

Utilização de gordura animal como substrato na produção de biossurfactante por *serratia mascescens* UCP 1549 com potencial de aplicação na área ambiental**Use of animal fat as a substrate in the production of biosurfactant by *serratia mascescens* UCP 1549 with potential for application in the environmental area**

DOI:10.34117/bjdv6n8-045

Recebimento dos originais:08/07/2020

Aceitação para publicação: 07/08/2020

Laís Montenegro Teixeira

Engenheira Sanitarista e Ambiental pela UEPB, Mestranda em Ciências e Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-graduação da UEPB.

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 – Universitário, Campina Grande (PB). CEP: 58429-500.

E-mail: laismontenegrot@gmail.com

Helvia Waleska Casullo de Araújo

Doutora em Biotecnologia em Recursos Naturais pela Rede Nordeste em Biotecnologia.

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 – Universitário, Campina Grande (PB). CEP: 58429-500.

E-mail: hwcasullo@hotmail.com

Galba Maria de Campos Takaki

Doutora em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo/Newcastle upon Tyne-Inglaterra

Instituição: Professora Titular, Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-590 Recife - PE

E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

Rosileide Fontenele da Silva Andrade

Doutora pela Universidade Federal de Pernambuco em Ciências Biológicas.

Instituição: Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife - PE

E-mail: rosileide_fontenele@yahoo.com.br

Dayana Montero Rodríguez

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: PNPD-CAPEs, Universidade Católica de Pernambuco

Endereço: Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife - PE

E-mail: dayanamontero87@gmail.com

Weruska Brasileiro Ferreira

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Federal de Campina Grande

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 – Universitário, Campina Grande (PB). CEP: 58429-500.

E-mail: weruska_brasileiro@yahoo.com.br

Marcello Maia de Almeida

Doutor em Engenharia de Processos pela Universidade Federal de Campina Grande

Instituição: Universidade Estadual da Paraíba

Endereço: Rua Baraúnas, 351 – Universitário, Campina Grande (PB). CEP: 58429-500.

E-mail: marcello_maia2000@yahoo.com.br

RESUMO

Biossurfactantes são compostos que possuem aplicações potenciais em muitas áreas, pois são considerados não tóxicos e biodegradáveis, além de exibirem ótimas propriedades de superfície, como abaixamento de tensão superficial e interfacial entre duas fases e capacidade de emulsificação. Portanto, neste trabalho foi empregado o uso da tecnologia aliada ao uso de microrganismos como agentes produtores de biossurfactantes e degradadores de petroderivados visando reduzir os impactos ambientais por eles causados. O objetivo deste trabalho é verificar a produção e a caracterização de biossurfactante produzido por *Serratia marcescens* UCP 1549 nos resíduos sólidos: casca de abacaxi e rejeitos de gordura animal, afim de alcançar um correto balanço nutricional entre fonte de carbono e nitrogênio na produção de biossurfactante pelo microrganismo *Serratia marcescens* UCP 1549, utilizando como substrato gordura animal e óleos vegetais pós-fritura. As variáveis medidas foram emulsificação e tensão superficial utilizando os substratos hidrofóbicos óleo pós-fritura, óleo de milho e óleo de girassol. O melhor resultado obtido para índice de emulsificação e tensão superficial, respectivamente, foi de 100% na condição fermentada por 96 h e 27,7 mN/m na condição fermentada por 48 h. Com a melhor condição representada pelo resultado da redução da tensão superficial foi produzido 1 L do meio para a sua extração. Os resultados demonstram boa capacidade de *S. marcescens* UCP 1549 para produzir biossurfactante com propriedades para aplicações na descontaminação ambiental de petróleo e derivados.

Palavra-chaves: Índice de emulsificação. Tensão superficial. Extração.

