



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL**  
**BACHARELADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

**SAMUEL ARAUJO DE OLIVEIRA**

**APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PARA DISPERSÃO DE  
DERRAMAMENTO DE ÓLEO E LIMPEZA DE AREIA**

**FORTALEZA**

**2021**

SAMUEL ARAUJO DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PARA DISPERSÃO DE  
DERRAMAMENTO DE ÓLEO E LIMPEZA DE AREIA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Maria Maciel Melo

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O51a Oliveira, Samuel Araújo de.  
Aplicação de biossurfactantes para dispersão de derramamento de óleo e limpeza de areia / Samuel Araújo de Oliveira. – 2021.  
46 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Ambiental, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.
1. Biorremediação. 2. Petróleo. 3. Descontaminação. 4. Poluição. 5. Hidrocarboneto. I. Título.  
CDD 628
-

SAMUEL ARAUJO DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PARA DISPERSÃO DE  
DERRAMAMENTO DE ÓLEO E LIMPEZA DE AREIA**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Valderez Ponte Rocha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>ª</sup>. Bárbara Cibelle Soares Farias Quintela  
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

A minha família, amigos e em especial, minha  
mãe e minha orientadora.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Lucivanda**, o grande amor da minha vida, por sempre acreditar em mim e por todo esforço e dedicação à minha vida, por ter aberto mão de tantas coisas para investir na minha criação e educação formal.

Aos meus irmãos **Sara, Salatiel e Saulo** por sempre torcerem por mim e apoio nessa difícil jornada chamada vida.

Aos meus parentes por parte de mãe por todo amor mesmo estando fisicamente distantes, eu tenho carinho especial pela família Saldanha.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Vânia Melo**, que considero minha mãe na ciência, agradeço cada oportunidade desde a época do Projeto Petra que me mostrou que o mundo científico estava ao meu alcance e mudou completamente minha realidade para melhor. Eu tenho grande admiração e afeto!

À **Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Valdez Ponte Rocha**, participante da banca examinadora, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À **Dra. Bárbara Cibelle** pela amizade e acompanhamento desde o primeiro dia como integrante oficial do Lembiotech, você foi essencial em aprender cada análise. Agradeço também pelas contribuições com membro da banca examinadora.

À família Lembiotech a cada atual e ex integrante por cada dia, essa jornada se tornou possível e mais leve ao lado de vocês. Obrigado a cada um pela ajuda em cada análise e ensinamentos. Dedico aqui em especial aos meus companheiros de bancada **Gabrielly, Jonathan, João, Brenda, Bella, Cristiane, Mirella e Saulo** por me ajudarem diretamente nas análises da monografia.

À **prof.<sup>a</sup> Denise Hissa** pela amizade, ajuda nas interpretações das análises e por todos os anos de aprendizagem. Tenho grande admiração pela pessoa que és.

À minha supervisora de estágio **Dra. Walderly Melgaço**, agradeço pelos ensinamentos desde a época do Petra, até hoje aprendo muito sobre o mundo da indústria farmacêutica e corporativo. Além de uma supervisora eu tenho uma amiga forte, sensível e guerreira.

Ao **prof. Dr. Erivan Melo**, pela obtenção dos dados físicos e pelo seu apoio e carinho.

Aos meus colegas de trabalho do CQB, em especial ao **Paulo Ricardo, Aline Almeida, Luiz e Diana** por toda paciência, aprendizagem e por colaborarem na minha

atuação profissional.

Aos meus companheiros de estágios da Fresenius Kabi por cada ensinamento e palavra de incentivo. Agradeço pela oportunidade de fazer parte de uma empresa de tal porte e pelas pessoas que tornam meu trabalho mais agradável.

Ao **Aterlane Martins**, Ater, um grande amor que se tornou amigo muito especial, que me acompanha desde o início da graduação. Agradeço por ter me mostrado o mundo e por cada dia de felicidade ao seu lado, obrigado por acreditar em mim e vibrar por cada conquista.

Aos meus amigos de graduação, em especial, **Fernando, Letícia, Carol, Thaís, Mardones, Gleciane e Nayara** pela amizade e apoio durante a graduação. Ter amigos dentro do curso é de suma importância para ser resiliente durante a graduação.

Aos meus amigos da época da Agronomia **Rauny, Filipe, Igor e Danier** pela amizade e por me apoiarem na difícil decisão de mudar de curso. Sou grato por cada palavra de incentivo e consolo.

Ao seu **Valdenor**, agradeço a dedicação e as palavras de força.

E, por fim, a Universidade Federal do Ceará, PETROBRÁS e CNPq, pelo apoio financeiro e técnico.

“Você não pode tocar sem ser tocado”

- Isaac Newton.

## RESUMO

O crescimento da indústria petrolífera tem ocasionado um aumento no número de acidentes envolvendo derramamento de óleo nas regiões costeiras e estuarinas. Um exemplo marcante foi o óleo pesado que atingiu o litoral do Nordeste e praias do Espírito Santo e do Rio de Janeiro, em 2019, sendo o maior desastre ambiental em extensão já registrado no Brasil. Dentro dessa temática, o presente estudo objetivou avaliar o potencial do biossurfactante produzido por uma estirpe de bactéria, identificada como TIM49, como agente de dispersão de óleo e limpeza de areias de praia contaminadas com óleo. A atividade tensoativa da amostra foi comprovada através da determinação do índice de emulsificação, redução da tensão superficial, atividade dispersante de óleo derramado em água e remoção de limpeza de óleo impregnado em areia, tendo como referência o surfactante sintético SDS (dodecil sulfato de sódio). A espécie produtora foi identificada por sequenciamento do gene RNAr 16S e a molécula tensoativa caracterizada por espectroscopia de infravermelho. A exotoxicidade foi avaliada contra náuplios de *Artemia* sp. O biossurfactante produzido por TIM49 possui atividade emulsificante, sendo capaz de emulsificar em 62% uma mistura de água-querosene, assim como reduz a tensão superficial da água de 75 mN/m para 27,4 mN/m. Também é um eficiente dispersante de óleo, superior ao SDS, e também um excelente agente de limpeza de areia, conseguindo remover 98% de óleo impregnado, semelhante ao SDS (p>95%), com a vantagens de ser biodegradável e não tóxico, já que não causou a morte dos náuplios de *Artemia* sp. o biossurfactante produzido pela TIM49, mesmo numa concentração 10 vezes maior do que sua concentração micelar crítica (11 mg/L). TIM49 foi identificada como *Bacillus subtilis*, uma espécie de nível de biossegurança NB-1 e o biossurfactante pertencente a classe dos lipopeptídeos, que são reconhecidos como potentes surfactantes. Assim sendo, o sobrenadante bruto da cultura de TIM49, rico em biossurfactante, representa uma alternativa eficiente e ecologicamente compatível aos surfactantes sintéticos comumente usados como dispersante e agentes de limpeza de areias de praias impregnadas com óleo.

**Palavras chave:** Biorremediação; Petróleo; Descontaminação; Poluição; Hidrocarbonetos.

## ABSTRACT

The oil industry growth has caused an increase in the number of accidents involving oil spills in coastal and estuarine regions. A striking example was the heavy oil that hit the coast of the Northeast and beaches of Espírito Santo and Rio de Janeiro in 2019, being the largest environmental disaster in extension ever recorded in Brazil. Aiming to contribute for development strategies for bioremediation of oil contaminated environment, the present study evaluated the potential of the biosurfactant produced by a bacterial strain, identified as TIM49, as an oil dispersing agent and cleaning oil-contaminated beach sands. The surfactant activity was proven by determining the emulsification index, surface tension reduction, dispersing activity of oil spilled in water and cleaning oil-contaminated beach sand, using the synthetic surfactant SDS as a reference. The producing species was identified by sequencing the RNAr 16S gene and the surfactant molecule characterized by infrared spectroscopy. Exotoxicity was evaluated against *Artemia* sp. The biosurfactant produced by TIM49 has emulsifying activity, being able to emulsify a water-kerosene mixture, 62%, as well as to reduce the surface tension of water from 75 mN/m to 27.4 mN/m. It is also an efficient oil dispersant, superior to SDS (sodium dodecyl sulfate), and an excellent sand cleaning agent, removing 98% of impregnated oil, similar to SDS (p > 95%), with the advantages of being biodegradable and non-toxic, as it not caused the death of nauplii of *Artemia* sp. TIM49, even at a concentration 10 times greater than its critical micellar concentration (11 mg / L). TIM49 was identified as *Bacillus subtilis*, a species of biosafety level NB-1 and the biosurfactant belongs to the class of lipopeptides, which are recognized as potent surfactants. Therefore, the crude supernatant of the TIM49 culture, rich in biosurfactant, represents an efficient and ecologically compatible alternative to the synthetic surfactants commonly used as a oil dispersant and cleaning agents for beach sand impregnated with oil.

