnolipídeo produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, tendo água produzida e glicerina bruta em sua composição foi lida no espectrômetro Vertex 70 (Bruker, EUA), calibrado para o método ATR. Os espectros foram gerados com o software OPUS, com janela de leitura configurada para 4000 a  $500\text{ cm}^{-1}$ , com a amostra sendo lida 16 vezes (16 scans). O tratamento dos espectros foi feito com o software OriginPRO 8.5.

#### **4.2.7 Espectrometria de massa**

Um Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (U.S.A.) foi utilizado com cubeta de quartzo de 1cm. Os espectros de emissão fluorescente das amostras foram obtidos a 250-800nm em intervalos de 0,5nm, enquanto a amostra foi excitada em comprimentos de onda de 200-775nm com incrementos de 25nm. Um total de 24 comprimentos de onda de excitação e 1101 comprimentos de onda de emissão foram obtidos para cada amostra. As medições foram feitas com uma fenda de 2,5nm e uma velocidade de varredura de 1200nm/min. Os mapas espectrofluorimétricos foram gerados com o OriginPRO 8.5.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CINÉTICA EM MEIO DE PROPAGAÇÃO CELULAR

Os dados da figura 03 mostram o comportamento cinético da bactéria *P. aeruginosa* em meio TSB, utilizado para propagação do inóculo. A partir dos dados, observa-se uma fase exponencial que vai do tempo 0h a 8h, sugerindo que o tempo para retirada das células (inóculo) do meio de propagação para o meio de produção é de 8 a 12hs, uma vez que o metabolismo celular ainda estará mais ativo como na fase exponencial.

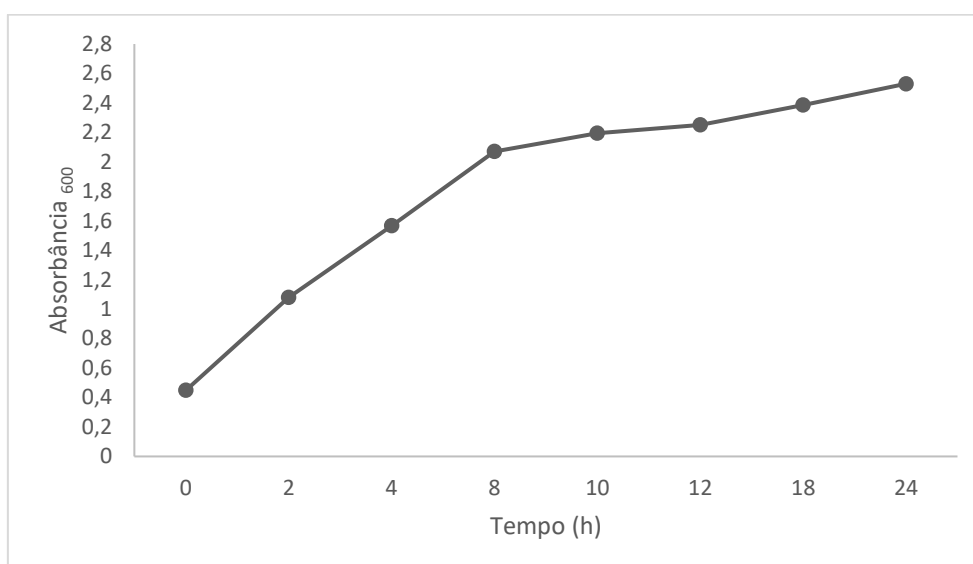


Figura 3: Comportamento cinético da *Pseudomonas aeruginosa* em meio TSB, utilizado para propagação celular, no período de 48 horas.

Grande maioria dos autores utilizam o meio Luria-Bertanni (LB) para produção do inóculo (GUDIÑA et al., 2016; NICOLÒ et al., 2017; SALAZAR-BRYAM et al., 2017), com tempos de incubação que variam de 10 a 18 horas, com uma média de 12 horas (SOUSA, DE et al., 2011; WEI et al., 2008; NICOLÒ et al., 2017; GUDIÑA et al., 2016). SHAH et al. (2016) ainda optaram pela produção do pré-inóculo em meio LB e do inóculo em meio MSM (Meio Mineral Salino), sendo o mesmo utilizado na etapa de produção do ramnolípídeo, contudo o autor adicionou ao meio óleo bruto, que serviu como fonte de carbono ao microrganismo.

Apesar de não ser muito comum a utilização do meio TSB na literatura para propagação celular de *Pseudomonas aeruginosa* (com a finalidade de produzir ramnolípídeo), tal meio desempenha função semelhante a outros meios utilizados na

literatura, de propagação destas células microbianas em um tempo relativamente curto.

## 5.2 INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE ÁGUA PRODUZIDA BRUTA E DIALISADA:

### 5.2.1 Na quantificação de ramnolipídeo

A figura 04 apresenta as concentrações de ramnolipídeo encontradas quando houve a utilização da água produzida nas concentrações de 30, 50 e 100% (v/v) do seu volume original (AP03, AP05 e AP10, respectivamente). As diluições ocorreram com a adição de água destilada. Também são apresentadas as concentrações de ramnolipídeo obtidas com a utilização de apenas água destilada e apenas água dialisada (AD e DI, respectivamente).

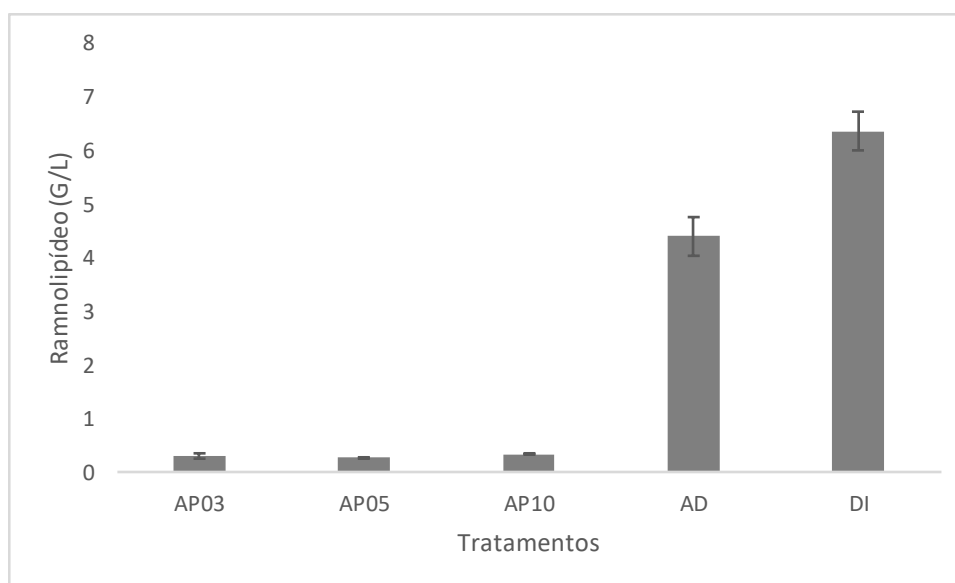


Figura 4: Produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa* em meio LABEM com variação na concentração de água produzida, sendo essa variação correspondente a utilização de 30, 50 e 100% (v/v) de água produzida, diluída em água destilada (AP03, e AP05 e AP10, respectivamente) e com o uso de meio LABEM contendo apenas água destilada e água produzida dialisada (AD e DI respectivamente).

Quando da utilização da água produzida bruta, seja ela diluída ou não, observa-se uma baixa produção de ramnolipídeo (aproximadamente  $0,3 \pm 0,05$  G/L nos dados ensaios). Na utilização da água produzida dialisada, observa-se uma maior concentração do surfactante, que chega a ser maior que a concentração encontrada

com a utilização de apenas água destilada no meio de cultura ( $6,4 \pm 0,4\text{G/L}$ , contra  $4,4 \pm 0,4\text{G/L}$ ).

### 5.2.2 No índice de emulsificação

A capacidade de promover emulsificação entre dois líquidos imiscíveis é uma das principais propriedades dos surfactantes. A figura 05 mostra a emulsificação entre o querosene e o caldo livre de células. Como pode ser observado, nenhum dos caldos livres de células obtidos através dos 3 diferentes tratamentos (bioprocessos com 30, 50 e 100% v/v de água produzida bruta) conseguiu promover emulsificação.

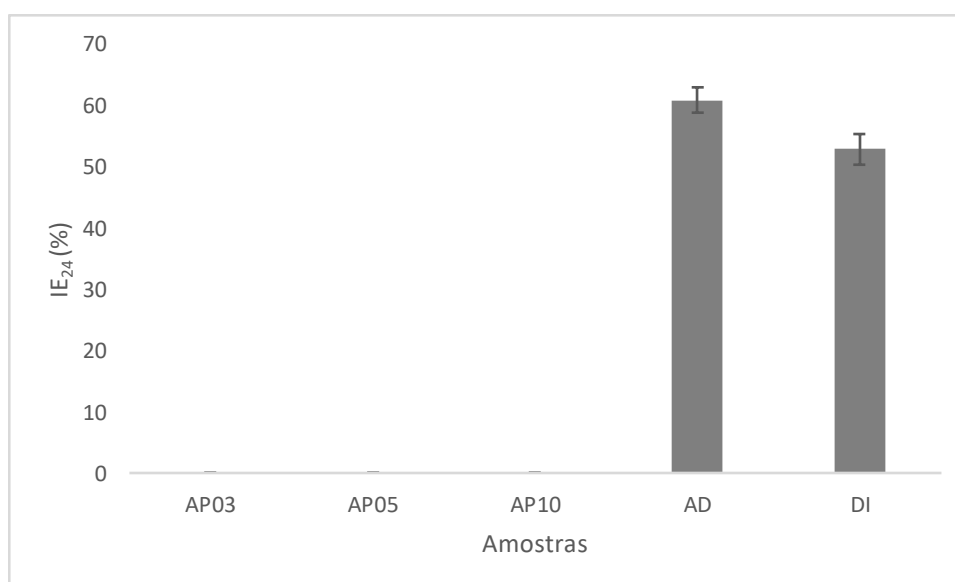


Figura 5: Índice de emulsificação após 24 horas, utilizando caldo livre de células obtido através de bioprocessos durante 120 horas por *P. aeruginosa*. Nos presentes ensaios, a concentração de água produzida bruta foi variada, sendo essa variação correspondente a utilização de 30, 50 e 100% (v/v) de água produzida, diluída em água destilada (AP03, e AP05 e AP10, respectivamente) e com o uso de meio LABEM contendo apenas água destilada e água produzida dialisada (AD e DI respectivamente).

Observa-se uma emulsão somente nos meios que utilizaram apenas água destilada e apenas água produzida dialisada. Nessa avaliação, o meio que continha água destilada em sua formulação foi o que obteve melhor resultado ( $60,9 \pm 2\%$ ), em comparação ao meio com água dialisada ( $52,9 \pm 2,5\%$ ).

### 5.2.3 Na tensão superficial

A partir da figura 06 é possível observar a propriedade de redução da tensão superficial presente nos surfactantes.

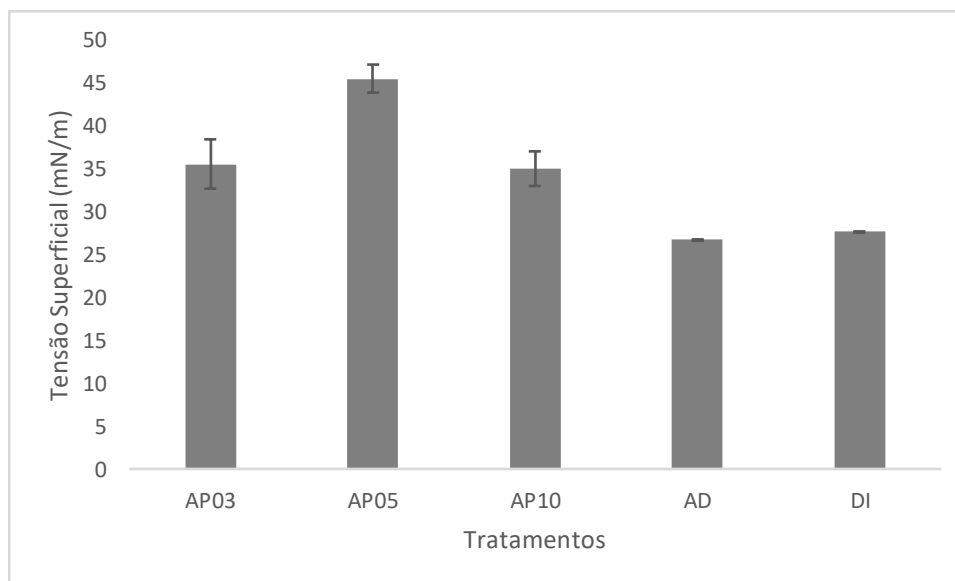


Figura 6: Tensão superficial utilizando caldo livre de células obtido através de bioprocesso durante 120 horas por *P. aeruginosa*. Nos presentes ensaios, a concentração de água produzida bruta foi variada, sendo essa variação correspondente a utilização de 30, 50 e 100% (v/v) de água produzida, diluída em água destilada (AP03, e AP05 e AP10, respectivamente) e com o uso de meio LABEM contendo apenas água destilada e água produzida dialisada (AD e DI respectivamente).

Observa-se que os meios que tinham água produzida bruta (AP03, AP04 e AP05) em sua formulação foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72mN/m para 35,6 ± 2,9; 45,5 ± 1,6 e 35,1 ± 2 mN/m (respectivamente).

Tensões superficiais mais baixas são encontradas quando se utiliza água destilada (26,7 ± 0,1mN/m) e/ou água produzida dialisada (27,7 ± 0,1mN/m).

#### 5.2.4 Na tensão interfacial

Para o teste de tensão interfacial entre o caldo livre de células contendo o ramnolipídeo e o óleo de petróleo bruto, escolheu-se os melhores resultados das avaliações anteriores. Sendo assim, as amostras avaliadas foram AD (meio composto apenas por água destilada) e DI (meio composto apenas por água produzida dialisada). Um meio que não passou pelo bioprocesso foi utilizado como controle (C).



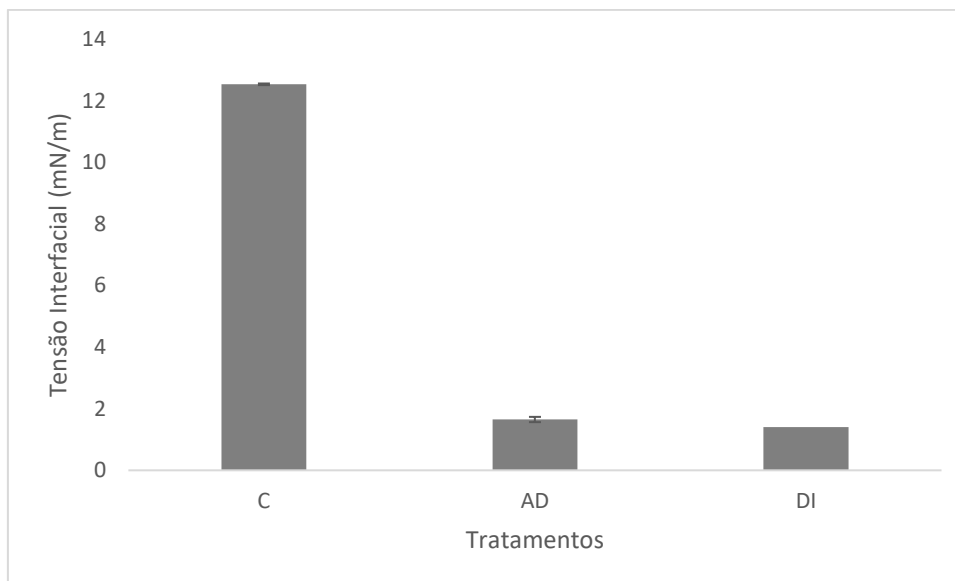


Figura 7: Tensão interfacial utilizando caldo livre de células obtido através de bioprocesso durante 120 horas por *P. aeruginosa*. Apresenta-se a água produzida bruta sem participação no bioprocesso (C), o meio onde se utilizou apenas água destilada (AD) e o meio onde se utilizou apenas água dialisada (DI).

Observa-se uma melhor tensão interfacial no meio onde se utilizou apenas água dialisada, em comparação com o meio que se utilizou apenas água destilada. O meio DI reduziu a tensão interfacial entre o meio e o óleo bruto de  $12,5 \pm 0,06$  mN/m para  $1,4 \pm 0,09$ , enquanto o meio AD reduziu esta tensão para  $1,7 \pm 0,06$  mN/m (figura 07).