ABSTRACT

Biosurfactants are compounds that have applications used in many areas, as they are considered non-toxic and biodegradable, in addition to exhibiting excellent surface characteristics, such as the muffling of surface and interfacial tension between two phases and the emulsification capacity. Therefore, in this work, the use of technology combined with the use of microorganisms was used, as agents producing biosurfactants and petrodivirus degraders, which reduce the effects caused by them. The objective of this work is to verify the production and characterize the biosurfactant produced by *Serratia Marcescens* UCP 1549 in the residues: pineapple peel and animal fat rejects, in addition to achieving a nutritional control between carbon and nitrogen source in the production of biosurfactant by the microorganism *Serratia marcescens* UCP 1549, using animal fat and post-frying vegetable oils as substrate. The measured variables were emulsification and surface tension using the hydrophobic substrates post-frying oil, corn oil and sunflower oil. The best result obtained for emulsification index and surface tension, respectively, was 100% in the fermented condition for 96 h and 27.7 mN / m in the fermented condition for 48 h. With the best condition represented by the result of the reduction of the surface tension, 1 L of the medium was produced for its extraction. The results demonstrate good ability of *S. marcescens* UCP 1549 to produce biosurfactant with properties to apply to environmental decontamination of pretroleum and derivatives.

Keywords: Emulsification index. Surface tension. Extraction.

1 INTRODUÇÃO

Devido ao crescimento industrial e populacional no mundo, há um aumento da poluição devido aos resíduos produzidos por estes. Além disso, constantes acidentes ambientais envolvendo derramamentos de petróleo e seus derivados vêm desencadeando a preocupação com o desenvolvimento de técnicas que objetivam a descontaminação das regiões impactadas (LAWNICZAK, MARECIK, CHRZANOWSK, 2013).

Os hidrocarbonetos são descritos como potenciais extremamente poluentes, tóxicos, cancerígenos e mutagênicos para humanos, além de apresentarem uma complexa remoção do meio ambiente, pois eles se ligam a diferentes matrizes devido à sua propriedade hidrofóbica. A contaminação da água e do solo por hidrocarbonetos aromáticos vem aumentando devido à sua utilização em vários segmentos industriais e os métodos de remediação para esses ambientes contaminados são baseados em atividades química, física ou biológica, a exemplo da utilização de surfactes químicos que estão disponíveis comercialmente, sendo estes derivados do petróleo. (MORAIS *et al.*, 2015).

O uso de surfactantes químicos provoca danos ambientais associados à sua produção e ao seu descarte, como a redução da tensão superficial da água diminuindo sua taxa de evaporação e o aumento da solubilidade de compostos orgânicos presentes nos corpos hídricos. Considerando a crescente preocupação ambiental e econômica, a substituição dos surfactantes químicos pelos biológicos torna-se de grande interesse devido às características de baixa toxicidade, biodegradabilidade e síntese a partir de fontes renováveis e de baixo custo, fatores esses que os caracteriza como compostos reconhecidamente seguros (CAMPOS-TAKAKI, SARUBBO, ALBUQUERQUE, 2010).

Os biosurfactantes são surfactantes produzidos principalmente por microrganismos que possuem função biológica de obter o acesso a substratos hidrofóbicos, aumentando sua disponibilidade de nutrientes para os microrganismos produtores, e exposição à bactérias, favorecendo a biodegradação de hidrocarbonetos. Recentemente, eles atraem a atenção para possíveis aplicações em muitos aspectos da indústria, variando da biotecnologia à limpeza ambiental (GARGOURI *et al.*, 2017).

Os biosurfactantes são estáveis, mesmo em condições extremas, em uma ampla gama de pH, temperatura e salinidade, e sua produção é afetada por vários fatores que dependem do microrganismo utilizado, meio (fonte de Carbono, Nitrogênio e salinidade) e condições operacionais (pH, temperatura e velocidade de agitação). Uma das características mais importantes do biosurfactante produzido é a sua capacidade para emulsionar hidrocarbonetos em solução,

produzindo agentes tensoativos que podem causar a dispersão de hidrocarbonetos em emulsões de água em micro gotas ou micelas, ou seja, possuem atividade superficial (IBRAHIM *et al.*, 2013).