Keywords: Bioremediation; Petroleum; Decontamination; Pollution; Hydrocarbons.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Índice de emulsificação de uma mistura água-querosene produzido pelo sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. TIM49 e por uma solução de SDS 1%. Letras iguais indicam semelhança estatística das médias ( $p>0,95$ )..... 33
- Figura 2 – Valores de redução de tensão superficial mensurados para o sobrenadante da cultura de TIM49, solução de SDS 1 %, Meio Mineral e água. Letras diferentes indicam diferenças das médias ( $p>0,95$ )..... 33
- Figura 3 – Tensão superficial (mN/m) do biossurfactante produzido por *Bacillus* TIM49 em água ultrapura em diferentes concentrações à temperatura ambiente (25 °C)..... 34
- Figura 4 – Percentual de remoção de petróleo da areia de praia promovido pelo biossurfactante produzido por TIM49 comparado ao surfactante sintético SDS. Letras diferentes indicam diferenças das médias ( $p<0,05$ ), de acordo com ANOVA..... 35
- Figura 5 – Aspecto visual das areias após os tratamentos com SDS 1 %, TIM49 e água..... 35
- Figura 6 – Atividade de dispersão de petróleo em 1, 5, 30, 60 min e 24 h depois de aplicar 1 % de SDS (A) e sobrenadante da estirpe TIM49 (B) em uma fina camada de petróleo bruto na superfície da água do mar..... 36
- Figura 7 – Espectro FTIR-ATR do biossurfactante produzido pelo isolado TIM49..... 37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos de biossurfactantes e seus micro-organismos produtores.....	26
Tabela 2 – Identificação molecular da cepa TIM49 com base em sequências genéticas de 16S rRNA, <i>gyrB</i> e <i>rpoB</i> usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local (BLAST).....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo
API	<i>American Petroleum Institute</i>
Art.	Artigo
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CMC	Concentração Micelar Crítica
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
<i>gyrB</i>	Subunidade $\beta$ da DNA girase
HPAs	Hydrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IMO	International Marine Organization
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MPF	Ministério Público Federal
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PF	Polícia Federal
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNC	Plano Nacional de Contigência
RNase	Ribonuclease
<i>rpoB</i>	Subunidade $\beta$ da RNA Polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UFC	Universidade Federal do Ceará
VOCs	Compostos Orgânicos Voláteis

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 Exploração do petróleo: Quais são os danos? .....	16
2.2 Legislação ambiental brasileira aplicada ao derramamento de óleo .....	18
2.3 Técnicas de biorremediação.....	22
2.4 Surfactantes .....	25
2.5 Biossurfactantes .....	25
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>27</b>
4.1 Produção do biossurfactante.....	27
4.2 Purificação do biossurfactante .....	28
4.3 Avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante .....	28
4.4 Determinação da tensão superficial .....	28
4.5 Determinação da Concentração Micelar Crítica .....	29
4.6 Ensaio de remoção de petróleo impregnado em areia de praia.....	29
4.7 Ensaio de dispersão de óleo.....	29
4.8 Avaliação de toxicidade do biossurfactante sobre náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	30
4.9 Análise do biossurfactante por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	30
4.10 Identificação molecular da estirpe TIM49 .....	31
4.11 Análise estatística .....	32
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 Avaliação da capacidade emulsificante dos biossurfactante.....	32
5.2 Determinação da tensão superficial .....	33

<b>5.3 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)</b> .....	<b>33</b>
<b>5.4 Limpeza de areia impregnada com petróleo</b> .....	<b>34</b>
<b>5.5 Ensaio de dispersão de óleo</b> .....	<b>35</b>
<b>5.6 Avaliação da ecotoxicidade do biossurfactante</b> .....	<b>36</b>
<b>5.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>36</b>
<b>5.8 Identificação molecular</b> .....	<b>37</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores poluidores de ambientes marinhos são os hidrocarbonetos do petróleo. A contaminação de ecossistemas por hidrocarbonetos são resultados das atividades relacionadas à extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados (GENTILI *et al.*, 2006; XUE *et al.*, 2015).

O crescimento da indústria petrolífera tem ocasionado um aumento no número de acidentes envolvendo derramamento de óleo nas regiões costeiras e estuarinas (GENTILI *et al.*, 2006; XUE *et al.*, 2015). Um exemplo marcante foi o derramamento no golfo do México em 2010 conhecido como o maior acidente envolvendo petróleo no meio ambiente e que impactou os ecossistemas da região e a economia de diversos países (MASCARELLI, 2010). No Brasil, em 2019, ocorreu o maior derramamento de óleo bruto da história do país e um dos mais extensos registrados no mundo (PENA *et al.*, 2020).

Em contaminações leves onde não há grave comprometimento do ambiente, a recuperação muitas vezes ocorre de maneira natural (Burns and Codi, 1998; Thapa *et al.*, 2012). Porém, em casos graves com alta quantidade de contaminantes e comprometimento do meio ambiente, é necessária uma intervenção para acelerar o tempo de recuperação evitando assim um dano permanente (Brito *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2011). O desenvolvimento de tecnologias para remover esses compostos tóxicos do petróleo tem recebido cada vez mais atenção. Nos últimos anos as pesquisas científicas tem recomendado cada vez mais a biorremediação, que é uma técnica que consiste em remover ou reduzir de forma *eco-friendly* contaminantes do ambiente utilizando organismos vivos, normalmente plantas ou micro-organismos; ou seus produtos, por exemplo enzimas, biossurfactantes, entre outros (Karigar and Rao, 2011; Barreto *et al.*, 2010; Angelim *et al.*, 2013; Bezza and Chirwa, 2015; Borah and Yadav, 2016; De Oliveira *et al.*, 2017).

Biossurfactantes são compostos ativos de superfície capazes de aumentar a interação entre moléculas de diferentes graus de polaridade, como água e óleo. As características que definem os biossurfactantes são suas habilidades de aumentar a solubilidade em água de compostos hidrofóbicos, de formar emulsões com hidrocarbonetos e de reduzir as tensões superficial e interfacial de líquidos (MNIF; GHRIBI, 2015). Portanto o presente estudo partiu do seguinte pergunta:

*Seria o biossurfactante produzido pela estirpe de bactéria TIM49 uma alternativa aos surfactantes sintéticos comumente usados em derramamentos de petróleo?*

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Exploração do petróleo: Quais são os danos?

Um dos maiores poluidores de ambientes marinhos são os hidrocarbonetos do petróleo (XUE et al., 2015). A contaminação de ecossistemas costeiros por hidrocarbonetos são resultados das atividades relacionadas à extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados (GENTILI *et al.*, 2006). O petróleo bruto é uma mistura complexa que contém uma diversidade de compostos tóxicos conhecidas, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos orgânicos voláteis (VOCs), sulfeto de hidrogênio e metais pesados. A gravidade da exposição ocorre por ingestão, absorção por meio da pele íntegra e inalação. Os riscos toxicológicos envolvidos são graves, agudos e crônicos, com atenção especial para frações tóxicas do petróleo que podem levar à morte por intoxicação, principalmente associada aos compostos aromáticos.

Os HPAs incluem substâncias cancerígenas conhecidas e podem alterar as funções reprodutivas e imunológicas em mulheres e homens, o que agrava os riscos de exposição para gestantes e crianças (AGUILERA *et al.*, 2010; HA *et al.*, 2013). O sulfeto de hidrogênio pode causar efeitos agudos e crônicos do sistema nervoso central, como cefaleias, alterações da atenção, memória insuficiente (PALINKAS LA, PETTERSON JS, RUSSELL J, 1993). Os metais pesados encontrados no petróleo bruto, como arsênio, cádmio, cromo, manganês, cobre, níquel, vanádio e chumbo apresentam várias enfermidades, tais como lesões renais, neurotoxicidade, carcinogenicidade e imunotoxicidade (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2009). Os VOCs, particularmente o benzeno, têm sido associados às doenças carcinogênicas e a efeitos hematotóxicos, imunotóxicos e disfunção renal, mesmo em níveis relativamente baixos de exposição (BAAN *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2010; SAVITZ; ANDREWS, 1997). Efeitos outros como alterações hepáticas e hormonais, irritação respiratória, transtornos mentais, quadros de depressão (GILLIS *et al.*, 2007; PALINKAS LA, PETTERSON JS, RUSSELL J, 1993). As pesquisas demonstram que é difícil medir com precisão os riscos e impactos de derramamentos de petróleo e as análises de risco subestimam os agravantes, os quais podem perdurar por décadas. O efeito na cadeia alimentar tem sido verificado na avaliação de impactos em áreas atingidas pela poluição de petróleo há mais de 50 anos (PENA *et al.*, 2020).

O maior acidente recente envolvendo derrame de petróleo em ambiente marinho foi o que ocorreu no golfo do México em 2010 que levou ao mar cerca 4,9 milhões de barris de petróleo, impactando drasticamente os ecossistemas de entorno e a economia de diversos países (MASCARELLI, 2010). Uma das técnicas de remediação utilizadas lançou mão de surfactantes sintéticos como agentes de limpeza. Foram utilizadas grandes quantidades de dispersantes sintéticos, aproximadamente 1,8 milhões de galões. Os dispersantes utilizados são misturas complexas de dois componentes básicos, de um ou mais surfactantes que podem emulsionar óleo e uma mistura de solventes à base de hidrocarbonetos que ajuda a quebrar grandes porções de óleo viscoso de alto peso molecular (TRANNUM; BAKKE, 2012).

A utilização de dispersantes sintéticos tem sido controversa, uma vez que os dispersantes também representam um alto risco de toxicidade (SILVA *et al.*, 2014). Estudos apontaram um efeito sinérgico de aumento de toxicidade quando o dispersante sintético foi associado ao petróleo (KHAN & PAYNE, 2005). Também foi mostrado que o surfactante Corexit 9500, dispersante sintético utilizado no Golfo do México, inibe bactérias presentes em areia de praia, e sugere que o uso do dispersante tem o potencial de diminuir a capacidade de biorremediação da comunidade microbiana, processo biológico importante na diminuição do impacto ambiental ocasionado pelo petróleo que chega à praia (TRANNUM; BAKKE, 2012).

Diferente do que normalmente acontece em derramamento de petróleo no mar, o desastre ocorrido no Brasil em 2019, e contaminou 4.334 km de praias em 11 estados do Nordeste e Sudeste, 120 municípios e 724 localidades, foi mais desafiador do que um derramamento de óleo típico porque o óleo cru denso não estava flutuando na superfície e só apareceu quando chegou à costa. Portanto os métodos convencionais de barreiras flutuantes e dispersantes normalmente empregadas para evitar que o óleo chegue à costa teria pouco efeito, por exemplo, então o trabalho foi concentrado na limpeza do petróleo que impregnou a costa, inclusive a areia de praia (BBC, 2019). Ressalta-se que o óleo bruto trouxe riscos a saúde de pelo menos 144 mil pescadores artesanais do Nordeste do país e sérios prejuízos a economia local (PENA *et al.*, 2020).

Diversos voluntários e o exército brasileiro trabalharam na remoção manual do petróleo que impregnou as praias. Segundo PENA *et al.* (2020) a desorganização e resposta inadequada levaram ao apelo generalizado do voluntarismo – mobilizando milhares de pessoas desprotegidas para retirada do óleo, muitas vezes manualmente e sem orientações e equipamentos necessários – refletindo a falta de recursos financeiros, tecnológico e humanos, associados à fragilidade organizacional das ações de saúde.