STEPHENSON (1992) aponta a nocividade da água produzida, por conta das suas altas concentrações de substâncias tóxicas ao ambiente. O autor ainda sugere a diluição do rejeito, antes do seu descarte, como uma das formas de minimizar o seu efeito tóxico.

Este ensaio deixa claro o potencial de inibição do produto pela água produzida, uma vez que, quando este resíduo é utilizado na sua forma bruta, há uma diminuição na concentração do produto formado.

Através da diálise do rejeito, diversos compostos possivelmente presentes na água produzida, como biocidas e outros com concentrações elevadas como sais, metais pesados e hidrocarbonetos (HENDERSON et al., 1999), podem ter tido sua influência atenuada, possibilitando assim, uma maior produção do produto em questão nos meios compostos pela água produzida dialisada.

Em seu estudo, MOYA RAMÍREZ et al. (2016) também esbarraram com a necessidade do pré-tratamento de uma das fontes nutricionais que compunha o seu meio de cultura. O pré-tratamento consistia na hidrólise enzimática do resíduo do lagar

de azeite, resíduo utilizado pelos autores como fonte de carbono pelas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* na produção de ramnolipídeo e surfactina.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SALINIDADE

#### 5.3.1 Na quantificação de ramnolipídeo

O ensaio com diferentes concentrações de sais no meio de cultura foi realizado para se ter uma ideia sobre a influência da salinidade presente no meio de cultura, na produção de ramnolipídeo. O sal NaCl foi o escolhido por se encontrar na água produzida mais íons Cl<sup>-</sup> em detrimento a outros, apontando para a influência desse íon na maior parte da salinidade da água.

A salinidade não se mostrou de forma muito padronizada na produção de ramnolipídeo, onde a segunda maior produção aconteceu quando não foi adicionado nenhuma concentração de NaCl (0G/L de NaCl; 3,68G/L de ramnolipídeo), seguido por um decréscimo de produção nas outras duas concentrações (2 e 4), até chegar na concentração salina que apresentou menor produção (4G/L de NaCl; 0,16G/L de ramnolipídeo). A partir de então, nas três últimas concentrações (6, 8 e 10G/L de NaCl), observa-se um aumento, diminuição e leve aumento na produção do produto, contudo, pelo desvio das concentrações 6 e 8 ( $1,85 \pm 1,12$ ;  $1,52 \pm 0,43$  respectivamente), pode-se supor que a produção se manteve estável, porém ainda assim, aproximadamente 97% a menos, se comparada com o meio em que não houve adição do sal (ver figura 08).

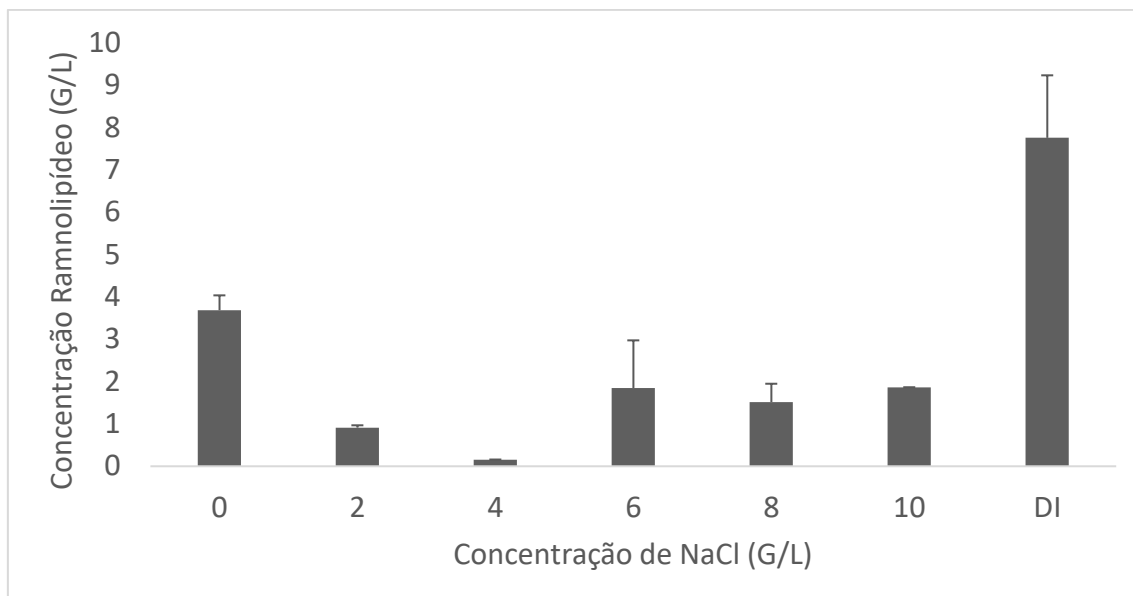


Figura 8: Concentração de ramnolípido produzido em meio com diferentes concentrações de salinidade (0 a 10G/L) em água destilada e em água produzida dialisada sem adição de NaCl (DI), incubado por 120 horas, a 30°C.

Segundo ABU-RUWAIDA et al. (1991), *Pseudomonas* sp. consegue ter uma produção de ramnolípido estável em concentrações de até 10% (p/v) de cloreto de sódio, o que não foi verificado no presente trabalho, uma vez que, com apenas 0,2% (p/v) de NaCl, o microrganismo obteve produções muito baixas do biocomposto.

O meio que permitiu uma maior produção de ramnolípido entre os testados foi o meio com água produzida dialisada e que não recebeu adição de NaCl (DI). Este apresentou incremento de mais de 2x na produção, se comparado com o meio produzido apenas com água destilada.

Por apresentar uma composição complexa, a água produzida pode contribuir para a produção de biocompostos, pois pode fornecer elementos traços que são solicitados pelos microrganismos para a biossíntese dos bioprodutos (STEPHENSON, 1992).

### 5.3.2 No índice de emulsificação do produto formado

Tabela 3: Índice de emulsificação após 24 horas em tubo contendo querosene e caldo fermentado livre de células a partir de meio produzido com concentrações 0 a 10G/L de NaCl e água destilada. No tratamento DI foi utilizada água produzida dialisada e não houve adição de NaCl. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas de incubação e 30°C.

| Concentração NaCl (G/L) | %IE <sub>24</sub> |
|-------------------------|-------------------|
| 0                       | 41,70±2,94        |
| 2                       | -                 |
| 4                       | -                 |
| 6                       | -                 |
| 8                       | -                 |
| 10                      | -                 |
| DI                      | 45,51±5,43        |

A partir da tabela 03, pode-se analisar a influência das diferentes concentrações salinas presentes nos meios de produção de ramnolípido, no poder de emulsionar, pertinente ao produto estudado. Como observado, nenhum dos caldos livres de células fermentados que tiveram alguma adição de concentração de NaCl na sua composição apresentaram poder de emulsionar. O meio com água produzida dialisada foi o que se mostrou melhor para emulsionar, uma vez que conseguiu emulsionar o querosene com um IE<sub>24</sub> de aproximadamente 46%. O meio produzido com água destilada e que não recebeu adição de NaCl (0) conseguiu emulsionar o querosene com um IE<sub>24</sub> de aproximadamente 42%.

A partir desse resultado, seguiu-se com a utilização da água produzida dialisada no meio de cultura para a produção de ramnolípido por *P. aeruginosa*.

## 5.4 TESTE DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

### 5.4.1 Na quantificação de ramnolipídeo

A fonte e a concentração de nitrogênio devem ser levadas em conta na produção do ramnolipídeo por *P. aeruginosa*, uma vez que estas variáveis influenciam diretamente na proporção C/N, na quantidade do produto formado, no tipo de produto formado e no crescimento bacteriano. Sendo assim, testaram-se os compostos  $\text{NaNO}_3$  (nitrato de sódio) e extrato de levedura, utilizados como fontes inorgânica e orgânica de nitrogênio pelo microrganismo. O  $\text{NaNO}_3$  foi testado nas concentrações de 2G/L (N2), 3G/L (N3) e 4G/L (N4) e o extrato de levedura, nas concentrações de 0,25G/L (Y25); 0,50G/L (Y50) e 0,75G/L (Y75), faixas de concentração observadas na literatura para produção de ramnolipídeo por *P. aeruginosa*.

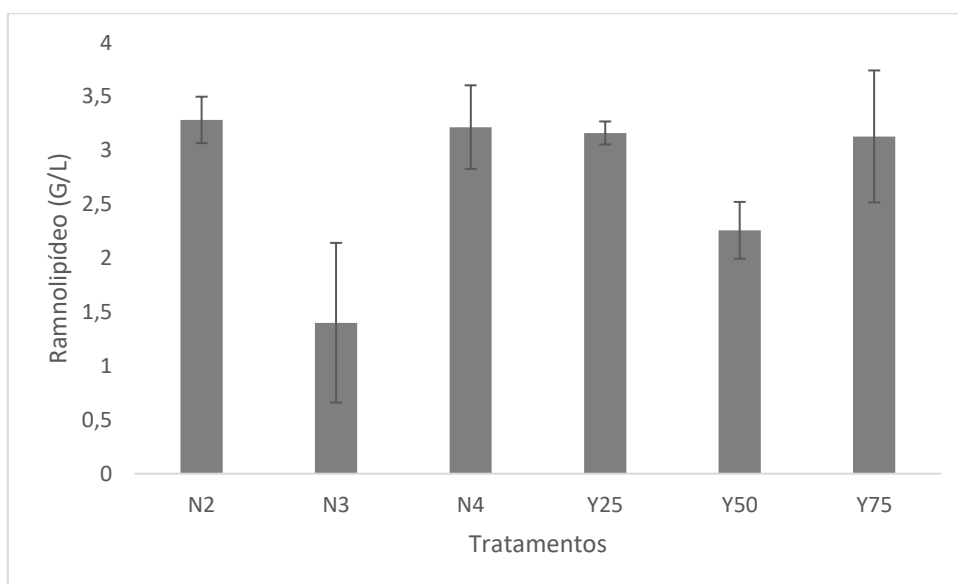


Figura 9: Concentração de ramnolipídeos produzidos em meios contendo  $\text{NaNO}_3$  (nas concentrações de 2, 3 e 4G/L) e extrato de levedura (nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75G/L), utilizadas como fonte de nitrogênio. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C.

A partir da figura 09, observou-se melhores produções de ramnolipídeo nos meios de cultura que receberam 2 e 4G/L (N2 e N4) de  $\text{NaNO}_3$  ( $3,3 \pm 0,2\text{G/L}$  e  $3,2 \pm 0,4\text{G/L}$  respectivamente) e 0,25 e 0,75G/L (Y25 e Y75) de extrato de levedura ( $3,2 \pm 0,1\text{G/L}$  e  $3,1 \pm 0,6\text{G/L}$  respectivamente).

### 5.4.2 Índice de emulsificação do produto formado

A figura 10 apresenta os percentuais de querosene emulsificado pelo caldo livre de células produzidos a partir da adição de extrato de levedura (nas concentrações de 0,25; 0,5 e 0,75G/L) ou de nitrato de sódio (nas concentrações de 2, 3 e 4G/L) utilizados como fonte de nitrogênio.

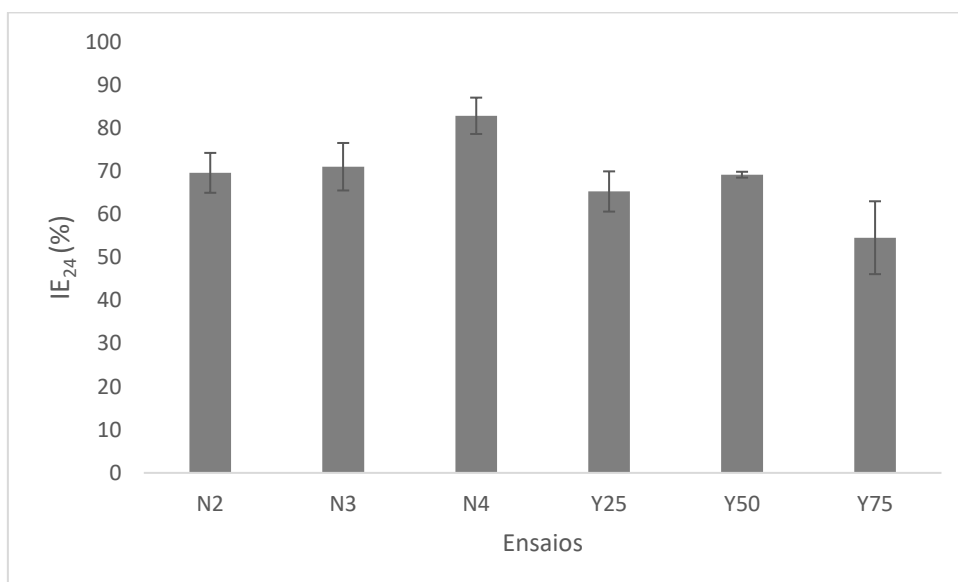


Figura 10: Índice de emulsificação após 24 horas utilizando querosene e caldo livre de células a partir de meio fermentado produzido com extrato de levedura (nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75G/L), utilizadas como fonte de nitrogênio. O bioprocesso aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C.

A partir da figura 10 pode-se verificar que o maior índice de emulsificação foi encontrado quando se utilizou 4G/L de  $\text{NaNO}_3$ , onde aproximadamente  $82,8 \pm 4,2\%$  do querosene foi emulsionado após 24 horas. O menor índice de emulsificação foi de aproximadamente  $54,6 \pm 8,5\%$ , encontrado no meio onde teve a adição de 0,75G/L de extrato de levedura. O meio contendo extrato de levedura onde se obteve maior emulsificação do querosene foi o que recebeu 0,5G/L de extrato de levedura, obtendo um  $\text{IE}_{24}$  de  $69,2 \pm 0,7\%$ .

#### 5.4.3 Tensão superficial

Uma das propriedades do ramnolípido é a redução da tensão superficial. Esta propriedade foi mensurada em tensiômetro à temperatura ambiente (25°C) e os resultados estão representados na figura 11.

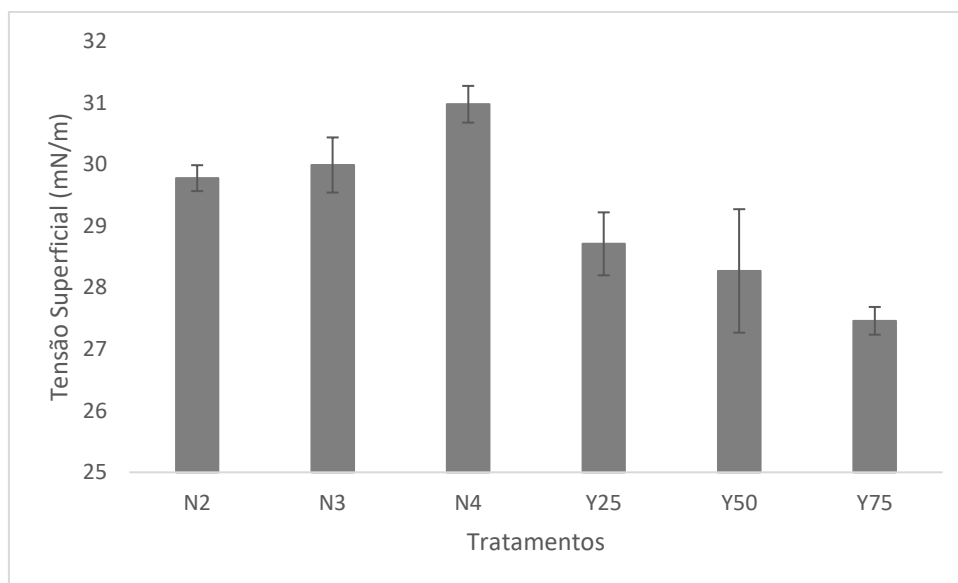


Figura 11: Medidas de tensão superficial obtidas a partir do caldo livre de células. As amostras foram preparadas em meios de cultura contendo 2, 3, 4G/L (amostras N2, N3 e N4 respectivamente) de  $\text{NaNO}_3$  e 0,25; 0,5; e 0,75G/L (amostras Y25, Y50 e Y75 respectivamente) com água produzida pré-tratada.

A utilização de 0,50 e 0,75G/L de extrato de levedura proporcionaram uma maior redução na tensão superficial do meio ( $28,7 \pm 1,0 \text{ mN/m}$  e  $27,5 \pm 0,2$  respectivamente). A menor redução da tensão superficial da água se deu quando da utilização de  $\text{NaNO}_3$  na formulação do meio, onde este apresentou tensões de  $31 \pm 0,3 \text{ mN/m}$  (4G/L) a  $29,7 \pm 0,2 \text{ mN/m}$  (2G/L).