Serratia marcescens tem sido relatada como um microrganismo promissor na biodegradação de petróleo e derivados em processos de descontaminação ambiental (OKORO *et al.*, 2012; IBRAHIM *et al.*, 2013). A ampliação da escala de produção de biossurfactante por *Serratia marcescens*, nas condições otimizadas representa considerável contribuição à saúde pública e ao meio ambiente, tendo em vista a persistência e toxicidade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados do petróleo, em especial, o óleo diesel.

O grande problema na produção dos biossurfactantes é o custo envolvido no processo, sendo a fonte de carbono, como os alcanos, responsável por parte considerável destes custos. As fontes mais exploradas para a extração dos biossurfactantes são matérias-primas renováveis, proteínas e sais minerais industrializados (LI *et al.*, 2016). Como consequência, são realizadas diversas pesquisas avaliando subprodutos e rejeitos agroindustriais como fontes nutricionais alternativas, tornando-se uma estratégia atraente e de baixo custo e possibilitando a minimização dos problemas ambientais causados pelo descarte sem o tratamento prévio (BERGER *et al.*, 2014).

Os resíduos de várias frutas, legumes e hortaliças são, na maioria das vezes, desprezados pelas indústrias. Atualmente, estes resíduos estão sendo utilizados como fonte alternativa de nutrientes para a produção de biopolímeros. O abacaxi destaca se pelo seu valor energético, devido à sua alta composição de açúcares e valor nutritivo pela presença de sais minerais e vitaminas. A gordura animal e o sebo podem ser obtidos em grandes quantidades nas indústrias de processamento de carne. Estas gorduras têm perdido a maior parte do mercado para os óleos vegetais devido ao menor dano provocado por estes últimos à saúde (MANEERAT, 2005).

Portanto, será explorado nesse trabalho a produção de um biossurfactante com possibilidade de baixo custo e seu potencial de aplicação na descontaminação ambiental de petróleo e derivados. Avaliando assim, a influência de diferentes combinações de substratos para selecionar nas condições testadas o melhor meio de cultivo para a produção do biossurfactante.

2 METODOLOGIA

2.1 PLANEJAMENTO FATORIAL DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC)

O experimento foi realizado com o planejamento experimental Delineamento Composto Central (DCC) do tipo 2^2 , sendo realizado de acordo com as condições estabelecidas na Tabela 1 com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes casca de abacaxi e gordura animal sobre a variável resposta tensão superficial e índice de emulsificação.

Tabela 1: Matriz codificada do planejamento fatorial DCC 2²

| CONDIÇÕES | CASCA DE ABACAXI | GORDURA ANIMAL |
|-----------|------------------|----------------|
| 1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 |
| 4 | 1 | -1 |
| 5 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 |

Fatores (%): Casca de Abacaxi: -1 (5 g), 1 (7 g); 0 (6 g); Gordura animal: -1 (2 g), 1 (6 g); 0 (4 g).

A produção do biossurfactante foi realizada por fermentação com frascos de 100 mL do meio, misturando os fatores de acordo com o planejamento experimental. As variáveis casca de abacaxi e gordura animal foram cortadas em pedaços com tamanhos aproximados de 1 cm² para a uniformização do processo. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital por um período de 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. Alíquotas foram retiradas até o final da fermentação. As células foram separadas do líquido metabólico por centrifugação a 10.000 g por 15 min, a 10°C, com posterior filtração em Millipore de 0,45 µm para separação total das células. O líquido metabólico livre de células foi utilizado para as determinações de tensão superficial e índice de emulsificação.

2.2 TENSÃO SUPERFICIAL

A tensão superficial do líquido metabólico livre de células contendo o biossurfactante foi medido em um tensiômetro automático (modelo Sigma 70-KSV Ltda., Finland), utilizando o anel de DU NUOY, através de sua imersão no líquido, registrando-se a força requerida para retirá-lo através da interface ar-líquido (KUYUKINA, *et al.*, 2001).