## 2.2 Legislação ambiental brasileira aplicada ao derramamento de óleo

A primeira lei que se remete quando falamos de direito ambiental é o Art. 225 da Constituição Federal que garante direito a toda população ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, e que é dever do poder público e à coletividade de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

Com relação a legislação relacionada a área petrolífera tem-se a Lei N° 9.966 de 28 de abril de 2000 que estabelece os princípios básicos a serem obedecidos na movimentação de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em portos organizados, instalações portuárias, plataformas e navios em águas sob jurisdição nacional. Esta Lei proíbe o descarte em águas nacionais, de substâncias nocivas ou perigosas, além de água de lastro, resíduos de lavagem de tanques, a não ser nos casos permitidos pela Marpol 73/78, e dentro dos limites estabelecidos de áreas ecologicamente sensíveis.

Marpol 73/78 é Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição Causada por Navios, concluída em Londres, em 2 de novembro de 1973, alterada pelo Protocolo de 1978, concluído em Londres, em 17 de fevereiro de 1978, e emendas posteriores, da qual o Brasil é país signatário, publicada pela *International Marine Organization* (IMO), agência das Nações Unidas que estabelece convenções internacionais a respeito de assuntos marítimos. De forma geral Marpol tem por propósito o estabelecimento de regras para a completa eliminação da poluição intencional do meio ambiente por óleo e outras substâncias danosas oriundas de navios, bem como a minimização da descarga acidental daquelas substâncias no ar e no meio ambiente marinho.

A Lei N° 9.966 define Plano de Emergência como “(...) as medidas que determinam e estabelecem as responsabilidades setoriais e ações a serem tomadas após um incidente, definindo também recursos humanos, materiais e equipamentos adequados a prevenção, controle e combate à poluição das águas”, e determina que este deve ser elaborado pelas entidades exploradoras. Já o Plano de Contingência é definido como “(...) a integração dos diversos planos de emergência setoriais”, e deve ser organizado pelo órgão ambiental em articulação com órgãos da defesa civil, assim como o Plano Nacional de Contingência, que tem como objetivo ampliar a capacidade de resposta do poluidor.

A mesma lei ainda determina que todos os incidentes devem ser comunicados imediatamente ao órgão ambiental competente, à Capitania dos Portos e ao órgão regulador da indústria de petróleo, no caso a Agência Nacional de Petróleo (ANP). Em caso de descumprimento desta lei é previsto multa, retenção do navio até que a situação seja

regularizada, suspensão imediata das atividades da empresa transportadora em situação irregular. Respondem pelas infrações previstas, na medida de sua ação ou omissão: o proprietário do navio, pessoa física ou jurídica, ou quem legalmente o represente; o armador ou operador do navio, caso este não esteja sendo armado ou operado pelo proprietário; o concessionário ou a empresa autorizada a exercer atividades pertinentes à indústria do petróleo; o comandante ou tripulante do navio; a pessoa física ou jurídica, de direito público ou privado, que legalmente represente o porto organizado, a instalação portuária, a plataforma e suas instalações de apoio, o estaleiro, a marina, o clube náutico ou instalação similar; o proprietário da carga. As infrações desta lei estão detalhadas no Decreto N° 4.136, de 21 de fevereiro de 2002.

A Resolução CONAMA 293, de 12 de dezembro de 2001, complementa à Lei N° 9.966, em relação as medidas a serem tomadas quando do derramamento de substâncias perigosas e tóxicas no mar. Esta Resolução foi publicada considerando os graves incidentes de derramamento de óleo ocorridos no País e a urgência para o estabelecimento de diretrizes e procedimentos que venham a contribuir para a eficácia das ações de resposta a incidentes de poluição por óleo nos portos organizados, instalações portuárias ou terminais, dutos, plataformas, bem como suas respectivas instalações de apoio. Segundo a mesma, a apresentação do Plano de Emergência Individual deve acontecer na ocasião do Licenciamento Ambiental, e suas respectivas aprovações. Os pontos principais que devem constar do Plano de Emergência Individual são: identificação da instalação, cenários acidentais, informações e procedimentos para resposta, encerramento das operações, mapas, cartas náuticas, plantas, desenhos, fotografias e anexos.

A Resolução CONAMA N° 269, de 14 de setembro 2000 estabelece critérios para as ações de combate aos derrames de petróleo e seus derivados no mar e discutir parâmetro do uso de dispersantes nessas situações. Segundo esta resolução é necessário que o dispersante seja registrado no IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). as considerações sobre critérios para utilização de dispersantes constantes neste documento são de caráter geral, cujas orientações norteiam a utilização em situações de derrames de óleo, recomendando-se para tanto: a definição da área geográfica a ser considerada (área de risco direto e indireto); a definição da distribuição e da sazonalidade das espécies de cada ecossistema que compõe a área; a identificação dos recursos socioeconômicos em risco; a definição da geomorfologia costeira e de relativa sensibilidade dos ambientes ao óleo; a obtenção de dados meteorológicos e climatológicos da área; a obtenção de dados hidrodinâmicos e hidrográficos da área; a cartografia dos dados físico-

naturais e socioeconômicos, identificando onde a aplicação de dispersantes é recomendável ou não.

É importante que seja utilizado, também, um modelo matemático que preveja a tendência de orientação e movimentação das manchas de óleo no mar, nas regiões de influência direta e indireta das potenciais fontes poluidoras, tais como: terminais, oleodutos e rotas de navios. Quanto aos critérios de uso a resolução autoriza nas seguintes situações: Em consonância com a Convenção sobre a Salvaguarda da Vida Humana no Mar (SOLAS/74), quando for necessária a adoção de medidas emergenciais decorrentes do derrame de óleo, nas quais haja risco iminente de incêndio com perigo para a vida humana no mar ou regiões costeiras, envolvendo instalações marítimas ou navios próprios ou de terceiros; em situações nas quais outras técnicas de resposta, tais como contenção e recolhimento do óleo, não sejam eficientes, em função das características do óleo, do volume derramado e das condições ambientais; em situações nas quais a mancha de óleo estiver se deslocando para áreas designadas como ambientalmente sensíveis, devendo ser aplicados no mínimo a 2.000 m da costa, inclusive de ilhas, ou em distâncias menores do que esta, se atendidas as profundidades maiores que as isóbatas, encontradas ao longo do mar territorial; em situações que sua aplicação é mais eficiente e vantajosa na minimização do impacto global de um derrame, que possa vir a atingir áreas ambientalmente sensíveis, a fim de assegurar que a mistura óleo/dispersante não chegue a comprometer o ambiente costeiro e nem outros ativos ambientais importantes; em áreas e situações específicas não prevista.

Os dispersantes químicos não poderão ser utilizados em: áreas costeiras abrigadas, com baixa circulação e pouca renovação de suas águas, onde tanto o dispersante químico quanto a mistura de óleo possam permanecer concentrados ou ter um alto período de residência, tais como corpos d'água costeiros semi-fechados; estuários, canais, costões rochosos, praias arenosas, lodosas ou pedregulhos ou, ainda, áreas sensíveis tais como manguezais, marismas, recifes de corais, lagunas, restingas, baixios expostos pela maré, unidades de conservação, parques ecológicos e reservas ambientais; áreas discriminadas nos mapas de sensibilidade como sendo de: ressurgência, desova e berçário naturais de peixes, espécies ameaçadas de extinção, populações de peixes ou frutos do mar de interesse comercial ou ainda de criadouros artificiais de peixes, crustáceos ou moluscos (aquacultura), migração e reprodução de espécies (mamíferos, aves, tartarugas), recursos hídricos para o uso tanto de abastecimento humano como para fins industriais; derrames de petróleo ou derivados que possuam viscosidade dinâmica inferiores a 500 mPa.s ou superiores a 2.000 mPa.s a 10 °C, pois a eficiência dos dispersantes sobre este tipo de óleo é baixa ou nula; casos em que o

processo de formação da emulsão água-óleo tenha sido iniciado ou, ainda, quando o processo de envelhecimento da mistura de óleo for visível; na limpeza de instalações portuárias, em qualquer tipo de embarcação, bem como em equipamentos utilizados na operação de resposta ao derrame de petróleo ou derivados. Esta resolução ainda discute sobre critérios para tomada de decisão para uso de dispersante, métodos e formas de aplicação, monitoramento da aplicação, comunicação e relatório sobre a aplicação de dispersantes e dar outras providências sobre o tema.

Diante do arcabouço legal apresentado vem o questionamento: Em caso de derramamento de petróleo no Brasil, quais as responsabilidades de cada órgão público?

O Ministério do Meio Ambiente (MMA) é responsável pela coordenação do Plano Nacional de Contingência para Incidentes de Poluição por Óleo (PNC) e exerce autoridade sobre duas agências federais envolvidas nas ações, o IBAMA e o ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). IBAMA é quem deve fornecer os equipamentos de segurança necessários para remover o petróleo das praias e orientar voluntários nas atividades. Outra atribuição do órgão é conduzir um processo administrativo contra os responsáveis pelo incidente, multando-os e exigindo a reparação dos danos. O ICMBio administra as unidades de conservação federais, portanto quando há dano ambiental nessas áreas, o ICMBio deve agir em parceria com o Ibama na reparação do problema. Isso envolveria, por exemplo, a participação de agentes do ICMBio nos mutirões de limpeza nas praias. Já a Polícia Federal (PF) é o único órgão federal que investiga crimes, inclusive os ambientais (já que o IBAMA atua apenas na esfera administrativa). Portanto, a PF tem papel central na responsabilização dos culpados pelo vazamento. Cabe a ela instaurar um inquérito policial e apurar as circunstâncias do desastre, colhendo provas e depoimentos. O inquérito deve ser compartilhado com o Ministério Público Federal (MPF). Com base nas informações levantadas pela Polícia Federal, o MPF avalia se oferece uma denúncia à Justiça ou se arquiva o caso. Essa ação pode tramitar na esfera criminal e buscar a punição dos responsáveis, com pena de multa ou até prisão. Mesmo empresas e pessoas estrangeiras podem ser investigadas e denunciadas. O MPF também atua na esfera cível. O órgão pode conduzir uma Ação Civil Pública para cobrar providências das autoridades responsáveis por sanar um dano ambiental, por exemplo. Essas ações costumam ter efeitos mais rápidos e atendem a interesses difusos, que envolvem grupos maiores de vítimas. Outro desdobramento possível é uma ação de improbidade administrativa, caso o MPF avalie que alguma autoridade descumpriu suas atribuições na resposta a um incidente. Condenados por improbidade administrativa tem seus direitos políticos suspensos e ficam impossibilitados de se candidatar a cargos eletivos. Já a

ANP é responsável por fiscalizar e regulamentar a extração petrolífera em território nacional, deve coordenar as demais agências governamentais nos casos de incidentes de poluição por óleo que ocorram a partir de estruturas submarinas de perfuração e produção de petróleo. Por últimos e não menos importantes as defesas civis estaduais e municipais, bem como as secretarias estaduais e municipais do Meio Ambiente, devem colaborar com os órgãos federais na limpeza das praias e no atendimento a comunidades impactadas (FELLET, 2019).