#### 5.4.4 Tensão interfacial

Com base nas análises anteriores, os melhores resultados foram a partir das amostras N2 e N4 (com utilização de 2 e 4G/L de  $\text{NaNO}_3$ ) e Y25 e Y75 (com a utilização de 0,25 e 0,75G/L de extrato de levedura). Sendo assim, estas foram as selecionadas para a realização de medidas de tensão interfacial entre o caldo livre de células e o óleo bruto de petróleo, tendo como controle o meio não bioprocessado com água produzida da coleta 3 (CA 1- 3).

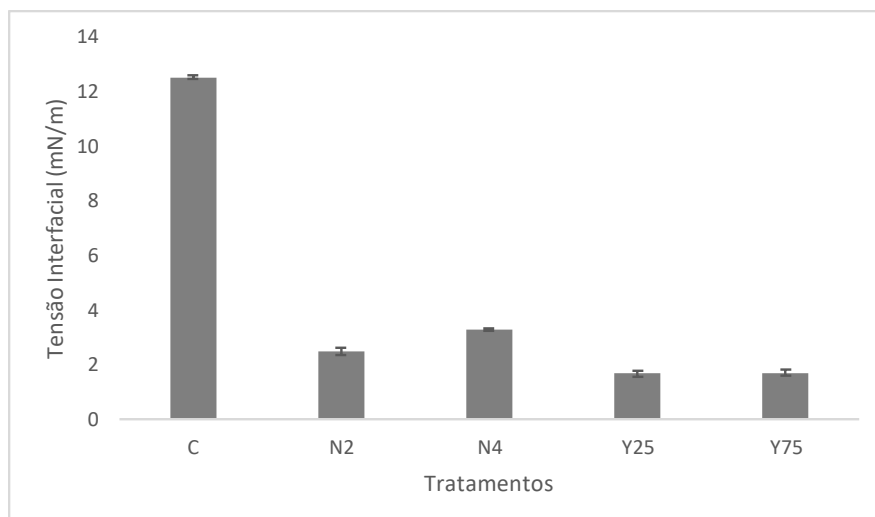


Figura 12: Medidas de tensão interfacial obtidas a partir do caldo livre de células das melhores amostras. As amostras foram preparadas em meios de cultura contendo 2 e 4G/L (amostras N2 e N4 respectivamente) de  $\text{NaNO}_3$  e 0,25 e 0,75G/L (amostras Y25 e Y75 respectivamente) com água produzida pré-tratada. Os valores de tensão interfacial do controle (C) foram obtidos através da medição da tensão em meio não bioprocessado, contendo água produzida.

Observa-se que as menores tensões interfaciais água/óleo foram obtidas quando da utilização de extrato de levedura como fonte de nitrogênio (figura 12). Ambos os meios reduziram a tensão interfacial entre a água produzida e o óleo bruto de  $12,5 \pm 0,06 \text{ mN/m}$  para  $1,7 \pm 0,01 \text{ mN/m}$ . Já quando se utilizou  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio, essa redução foi para  $2,5 \pm 0,1$  e  $3,3 \pm 0,05 \text{ mN/m}$ , na utilização de 2 e 4G/L de  $\text{NaNO}_3$ .

ATHUKORALA et al., (2006) reportaram que fontes orgânicas de nitrogênio podem ajudar no crescimento celular, porém não são favoráveis à produção de biossurfactante.

BENINCASA et al., (2002) ainda apontaram a existência de um estímulo mais eficiente no acúmulo de biossurfactante quando o microrganismo está sob condições limitantes de nitrogênio, o que também foi verificado por DEEPIKA et al., (2016). Sendo assim, a escolha pelo nitrato de sódio em detrimento às outras fontes de nitrogênio pode ser devido à lenta assimilação deste composto em comparação à outras fontes, o que gera uma condição nutricional limitante (PRIETO et al., 2008; SILVA et al., 2010).

ZHANG; MILLER, (1992) utilizaram como fontes de nitrogênio o fosfato de amônio e a peptona, que são fontes orgânicas, obtendo baixos rendimentos de ramnolípido ( $250 \text{ mG/L}$ ). Por outro lado, Lee et al (2004), usando a fonte orgânica de



nitrogênio ureia (0,01%) conseguiram uma produção de 17G/L de ramnolípídeo usando reator em batelada e 22,7G/L em batelada contínua, utilizando óleo de peixe como fonte de carbono.

Também há o relato da utilização de extrato de levedura por ZHANG et al. (2012) e por OLWASEUN et al. (2017), porém em associação com o nitrato de sódio.

Contudo, diferente do que é encontrado na literatura, o presente estudo verificou uma produção sem diferenças estatísticas de ramnolípídeo por *P. aeruginosa* utilizando água produzida pré-tratada entre a utilização do extrato de levedura, que é considerada uma fonte de nitrogênio orgânica e do  $\text{NaNO}_3$ , considerado uma fonte de nitrogênio inorgânica. Porém, se tratando de tensão superficial e interfacial, o extrato de levedura se mostrou como sendo a melhor opção de fonte de nitrogênio nas condições testadas.

Segundo MULLIGAN et al (2014), o peso molecular dos biossurfactantes pode influenciar nas propriedades físico-químicas da molécula como tensões superficial e interfacial, uma vez que moléculas com baixo peso molecular irão promover a redução dessas tensões e moléculas de alto peso molecular irão se ligar firmemente às superfícies, dificultando a redução das tensões.

## 5.5 OTIMIZAÇÃO ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA AS VARIÁVEIS NITROGÊNIO E CARBONO

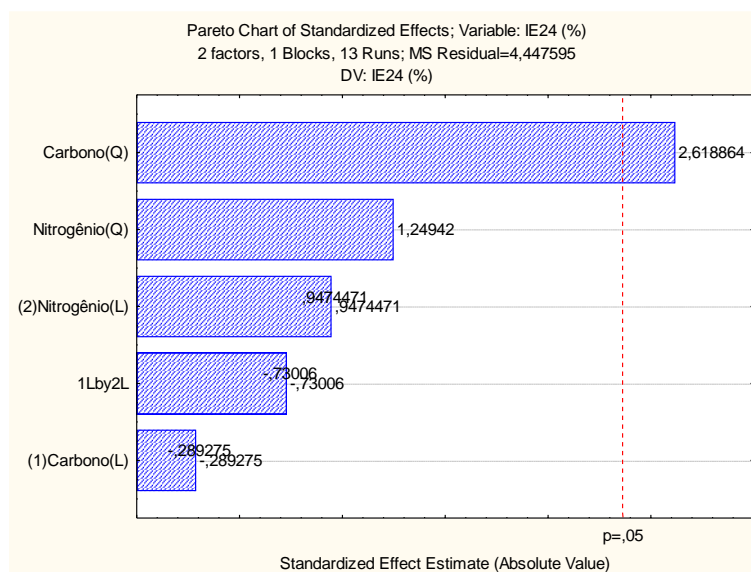
De acordo com o planejado, os experimentos foram feitos e os valores obtidos foram compilados na tabela 4, onde se apresentam as concentrações das variáveis independentes fonte de carbono (glicerina bruta) e fonte de nitrogênio (extrato de levedura) testadas, bem como os valores das variáveis resposta índice de emulsificação (%), tensão superficial (com seus valores inversos) e produção de ramnolípídeo (G/L).

Tabela 4: Concentração das variáveis independentes fonte de carbono (glicerina bruta) e fonte de nitrogênio (extrato de levedura), indicadas a partir do DCCR, e valores de índice de emulsificação (IE24%), tensão superficial (com seus valores inversos) (mN/m) e produção de ramnolipídeo (G/L).

| Corridas | Glicerina bruta (ml/l) | Extrato de levedura (G/L) | IE 24 (%) | 1- Tensão superficial (mN/m) | Ramnolipídeo (G/L) |
|----------|------------------------|---------------------------|-----------|------------------------------|--------------------|
| 1        | 10,00000               | 0,214500                  | 57,89474  | 0,7084                       | 3,350337079        |
| 2        | 10,00000               | 1,250000                  | 60,52632  | 0,7075                       | 4,1882397          |
| 3        | 30,00000               | 0,214500                  | 57,89474  | 0,7163                       | 3,424513109        |
| 4        | 30,00000               | 1,250000                  | 57,44681  | 0,726                        | 4,524419476        |
| 5        | 5,85786                | 0,732300                  | 59,45946  | 0,717                        | 1,582209738        |
| 6        | 34,14214               | 0,732300                  | 60,41667  | 0,7328                       | 6,791086142        |
| 7        | 20,00000               | 0,000091                  | 56,52174  | 0,7219                       | 4,045617978        |
| 8        | 20,00000               | 1,464509                  | 58,97436  | 0,7183                       | 6,233333333        |
| 9 (C)    | 20,00000               | 0,732300                  | 57,89474  | 0,7218                       | 4,133483146        |
| 10 (C)   | 20,00000               | 0,732300                  | 57,89474  | 0,7265                       | 4,70906367         |
| 11 (C)   | 20,00000               | 0,732300                  | 55,26316  | 0,7213                       | 4,459475655        |
| 12 (C)   | 20,00000               | 0,732300                  | 51,42857  | 0,7269                       | 4,354207241        |
| 13 (C)   | 20,00000               | 0,732300                  | 55,26316  | 0,7213                       | 4,391985019        |

A partir dos valores da tabela 4, calculou-se os coeficientes de regressão linear (L) e quadrática (Q), e avaliou-se a significância estatística ( $P \leq 0,05$ ) de cada variável (fontes de carbono e nitrogênio) de forma isolada e conjunta em cada variável resposta (IE24, TS e concentração de ramnolipídeo). Os dados são apresentados abaixo, através dos gráficos de Pareto.

A

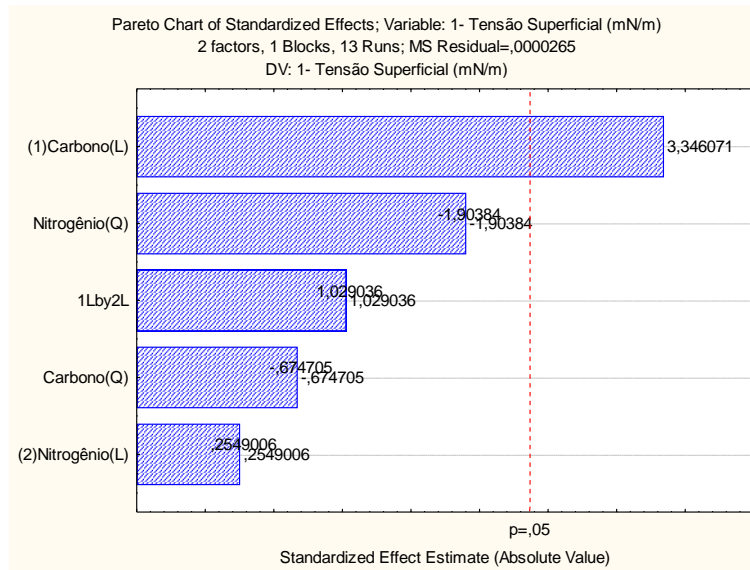


B

|                   | SS       | df | MS       | F        | p        |
|-------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| (1)Carbono (L)    | 0,37218  | 1  | 0,37218  | 0,083680 | 0,780751 |
| Carbono (Q)       | 30,50359 | 1  | 30,50359 | 6,858446 | 0,034466 |
| (2)Nitrogênio (L) | 3,99241  | 1  | 3,99241  | 0,897656 | 0,374962 |
| Nitrogênio (Q)    | 6,94292  | 1  | 6,94292  | 1,561050 | 0,251668 |
| 1L by 2L          | 2,37051  | 1  | 2,37051  | 0,532987 | 0,489059 |
| Error             | 31,13316 | 7  | 4,44759  |          |          |
| Total SS          | 72,10136 | 12 |          |          |          |
| R-sqr             | 0,56820  |    |          |          |          |
| Adj               | 0,25978  |    |          |          |          |

Figura 13: Gráfico de Pareto (A) e tabela ANOVA (B) na avaliação do índice de emulsificação (% IE24) testando as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio do meio de cultura.

A

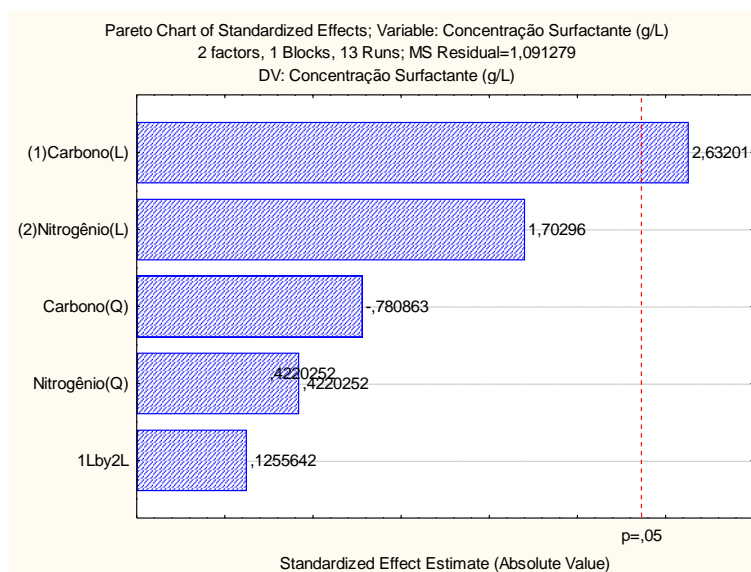


B

|                          | SS              | df       | MS              | F               | p               |
|--------------------------|-----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>(1)Carbono (L)</b>    | <b>0,000297</b> | <b>1</b> | <b>0,000297</b> | <b>11,19619</b> | <b>0,012317</b> |
| <b>Carbono (Q)</b>       | 0,000012        | 1        | 0,000012        | 0,45523         | 0,521516        |
| <b>(2)Nitrogênio (L)</b> | 0,000002        | 1        | 0,000002        | 0,06497         | 0,806127        |
| <b>Nitrogênio (Q)</b>    | 0,000096        | 1        | 0,000096        | 3,62462         | 0,098647        |
| <b>1L by 2L</b>          | 0,000028        | 1        | 0,000028        | 1,05892         | 0,337701        |
| <b>Error</b>             | 0,000186        | 7        | 0,000027        |                 |                 |
| <b>Total SS</b>          | 0,000614        | 12       |                 |                 |                 |
| <b>R-sqr</b>             | 0,697360        |          |                 |                 |                 |
| <b>Adj</b>               | 0,481190        |          |                 |                 |                 |

Figura 14: Gráfico de Pareto na avaliação do inverso da tensão superficial (1-TS) (mN/m), testando as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio do meio de cultura.

A



B

|                          | SS             | df       | MS              | F               | p               |
|--------------------------|----------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>(1)Carbono (L)</b>    | <b>7,55982</b> | <b>1</b> | <b>7,559816</b> | <b>6,927481</b> | <b>0,033814</b> |
| <b>Carbono (Q)</b>       | 0,66540        | 1        | 0,665404        | 0,609747        | 0,460470        |
| <b>(2)Nitrogênio (L)</b> | 3,16479        | 1        | 3,164788        | 2,900071        | 0,132358        |
| <b>Nitrogênio (Q)</b>    | 0,19436        | 1        | 0,194363        | 0,178105        | 0,685666        |
| <b>1L by 2L</b>          | 0,01721        | 1        | 0,017206        | 0,015766        | 0,903607        |
| <b>Error</b>             | 7,63895        | 7        | 1,091279        |                 |                 |
| <b>Total SS</b>          | 19,35109       | 12       |                 |                 |                 |
| <b>R-sqr</b>             | 0,60524        |          |                 |                 |                 |
| <b>Adj</b>               | 0,32328        |          |                 |                 |                 |

Figura 15: Gráfico de Pareto (A) e tabela ANOVA (B) na avaliação da concentração de ramnolipídeo (G/L), testando as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio do meio de cultura.

Através dos gráficos de Pareto e da tabela ANOVA, gerados pelo programa STATISTICA 8 é possível observar que houve significância estatística para a variável fonte de carbono (glicerina bruta), de forma linear nas análises de concentração de ramnolipídeo e índice de emulsificação e de forma quadrática na análise da tensão superficial. A variável fonte de nitrogênio (extrato de levedura) não apresentou significância estatística em nenhuma das duas formas (linear ou quadrática).