2.3 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

A determinação do índice de emulsificação foi realizada durante 24 horas (E₂₄) em todas as condições do planejamento experimental utilizando óleo girassol, óleo pós-fritura e óleo de milho para cada condição produzida. Foi determinado pela adição de 2,0 mL dos substratos testados em 2,0 mL do sobrenadante, misturando-se em vórtex por 2 min e deixando em repouso por 24 h. O índice foi calculado como porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm) (COOPER E GOLDENBERG, 1987).

2.4 ISOLAMENTO E EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O biossurfactante produzido na melhor condição selecionada do planejamento fatorial, com 48 horas de cultivo da *S. marcescens* UCP 1549 devido a menor tensão superficial, após ter passado por testes de estabilidade frente à pH e força iônica, foi extraído a partir do líquido metabólico livre de células submetido ao processo de extração de acordo com a metodologia descrita por Nitschke e Pastore (2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**3.1 TENSÃO SUPERFICIAL**

Após o procedimento de produção do biossurfactante, foi medido a Tensão Superficial das condições produzidas. A Tabela 2 apresenta os resultados das condições fermentadas em modo cinético da bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549 em 48 h, 72 h, 96 h e 120 h.

Tabela 2 – Resultados da Tensão Superficial (TS) da fermentação em modo cinético da *Serratia marcescens* UCP 1549 em 48h, 72h, 96h e 120h

| CONDIÇÕES | CASCA DE ABACAXI | GORDURA ANIMAL | TS (mN/m)- 48h | TS (mN/m)- 72h | TS (mN/m)- 96h | TS (mN/m)- 120h |
|-----------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| 1 | -1 | -1 | 27,70 | 41,38 | 27,90 | 31,53 |
| 2 | 1 | 1 | 29,46 | 29,46 | 36,50 | 29,52 |
| 3 | -1 | 1 | 34,78 | 36,75 | 36,00 | 30,55 |
| 4 | 1 | -1 | 33,53 | 47,66 | 31,23 | 28,00 |
| 5 | 0 | 0 | 39,01 | 40,13 | 38,50 | 36,98 |
| 6 | 0 | 0 | 40,32 | 40,06 | 37,30 | 30,29 |
| 7 | 0 | 0 | 39,78 | 37,83 | 38,20 | 34,25 |
| 8 | 0 | 0 | 39,65 | 36,40 | 38,40 | 36,30 |