Em caso de derramamento de petróleo no território marítimo brasileiro existem duas esferas de responsabilização neste caso: civil e criminal. No caso da responsabilização civil, o objetivo do Brasil será buscar indenização para cobrir todos os danos econômicos e ambientais, de curto e longo prazo, provocados pelo vazamento. Já no âmbito criminal, será preciso identificar se houve dolo ou culpa, ou seja, se as pessoas envolvidas tiveram a intenção de cometer aquele crime ou assumiram o risco de que esses danos ocorressem. Segundo o direito internacional e a legislação brasileira, uma vez identificada a origem do derrame de petróleo, há uma série de possíveis responsáveis a serem processados civil e criminalmente. O primeiro possível responsável é o dono da embarcação de onde saiu o óleo, e o capitão do navio também pode ser punido criminalmente. Todas as empresas e até países envolvidos na operação, como a companhia que receberia a mercadoria e o país que vendeu o produto, podem eventualmente ser processados e obrigados a pagar indenizações pelos danos econômicos e ambientais provocados. (WWF, 2019).

### **2.3 Técnicas de biorremediação**

O termo biorremediação pode ser definido como um processo que utiliza a biotecnologia na aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos. Esse procedimento consiste na utilização de organismos vivos, normalmente plantas ou micro-organismos, para remover ou reduzir (remediar) ambientes poluídos, tais como águas superficiais e subterrâneas, solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção (ALVAREZ; ILLMAN, 2005).

A biorremediação pode ser um processo *in situ*, quando a técnica é aplicada no local sem a necessidade de remoção do substrato contaminado, ou *ex situ*, quando o material contaminado é removido do local para receber o tratamento necessário. Os tratamentos *ex situ* de biorremediação são mais onerosos em comparação com as abordagens *in situ*. Estes dois métodos principais de biorremediação são também significativamente diferentes em relação aos controles experimentais e consistência dos resultados do processo. A taxa de

biodegradação do processo *in situ* é mais variável do que o processo *ex situ*. A outra vantagem significativa com a aplicação de biorremediação *ex situ* é o fato de esse procedimento ser independente dos fatores ambientais que possam afetar de forma adversa a eficácia do processo. Além disso, como a biorremediação *ex situ* é realizada em ambientes não-naturais, o processo pode ser manipulado facilmente por tratamentos físico-químicos dos poluentes alvos antes e/ou durante a degradação (ALVAREZ; ILLMAN, 2005; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

A seleção entre qualquer uma das abordagens acima é determinada principalmente pelas características físico-químicas do local contaminado, presença de contaminante secundários, tipo e concentração do poluente, etc. Por exemplo, sugere-se que a aplicação de métodos de biorremediação *ex situ* pode ser mais útil para a remediação de (1) solo/sedimentos contaminados com altos níveis de poluentes recalcitrantes, (2) solo rico em argila com baixa permeabilidade de poluentes, (3) locais contaminados onde as condições ambientais são desfavoráveis para processos biológicos e (4) onde a liberação ambiental de micro-organismo não é viável por razões regulatórias. Além disso, é importante que a seleção da abordagem de remediação seja racionalizada de acordo com os resultados esperados do processo (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009; ROBLES-GONZÁLEZ; FAVA; POGGI-VARALDO, 2008).

Atenuação natural é o método de biorremediação no qual o contaminante permanece no local e, através de processos naturais como biodegradação, volatilização, diluição e sorção, ocorre a descontaminação do ambiente (MULLIGAN; YONG, 2004). Por depender exclusivamente destes processos naturais, a biorremediação passiva pode ser muito lenta, exigindo o uso conjunto de outras técnicas e obrigatoriamente, o monitoramento do local por longos períodos de tempo, visando à proteção da saúde do homem e do ambiente (BENTO *et al.*, 2005).

Bioestimulação é uma técnica *in situ* onde são adicionados nutrientes orgânicos e inorgânicos ao substrato contaminado visando estimular a atividade dos micro-organismos degradadores. Esta técnica é utilizada quando os estudos indicam que existe micro-organismos autóctones capazes de degradar o poluente em questão (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

No caso em que os estudos indicam a ineficiência dos micro-organismos autóctones em metabolizar o contaminante pode ser recomendado utilizar a técnica de bioaugmentação, que consiste em adicionar micro-organismos ao substrato visando a degradação do poluente

(JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

A bioventilação é utilizada quando se detecta baixa concentração de oxigênio no solo onde é necessário introduzir oxigênio ao substrato contaminado visando estimular a atividade dos micro-organismos aeróbicos que demonstram uma maior taxa de degradação comparados aos micro-organismos anaeróbicos (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

O sistema de biopilhas, que é uma variação do processo de compostagem, é uma técnica *ex situ* muito utilizada no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos. Sendo este normalmente removido do local de origem e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas, visando à degradação dos contaminantes por micro-organismos aeróbicos. Para acelerar o processo de remediação pode ser realizada a adição de corretivos, fertilizantes, água, micro-organismos, biossurfactantes para aumentar a biodisponibilidade de poluentes, etc. (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

A fitorremediação é uma técnica, que utiliza plantas para remediar o solo contaminado por metais pesados, compostos orgânicos e radionuclídeos. A fitorremediação pode ser dividida em 5 tipos principais, que são: a) rizofiltração, que é uma técnica de tratamento de água em que os contaminantes são removidos e retidos no tecido vegetal; b) fitoextração, em que os contaminantes são removidos do solo e retidos no tecido vegetal; c) fitotransformação, uma técnica que pode ser aplicada ao tratamento da água e do solo, na qual ocorre a degradação dos contaminantes através do metabolismo da planta; d) fitoestimulação, em que ocorre a estimulação da atividade dos micro-organismos degradadores dos contaminantes pela rizosfera da planta; e e) fitoestabilização, quando as plantas são utilizadas para reduzir a migração dos contaminantes no solo (PILON-SMITS, 2005).

Em relação as técnicas *ex situ* é possível utilizar biorreatores que torna o processo de biorremediação eficiente para o tratamento de solos e sedimentos contaminados com poluentes recalcitrantes. Nesse processo, o material contaminado é tratado em reatores, sob condições ambientais controladas, utilizando agitação mecânica para aumentar a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos micro-organismos. A alta eficiência nesse processo está relacionado com a capacidade de controle de processo onde é possível projetar condições abióticas e até mesmo bióticas, onde as condições ambientais, o valor de pH, a disponibilidade de nutrientes, a aeração e a temperatura são otimizadas para o máximo

crescimento microbiano, e também é possível inoculação de micro-organismos com comprovada atividade degradativa (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; DA FONSECA; DE CARVALHO, 2011).

## 2.4 Surfactantes

Os surfactantes (**SURFace ACTive AgeNTS**) são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, orgânicos ou organometálicos que formam micelas em solução (NITSCHKE; PASTORE, 2002b) . A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE; PASTORE, 2002a). Tal característica possibilita uma série de propriedades aos surfactantes, esses compostos tendem a se distribuir nas interfaces com diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão superficial e interfacial (BANAT *et al.*, 2010). Por isso, os surfactantes são amplamente utilizados em diversos ramos industriais pois apresentam propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou microemulsões, dispersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou antiespumante, solubilidade, umectância ou detergência (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; BARROS *et al.*, 2007).

## 2.5 Biosurfactantes

Diversos compostos com propriedades surfactantes são sintetizados por plantas (saponinas), micro-organismos (glicolipídios, lipopeptídeos, ramnolípideos, ácidos graxos, polímeros), animais (anfíbios, peixes) e também pelo homem (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais. Quando uma molécula surfactante é produzida por organismos vivo é denominado biosurfactante (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os biosurfactantes de origem microbiana são classificados quanto a sua composição química, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Principais tipos de biossurfactantes e seus micro-organismos produtores.

Tipo de Biossurfactante	Micro-organismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptidio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: NITSCHKE; PASTORE, 2002

Os biossurfactantes quando comparados aos surfactantes sintéticos apresentam diversas vantagens, tais como biodegradabilidade, baixa ecotoxicidade, síntese a partir de matérias-primas renováveis, alta atividade de superfície em baixas concentrações, eficiência em condições extrema de salinidade, pH e temperatura (GAUTAM; TYAGI, 2006; ISLAS *et al.*, 2010; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; NITSCHKE *et al.*, 2005). Durante o vazamento do *Deepwater Horizon* no Golfo do México, em abril de 2010, cerca de 7 milhões de litros do dispersante Corexit foram utilizados para limpeza da área contaminada. Desde então tem sido mostrado os efeitos adversos deste dispersante químico ao meio ambiente, uma vez que o principais compostos do Corexit, como o surfactante Dioctil Sulfosuccinato de Sódio e os

solventes presentes na preparação são tóxicos a componentes da biota (KLEINDIENST; PAUL; JOYE, 2015; MAPELLI *et al.*, 2017), o que ressalta a importância dos biossurfactantes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial do biossurfactante produzido pela estirpe de *Bacillus* sp. TIM49 na remoção de óleo derramado em areia de praia.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as propriedades de redução da tensão superficial, emulsificação e dispersão de óleo do biossurfactante;
- Mensurar a remoção de petróleo bruto de areia de praia utilizando o biossurfactante;
- Avaliar a ecotoxicidade do biossurfactante;
- Determinar a natureza química do biossurfactante;
- Realizar a identificação molecular da estirpe TIM49.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Produção do biossurfactante

Para produção de biossurfactante, a estirpe TIM49 (Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará) foi cultivada em meio mineral, composição por litro: 10,0 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 6,0 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 3,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,7 g de NaCl e 0,6 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0. Ao meio mineral foram acrescentados 0,1 % (v/v) de uma solução de micronutrientes, composição por litro: 10,95 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5,0 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,54 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,39 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 0,17 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Uma alíquota de 10 % (v/v) de uma suspensão celular em fase exponencial (18 h), com absorbância ajustada para  $0,150 \pm 0,020$  a 600 nm, foi utilizada como inóculo. A cultura foi

incubada sob agitação contínua (150 rpm), a 30 °C por 48 h, e em seguida centrifugada a  $7.000 \times g$ , 4 °C por 15 min, para a obtenção do sobrenadante livre de células contendo o biossurfactante.