PEREIRA et al. (2013) lançaram mão da metodologia de superfície de resposta para otimizar o meio de produção do ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa*, avaliando de forma conjunta as variáveis carbono (glicerina bruta) e nitrogênio ( $\text{NaNO}_3$ ), obtendo um ponto ótimo quando da utilização de 50G/L de glicerina bruta e 4G/L de  $\text{NaNO}_3$ , o que permitiu uma produção de 44,5mG/L.h de ramnolipídeo.

Um ponto importante a ser observado nos resultados apresentados no presente trabalho é que a interação entre as duas variáveis (fonte de carbono e fonte de nitrogênio) (1L by 2L) não apresentou significância estatística, ou seja, nas condições testadas, não foi verificada dependência estatística entre as duas variáveis independentes testadas (fonte de carbono e fonte de nitrogênio) sobre as variáveis resposta concentração de ramnolipídeo, tensão superficial e índice de emulsificação, sugerindo que a otimização do meio de cultura envolvendo essas duas variáveis independentes deva ser feita de forma dissociada.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA GLICERINA BRUTA COMO FONTE DE CARBONO

### 5.6.1 Na quantificação de ramnolipídeo

Seguiu-se então, com a avaliação da concentração de glicerina bruta na produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa*. Testou-se 6 diferentes concentrações de glicerina bruta, com variação de 0 a 30ml/l.

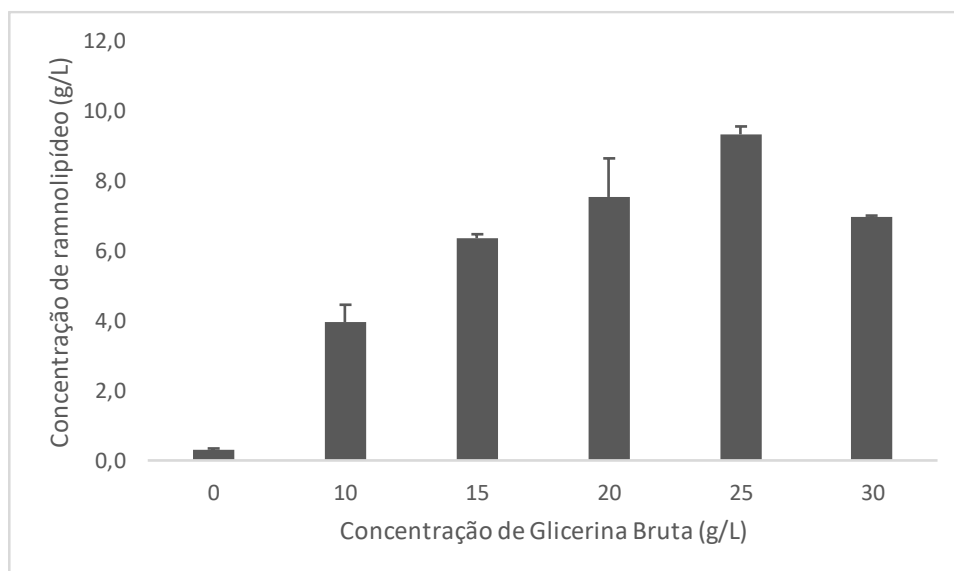


Figura 16: Produção de ramnolipídeo em meio LABEM, com água produzida, utilizando glicerina bruta nas concentrações de 0 a 30ml/l.

Nota-se na figura 16 que a maior produção de ramnolípídeo aconteceu nos meios com a concentração de 25ml/l de glicerina bruta, onde a concentração de ramnolípídeo encontrada foi de 9,33G/L.

Mesmo não se adicionando nenhuma fonte extra de carbono ao meio de cultura, observou-se que ainda há uma produção de ramnolípídeo de 0,32G/L, porém essa foi a menor concentração de ramnolípídeo encontrada, seguida pela concentração de 3,96G/L, que foi produzido no meio onde se adicionou 10ml/l de glicerina bruta.

### 5.6.2 No índice de emulsificação do produto formado

Quanto à emulsificação, de todos os testados, apenas o meio que não recebeu fonte de carbono extra não foi capaz de emulsificar o querosene. O maior índice de emulsificação do querosene após 24 horas foi de aproximadamente 62%, obtido pelo caldo livre de células produzido com 10ml/l de glicerina bruta.

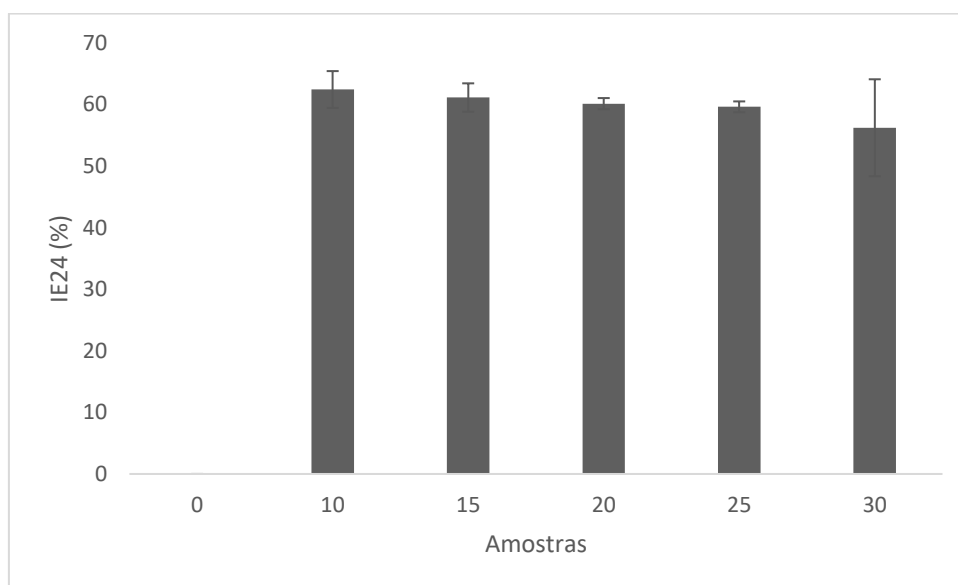


Figura 17: Índice de emulsificação entre o querosene e o caldo livre de células, produzido a partir de meio contendo concentrações de 0 a 30ml/l de glicerina bruta, utilizada como fonte de carbono.

PAPANIKOLAOU et al. (2008) apontam a toxicidade causada pela glicerina bruta em decorrência de impurezas do processo de transesterificação para a obtenção do biodiesel. Entre as principais impurezas, destacam-se os sais de sódio e potássio, que podem se apresentar nas concentrações de 4 a 5% (p/p) no rejeito. Estas

impurezas podem causar efeitos inibitórios no crescimento microbiano, como também na produção de metabólitos por esses microrganismos.

SOUSA, DE et al., (2011) testaram diferentes fontes de carbono, para a produção de ramnolípido por *Pseudomonas aeruginosa*, conseguindo produções de 355mG/L a mais de 1200mG/L. O menor resultado de produção se deu com a utilização da glicerina bruta na concentração de 5% (p/v), contudo, ainda assim, os autores obtiveram bons resultados de índice de emulsificação e tensão superficial.

(PEREIRA et al., 2013) testaram concentrações de glicerina bruta de 20,9G/L a 64,1 G/L, observando melhores concentrações de ramnolípido na concentração de 50G/L, que correspondeu a uma produção do biossurfactante de 2,75G/L e 3,88G/L em biorreator de batelada e batelada alimentada, respectivamente.

Os valores de produção de ramnolípido encontrados no presente estudo foram maiores que os encontrados na literatura, quando se faz utilização da glicerina bruta como fonte de carbono. Aparentemente o microrganismo não sofreu inibição pela glicerina bruta usada, ou pela sua resistência aos seus contaminantes ou pela presença de poucos contaminantes em relação à concentração e/ou tipos.

Uma vez que a glicerina bruta se apresenta como um resíduo, pode haver grande flutuação na quantidade e concentração desses contaminantes. O tipo e a fonte do ácido graxo, bem como o tipo de catálise utilizada para a produção do biodiesel irão influenciar nas propriedades físicas, químicas e nutricionais da glicerina bruta (THOMPSON; HE, 2006).

## 5.7 MODELAGEM CINÉTICA DA PRODUÇÃO OTIMIZADA EM SHAKER E BIORREATOR

O experimento objetivou a modelagem cinética da produção de ramnolípido em meio de cultura otimizado anteriormente (0,75 G/L de extrato de levedura e 25G/L de glicerina bruta). Os testes foram conduzidos em shaker orbital e em biorreator, pelo período de 144 horas. Os gráficos foram plotados, a regressão linear foi calculada, e a equação da reta permitiu a análise dos modelos que se seguem.



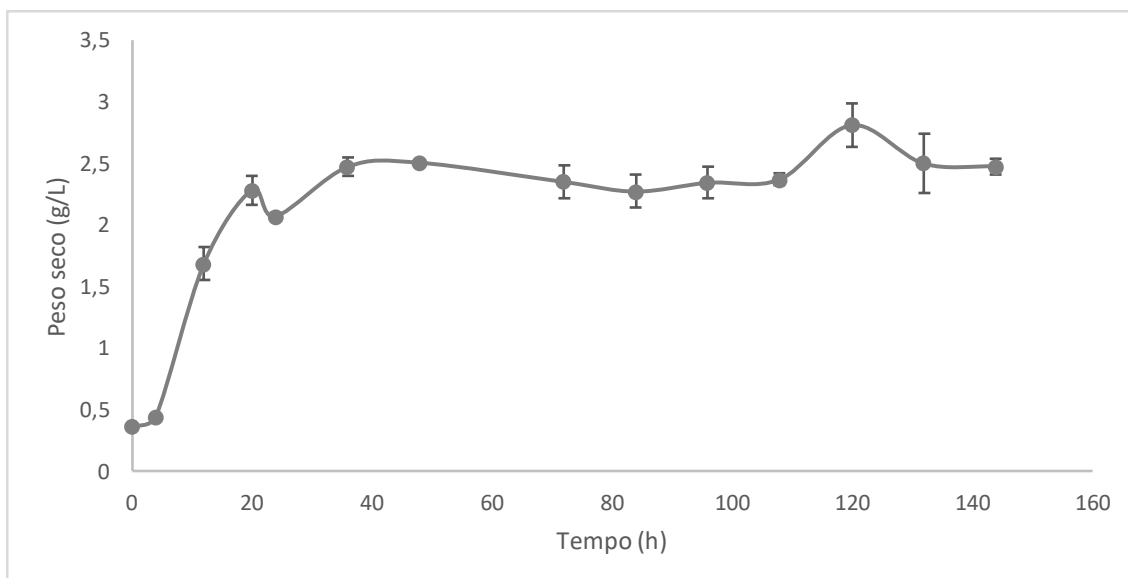


Figura 18: Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em shaker.

A partir das análises de peso seco da biomassa é possível observar a fase exponencial do microrganismo no meio de produção em estudo, que vai do tempo 4 ao tempo 20hs. Depois, a cinética mostra um equilíbrio dinâmico do microrganismo (figura 18).

Isolando a fase exponencial, é possível se obter o coeficiente de crescimento específico do microrganismo em meio de produção pela avaliação do LN (logaritmo Neperiano) com o tempo. Tal análise é mostrada na figura 19.

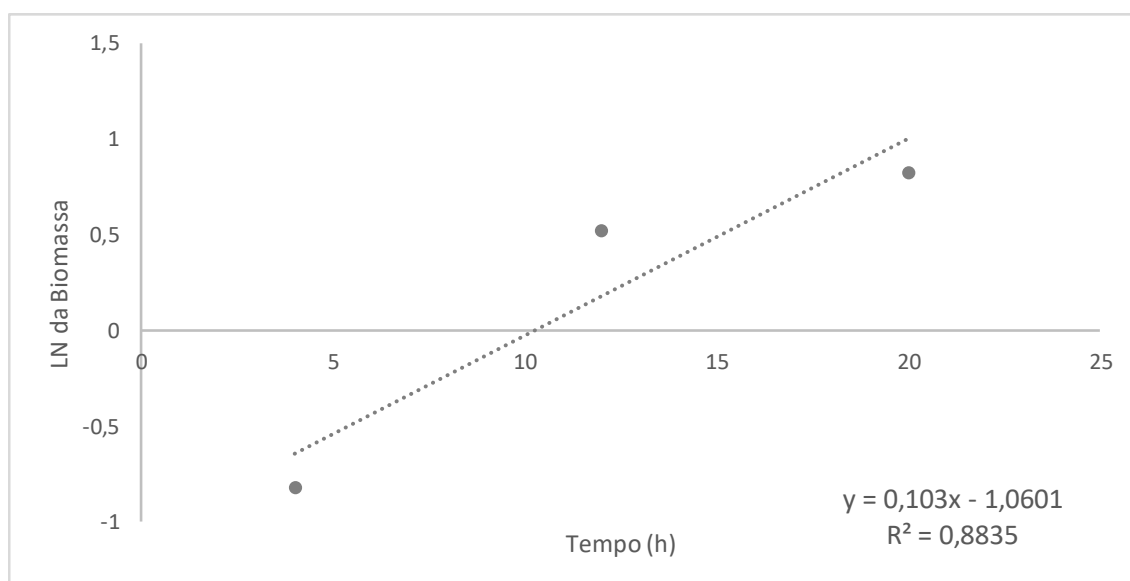


Figura 19: Cálculo do  $\mu$  específico do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em shaker de 4 a 20 horas.

A partir da análise dos dados da figura 19, é possível inferir que o crescimento específico ( $\mu_{\text{esp}}$ ) da *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo água produzida e glicerina bruta para a produção de ramnolipídeo foi de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

Nas primeiras horas de crescimento houve um decréscimo na produção de biomassa, se fazendo necessária a estimativa da fase exponencial para o cálculo do  $\mu_{\text{esp}}$  a partir do tempo de 4 horas após o início da produção.

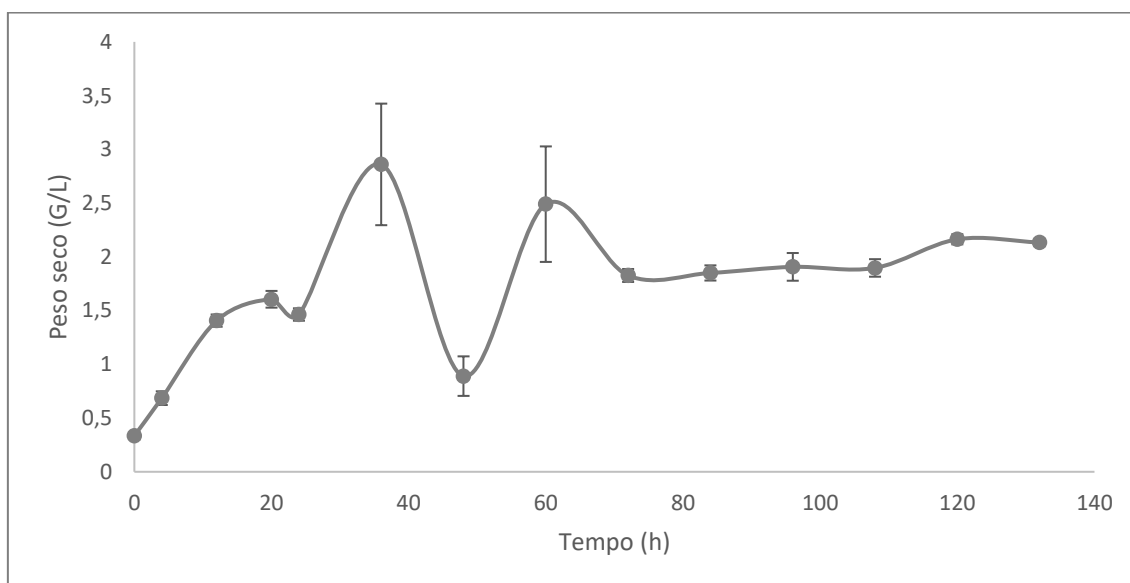


Figura 20: Cinética de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em reator.

Já em reator, a fase exponencial já se deu a partir do tempo 0, uma vez que não houve nenhuma perda de biomassa aparente até o final da fase exponencial. Os dados da figura 20 mostram que a fase exponencial da produção de biomassa de *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo água produzida e glicerina bruta foi do tempo 0 a 20hs, final compatível com o fim da fase exponencial encontrada na produção em shaker.

A biomassa foi transformada em LN e analisando em relação ao tempo, foi possível encontrar o  $\mu_{\text{esp}}$  do microrganismo nas condições avaliadas em reator.