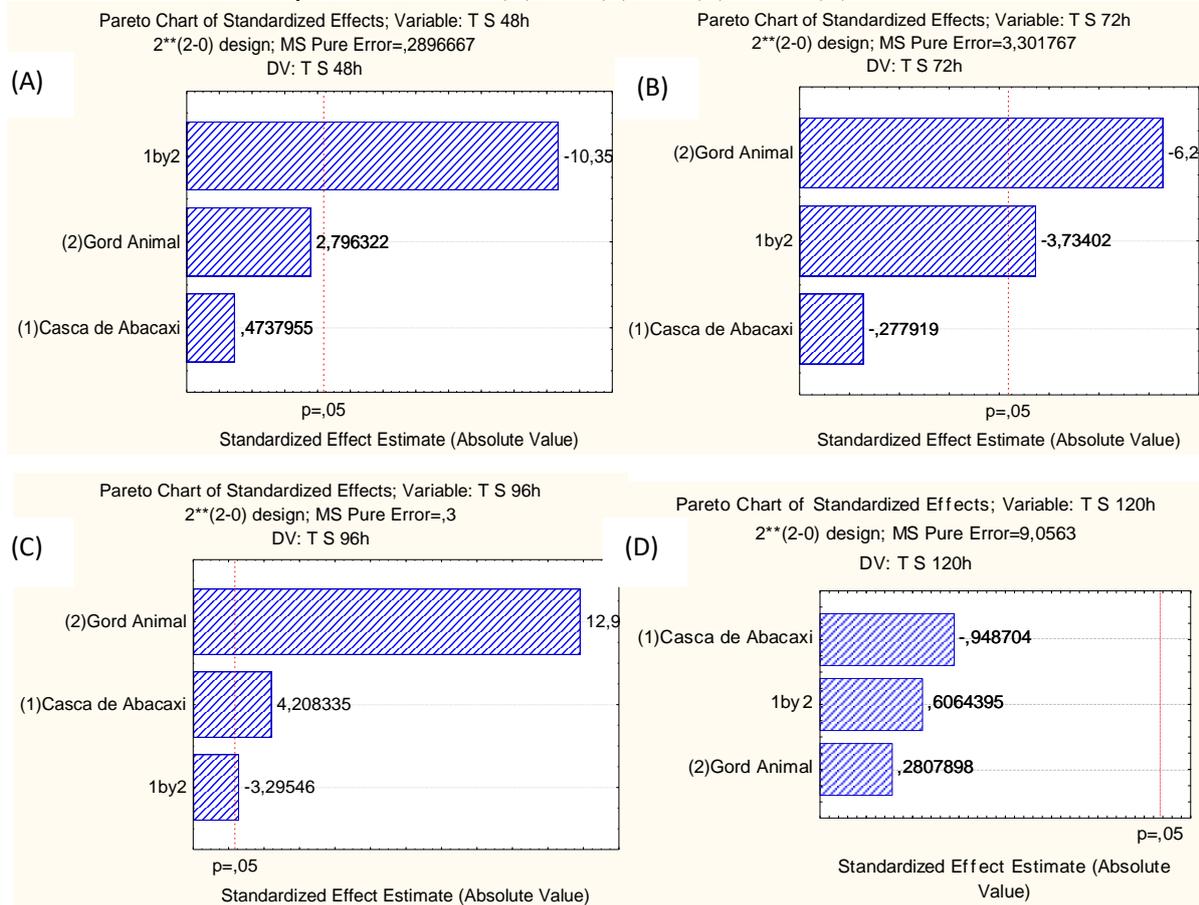
Fatores (%): Casca de Abacaxi: -1 (5 g), 1 (7 g); 0 (6 g); Gordura animal: -1 (2 g), 1 (6 g); 0 (4 g).

Entre as condições analisadas, a que apresentou o melhor resultado para tensão superficial, de acordo com os dados apresentados na Tabela 2, foi a condição 1 que continha 5 gramas de casca de abacaxi e 2 gramas de gordura animal fermentado por 48 horas com 27,7 mN/m. Esse resultado exibiu uma grande atividade superficial, propriedade esta que o caracteriza como um bom tensoativo.

Com a finalidade de obter uma análise mais detalhada da eficiência na redução da tensão superficial, através da interação das variáveis (casca de abacaxi e gordura animal), foi feito o Diagrama de Pareto realizado pelo pacote computacional “STATISTICA” versão 10, sendo considerada a condição 1 que apresentou melhor resultado de Tensão Superficial. A Figura 1

apresenta o Diagrama de Paretos para a cinética 155rpm na produção do biossurfactante em 48, 72, 96 e 120h.

Figura 1 – Diagrama de Pareto para avaliação da Tensão Superficial na produção de biossurfactante utilizando *Serratia marcescens* UCP 1549, a 155rpm, 28°C, em 48h (A), 72h (B), 96h (C) e 120h (D)



De acordo com a Figura 1 (A) e 1 (B) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal foram significativas estatisticamente e contribuíram positivamente para a redução da tensão superficial. Entretanto, o efeito da variável independente casca de abacaxi foi estatisticamente representativa, mas contribuiu negativamente para a redução da tensão superficial com as condições estabelecidas pelo planejamento fatorial de 2^2 sobre a variável resposta tensão superficial, após 48 horas de cultivo a 28° C e 155 rpm com nível de confiança de 95%.