#### **4.2 Purificação do biossurfactante**

Para purificação do biossurfactante o sobrenadante da cultura foi submetido a precipitação ácida (PEREIRA *et al.*, 2013). O protocolo consiste em ajustar o pH para 2,0 com HCl 12 M e deixar em repouso por 24 h a 4 °C. O precipitado formado é recolhido após centrifugação a  $15.000 \times g$ , 20 min, 4 °C e lavado duas vezes com água acidificada (pH 2,0), sob centrifugação nas mesmas condições. O precipitado final é dissolvido em uma quantidade mínima de água ultrapura e o pH para 7,0 com NaOH 1 M. Essa amostra de biossurfactante foi liofilizada (Analítica, Christ alpha 1-2 LD plus), pesada e armazenada a temperatura ambiente (25 °C) para testes posteriores.

#### **4.3 Avaliação da capacidade emulsificante do biossurfactante**

A atividade emulsificante foi verificada seguindo a metodologia proposta por Iqbal *et al* (1995). Para o ensaio 2,0 mL de querosene foram adicionados a 2,0 mL do sobrenadante da cultura livre de células em tubo de ensaio com tampa rosqueada e a mistura foi agitada vigorosamente, em *vortex* por 2 min. Os tubos (duplicada) foram deixados em repouso por 24 h, a 25 °C, e o índice de emulsificação (E24) foi calculado dividindo-se a altura da camada emulsificada (cm) pela altura da camada total de líquido (cm), multiplicando-se por 100.

#### **4.4 Determinação da tensão superficial**

A capacidade do sobrenadante da cultura livre de células em reduzir a tensão superficial da água foi avaliada pelo método do anel Du Nöuy, em tensiômetro (Krüss, modelo K6) à temperatura ambiente (20 °C) (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010). Neste método, mede-se a força necessária para remover um anel de platina, de raio e espessura conhecidos, da superfície da solução. Para isso o equipamento foi calibrado utilizando 20 mL de água ultrapura até obter valores próximos de 72 mN/m. Após a

calibração, foi medido a tensão de 20 mL do sobrenadante da cultura e de 20 mL do meio mineral, como controle.

#### **4.5 Determinação da Concentração Micelar Crítica**

A concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante liofilizado foi determinada a partir do gráfico construído com as medidas de redução de tensão superficial obtidas com soluções do biossurfactante em diferentes concentrações (200, 100, 50, 40, 30, 20, 25, 10 e 5 mg/L). A CMC corresponde ao ponto de inflexão da curva. A análise foi feita no programa GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA, EUA).

#### **4.6 Ensaio de remoção de petróleo impregnado em areia de praia**

Para simular um derramamento, 10 g de petróleo (Fazenda Belém, Icapuí, Ceará) foram derramados sobre 50 g de areia de praia, previamente seca a 100 °C, acondicionada em um frasco de vidro. Em seguida, foram adicionados 150 mL de sobrenadante da cultura TIM49 livre de células, rico em biossurfactante, e o frasco foi deixado sob agitação a 150 rpm durante 24 h à temperatura ambiente. O surfactante sintético Dodecil sulfato de sódio 1% (SDS) e água destilada foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Após o tempo de tratamento, as amostras foram filtradas em papel para recuperação da areia e foram secas em estufa a 100 °C até peso constante. Em seguida, a quantidade de óleo foi determinada de acordo com o protocolo da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 1990). Para isso as massas totais das amostras recuperadas na filtração foram acondicionadas em um cartucho de papel de filtro para em seguida ser submetidas a extração de petróleo residual utilizando hexano em extrator Soxhlet 303 MM. Após completa extração do óleo, a areia foi seca em estufa a 100 °C até peso constante. A diferença obtida entre a massa seca de areia impregnada com óleo inicial e a massa final obtida após tratamento representa a massa de óleo removido. Os experimentos foram feitos em triplicata e o resultado expresso em percentual de óleo removido.

#### **4.7 Ensaio de dispersão de óleo**

A atividade de dispersão de óleo foi determinada segundo Morikawa e Hirata (2000) com adaptações. Neste ensaio 0,15 g de petróleo bruto foram derramados na superfície de 40 mL de água do mar em uma placa de petri (100 x 20 mm) para formar uma fina camada de óleo. Em seguida, 100 µl do sobrenadante da cultura TIM49 foram suavemente adicionado no centro do filme de óleo. Após 1 min, 5 min, 60 min e 24 h foram medidos os halos de dispersão com o auxílio de um paquímetro. O controle negativo foi realizado substituindo o sobrenadante da cultura por meio mineral estéril, e SDS 1% foi utilizado como controle positivo.

#### **4.8 Avaliação de toxicidade do biossurfactante sobre náuplios de *Artemia* sp.**

A avaliação da ecotoxicidade do biossurfactante produzido por TIM49 foi feita com náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp. (MEYER *et al.*, 1982; Carvalho *et al.*, 1988). Antes de iniciar o ensaio 10 mg de cistos em pó de artemia foram postos para eclodir em um tanque aerado contendo 2 L de água do mar artificial, contendo a seguinte composição por litro: 15,15 g de NaCl, 2,18 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2,85 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,65 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,116 g de NaHCO<sub>3</sub>, 0,414 g de KCl sob iluminação artificial constante. Após 48 h, os náuplios foram coletados com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro (n = 10) e transferidos para tubos de ensaio contendo água do mar adicionada do biossurfactante (50 e 100 ppm) ou do surfactante sintético, SDS (50 e 100 ppm). Tubos contendo apenas água do mar foram preparados como controle negativo. Após 24 h foi realizada a contagem dos náuplios sobreviventes sendo considerados mortos aqueles que permaneceram imóveis após agitação suave dos tubos.

#### **4.9 Análise do biossurfactante por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de infravermelho foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Microscopia do Departamento de Física da UFC. O biossurfactante purificado liofilizado foi caracterizado em um espectrômetro de absorção infravermelho por transformada de Fourier FT-IR VERTEX 70v (Bruker) operando em modo de reflexão atenuada total (ATR) à vácuo. Os espectros de FTIR com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> foram coletados em comprimentos de onda entre 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, sendo realizado uma média de 128 *scans* corrigidos e convertidos para transmitância.

#### 4.10 Identificação molecular da estirpe TIM49

O DNA genômico da estirpe TIM49 foi extraído usando o protocolo do brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) (WARNER, 1996). Ao final da extração, o DNA obtido foi eluído em 50 µl de Tris-HCl (10 mM, pH 8.0) com 20 µg/µl de RNase. A concentração e qualidade da extração de DNA foi avaliada por medidas da absorbância a 260 nm, 280 nm e 230 nm em espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

A identificação molecular da estirpe de bactéria foi realizada pelo sequenciamento dos genes codificadores do RNAr 16S, da subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) e da subunidade β da DNA girase (*gyrB*). As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (GoTaq, Promega, USA).

O gene do RNAr 16S foi amplificado por PCR usando os iniciadores universais para bactérias 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3') e 1525R (5'- AAGGAGGTGWTCCARCC -3') (MARCHESI *et al.*, 1998). A PCR foi feita em termociclador *Eppendorf Mastercycler® egradientS* (Hamburgo, Alemanha) programado para uma etapa de desnaturação inicial (4 min a 94 °C), seguido por 35 ciclos de 1 min 94 °C, 1 min a 55 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os genes da subunidade beta da DNA girasse (*gyrB*), e a subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) foram amplificados e sequenciados utilizando os iniciadores UP1-F (5'- GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA YGCNGGNGGNAARTTYGA-3 ') e UP2-R (5'- AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTC NACRTCNGCRTCNGTCAT-3') para *gyrB*; e *rpoB* – F (5'-AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC-3') e *rpoB* – R (5'- AAGAACCGTAACCGGCAACTT-3') para *rpoB* (AHAOTU *et al.*, 2013). A amplificação do gene *gyrB* consistiu de uma etapa inicial de desnaturação durante 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 66 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 7 min a 72 °C. Enquanto para amplificação do gene *rpoB*, a reação de PCR foi realizada utilizando as seguintes condições: primeiro, desnaturação a 94 °C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 51 °C, 50s a 68 °C, e uma extensão final de 68 °C durante 90s. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com *SYBR® Safe DNA* (Invitrogen, EUA).

Os produtos foram purificados usando o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A concentração dos produtos purificados foi determinada medindo-se a absorvância a 260 nm (A260) em espectrofotômetro *Nanodrop® ND-1000*.

O sequenciamento de DNA foi realizado pela empresa *Macrogen Inc.*, Seul, Coréia. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os iniciadores 27F, 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG -3 ') e 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC -3') para rRNA 16S; UP1-F, UP2-R para *gyrB*; rpoBF, rpoB-R for *rpoB* genes e o kit *ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os produtos foram purificados por precipitação em etanol e ressuspendidos em água ultrapura e aplicados no sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências parciais fornecidas pela empresa *Macrogen* foram de alta qualidade (Phred>20) e utilizadas para gerar sequências consenso usando o programa *CodonCode Aligner* versão 6.0.2 (CodonCode Corp, USA). As sequências obtidas foram depositadas no *GenBank*.

#### **4.11 Análise estatística**

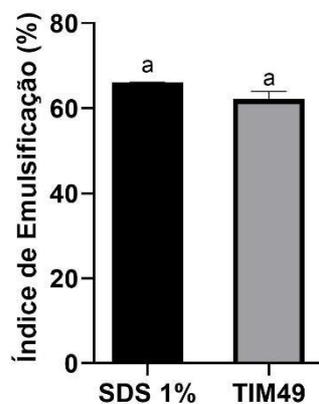
Para verificação de diferenças estatísticas entre grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 6.0. Para todas as análises, o resultado foi considerado significativo quando  $p > 0,95$ .