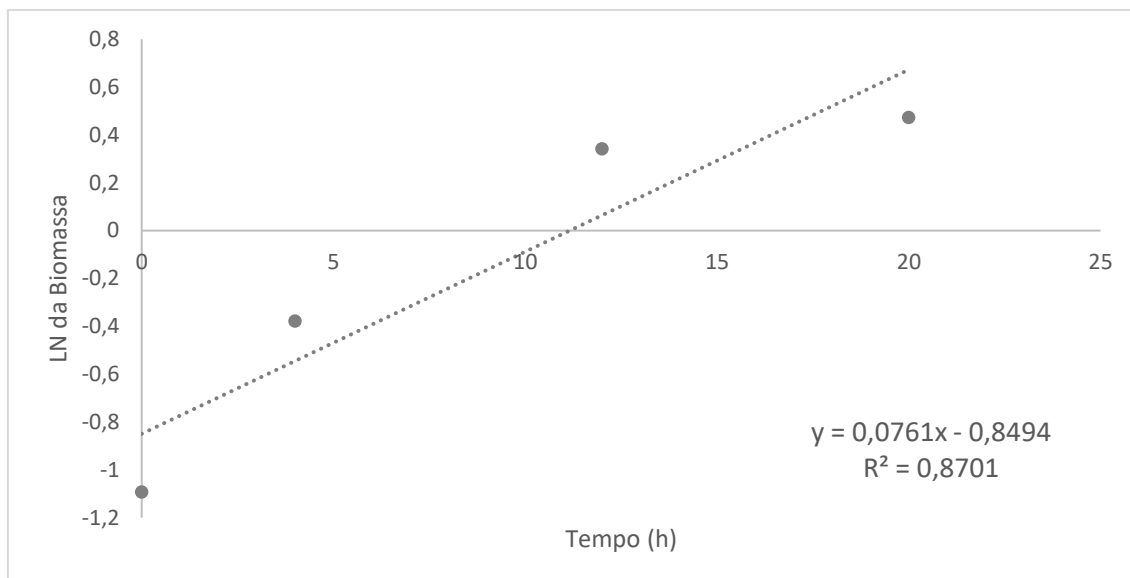


Figura 21: Cálculo do  $\mu$  específico do crescimento em reator 0 a 20 horas

Como mostra a figura 21, o  $\mu_{esp}$  calculado foi  $0,076 \text{ h}^{-1}$ .

RANJBAR E HEJAZI (2019) encontraram coeficientes de crescimento específicos de  $0,1$  a  $0,33 \text{ h}^{-1}$ , variando as concentrações de resíduos lignocelulósicos, usados como fonte de carbono, e temperatura, na produção e modelagem do ramnolípídeo produzido por *P. aeruginosa*, o que corrobora com os achados na produção feita em shaker.

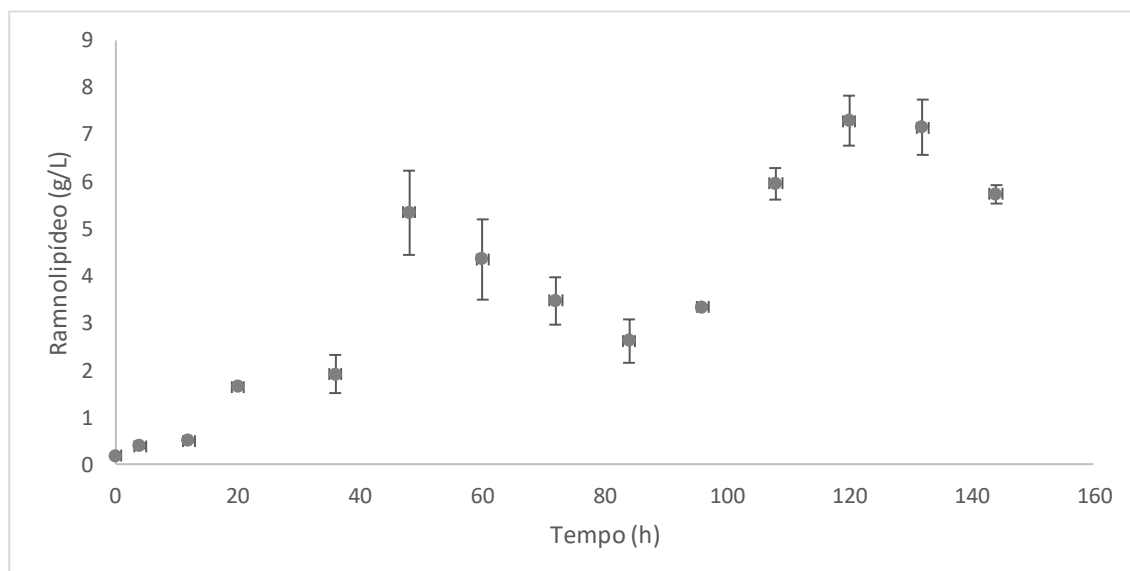


Figura 22: Cinética de produção de ramnolípídeo em shaker.

Avaliando a cinética de produção do ramnolípídeo nas condições do estudo em shaker (figura 22), observa-se que a produção de ramnolípídeo já se inicia em 4 horas, se mantendo até 48 horas, onde observa-se uma decaída na concentração total de

surfactante e retomada em 84 horas, indo até 120 horas, onde a produção chega ao seu máximo (7,28G/L).

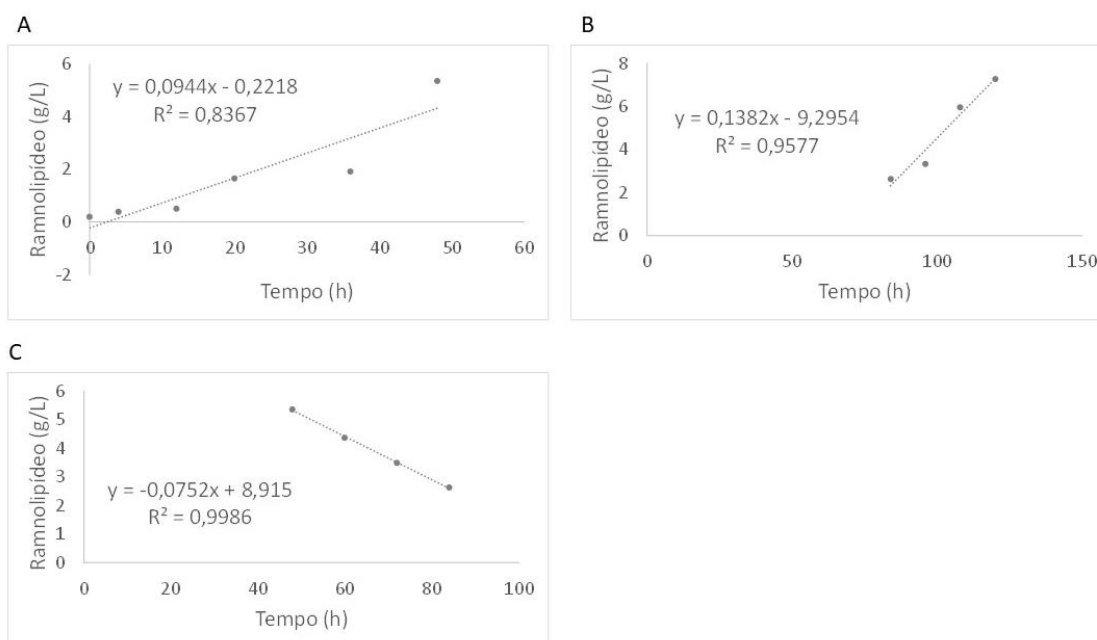


Figura 23: Taxas de produção e consumo de ramnolipídeo nas fases da cinética em shaker

Avaliando de forma isolada cada reta fragmentada da cinética, observa-se que a produção de ramnolipídeo em shaker se deu em dois momentos. Um primeiro que foi do tempo 0 a 48h, tendo uma taxa de produção de 0,0944G/L.h e o segundo momento que vai do tempo 84 ao 120. Neste segundo momento, a taxa de produção foi de 0,138G/L.h. Observa-se também que esses dois momentos de produção são intercalados por um momento de consumo do produto, que aconteceu no tempo de 48 a 84 horas, com uma taxa de consumo chegando a 0,0752G/L.h.

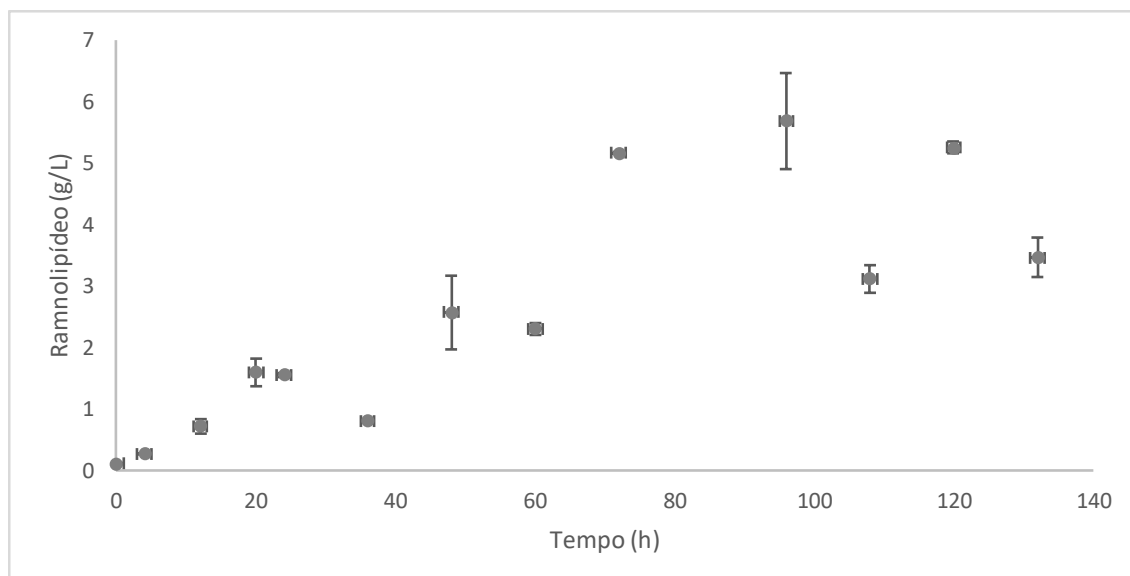


Figura 24: Cinética de produção de ramnolípídeo em biorreator

A partir da análise da figura 24, pode-se verificar que a produção de ramnolípídeo se deu, como no shaker, a partir de 4 horas, onde começou a sua variação em 24 horas e teve sua produção máxima em 96 horas.

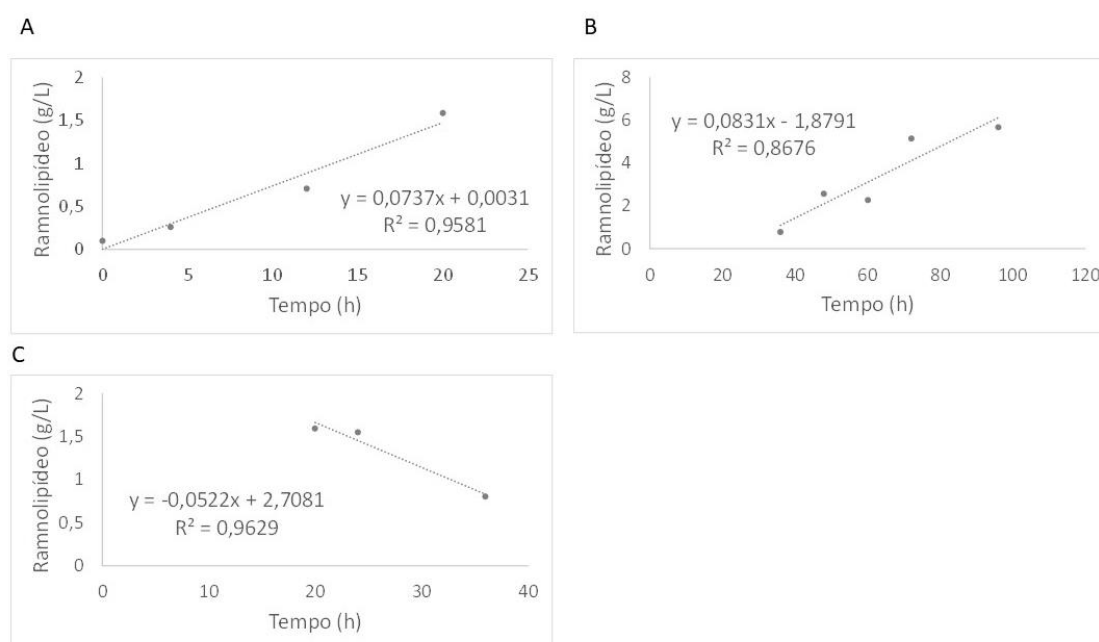


Figura 25: Taxas de produção e consumo de ramnolípídeo nas fases da cinética em reator

A partir da fragmentação da cinética de produção em reator (figura 25), também, como na produção em shaker, é possível a visualização de duas fases de produção distintas. A primeira fase vai do tempo 0 a 20hs, com uma taxa de produção de 0,0737G/L.h e a segunda vai do tempo 36 a 96h, com uma taxa de produção de

0,083G/L.h. Estas fases são intercaladas por uma fase de consumo do produto, que vai do tempo 20 a 36hs, com uma taxa de consumo de 0,052G/L.h.

Tabela 5: Resumo das fases de produção e consumo de ramnolípido nas fases da cinética em shaker e reator.

|                        | Fases da produção e consumo do ramnolípido | PR (G/L.h) | R <sup>2</sup> |
|------------------------|--|------------|----------------|
| Produção em Shaker     | 1ª Fase de produção                        | 0,09       | 0,83           |
|                        | 2ª Fase de produção                        | 0,14       | 0,95           |
|                        | Fase de consumo                            | 0,08       | 0,99           |
| Produção em Biorreator | 1ª Fase de produção                        | 0,07       | 0,95           |
|                        | 2ª Fase de produção                        | 0,08       | 0,86           |
|                        | Fase de consumo                            | 0,05       | 0,96           |

A tabela 5 resume as fases de produção e consumo encontradas na produção em shaker e na produção em biorreator, com os respectivos R<sup>2</sup> das regressões lineares calculadas para a estimativa da taxa de produção.

Uma hipótese para o que se vê na cinética de produção de ramnolípido em shaker e em biorreator é que o microrganismo está sob influência do efeito semelhante a um crescimento diaúxico (crescimento onde o microrganismo tem duas fases de crescimento acelerado, devido à utilização de duas fontes de carbono distintas), uma vez que o extrato de levedura pode também ser utilizado como fonte de carbono, pode estar ocorrendo o consumo da fonte extrato de levedura e só depois da fonte de carbono principal, que é a glicerina bruta.

PEREIRA et al. (2013) usando glicerina bruta para produção de ramnolípido em reator em batelada e batelada alimentada conseguiram uma taxa de produção de 22,9 e 32,4mG/L.h. Assim também BENINCASA et al. (2002) usaram soapstock como fonte de carbono para produção de ramnolípido e obtiveram uma taxa de produtividade de 125 mG/L.h.

Apesar de nenhum dos autores terem observado uma produção em duas fases, os achados do presente trabalho são superiores aos encontrados na literatura.

Tabela 6: Valores de produção máxima de ramnolipídeo (PRL), biomassa (pX), coeficiente de crescimento específico ( $\mu_{esp}$ ), tempo em que houve a produção máxima do ramnolipídeo (T), índice produto / tempo ( $Y_p/t$ ), índice produto / biomassa ( $Y_p/X$ ) em shaker e em biorreator.

|                                | Produção em Shaker | Produção em Biorreator |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|
| <b>pRL (G/L)</b>               | 7,29               | 5,7                    |
| <b>pX (G/L)</b>                | 2,8                | 1,9                    |
| <b><math>\mu_{esp}</math></b>  | 0,1                | 0,076                  |
| <b>t (h)</b>                   | 120                | 96                     |
| <b><math>Y_{pRL}/t</math></b>  | 0,061              | 0,059                  |
| <b><math>Y_{pRL}/pX</math></b> | 2,6                | 3                      |

Valores de produção máxima de ramnolipídeo (PRL), biomassa (pX), coeficiente de crescimento específico ( $\mu_{esp}$ ), tempo em que houve a produção máxima do ramnolipídeo (T), índice produto / tempo ( $Y_p/t$ ), índice produto / biomassa ( $Y_p/X$ ) em shaker e em biorreator.