Na Figura 1 (C) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal foram significativas estatisticamente e contribuíram positivamente para a redução da tensão superficial, assim como o efeito das variáveis independentes gordura animal e casca de abacaxi.

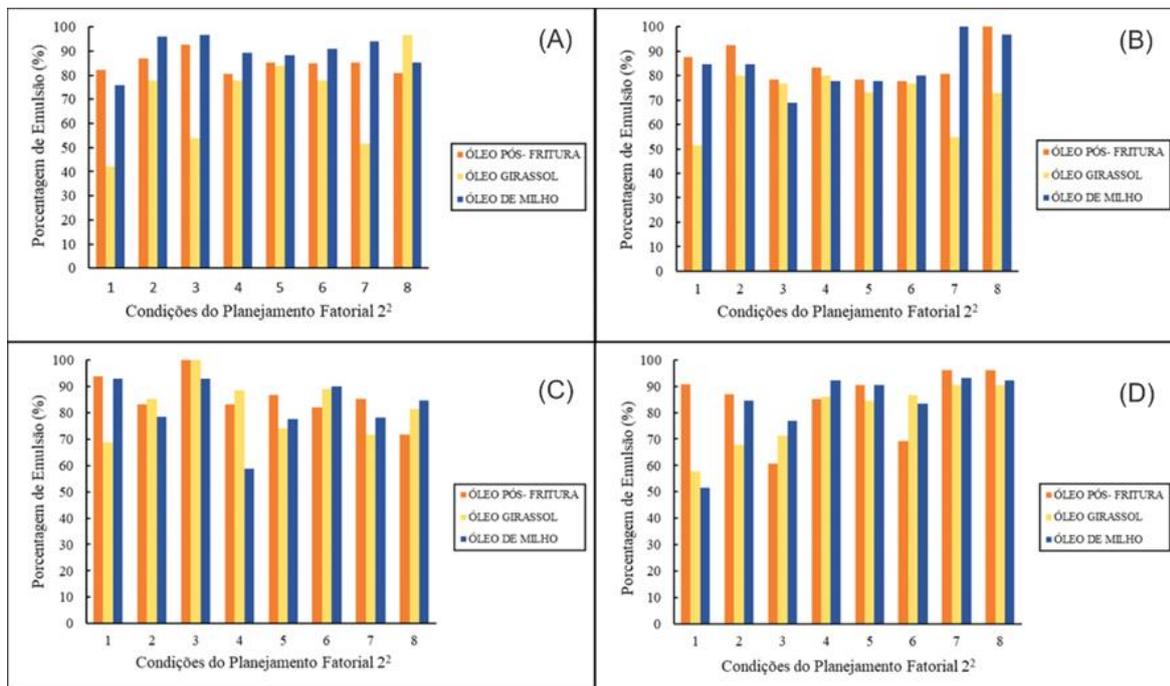
Para a Figura 1 (D) as interações entre a casca de abacaxi e a gordura animal não foram significativas estatisticamente e contribuíram negativamente para a redução da tensão superficial, assim como o efeito das variáveis independentes gordura animal e casca de abacaxi. Portanto, na cinética de 120h a redução da tensão superficial não obteve um resultado satisfatório, uma vez que, a interação dos substratos analisados não apresentou resultados significativos.

Santos *et al.*, (2018) utilizando como microrganismo *Streptomyces* sp. DPUA1559 isolado de líquenes da região amazônica para produção de biossurfactante, obteve uma cinética da produção de biossurfactante acompanhada pela redução da tensão superficial do meio de cultura de 60 para valores em torno de 27,14 mN/m.