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação da capacidade emulsificante dos biossurfactante**

O sobrenadante da cultura de TIM49 promoveu a emulsão de uma mistura água-querosene, com resultado estatisticamente semelhante ao surfactante sintético SDS (Figura 1).

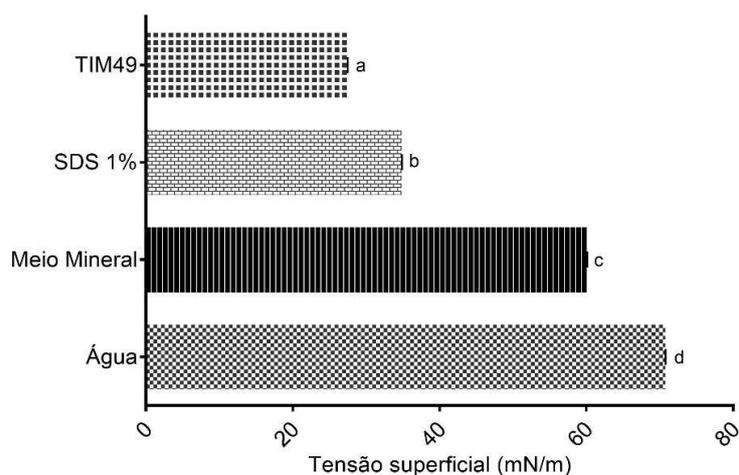
Figura 1 - Índice de emulsificação de uma mistura água-querosene produzido pelo sobrenadante da cultura de *Bacillus* sp. TIM49 e por uma solução de SDS 1%. Letras iguais indicam semelhança estatística das médias ( $p>0,95$ ).



## 5.2 Determinação da tensão superficial

Os valores de redução da tensão superficial obtidos para o biossurfactante de TIM49 foi 27,4 mN/m e para SDS 1% foi 34,8 mN/m, sendo esses valores estatisticamente diferentes ( $p>0,95$ ) (Figura 2).

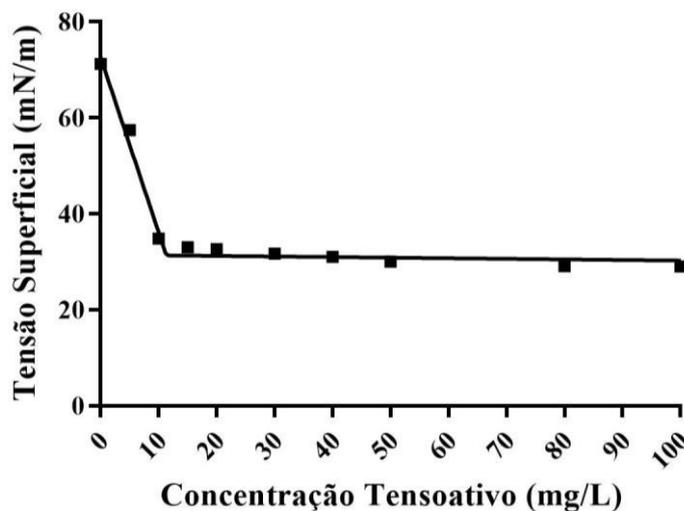
Figura 2 – Valores de redução de tensão superficial mensurados para o sobrenadante da cultura de TIM49, solução de SDS 1 %, meio mineral e água. Letras diferentes indicam diferenças das médias ( $p>0,95$ ).



## 5.3 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A correlação entre concentração do biossurfactante e a redução da tensão superficial foi determinada para alcançar o CMC do biossurfactante de TIM49. Como mostrado na Figura 3 observa-se uma diminuição gradual da tensão superficial à medida que a concentração do biossurfactante aumenta, e a partir de 11,35 mg/L o aumento da concentração não demonstra significativa alteração na tensão superficial, sendo esta a CMC.

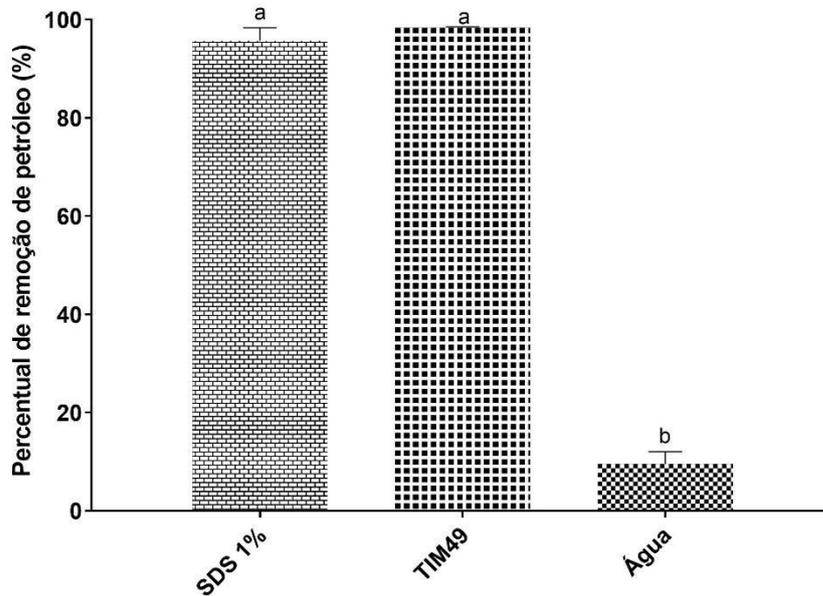
Figura 3. Tensão superficial (mN/m) do biossurfactante produzido por *Bacillus* TIM49 em água ultrapura em diferentes concentrações à temperatura ambiente (25 °C).



#### 5.4 Limpeza de areia impregnada com petróleo

O sobrenadante da cultura TIM49 apresentou excelente percentual de remoção do petróleo da areia, chegando a quase 100 %, sendo essa atividade estatisticamente semelhante àquela produzida pela solução de SDS 1%, enquanto que a água removeu apenas 9,5 % (Figura 4). A Figura 5 é possível observar visualmente a clara remoção do petróleo da areia, enquanto apenas a água foi ineficiente nesse processo.

Figura 4 - Percentual de remoção de petróleo da areia de praia promovido pelo biossurfactante produzido por TIM49 comparado ao surfactante sintético SDS. Letras diferentes indicam diferenças das médias ( $p < 0,05$ ), de acordo com ANOVA.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 5 - Aspecto visual das areias após os tratamentos com SDS 1%, TIM49 e água.



Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.5 Ensaio de dispersão de óleo

O sobrenadante produzido por TIM49 mostrou-se eficiente na dispersão do petróleo bruto, formando halo claro instantaneamente equivalente ao diâmetro da placa de petri (100 mm) e manteve tal atividade estável após 24 h. Por outro lado, o surfactante sintético SDS 1% também demonstrou halo completo equivalente ao diâmetro da placa de petri, porém essa dispersão foi altamente instável e regrediu dentro de 60 min (Figura 6).

Figura 6. Atividade de dispersão de petróleo em 1, 5, 30, 60 min e 24 h depois de aplicar 1% de SDS (A) e sobrenadante da estirpe TIM49 (B) em uma fina camada de petróleo bruto na superfície da água do mar.



Fonte: elaborado pelo autor.

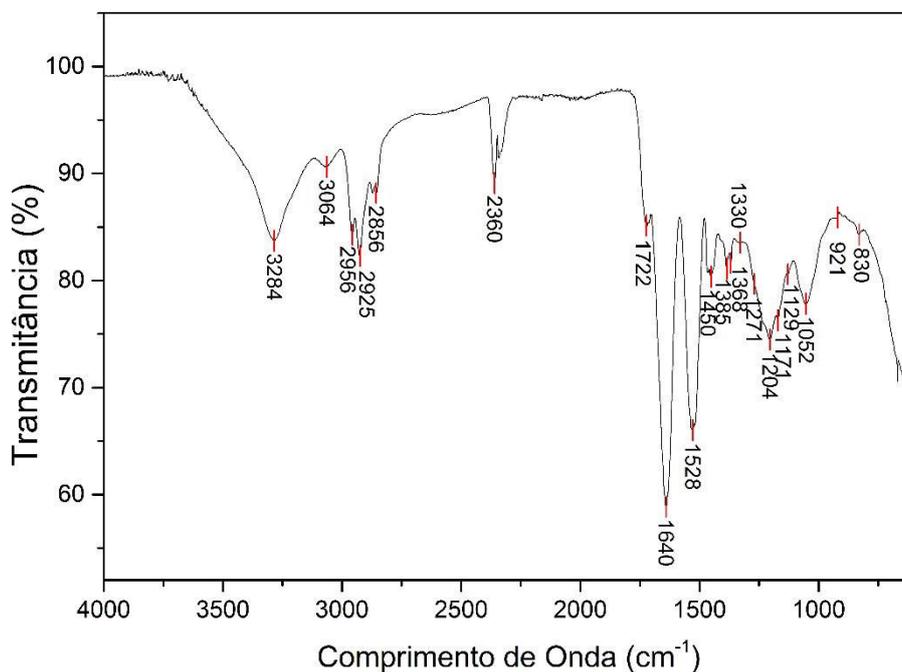
### 5.6 Avaliação da ecotoxicidade do biossurfactante

A avaliação da ecotoxicidade do biossurfactante bruto produzido por TIM49 revelou que este não foi tóxico aos náuplios de *Artemia* sp. nas concentrações de 50 ppm e 100 ppm. Ao contrário, o SDS foi extremamente tóxico, promovendo 82% e 100% de letalidade nas concentrações de 50 e 100 ppm, respectivamente.

### 5.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro do isolado TIM49 foi comparado com os descritos na literatura e apresentou picos de absorção características de ligações peptídicas CO–N na banda  $1640\text{ cm}^{-1}$  e na banda  $3284\text{ cm}^{-1}$  (estiramento NH), e do padrão de estiramento da ligação C–N no pico de  $1528\text{ cm}^{-1}$ . A cadeia alifática ( $-\text{CH}_3$ ;  $-\text{CH}_2-$ ) pode ser observada nas bandas entre  $2840$ - $2980\text{ cm}^{-1}$ , e  $1455$ - $1400\text{ cm}^{-1}$ . A banda observada em  $1722\text{ cm}^{-1}$  é característica do grupo funcional carbonila (Figura 7).

