



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

GABRIELLY OLIVEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE DA ESTABILIDADE E VALORAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES MICROBIANOS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

**Fortaleza
2018**

GABRIELLY OLIVEIRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE DA ESTABILIDADE E VALORAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES MICROBIANOS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Monografia apresentada ao curso de
Biotecnologia do Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular da Universidade Federal
do Ceará, como requisito para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel
Melo

Coorientadora: Dra. Bárbara Cibelle Soares
Farias Quintela

Fortaleza

2018

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)

- S58c Silva, Gabrielly Oliveira da.
Caracterização, análise da estabilidade e valoração de biossurfactantes microbianos para aplicação industrial / Gabrielly Oliveira da Silva. – 2018.
70 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.
Coorientação: Profa. Dra. Bárbara Cibelle Soares Farias Quintela.
1. Biossurfactantes. 2. Lipopeptídeos. 3. Bacillus. 4. CMC. 5. custo de produção. I. Título.

CDD 661

GABRIELLY OLIVEIRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISE DA ESTABILIDADE E VALORAÇÃO DE
BIOSURFACTANTES MICROBIANOS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Monografia apresentada ao curso de
Biotecnologia do Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular da Universidade Federal
do Ceará, como requisito para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 20 / 11 / 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus,

A minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

O caminho que eu trilhei não é apenas meu. Tantas pessoas passaram pela minha trajetória, e contribuíram de alguma forma para que eu pudesse chegar até aqui. A todas elas eu dedico esse trabalho, principalmente a **Deus**, ao qual agradeço pela minha vida, e pela oportunidade de estar viva para celebrar esse momento tão especial.

Aos meus pais, **Lena** e **Amarildo**, que me ensinaram a ser determinada, ambiciosa e sempre ter fome pela sabedoria. Tudo isso é para eles, e também para meus irmãos, **Thiago** e **Sabrina**, que de forma indireta já demonstram interesse pela ciência.

À minha orientadora, profa. Dra. **Vânia Maria Maciel Melo**, que me ajudou a entender que a ciência, quando feita com amor e dedicação, se torna a base de tudo. Obrigada por todo o ensinamento, carinho, paciência e dedicação.

À minha co-orientadora, Dra. **Bárbara Cibelle**, que caminhou comigo durante esses 5 anos. Obrigada por acreditar em mim, de verdade. Uma mulher forte, inteligente e determinada como você me inspira muito.

Ao Laboratório ThoMSom na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela disponibilidade e ajuda na obtenção dos dados de espectrometria. Ao prof. Dr. **Erivan Melo**, pela obtenção dos dados físicos e pelo seu apoio e carinho.

Aos meus mais que parceiros de laboratório **Claudiane**, **Malu**, **Saulo**, **Brenda**, **João Alberto**, **Samuel** e **Bella**. Vocês me ajudaram muito, me consolaram e me encorajaram. Muito obrigada, vocês estão para sempre no meu coração, e na minha vida. Profa. Dra. **Denise Hissa**, Dras. **Mirella**, **Cristiane** e **Walderly**, muito obrigada pelo carinho e preocupação. Tantas vezes eu estava triste ou desmotivada, e vocês estavam lá para e por mim.

Ao meu amado amigo **Jonathan**, que trilhou comigo esse caminho desde o colégio, e foi meu parceiro em tantos momentos. Mais uma etapa concluída, de tantas outras que iremos enfrentar.

Ao meu amor **Adriano**, que a tanto tempo caminha e amadurece junto comigo. Agradeço aos seus conselhos, ao seu amor, amizade, carinho e parceria. Hoje percebo que estamos indo no caminho certo. Muito ainda está por vir!

Aos meus amigos do curso, vizinhos e do ensino médio, que deixaram a minha vida muito mais leve e divertida, e à minha família, pelo apoio e carinho ao longo da minha vida.

A todos os professores que passaram pela minha vida. Muito obrigada pela dedicação e ensinamentos. Ao seu **Valdenor** e ao **Gilmar**, agradeço a dedicação e as palavras de força que, por mais simples que sejam, fazem toda a diferença. E, por fim, a Universidade Federal do Ceará, PETROBRÁS e CNPq, pelo apoio financeiro e técnico.