Outras variáveis provenientes da modelagem cinética podem ser avaliadas, como o índice de ramnolipídeo produzido pelo tempo ( $Y_{pRL}/t$ ) (tabela 6), onde verifica-se que há uma pequena diferença entre a produção em shaker e no biorreator (0,061 e 0,059 respectivamente), porém, voltando às análises cinéticas, também pode-se perceber que no reator, a produção manteve-se apenas até 96hs (chegando a uma produção máxima de 5,7G/L), enquanto que no shaker essa produção se manteve até 120 horas, chegando a uma produção máxima de 7,29G/L. Também verifica-se que nesses mesmos tempos (96h e 120h), o comportamento da produção de biomassa foi semelhante ao observado na produção do ramnolipídeo, sendo maior no shaker em relação ao biorreator (2,8G/L e 1,9G/L respectivamente), o que é refletido no menor coeficiente de crescimento específico do microrganismo em reator em comparação ao shaker (0,076 e 0,1 respectivamente).

Essa menor produção tanto de produto, quanto de biomassa no biorreator pode ser explicada pela limitação do processo decorrente à formação de espuma.

REIS et al. (2010) apontam a redução da transferência de oxigênio por conta da diminuição do  $O_2$  dissolvido. Os autores apontam que com a formação de espuma causada pelo próprio ramnolipídeo no meio, há a formação de um complexo surfactante/ $O_2$ , tornando o oxigênio menos disponível no meio. WEI et al. (2005) ainda alertam para a necessidade da aeração no meio de produção do ramnolipídeo, onde

a limitação de  $O_2$  causa uma ineficiência na produção tanto de ramnolipídeo quanto de biomassa.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES COLETAS DE ÁGUA PRODUZIDA NA FORMULAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

### 5.8.1 Na quantificação de ramnolipídeo

Três diferentes amostras de água produzida advindas de diferentes coletas foram testadas para fins de produção de ramnolipídeo. Todas as coletas foram feitas no campo 1, e as coletas utilizadas foram a 3 (CA1-3, identificada como AP03), 4 (CA1-4 identificada como AP04) e 5 (CA1-5 identificada como AP05). Um meio com água destilada (AD) foi utilizado como controle.

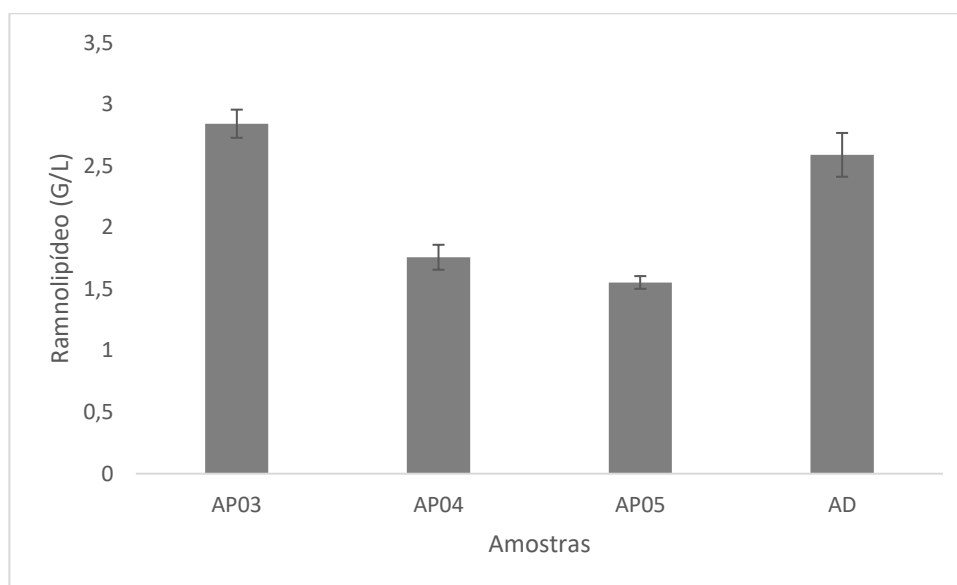


Figura 26: Concentração de ramnolipídeos produzidos em meios contendo água produzida de diferentes coletas (coleta 3, AP03; coleta 4, AP04 e coleta 5, AP05). O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C.

Observa-se a partir da figura 26 que a melhor concentração de ramnolipídeo ocorreu quando se fez uso da água produzida da coleta 3 (AP03), com concentração de  $2,8 \pm 0,1$  G/L de ramnolipídeo. Esse resultado é parecido com o obtido com a administração de água destilada, que apresentou concentração de ramnolipídeo de  $2,6 \pm 0,2$  G/L. As menores concentrações foram verificadas na utilização das coletas 4



e 5 (AP04 e AP05, respectivamente), que apresentaram concentrações de  $1,8\pm 0,1$  e  $1,6\pm 0,05\text{G/L}$ .

### 5.8.2 No índice de emulsificação

Os índices de emulsificação foram obtidos através da junção do caldo livre de células pós bioprocessamento (120hs), com o hidrocarboneto querosene.

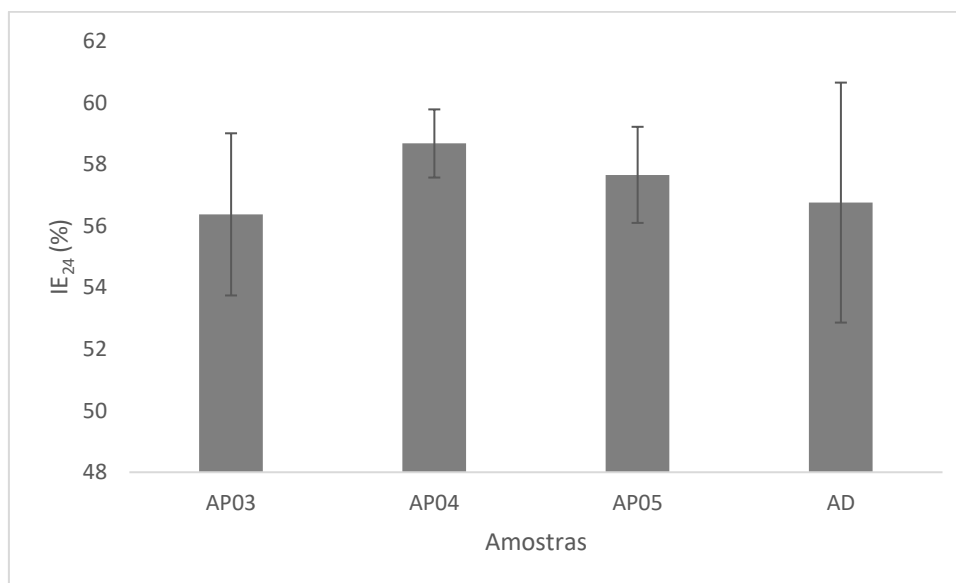


Figura 27: Índice de emulsificação após 24 horas utilizando querosene e caldo livre de células a partir de meio fermentado produzido com água produzida de diferentes coletas (3, 4 e 5). O meio com água destilada (AD) foi tido como controle. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C.

A partir da figura 27, pode-se observar que o maior índice de emulsificação aconteceu através do meio produzido com a água de coleta 4 ( $58,7\pm 1,1\%$ ) e o menor índice se deu com a água da 3ª coleta ( $56,4\pm 2,6\%$ ). O meio produzido com água destilada teve uma emulsão de  $56,8\pm 3,9\%$ . Contudo, não houve diferença estatística entre os meios testados.

### 5.8.3 Na tensão superficial

Os valores de tensão superficial dos caldos livre de células obtidos pelo bioprocessamento utilizando águas produzidas de diferentes coletas estão descritos na figura 28.

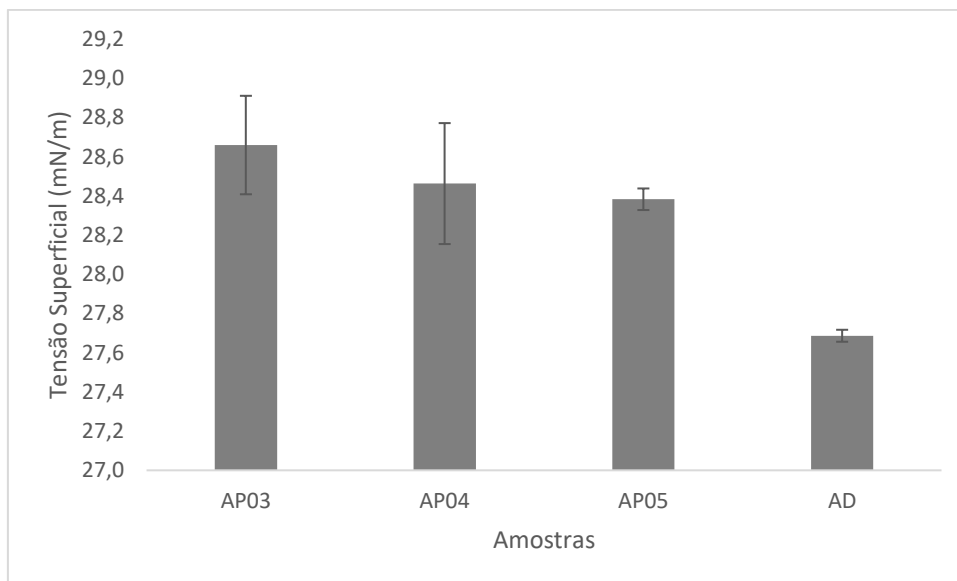


Figura 28: Medidas de tensão superficial obtidas a partir do caldo livre de células, obtido a partir de meio bioprocessado, produzido com água produzida de diferentes coletas (3, 4 e 5). O meio com água destilada (AD) foi tido como controle. O bioprocessamento aconteceu durante 120 horas, à temperatura de 30°C.

A menor tensão superficial foi encontrada no meio produzido com água destilada, onde este meio possibilitou a queda da tensão de 72mN/m para  $27,7 \pm 0,03$  mN/m. O meio com água produzida que obteve menor tensão superficial foi o obtido com água da coleta 5, com redução da tensão para  $28,4 \pm 0,05$  mN/m. Contudo, entre as tensões obtidas pelas águas produzidas não houve diferença estatística.

#### 5.8.4 Na tensão interfacial

A tensão interfacial foi obtida através do método da gota pendente, onde o caldo livre de células do bioprocessamento utilizando as águas produzidas das coletas 3, 4 e 5 foi utilizado como fase pesada, enquanto a fase leve foi o óleo bruto de petróleo.

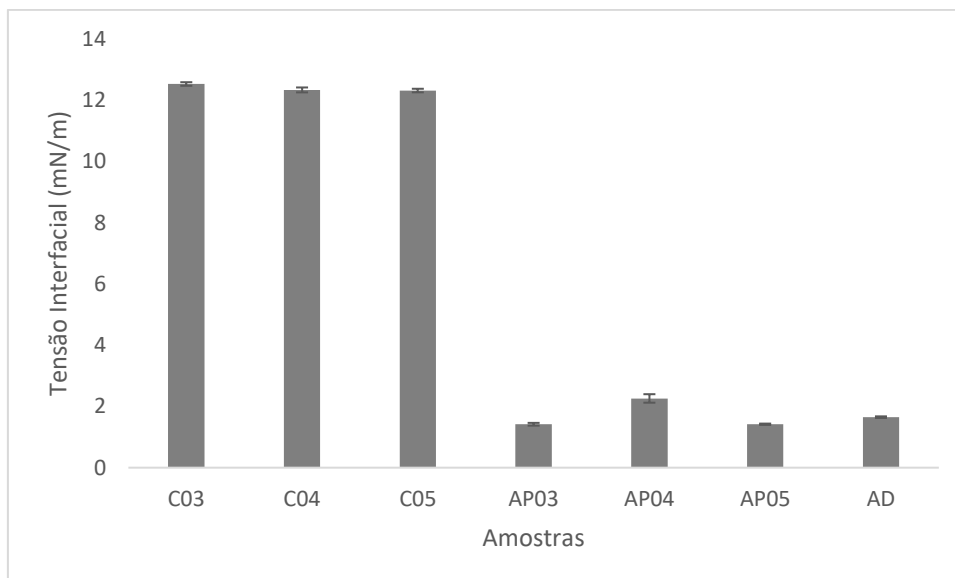


Figura 29: Medidas de tensão interfacial obtidas a partir do caldo livre de células das amostras utilizando diferentes coletas de água produzida (3, 4 e 5). Os valores de tensão interfacial do controle (C3, C4 e C5) foram obtidos através da medição da tensão em meio não bioprocessado contendo água produzida.

Observa-se a partir da figura 29 que as amostras de água produzida não bioprocessadas, utilizadas como controle (C3, C4 e C5) apresentam uma certa homogeneidade nos valores de tensão interfacial, que é de aproximadamente  $12 \pm 0,5 \text{ mN/m}$ . Os meios que apresentaram menores valores de tensão interfacial foram os produzidos a partir das águas da 3ª e 5ª coletas, que apresentaram valores de  $1,4 \pm 0,05$  e  $1,4 \pm 0,02 \text{ mN/m}$  respectivamente. O meio formulado com água destilada apresentou valores de  $1,7 \pm 0,03 \text{ mN/m}$ , enquanto o meio formulado com a água produzida de coleta 4 foi o que apresentou maior tensão interfacial, com valores de  $2,3 \pm 0,1 \text{ mN/m}$ .

Segundo STEPHENSON, (1992), a composição da água produzida vai depender de fatores como tipo de campo, profundidades e características intrínsecas ao campo produtor do óleo, histórico de produção, origem e qualidade do óleo e o procedimento utilizado na extração do óleo.

Através dos resultados apresentados, a água produzida do mesmo campo modificou a quantidade de produção e a qualidade da produção do ramnolípido produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando glicerina bruta como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, uma vez que mesmo nos meios que apresentaram relativamente menores produções, conseguiu-se valores de tensão superficial, interfacial e emulsificação iguais ou bem próximos dos meios que possibilitaram maiores produções.

### 5.8.5 FT-IR

As análises de FT-IR do ramnolípido produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo água produzida e glicerina bruta como fontes de suplementação e carbono, respectivamente, são mostradas na figura 30.

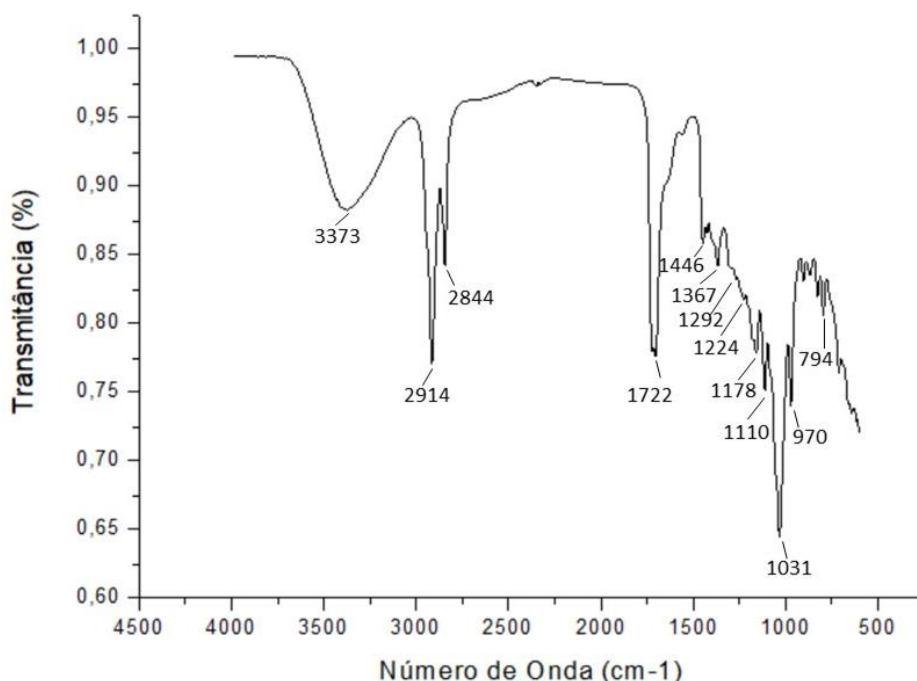


Figura 30: Espectro FT-IR do ramnolípido produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo água produzida e glicerina bruta

A impressão digital (fingerprint) comuns às moléculas de ramnolípido estão na área de 400-1500 $\text{cm}^{-1}$ , que mostra a deformação da banda C-OH em 1367 $\text{cm}^{-1}$ , o O-H em deformação plana em 1178, 1110 e 1031 $\text{cm}^{-1}$ , deformações C-H em 1446, 1224 e 794 e balanço de  $\text{CH}_3$  em 983 $\text{cm}^{-1}$  para ramnolípido. Há também típicos alongamentos de vibrações do grupo  $\text{COO}^-$ . O forte alongamento simétrico da banda C=O do grupo carboxilato do ramnolípido é observada em 1722. O espectro do ramnolípido ainda apresentou bandas de absorção em 3360 $\text{cm}^{-1}$  para simétrico alongamento O-H. E o espectro também apresentou vibrações em 2914 $\text{cm}^{-1}$  e 2944 $\text{cm}^{-1}$  típicos de alongamentos de vibrações C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

Tais resultados estão de acordo com os resultados de FT-IR da molécula de ramnolípido descrita por RIKALOVIC et al. (2012), utilizando uma cepa de

*Pseudomonas aeruginosa* san-ai isolada de uma amostra de óleo mineral industrial para corte de metais.