Figura 7 - Espectro FTIR-ATR do biossurfactante produzido pelo isolado TIM49.



Fonte: elaborado pelo autor.

## 5.8 Identificação molecular

Quanto a identificação molecular a estirpe TIM49 foi identificada pela homologia da sequência dos genes codificadores do RNAr 16S e da subunidade beta da DNA girase (*gyrB*) e da RNA polimerase (*rpoB*) com a sequência depositada no *GenBank*. A identificação consenso entre os três genes, os tamanhos das sequências, assim como seus números de acesso estão listados na Tabela 2. Após a análise da sequência a estirpe TIM49 foi identificada como *Bacillus subtilis*, que é uma espécie de biossegurança classe I, isto é, que não apresenta risco individual e coletivo.

Tabela 2. Identificação molecular da cepa TIM49 com base em sequências genéticas de 16S rRNA, *gyrB* e *rpoB* usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento local (BLAST).

Estirpe	Espécie mais relacionada (Consense ID)	16S rRNA		<i>gyrB</i>		<i>rpoB</i>		Número de acesso no GenBank		
		ID (%)	Tamanho (pb)	ID (%)	Tamanho (pb)	ID (%)	Tamanho (pb)	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>
TIM 49	<i>B. subtilis</i>	100	1505	100	904	99	551	KU556322	KY621337	KY621336

## 6 DISCUSSÃO

O potencial uso de biossurfactantes como solução alternativa aos surfactantes sintéticos em algumas aplicações industriais tem sido amplamente estudado entre pesquisadores e indústrias (NOGUEIRA FELIX et al., 2019; GIRO et al., 2009; MUNESWARI et al., 2021), e tem havido uma crescente demanda mundial por biossurfactantes que permitam menor toxicidade e maior biodegradabilidade dos efluentes gerados, e sustentabilidade ambiental das operações.

Este estudo caracterizou e avaliou o potencial do biossurfactante produzido pela estirpe TIM49, identificada como *Bacillus subtilis*, uma bactéria de nível de biossegurança NB-1, ou seja, que não apresenta risco individual e coletivo. Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (filo Firmicutes) são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, em forma de bastonetes, Gram-positivas, formadoras de endósporos e produtoras de inúmeros metabólitos secundários. Endósporos são estruturas que exibem resistência a estresses ambientais, como altas temperaturas e pressão, tolerância a sal e ácidos. Muitas das espécies de *Bacillus* são amplamente utilizadas na produção de antibióticos, enzimas e biossurfactantes, ou como probióticos e inseticidas (CASULA; CUTTING, 2002; DOS SANTOS et al., 2009; FEKETE, 2009; MEENA et al., 2021; NÚÑEZ-RAMÍREZ et al., 2020; YUE et al., 2021).

O sobrenadante da cultura de TIM49 foi avaliado quanto a sua capacidade de redução de tensão superficial atingindo uma redução de 27,4 mN/m. Esse resultado foi significativamente diferente ( $p < 0,5$ ) daquele obtido com uma solução do surfactante sintético SDS 1%, cuja redução chegou a 34,8 mN/m. De acordo com Mulligan (2005), bons surfactantes são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m. Portanto, o biossurfactante produzido por TIM49 é um excelente redutor da tensão superficial. Ressalta-se que a redução da tensão foi conseguida com o sobrenadante bruto da cultura de TMI49. Mesmo assim o desempenho se assemelha ao da Surfactina purificada, um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos, que reduz a tensão superficial da água de 75 mN/m para 27 mN/m (Peypoux, Bonmatin e Wallach 1999).

O sobrenadante de TIM49 foi avaliado quanto a sua capacidade de emulsionar uma mistura de água e querosene, e mostrou excelente resultado, com percentual de emulsificação de 62%. Esse resultado foi estatisticamente semelhante ao obtido com o SDS 1%. De acordo com Willumsen e Karlson (1997), um bom agente emulsificante deve apresentar um índice de emulsificação superior a 50%. Portanto, o biossurfactante produzido por TIM49 é um excelente emulsificante. Um biossurfactante que tem propriedade emulsificante apresenta a

capacidade de aumentar a interação interfacial entre água e óleo, então pode-se afirmar que o biossurfactante produzido por TIM49 tem potencial para favorecer a biodegradação de hidrocarbonetos em amostras ambientais, porque as emulsões aumentam a disponibilidade desses compostos para os micro-organismos hidrocarbonoclásticos, ou seja, que degradam hidrocarbonetos (THAPA *et al.*, 2012; DZIOONEK *et al.*, 2016).

O biossurfactante de TIM49 foi testado quanto a sua capacidade de remover óleo impregnado em areia de praia, resultando em 98% de remoção, desempenho semelhante ao surfactante sintético SDS. A remoção do óleo envolve a atividade do biossurfactante emulsionar o óleo favorecendo sua solubilidade em água, assim como reduzir a tensão e alterar a molhabilidade do óleo, permitindo que este se desprenda das partículas da areia (SOBRINHO *et al.*, 2008). O desempenho do biossurfactante de TIM49 para limpeza de areia contaminada com óleo foi superior ao do biossurfactante glicolípido produzido pelas leveduras *Candida sphaerica* UCP0995, que removeu 65% de óleo de areia de praia (SOBRINHO *et al.*, 2008) e *C. glabrata* UCP1002, que removeu 84% (LUNA *et al.*, 2009). Bezza e Chirwa (2015) trabalharam com biossurfactantes produzidos por estirpes de *B. subtilis* e reportaram remoção de 90% de óleo de areia. Quintela (2018) trabalhou com um estirpe de *B. Amyloliuefaciens* TIM96 produtora de biossurfactante lipopeptídico e obteve 91% de remoção de óleo de areia de praia. As diferenças nos percentuais de remoção de petróleo de areia podem estar relacionadas as propriedades do biossurfactante, ao protocolo de remoção utilizado e até mesmo ao grau API (*American Petroleum Institute*) do petróleo. Apesar dessas variáveis, os biossurfactantes se mostram promissores agentes de limpeza de areia, com a vantagem de serem mais facilmente biodegradáveis do que os sintéticos, portanto não agridem o meio ambiente e não deixam resíduos tóxicos.

A capacidade do biossurfactante de TIM49 de atuar como dispersante de óleo foi demonstrada pelo ensaio de deslocamento de óleo derramado na superfície da água do mar. A ação dispersante foi imediata e estável, sendo melhor do que a atividade do SDS. Os resultados de dispersão do biossurfacante de TIM49 foram melhores até do que o da surfactina de *B. amiloliuefaciens* TSBOS (ALVAREZ *et al.* 2015) e de outra estirpes de *Bacillus* (Chakraborty *et al.* 2014).

É sabido que além das muitas vantagens dos surfactantes naturais sobre os surfactantes sintéticos é importante salientar a baixa toxicidade e melhor compatibilidade ambiental (EDWARDS, LEPO E LEWIS, 2003). A prospecção de compostos ecologicamente compatíveis é essencial para um mundo sustentável. Neste sentido o biossurfactante de TIM49 e o SDS foram avaliados quanto a ecotoxicidade. Nesse estudo foi utilizado como

organismo vivo náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp. Os resultados mostraram que o biossurfactante não foi capaz de matar os náuplios e confirmaram a toxicidade do SDS. Oliveira *et al.* (2017) avaliaram a ecotoxicidade do biossurfactante produzidos por *B. subtilis* ICA56 para três organismos modelo: *Daphnia magna*, *Selenastrum capricornutum* e *Vibrio fischeri*, concluindo que o biossurfactante testado não era tóxico nas condições testadas.

A análise do biossurfactante de TIM49 por FTIR indicou a presença de hidrocarbonetos alifáticos com uma porção peptídica que é característica dos biossurfactantes lipopeptídeos (BEZZA AND CHIRWA, 2015; CHAKRABORTY *et al.*, 2014; SHARAFI *et al.*, 2014 e PEREIRA *et al.*, 2013). Os lipopeptídeos são constituídos por uma cadeia de ácido graxo em combinação com uma porção peptídica e as isoformas dos lipopeptídeos diferem pela composição dos aminoácidos no anel peptídico, ciclização do peptídeo, pelo comprimento e ramificação da cadeia de ácido graxo e pela ligação entre as duas partes. Lipopeptídeos são classificados em três famílias dependendo de sua sequência de aminoácidos: iturinas, fengicinas e surfactinas (INÈS; DHOUHA, 2015; MNIF; GHRIBI, 2015).

Na comunidade microbiana, existe uma grande diversidade de estruturas de lipopeptídeos. As diferenças na estrutura química sugerem que os compostos lipopeptídicos podem servir de diferentes, e possivelmente múltiplos propósitos. Para alguns lipopeptídeos, as funções relatadas incluem a promoção da comunidade bacteriana e propriedades tensoativas. Em muitos casos, os compostos lipopeptídicos são também conhecidos por exercerem um papel nas interações antagonísticas com outros organismos, atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral ou citotóxica (MNIF; GHRIBI, 2015). Portanto o biossurfactantes produzidos por TIM49 tem potencial para outras aplicações industriais além das estudadas no presente trabalho.

A concentração micelar crítica (CMC) é a menor concentração de um surfactante onde ocorre a formação de micelas. O aumento da concentração do surfactante acima de sua CMC, tem pouca influência na tensão superficial da solução (AKBARI *et al.*, 2018). Quanto menor a CMC de um surfactante, menor será a quantidade necessária do surfactante. A CMC do SDS, por exemplo, é de 2900 mg/L, enquanto a CMC do biossurfactante de TIM49 é 11,35 mg/L. Este resultado é muito promissor quando comparado com lipopeptídeos disponíveis comercialmente. Por exemplo, a surfactina é um dos biossurfactantes mais potentes e, em sua forma purificada, com uma concentração de 21,3 mg/L atinge o valor máximo da redução da tensão superficial da água de 27 mN/m (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). Quando comparado a alguns surfactantes sintéticos, o TIM49 se mostra ainda mais eficiente,

Enordet e Petrostep apresentam valores de CMC de aproximadamente 1000 mg/L (RODRIGUES *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2013). Em geral os biossurfactantes são conhecidos por apresentarem baixas CMCs, o que é uma vantagem em relação aos surfactantes sintéticos (INÈS; DHOUHA, 2015).