3.2 ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO

O índice de emulsificação avaliado refere-se ao valor quantitativo da emulsão produzida pelo biossurfactante presente no líquido metabólico, e quanto maior esse valor, mais estável será a emulsão formada. As análises de índice de emulsificação, de acordo com o planejamento estatístico, foram representadas a partir de gráficos comparativos entre os diferentes tipos de óleos (pós - fritura, girassol e milho) e tempos de rotação. A Figura 2 mostra o comparativo dos Índices de Emulsificação para as condições do modo cinético de 48h, 72h, 96h e 120h a 28°C, modo cinético.

Figura 2 – Comparativo dos Índice de Emulsificação em 48h (A), em 72h (B), em 96h (C), em 120h (D)



A capacidade de emulsificação foi melhor observada na condição 3 apresentada na Figura 2 (C), que continha 5 gramas de casca de abacaxi e 6 gramas de gordura animal, fermentada por 96 horas utilizando o óleo pós-fritura e óleo girassol, com uma emulsão de 100%. Concomitantemente, obteve-se o mesmo resultado para as condições 7 e 8 da Figura 2 (B), fermentadas por 72 horas, utilizando o óleo de milho e óleo pós- fritura, respectivamente.

Na análise dos resultados de todas as condições referentes à emulsificação do óleo de girassol neste trabalho, observou-se que a efetividade dos biossurfactantes foi baixa quando comparado com a efetividade de emulsão formada pelos óleos pós-fritura e milho.

Martins (2017), obteve uma produção eficiente de biossurfactante utilizando o microrganismo *Corynebacterium aquaticum* e peixe e resíduos de bagaço como fonte de carbono. A tensão superficial obtida para esses tratamentos foi de 27,8 e 33,9 mN /m e capacidade de emulsão foi de 87,6 e 61,6%, respectivamente. Desta forma, é possível observar que o biossurfactante produzido com o microrganismo *Serratia marcescens* teve um resultado satisfatório quanto aos resultados apresentados de índice de emulsificação.

No estudo feito por de Souza Mendonça *et al.* (2019) utilizando *Absidia* sp. UCP 1144 na produção de biossurfactante, os resultados obtidos demonstraram que o fungo produziu uma molécula com atividade emulsificante na condição que continha glicerol (3%), milhocina (3%) e soro de leite (4%) com índice de emulsificação de 79,17% utilizando óleo motor queimado, 73,68% com óleo de mamona e 92,31% com óleo motor *in natura*. A análise estatística comprovou a influência significativa das concentrações dos resíduos glicerol bruto, milhocina e soro de leite na produção do biossurfactante, constituindo substratos alternativos e de baixo custo, sendo um bioprocessamento econômico e atrativo para a indústria.

3.3 EXTRAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O biossurfactante produzido na melhor condição selecionada do planejamento experimental, ou seja, condição que contém 5 gramas de casca de abacaxi e 2 gramas de gordura animal fermentado por 48 horas, devido a menor tensão superficial, foi extraído de 1L do líquido metabólico livre de células, seguido de filtração em membrana de millipore e acidificado com uma solução de HCl 5N até atingir o pH 2,0. Colocou-se então para descansar por 16 h e centrifugou o sistema, descartando o sobrenadante e recolhendo o precipitado para ficar na estufa por aproximadamente 24 h, a uma temperatura de 37 °C.

O pó extraído apresentou +0,8677g/L, representando a quantidade de biossurfactante desidratado obtido em 1L do líquido metabólico. Segundo o trabalho de Santos *et al.* (2018),

utilizando o microrganismo *Streptomyces* sp. DPUA1559 para produção de biossurfactante, obteve um rendimento do biossurfactante isolado de 1,74 g / L.

4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir, que a eficiência do biopolímero produzido por *S. marcescens* UCP 1549 foi de boa qualidade, e obteve potencial biotecnológico, uma vez que, utilizando resíduos agroindustriais como a casca de abacaxi e gordura animal, obtiveram-se resultados satisfatórios para a produção do biossurfactante. O biossurfactante produzido na melhor condição selecionada do planejamento experimental fermentado por 48 horas, devido a menor tensão superficial, apresentou um resultado de 27,7 mN/m. Este mostrou um ótimo potencial de metabolização dos rejeitos industriais como fonte de Carbono e Nitrogênio para seu crescimento, gerando assim, insumos com alto valor biotecnológico.