### 5.8.6 Espectrometria de massa

A figura 31 mostra o espectro da espectrometria de massa da amostra de ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo água produzida e glicerina bruta como fontes de suplementação e carbono, respectivamente.

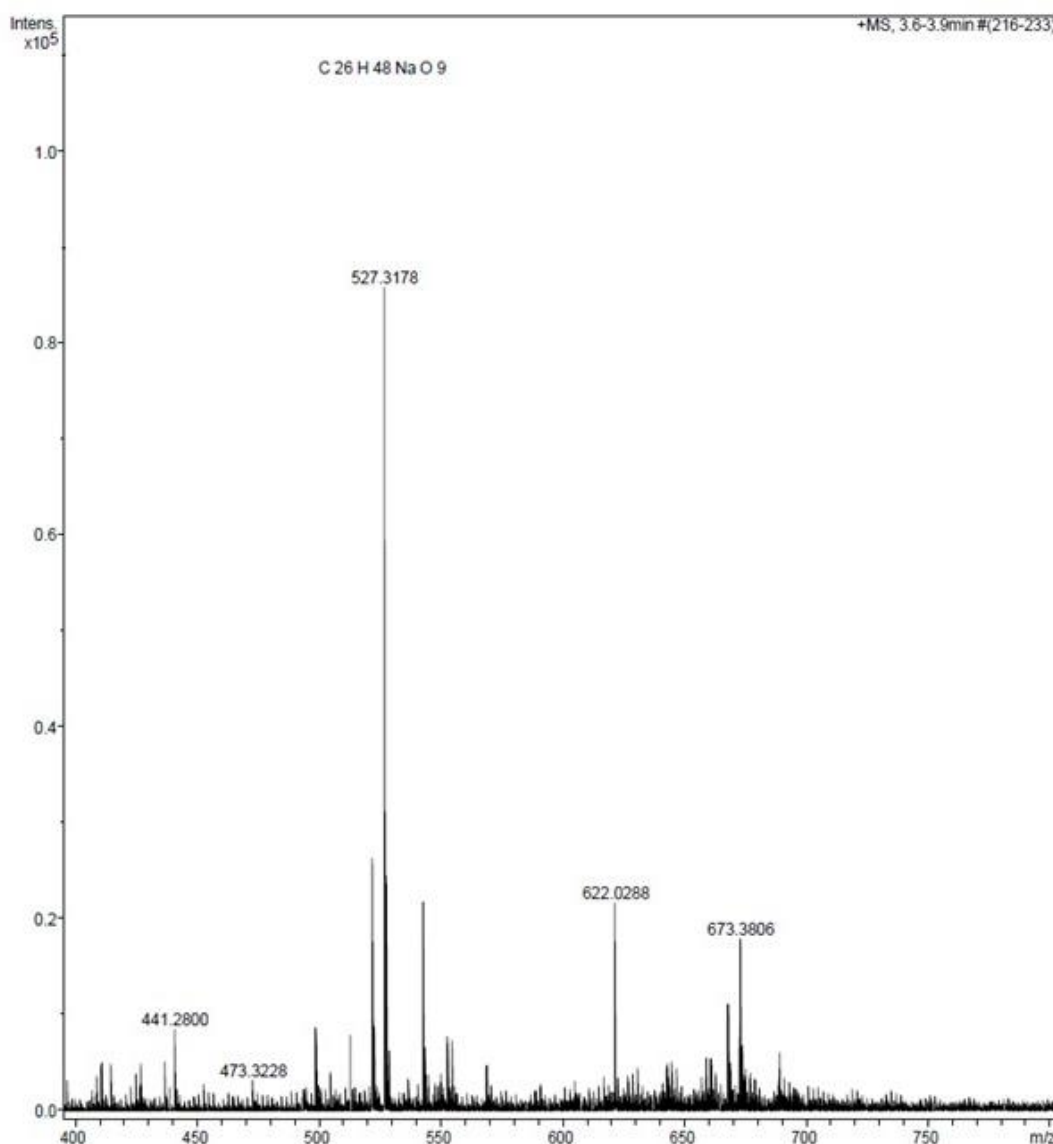


Figura 31: Espectrometria de massa do ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo água produzida e glicerina bruta.

A partir da análise da figura 31 é possível verificar sinais expressivos em 527 e 673  $m/z$ , que corresponde a adutos de sódio dos mono e dirramnolípídeos.

O espectro indica que há uma mistura de mono e dirramnolipídeos, contudo, verifica-se um maior sinal para o mono.

Os resultados estão de acordo com os achados de WEI et al. (2005), que utilizaram uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* J4, isolada da água produzida de petróleo originada de um campo ao sul de Taiwan, contudo, os autores não utilizaram água produzida de petróleo na composição do meio de produção do biossurfactante.

## 6 CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho foi possível concluir que há a viabilidade técnica da utilização da água produzida na composição do meio de cultura para a produção do surfactante ramnolipídeo nas condições de estudo, porém verificou-se a necessidade de um tratamento prévio nesse rejeito para o seu melhor uso.

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada no estudo apresentou uma certa sensibilidade negativa às concentrações salinas médias e elevadas, não possibilitando o uso de resíduos que apresentem essa característica para a produção de ramnolipídeo nas condições do estudo.

A fonte de nitrogênio extrato de levedura se apresentou como uma boa fonte de nitrogênio nas condições estudadas, principalmente nas concentrações de 0,25 e 0,75G/L, o que não foi encontrado na literatura.

A metodologia de superfície de resposta não foi uma ferramenta eficiente na otimização do meio de cultura para a produção de ramnolipídeo nas condições do presente estudo, já que não foi encontrada interação entre as variáveis fonte de carbono e fonte de nitrogênio testadas, permitindo que essa otimização pudesse ser feita de forma independente.

A glicerina bruta utilizada no estudo se mostrou uma eficiente fonte de carbono na produção de ramnolipídeo pela cepa de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada, nas condições do estudo, principalmente em concentrações mais altas, como a de 25ml/l.

A modelagem cinética permitiu o cálculo da taxa de produção de ramnolipídeo e o crescimento específico da biomassa, mostrando resultados satisfatórios tanto no processo ocorrido em shaker, quanto em reator. Contudo, no reator verificou-se o problema da espuma, que dificulta tanto o crescimento do microrganismo, quanto a produção do surfactante, onde esse processo se mostrou menos eficiente na produção do ramnolipídeo, se comparado ao processo realizado em shaker.

O presente estudo detectou também variações de concentração de ramnolipídeo utilizando diferentes coletas de águas produzidas, o que indica a influência dos compostos presentes em cada água coletada na produção do biocomposto, sugerindo um estudo mais aprofundado sobre a composição da água produzida e seu efeito na produção do biossurfactante.

A partir das análises do FT-IR e espectrometria de massa é possível inferir que as biomoléculas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* neste estudo podem ser caracterizadas como uma mistura de mono e dirramnolípídeo.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, 2010.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; et al. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013.

AL-SULAIMANI, H.; JOSHI, S.; AL-WAHAIBI, Y.; et al. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery : Current developments and future prospects. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, n. 2, p. 147–158, 2011.

AMANI, H. Study of enhanced oil recovery by rhamnolipids in a homogeneous 2D micromodel. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 128, p. 212–219, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2015.02.030>>. .

AMANI, H.; SARRAFZADEH, M. H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M. R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, n. 1–2, p. 209–214, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2010.11.008>>. .

ASHISH; DEBNATH (DAS), M. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, n. May, p. 40–48, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.06.034>>. .

ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1065–1074, 2006.

BACHMANN, R. T.; JOHNSON, A. C.; EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 86, p. 225–237, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>>. .

BAGHERI LOTFABAD, T.; EBADIPOUR, N.; ROOSTAAZAD, R.; PARTOVI, M.; BAHMAEI, M. Two schemes for production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Applying residues from soybean oil industry and silica sol–gel immobilized cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 159–168, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.024>>. .

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.

BAO, M.; KONG, X.; JIANG, G.; WANG, X.; LI, X. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 66, n. 1–2, p. 42–46, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2009.01.001>>. .

BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 445–449, 2007.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3843–3849, 2008.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 283–288, 2002.

BROWN, L. R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 316–320, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.011>>. .

CHAI, L.; ZHANG, F.; SHE, Y. H.; BANAT, I. M.; HOU, D. J. Impact of a Microbial-Enhanced Oil Recovery Field Trial on Microbial Commun...: University of Liverpool Library. **Nature EEnvironment and Pollution Technology**, v. 14, n. 3, p. 455–462, 2015. Disponível em: <<http://eds.a.ebscohost.com.liverpool.idm.oclc.org/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=9f0d>>. .

2b14-105e-4171-95b5-3b510db76f28%40sessionmgr4008&vid=0&hid=4111>. .

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J. Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511–1516, 2010.

DEEPIKA, K. V.; KALAM, S.; RAMU SRIDHAR, P.; PODILE, A. R.; BRAMHACHARI, P. V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 38–47, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.11.006>>. .

DESBÈNE, P. L.; DESMAZIÈRES, B.; EVEN, V.; BASSELIER, J. J.; MINSSIEUX, L. Analysis of non-ionic surfactants used in tertiary oil recovery. Optimisation of stationary phase in normal phase partition chromatography. **Chromatographia**, v. 24, n. 1, p. 857–861, 1987.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1485, n. 2–3, p. 145–152, 2000.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 3, p. 293–298, 2015. Egyptian Petroleum Research Institute.

ELRAIES, K. A.; TAN, I. M.; FATHADDIN, M. T.; ABO-JABAL, A. Development of a New Polymeric Surfactant for Chemical Enhanced Oil Recovery. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, n. 14, p. 1521–1528, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10916460903581427>>. .

FERNANDES, P. L.; RODRIGUES, E. M.; PAIVA, F. R.; et al. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced

oil recovery. **Fuel**, v. 180, p. 551–557, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.080>>. .

GAO, P.; LI, G.; LI, YANSHU; et al. An exogenous surfactant-producing *Bacillus subtilis* facilitates indigenous microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–14, 2016.

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. January, p. 23–32, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>>. .

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 694–705, 2009.

GUDIÑA, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; RODRIGUES, L. R.; COUTINHO, J. A. P.; TEIXEIRA, J. A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 68, p. 56–64, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001>>. .

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

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; FREITAS, V. DE; et al. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 144–150, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.027>>. .

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301–5, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6435520>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC241507>>. .

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379–387, 2000.

HENDERSON, S. B.; GRIGSON, S. J. W.; JOHNSON, P.; RODDIE, B. D. Potential impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 1141–1151, 1999.

HÖRMANN, B.; MÜLLER, M. M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 674–680, 2010.

JEONG, H. S.; LIM, D. J.; HWANG, S. H.; HA, S. D.; KONG, J. Y. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilised in polyvinyl alcohol beads. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 1, p. 35–39, 2004.

KOKAL, S.; AL-KAABI, A. Enhanced oil recovery: challenges and opportunities. **Global Energy Solutions**, p. 64–69, 2010. Disponível em: <[http://www.world-petroleum.org/docs/docs/publications/2010yearbook/P64-69\\_Kokal-AI\\_Kaabi.pdf](http://www.world-petroleum.org/docs/docs/publications/2010yearbook/P64-69_Kokal-AI_Kaabi.pdf)>. .

KRYACHKO, Y. Novel approaches to microbial enhancement of oil recovery. **Journal of Biotechnology**, v. 266, n. July 2017, p. 118–123, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.019>>. .

LAN, G.; FAN, Q.; LIU, YONGQIANG; et al. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 44–54, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.001>>. .

LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 25, n. 11, p. 1353–1366, 2007.

LYNCH, D. W.; LEWIS, T. R.; MOORMAN, W. J.; et al. Carcinogenic and toxicologic effects of inhaled ethylene oxide and propylene oxide in F344 rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 69–84, 1984.

MA, K. Y.; SUN, M. Y.; DONG, W.; et al. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation

of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 144–151, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.03.008>>. .

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

MAUDGALYA, S.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Microbial Enhanced-Oil-Recovery Technologies: A Review of the Past, Present, and Future. **Spe**, 2007.

MAURE, A.; SALDANA, A. A.; JUAREZ, A. R. Biotechnology application to EOR in Talara off-shore oil fields, northwest Peru. **SPE-94934 presented at Latin American and Caribbean Petroleum Engineering Conference, Rio de Janeiro, Brazil, 20--23 June**, 2005.

MOYA RAMÍREZ, I.; ALTMAJER VAZ, D.; BANAT, I. M.; et al. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 1–6, 2016.

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

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; et al. Rhamnolipids-Next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 366–380, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>>. .

MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3–4, p. 199–210, 1989.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 2001.

NARAGHI, Z. G.; YAGHMAEI, S.; MARDANPOUR, M. M.; HASANY, M. Produced Water Treatment with Simultaneous Bioenergy Production Using Novel Bioelectrochemical Systems. **Electrochimica Acta**, v. 180, p. 535–544, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.08.136>>. .

NICOLÒ, M. S.; CAMBRIA, M. G.; IMPALLOMENI, G.; et al. Carbon source effects

on the mono/diacylglycerol ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. **New Biotechnology**, v. 39, p. 36–41, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.013>>. .

NITSCHKE, M.; PAULISTA, U. E.; NITSCHKE, M.; et al. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 3, n. OCTOBER, p. 1562–1566, 2005.

OHMS, D.; MCLEOD, J. D.; GRAFF, C. J.; et al. Incremental-Oil Success From Waterflood Sweep Improvement in Alaska. **SPE Production & Operations**, v. 25, n. 03, p. 247–254, 2010. Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.2118/121761-PA>>. .

OKEKE, T.; LANE, R. Simulation and Economic Screening of Improved-Conformance Oil Recovery by Polymer Flooding and a Thermally Activated Deep Diverting Gel. **Proceedings of SPE Western Regional Meeting**, 2012. Disponível em: <<http://www.onepetro.org/mslib/servlet/onepetropreview?id=SPE-153740-MS&soc=SPE>>. .

PANSIRIPAT, S.; PORNUNTHORNTAWEE, O.; RUJIRAVANIT, R.; et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 185–191, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.011>>. .

PATEL, J.; BORGOHAIN, S.; KUMAR, M.; et al. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1539–1558, 2015. Elsevier Ltd.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 91–94, 1997.

PEREIRA, A. G.; PACHECO, G. J.; TAVARES, L. F.; et al. Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1271–1278, 2013.

Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.028>>. .

PHAM, T. H.; WEBB, J. S.; REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3405–3413, 2004.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, n. 9, p. 1781–1785, 2008.

RADZUAN, M. N.; BANAT, I. M.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99–105, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.052>>. .

RAMOS, B. F. M. **PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM ÁGUA PRODUZIDA DA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO**, 2011. Universidade Federal da Bahia.

RICO-MARTÍNEZ, R.; SNELL, T. W.; SHEARER, T. L. Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A ® to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). **Environmental Pollution**, v. 173, p. 5–10, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.024>>. .

RIKALOVIC, M.; GOJGIC-CVIJOVIC, G.; VRVIC, M.; KARADZIC, I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 1, p. 27–42, 2012.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871–874, 1989.

SALAZAR-BRYAM, A. M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects. **Heliyon**, v. 3, n. 6, p. e00337, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00337>>. .

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; et al. Aggregation behaviour of a



dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, n. 1, p. 246–253, 2007.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P. W.; VASQUEZ, G. S.; et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98–100, p. 1025–1035, 2002.

SATHI REDDY, K.; YAHYA KHAN, M.; ARCHANA, K.; GOPAL REDDY, M.; HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 291–299, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.041>>. .

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.

SHAH, M. U. H.; SIVAPRAGASAM, M.; MONIRUZZAMAN, M.; YUSUP, S. B. A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Procedia Engineering**, v. 148, p. 494–500, 2016. The Author(s). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.538>>. .

SILVA, R. DE C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 2014.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 1, p. 174–183, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>>. .