Durante o vazamento do *Deepwater Horizon* no Golfo do México, em abril de 2010, cerca de 7 milhões de litros do dispersante Corexit foram utilizados para limpeza da área contaminada. Desde então tem sido mostrado os efeitos adversos deste dispersante químico ao meio ambiente, uma vez que o principais compostos do Corexit, como o surfactante Dioctil Sulfosuccinato de Sódio e os solventes presentes na preparação são tóxicos a componentes da biota (KLEINDIENST; PAUL; JOYE, 2015; MAPELLI *et al.*, 2017), o que ressalta a importância dos biossurfactantes.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o biossurfactante lipopeptídeo produzido pela estirpe de *Bacillus subtilis* TIM49 apresenta excelente atividade de redução da tensão superficial, emulsificante e dispersante, agindo em baixa concentração (CMC). O biossurfactante bruto se mostrou um eficiente agente de limpeza de óleo impregnado em areia de praia, com a vantagem de ser seguro para o meio ambiente. Portanto pode ser uma alternativa *eco-friendly* aos surfactantes sintéticos, comumente usados em acidentes de derramamentos de óleo.

## 8 REFERÊNCIAS

- AGUILERA, F. et al. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. **Journal of Applied Toxicology**, p. n/a-n/a, 2010.
- AHAOTU, I. et al. Molecular identification and safety of *Bacillus* species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla* Benth) for production of Ugba. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 95–104, mar. 2013.
- AKBARI, S. et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81–90, jan. 2018.
- ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and Natural Attenuation**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- ALVAREZ, V. M. et al. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing

strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 136, p. 14–21, dez. 2015.

ANGELIM, A. L. et al. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 10–17, set. 2013.

AOAC. AOAC Official Methods of Analysis. **Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C.**, v. 15th, n. Volume 1, p. 136–138, 1990.

BAAN, R. et al. A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 12, p. 1143–1144, dez. 2009.

BANAT, I. M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 28 jun. 2010.

BARRETO, R. V. G. et al. New approach for petroleum hydrocarbon degradation using bacterial spores entrapped in chitosan beads. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2121–2125, abr. 2010.

BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, abr. 2007.

BBC. **Brazil environment: Clean-up on beaches affected by oil spill**. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/world-latin-america-50113383>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049–1055, jun. 2005.

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 168–178, set. 2015.

BORAH, D.; YADAV, R. N. S. Bioremediation of petroleum based contaminants with biosurfactant produced by a newly isolated petroleum oil degrading bacterial strain. **Egyptian Journal of Petroleum**, mar. 2016.

BRITO, E. M. S. et al. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 418–423, ago. 2009.

BURNS, K. A.; CODI, S. Contrasting impacts of localised versus catastrophic oil spills in mangrove sediments. **Mangroves and Salt Marshes**, v. 2, n. 2, p. 63–74, 1998.

Carvalho, A.F.F.U., Melo, V.M.M., Aguiar, L.M.B.A., Matos, F.J.A., 1988. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. *Cienc Cult* 40: 1109-1111.

CASULA, G.; CUTTING, S. M. *Bacillus* Probiotics: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2344–2352, maio 2002.

CHAKRABORTY, J.; CHAKRABARTI, S.; DAS, S. Characterization and antimicrobial properties of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* SJ301 and *Bacillus vallismortis* JB201. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 609–618, 24 nov. 2014.

CHANG, T.-Y. et al. Exposure to volatile organic compounds and kidney dysfunction in thin film transistor liquid crystal display (TFT-LCD) workers. **Journal of hazardous materials**, v. 178, n. 1–3, p. 934–40, 15 jun. 2010.

DE OLIVEIRA, D. W. F. et al. Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 52, n. 2, p. 174–181, 28 jan. 2017.

DOS SANTOS, K. B. et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 157–163, ago. 2009.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 28–36, set. 2016.

EDWARDS, K. R.; LEPO, J. E.; LEWIS, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1309–1316, out. 2003.

FEKETE, T. *Bacillus* species (not anthracis). **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 31, n. 12, p. 87–92, jun. 2009.

FELLET, J. **Vazamento de óleo no Nordeste: quais órgãos são responsáveis por limpar, investigar e punir**. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-50191420>>. Acesso em: 8 dez. 2020.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006.

GENTILI, A. R. et al. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 57, n. 4, p. 222–228, jun. 2006.

GILLIS, B. et al. Identification of human cell responses to benzene and benzene metabolites. **Genomics**, v. 90, n. 3, p. 324–333, set. 2007.

GIRO, M. E. A. et al. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. 738–747, 18 maio 2009.

GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 298–304, mar. 2010.

HA, M. et al. Children's Mental Health in the Area Affected by the Hebei Spirit Oil Spill Accident. **Environmental Health and Toxicology**, v. 28, p. e2013010, 30 ago. 2013.

INÈS, M.; DHOUBA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, set. 2015.

IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in applied microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–9, set. 1995.

ISLAS, D. J. et al. Revisión / Review INTRODUCCIÓN Los tensoactivos son moléculas anfifílicas que reducen la tensión en la interfase ( Gautam y Tyagi 2006 ). Debido a esta propiedad , las moléculas de los tensoactivos se ubican en la interfase de fluidos como son los sistema. v. 26, n. 1, p. 65–84, 2010.

JACQUES, R. J. S. et al. Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon–Degrading Microbial Consortium from a Petrochemical Sludge Landfarming Site. **Bioremediation Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–11, fev. 2007.

KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–11, 2011.

KHAN, R. A.; PAYNE, J. F. Influence of a Crude Oil Dispersant, Corexit 9527, and Dispersed Oil on Capelin (*Mallotus villosus*), Atlantic Cod (*Gadus morhua*), Longhorn Sculpin (*Myoxocephalus octodecemspinosus*), and Cunner (*Tautoglabrus adspersus*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 50–56, jul. 2005.

KLEINDIENST, S.; PAUL, J. H.; JOYE, S. B. Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 388–396, 6 jun. 2015.

MAPELLI, F. et al. Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 860–870, set. 2017.

MARCHESI, J. R. et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 2, p. 795–9, fev. 1998.

MASCARELLI, A. Deepwater Horizon: After the oil. **Nature**, v. 467, n. 7311, p. 22–24, 2 set. 2010.

MEENA, K. R. et al. Purification and identification of a surfactin biosurfactant and engine oil degradation by *Bacillus velezensis* KLP2016. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 26, 28 dez. 2021.

MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 29 maio 1982.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Biopolymers**, v. 104, n. 3, p. 129–147, maio 2015.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y. A study on the structure ^ function relationship of lipopeptide biosurfactants. v. 1488, p. 211–218, 2000.

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

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, jan. 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soils. **Environment International**, v. 30, n. 4, p. 587–601, jun. 2004.

MUNESWARI, R. et al. Microbial-induced biosurfactant-mediated biocatalytic approach for the bioremediation of simulated marine oil spill. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 4 jan. 2021.

NITSCHKE, M. et al. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 5, p. 1562–1566, 7 out. 2005.

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

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

NOGUEIRA FELIX, A. K. et al. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256–263, mar. 2019.

NÚÑEZ-RAMÍREZ, R. et al. Molecular architecture and activation of the insecticidal protein Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3974, 7 dez. 2020.

PALINKAS LA, PETERSON JS, RUSSELL J, D. M. Community patterns of psychiatric disorders after the Exxon Valdez oil spill. **American Journal of Psychiatry**, v. 150, n. 10, p. 1517–1523, out. 1993.

PANDEY, J.; CHAUHAN, A.; JAIN, R. K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 324–375, mar. 2009.

PENA, P. G. L. et al. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, 2020.

PEREIRA, J. F. B. et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, set. 2013.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553–563, 1999.

PILON-SMITS, E. PHYTOREMEDIATION. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 15–39, jun. 2005.

QUINTELA, Bárbara Cibelle Soares Farias. Biotecnologia aplicada à recuperação avançada de petróleo: injeção de biossurfactante. 2018. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ROBLES-GONZÁLEZ, I. V.; FAVA, F.; POGGI-VARALDO, H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 5, 2008.

RODRIGUES, L. R. et al. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 49, n. 1, p. 79–86, abr. 2006.

SANTOS, H. F. et al. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 216, n. 1–4, p. 329–350, 13 mar. 2011.

SAVITZ, D. A.; ANDREWS, K. W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 31, n. 3, p. 287–295, mar. 1997.

SHARAFI, H. et al. First Report of a Lipopeptide Biosurfactant from Thermophilic Bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 Newly Isolated from Municipal Landfill Site. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 5, p. 1236–1249, 1 jul. 2014.

SILVA, R. 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, 15 jul. 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99–121, jan. 2007.

SOBRINHO, H. B. S. et al. Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 912–917, set. 2008.

THAPA, B.; KC, A. K.; GHIMIRE, A. A Review On Bioremediation Of Petroleum Hydrocarbon Contaminants In Soil. **Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, 16 mar. 2012.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS: REVISÃO. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 04, p. 1010–1020, dez. 2010.

TRANNUM, H. C.; BAKKE, T. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill - focus on effects on fish and effects of dispersants. 2012.

TYAGI, M.; DA FONSECA, M. M. R.; DE CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231–241, abr. 2011.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Toxicological Profile for Vanadium**. [s.l: s.n.].

WARNER, S. A. J. Genomic DNA Isolation and lambda Library Construction in Plant Gene Isolation: Principles and Practice. In: FOSTER, G. D.; TWELL, D. (Eds.). . **John Wiley & Sons Ltd**. [s.l: s.n.]. p. 51–73.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415–423, 1997.

WWF. **O que se sabe até agora sobre o derramamento de óleo no Nordeste**. Disponível em: <<https://www.wwf.org.br/?73944/O-que-se-sabe-ate-agora-sobre-o-derramamento-de-oleo-no-Nordeste>>. Acesso em: 6 dez. 2020.

XUE, J. et al. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. **Current Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 220–228, 28 ago. 2015.

YUE, H. et al. Optimization of iturin A production from *Bacillus subtilis* ZK-H2 in submerge fermentation by response surface methodology. **3 Biotech**, v. 11, n. 2, p. 36, 7 fev. 2021.