Portanto, pode-se comprovar a capacidade de emulsificação do biossurfactante produzido pela bactéria *Serratia marcescens* UCP 1549, uma vez que, este foi capaz de formar emulsões entre duas fases fluidas que apresentavam diferentes graus de polaridade, chegando a apresentar 100% de emulsão. O biossurfactante produzido tem potencial de aplicação na descontaminação ambiental de petróleo e derivados com um baixo custo, uma vez que, um fator responsável pela diminuição desse custo seria a necessidade de concentrações inferiores de biossurfactante em relação ao surfactante químico para atingir os resultados esperados.

REFERÊNCIAS

CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SARUBBO L.A, ALBUQUERQUE C.D. **Environmentally friendly biosurfactants produced by yeasts**. Adv Exp Med Biol. 672, 250-60, 2010.

COOPER, D. G. and GOLDENBERG, B. G. **Surface active agents from two Bacillus species**, Appl. Environ. Microbiol., v. 53, p 224 –229, 1987.

DE SOUZA MENDONÇA, R., ALVES, M. F., SOUZA, A. F., RODRÍGUEZ, D. M., & DE CAMPOS TAKAKI, G. M. Bioemulsificante produzido por um fungo promissor Absidia sp. UCP 1144 isolado de solo da Caatinga no Nordeste do Brasil/Bioemulsifier Produced by a Promising fungus Absidia sp. UCP 1144 Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 11, p. 25402-25414, 2019.

GARGOURI, B., DEL MAR CONTRERAS, M., AMMAR, S., SEGURA-CARRETERO, A., BOUAZIZ, M. Biosurfactant production by the crude oil degrading Stenotrophomonas sp. B-2: chemical characterization, biological activities and environmental applications. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3769-3779, 2017.

IBRAHIM, M.L., IJAH, U.J.J., MANGA, S.B., BILBIS, L.S., UMAR, S. **Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria**. Int. Biodeterior. Biodegrad. 81, 28–34, 2013.

KUYUKINA, M.S, IVSHINA I.B., PHILP J.C, CHRISTOFI N, DUNBAR S.A, RITCHKOVA, M.I. **Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction**. J Microbiol Met 46: 109-120.2001.

LI, J., DENG, M., WANG, Y., CHEN, W. **Production and characteristics of biosurfactant produced by Bacillus pseudomycoides BS6 utilizing soybean oil waste**. Int. Biodeterior. Biodegrad. 112, 72–79, 2016.

LAWNICZAK, L., MARECIK, R., CHRZANOWSK, L. **Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation**. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 2327-2339, 2013.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin J. **Sci. Technol.**, 2005.

MARTINS, P. C., MARTINS, V. G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint, **International Biodeterioration & Biodegradation** n.127, p.10-16, 2017.

MORAIS, K.A.D., SOARES, R.S., ARAÚJO, M.V.F., OLIVEIRA, B.F.R., VIEIRA, J.D.G. Produção de biossurfactante por *Bacillus* sp. em meio mínimo contendo glucose. **Enciclopédia Biosfera**, 11(22):3884-3894, 2015.

NISTCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Revista Química Nova**, Campinas, vol.25, n.5, p. 772 – 776, 2002.

OKORO, C.; AGRAWAL, A; CALLBECK, C. Simultaneous biosurfactant production and hydrocarbon biodegradation by the resident aerobic bacterial flora of oil production skimmer pit at elevated temperature and saline conditions. **Life Science Journal**, v. 9, n. 3, p. 356-364, 2012.

SANTOS, A. P. P., SILVA, M. D. S., COSTA, E. V. L., RUFINO, R. D., SANTOS, V. A., RAMOS, C. S., PORTO, A. L. F. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 2, 2018.