SIMPSON, D. R.; NATRAJ, N. R.; MCINERNEY, M. J.; DUNCAN, K. E. Biosurfactant-producing *Bacillus* are present in produced brines from Oklahoma oil reservoirs with a wide range of salinities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1083–1093, 2011.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by

*Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718–725, 2005.

SOUSA, J. R. DE; COSTA CORREIA, J. A. DA; ALMEIDA, J. G. L. DE; et al. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1831–1839, 2011.

STEPHENSON, M. T. Components of Produced Water: A Compilation of Industry Studies. **Journal of Petroleum Technology**, v. 44, n. 5, p. 548–603, 1992.

Disponível em:

<<http://www.onepetro.org/mslib/servlet/onepetropreview?id=00023313&soc=SPE>>. .

STOSUR, G. J. EOR: Past, Present and What the Next 25 Years May Bring. **SPE International Improved Oil Recovery Conference in Asia Pacific**, v. 84864-MS, p. 5, 2003. Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.2118/84864-MS>>. .

SUDHAKAR BABU, P.; VAIDYA, A. N.; BAL, A. S.; et al. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 1996.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. CHARACTERIZATION OF CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL PRODUCTION FROM MULTIPLE FEEDSTOCKS. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 261–265, 2006.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. , v. 27, p. 146–154, 2005.

WEI, Y. H.; CHENG, C. L.; CHIEN, C. C.; WAN, H. M. Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 769–774, 2008.

WISJNUPRAPTO, N. A.; HELMY, Q.; KARDENA, E.; FUNAMIZU, N. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts. **International Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 1/2, p. 66, 2011. Disponível em: <<http://www.inderscience.com/link.php?id=42682>>. .

WOŹNIAK-KARCZEWSKA, M.; MYSZKA, K.; SZNAJDROWSKA, A.; et al. Isolation of rhamnolipids-producing cultures from faeces: Influence of interspecies communication on the yield of rhamnolipid congeners. **New Biotechnology**, v. 36, p. 17–25, 2017.

WU, J. Y.; YEH, K. L.; LU, W. BIN; LIN, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1157–1164, 2008.

YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S.; MCINERNEY, M. J. **Chapter 6 Microbial Processes in Oil Fields. Culprits, Problems, and Opportunities**. 1st ed. Elsevier Inc., 2009.

ZHANG, X.; XU, D.; ZHU, C.; LUNDAA, T.; SCHERR, K. E. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Chemical Engineering Journal**, v. 209, p. 138–146, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.110>>. .

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant ( Biosurfactant ). **Applied And Environmental microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3276–3282, 1992.

ZHAO, F.; SHI, R.; CUI, Q.; et al. Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing bacteria for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 157, p. 124–130, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2017.07.022>>. .

ZHAO, F.; ZHOU, J. D.; MA, F.; et al. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H<sub>2</sub>S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: Applications for microbial enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 24–30, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.126>>. .

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323–1336, 2010.

AL-BAHRY, S. N.; AL-WAHAIBI, Y. M.; ELSHAFIE, A. E.; et al. Biosurfactant

production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 81, p. 141–146, 2013.

AL-SULAIMANI, H.; JOSHI, S.; AL-WAHAIBI, Y.; et al. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery : Current developments and future prospects. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, v. 1, n. 2, p. 147–158, 2011.

AMANI, H. Study of enhanced oil recovery by rhamnolipids in a homogeneous 2D micromodel. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 128, p. 212–219, 2015. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2015.02.030>>. .

AMANI, H.; SARRAFZADEH, M. H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M. R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, n. 1–2, p. 209–214, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2010.11.008>>. .

ASHISH; DEBNATH (DAS), M. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C.tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, n. May, p. 40–48, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.06.034>>. .

ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1065–1074, 2006.

BACHMANN, R. T.; JOHNSON, A. C.; EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 86, p. 225–237, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>>. .

BAGHERI LOTFABAD, T.; EBADIPOUR, N.; ROOSTAAZAD, R.; PARTOVI, M.; BAHMAEI, M. Two schemes for production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Applying residues from soybean oil industry and silica sol–gel immobilized cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 159–168, 2017. Elsevier B.V. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.024>>. .

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 1, p. 1–12, 1995.

BAO, M.; KONG, X.; JIANG, G.; WANG, X.; LI, X. Laboratory study on activating indigenous microorganisms to enhance oil recovery in Shengli Oilfield. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 66, n. 1–2, p. 42–46, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2009.01.001>>. .

BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 445–449, 2007.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. Pseudomonas aeruginosa LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3843–3849, 2008.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 283–288, 2002.

BROWN, L. R. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 316–320, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.011>>. .

CHAI, L.; ZHANG, F.; SHE, Y. H.; BANAT, I. M.; HOU, D. J. Impact of a Microbial-Enhanced Oil Recovery Field Trial on Microbial Commun...: University of Liverpool Library. **Nature EEnvironment and Pollution Technology**, v. 14, n. 3, p. 455–462, 2015. Disponível em: <<http://eds.a.ebscohost.com.liverpool.idm.oclc.org/eds/pdfviewer/pdfviewer?sid=9f0d2b14-105e-4171-95b5-3b510db76f28%40sessionmgr4008&vid=0&hid=4111>>. .

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two Bacillus species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E.; CONTIERO, J.

Structure, properties and applications of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* L2-1 from cassava wastewater. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1511–1516, 2010.

DEEPIKA, K. V.; KALAM, S.; RAMU SRIDHAR, P.; PODILE, A. R.; BRAMHACHARI, P. V. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 38–47, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.11.006>>. .

DESBÈNE, P. L.; DESMAZIÈRES, B.; EVEN, V.; BASSELIER, J. J.; MINSSIEUX, L. Analysis of non-ionic surfactants used in tertiary oil recovery. Optimisation of stationary phase in normal phase partition chromatography. **Chromatographia**, v. 24, n. 1, p. 857–861, 1987.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F.; MILOT, S.; VILLEMUR, R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1485, n. 2–3, p. 145–152, 2000.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 3, p. 293–298, 2015. Egyptian Petroleum Research Institute.

ELRAIES, K. A.; TAN, I. M.; FATHADDIN, M. T.; ABO-JABAL, A. Development of a New Polymeric Surfactant for Chemical Enhanced Oil Recovery. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, n. 14, p. 1521–1528, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10916460903581427>>. .

FERNANDES, P. L.; RODRIGUES, E. M.; PAIVA, F. R.; et al. Biosurfactant, solvents and polymer production by *Bacillus subtilis* RI4914 and their application for enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 180, p. 551–557, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.080>>. .

GAO, P.; LI, G.; LI, YANSHU; et al. An exogenous surfactant-producing *Bacillus subtilis* facilitates indigenous microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in**

**Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–14, 2016.

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. January, p. 23–32, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.010>>. .

GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 694–705, 2009.

GUDIÑA, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; RODRIGUES, L. R.; COUTINHO, J. A. P.; TEIXEIRA, J. A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 68, p. 56–64, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001>>. .

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

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; FREITAS, V. DE; et al. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 144–150, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.027>>. .

GUERRA-SANTOS, L.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and environmental microbiology**, v. 48, n. 2, p. 301–5, 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6435520>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC241507>>. .

HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379–387, 2000.

HENDERSON, S. B.; GRIGSON, S. J. W.; JOHNSON, P.; RODDIE, B. D. Potential

impact of production chemicals on the toxicity of produced water discharges from North Sea oil platforms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, n. 12, p. 1141–1151, 1999.

HÖRMANN, B.; MÜLLER, M. M.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 6, p. 674–680, 2010.

JEONG, H. S.; LIM, D. J.; HWANG, S. H.; HA, S. D.; KONG, J. Y. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilised in polyvinyl alcohol beads. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 1, p. 35–39, 2004.

KOKAL, S.; AL-KAABI, A. Enhanced oil recovery: challenges and opportunities. **Global Energy Solutions**, p. 64–69, 2010. Disponível em: <[http://www.world-petroleum.org/docs/docs/publications/2010yearbook/P64-69\\_Kokal-AI\\_Kaabi.pdf](http://www.world-petroleum.org/docs/docs/publications/2010yearbook/P64-69_Kokal-AI_Kaabi.pdf)>. .

KRYACHKO, Y. Novel approaches to microbial enhancement of oil recovery. **Journal of Biotechnology**, v. 266, n. July 2017, p. 118–123, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.019>>. .

LAN, G.; FAN, Q.; LIU, YONGQIANG; et al. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 44–54, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.001>>. .

LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 25, n. 11, p. 1353–1366, 2007.

LYNCH, D. W.; LEWIS, T. R.; MOORMAN, W. J.; et al. Carcinogenic and toxicologic effects of inhaled ethylene oxide and propylene oxide in F344 rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 69–84, 1984.

MA, K. Y.; SUN, M. Y.; DONG, W.; et al. Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 for bioremediation of crude oil. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 144–151, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.03.008>>. .

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, n. 2,



p. 237–241, 1999.

MAUDGALYA, S.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Microbial Enhanced-Oil-Recovery Technologies: A Review of the Past, Present, and Future. **Spe**, 2007.

MAURE, A.; SALDANA, A. A.; JUAREZ, A. R. Biotechnology application to EOR in Talara off-shore oil fields, northwest Peru. **SPE-94934 presented at Latin American and Caribbean Petroleum Engineering Conference, Rio de Janeiro, Brazil, 20--23 June**, 2005.

MOYA RAMÍREZ, I.; ALTMAJER VAZ, D.; BANAT, I. M.; et al. Hydrolysis of olive mill waste to enhance rhamnolipids and surfactin production. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 1–6, 2016.

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

MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; HENKEL, M.; et al. Rhamnolipids-Next generation surfactants? **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 366–380, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.05.022>>. .

MULLIGAN, C. N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3–4, p. 199–210, 1989.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 2001.

NARAGHI, Z. G.; YAGHMAEI, S.; MARDANPOUR, M. M.; HASANY, M. Produced Water Treatment with Simultaneous Bioenergy Production Using Novel Bioelectrochemical Systems. **Electrochimica Acta**, v. 180, p. 535–544, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2015.08.136>>. .

NICOLÒ, M. S.; CAMBRIA, M. G.; IMPALLOMENI, G.; et al. Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. **New Biotechnology**, v. 39, p. 36–41, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.013>>. .

NITSCHKE, M.; PAULISTA, U. E.; NITSCHKE, M.; et al. Oil Wastes as

Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 3, n. OCTOBER, p. 1562–1566, 2005.

OHMS, D.; MCLEOD, J. D.; GRAFF, C. J.; et al. Incremental-Oil Success From Waterflood Sweep Improvement in Alaska. **SPE Production & Operations**, v. 25, n. 03, p. 247–254, 2010. Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.2118/121761-PA>>. .

OKEKE, T.; LANE, R. Simulation and Economic Screening of Improved-Conformance Oil Recovery by Polymer Flooding and a Thermally Activated Deep Diverting Gel. **Proceedings of SPE Western Regional Meeting**, 2012. Disponível em: <<http://www.onepetro.org/mslib/servlet/onepetropreview?id=SPE-153740-MS&soc=SPE>>. .

PANSIRIPAT, S.; PORNSUNTHORNTAWEE, O.; RUJIRAVANIT, R.; et al. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effect of oil-to-glucose ratio. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 185–191, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.011>>. .

PATEL, J.; BORGOHAIN, S.; KUMAR, M.; et al. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1539–1558, 2015. Elsevier Ltd.

PATEL, R. M.; DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 91–94, 1997.

PEREIRA, A. G.; PACHECO, G. J.; TAVARES, L. F.; et al. Optimization of biosurfactant production using waste from biodiesel industry in a new membrane assisted bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1271–1278, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.028>>. .

PHAM, T. H.; WEBB, J. S.; REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3405–

3413, 2004.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. **Chemosphere**, v. 71, n. 9, p. 1781–1785, 2008.

RADZUAN, M. N.; BANAT, I. M.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99–105, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.052>>. .

RAMOS, B. F. M. **PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM ÁGUA PRODUZIDA DA INDÚSTRIA DE PETRÓLEO**, 2011. Universidade Federal da Bahia.

RICO-MARTÍNEZ, R.; SNELL, T. W.; SHEARER, T. L. Synergistic toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A ® to the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera). **Environmental Pollution**, v. 173, p. 5–10, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.09.024>>. .

RIKALOVIC, M.; GOJGIC-CVIJOVIC, G.; VRVIC, M.; KARADZIC, I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 1, p. 27–42, 2012.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E.; BOSCH, M. P.; et al. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 12, p. 871–874, 1989.

SALAZAR-BRYAM, A. M.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J. Biodiesel byproduct bioconversion to rhamnolipids: Upstream aspects. **Heliyon**, v. 3, n. 6, p. e00337, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00337>>. .

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; et al. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, n. 1, p. 246–253, 2007.

SANTOS, A. S.; SAMPAIO, A. P. W.; VASQUEZ, G. S.; et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of

*Pseudomonas aeruginosa*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98–100, p. 1025–1035, 2002.

SATHI REDDY, K.; YAHYA KHAN, M.; ARCHANA, K.; GOPAL REDDY, M.; HAMEEDA, B. Utilization of mango kernel oil for the rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* DR1 towards its application as biocontrol agent.

**Bioresource Technology**, v. 221, p. 291–299, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.041>>. .

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.

SHAH, M. U. H.; SIVAPRAGASAM, M.; MONIRUZZAMAN, M.; YUSUP, S. B. A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas Aeruginosa*. **Procedia Engineering**, v. 148, p. 494–500, 2016. The Author(s). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.538>>. .

SILVA, R. DE C. F. S.; ALMEIDA, D. G.; RUFINO, R. D.; et al. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills.

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 2014.

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

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.050>>. .

SIMPSON, D. R.; NATRAJ, N. R.; MCINERNEY, M. J.; DUNCAN, K. E.

Biosurfactant-producing *Bacillus* are present in produced brines from Oklahoma oil reservoirs with a wide range of salinities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 1083–1093, 2011.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 718–725, 2005.

SOUSA, J. R. DE; COSTA CORREIA, J. A. DA; ALMEIDA, J. G. L. DE; et al.

Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production

of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1831–1839, 2011.

STEPHENSON, M. T. Components of Produced Water: A Compilation of Industry Studies. **Journal of Petroleum Technology**, v. 44, n. 5, p. 548–603, 1992.

Disponível em:

<<http://www.onepetro.org/mslib/servlet/onepetroreview?id=00023313&soc=SPE>>. .

STOSUR, G. J. EOR: Past, Present and What the Next 25 Years May Bring. **SPE International Improved Oil Recovery Conference in Asia Pacific**, v. 84864-MS, p. 5, 2003. Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.2118/84864-MS>>. .

SUDHAKAR BABU, P.; VAIDYA, A. N.; BAL, A. S.; et al. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 3, p. 263–268, 1996.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. CHARACTERIZATION OF CRUDE GLYCEROL FROM BIODIESEL PRODUCTION FROM MULTIPLE FEEDSTOCKS. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 261–265, 2006.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. , v. 27, p. 146–154, 2005.

WEI, Y. H.; CHENG, C. L.; CHIEN, C. C.; WAN, H. M. Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 769–774, 2008.

WISJNUPRAPTO, N. A.; HELMY, Q.; KARDENA, E.; FUNAMIZU, N. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts. **International Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 1/2, p. 66, 2011. Disponível em: <<http://www.inderscience.com/link.php?id=42682>>. .

WOŹNIAK-KARCZEWSKA, M.; MYSZKA, K.; SZNAJDROWSKA, A.; et al. Isolation of rhamnolipids-producing cultures from faeces: Influence of interspecies communication on the yield of rhamnolipid congeners. **New Biotechnology**, v. 36, p. 17–25, 2017.

WU, J. Y.; YEH, K. L.; LU, W. BIN; LIN, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1157–1164, 2008.

YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S.; MCINERNEY, M. J. **Chapter 6 Microbial Processes in Oil Fields. Culprits, Problems, and Opportunities**. 1st ed. Elsevier Inc., 2009.

ZHANG, X.; XU, D.; ZHU, C.; LUNDAA, T.; SCHERR, K. E. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Chemical Engineering Journal**, v. 209, p. 138–146, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.110>>. .

ZHANG, Y.; MILLER, R. M. Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant ( Biosurfactant ). **Applied And Environmental microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3276–3282, 1992.

ZHAO, F.; SHI, R.; CUI, Q.; et al. Biosurfactant production under diverse conditions by two kinds of biosurfactant-producing bacteria for microbial enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 157, p. 124–130, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.petrol.2017.07.022>>. .

ZHAO, F.; ZHOU, J. D.; MA, F.; et al. Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H<sub>2</sub>S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: Applications for microbial enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 24–30, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.126>>. .