“There been times that I thought
I couldn't last for long...
But now I think,
I'm able to carry on...”

- Sam Cooke.

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas que apresentam propriedades tensoativas e são produzidas majoritariamente por microrganismos. Essas moléculas são utilizadas em diversos setores industriais, principalmente na indústria do petróleo. As propriedades tensoativas, resistência às condições ambientais extremas, baixa toxicidade e custo são características essenciais para a escolha de biossurfactantes para fins industriais. Esse estudo teve como objetivo caracterizar, avaliar a estabilidade frente a elevada temperatura, pressão e concentração de NaCl e o custo de produção de biossurfactantes produzidos por 15 estirpes de *Bacillus* sp. visando aplicação industrial. As amostras foram caracterizadas como lipopeptídeos através da espectroscopia do infravermelho (FTIR) e identificadas por espectrometria de massas como pertencentes às famílias surfactina, iturina e fengicina. As moléculas suportam altas temperaturas, começando a se decompor em 260 °C, como revelado por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os biossurfactantes reduzem a tensão superficial da água para 30 mN/m ou menos, produzem emulsão água-óleo estáveis, e são capazes de dispersar óleo derramado em água do mar. As propriedades tensoativas mantiveram-se inalteradas após as moléculas terem sido submetidas a pressão de 600 bar seguida de autoclavação a 121 °C por 15 min, assim como em meio contendo altas concentrações de NaCl (100 g/L; 150 g/L). Os biossurfactantes analisados atuam em baixas concentrações, apresentando concentrações micelares críticas (CMC) menores do que 30 mg/L. Considerando-se a quantidade de biossurfactantes recuperada por litro de cultura e contabilizando-se os gastos com matéria-prima, tem-se que o grama produzido custa em média R\$ 11.69. Apesar do elevado custo, os biossurfactantes analisados são vantajosos, principalmente o produzido pela estirpe JAG255, já que são estáveis sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade, e suas CMCs são da ordem de 100 x mais baixas do que muitos surfactantes sintéticos, sendo assim mais rentáveis para a indústria, compensando a baixa competitividade comercial.

Palavras-chave: biossurfactantes, lipopeptídeos, *Bacillus*, CMC, custo de produção.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules, produced mainly by microorganisms. Due to their tensoactive properties, these molecules are used in several industrial sectors such as in oil industry. Its surface-active properties, resistance to extreme environmental conditions, low toxicity and cost are essential factors for biosurfactants introduction in the industrial market. Hence, this study aimed to characterize biosurfactants produced by 15 strains of *Bacillus* sp. for industrial purposes and evaluate their stability at high temperature, pressure and NaCl concentrations and production cost. The samples were characterized as lipopeptides by Infrared Spectroscopy (FTIR) and identified by mass spectrometry as belonging to the families of surfactin, iturin and fengycin. The molecules activities resisted high temperatures, starting to decompose at 260 °C, as revealed by Differential Scanning Calorimeter (DSC). The biosurfactants reduced the water surface tension to at least 30 mN/m, produced stable water-oil emulsion, and also dispersed oil. After the molecules had been subjected to a 600 bar pressure followed by 121 °C / 15 min, as well as in high concentrations of NaCl (100 g/L, 150 g/L), the tensoactives properties were maintained unchanged. The analyzed biosurfactants acted at low concentrations, showing critical micelle concentrations (CMC) below than 30 mg/L. The yield of biosurfactants was used to calculate the biosurfactants price by accounting the raw materials expenses. The cost per gram was on average R\$ 11,69. Despite the high cost, the biosurfactants of this study are advantageous, especially the one produced by strain JAG255, since it was stable under extreme conditions of temperature, pH and salinity, and its CMCs was in the order of 100 x lower than many synthetic surfactants, becoming profitable for the industry counterweighing the low commercial competitiveness.

Keywords: biosurfactants, lipopeptides, *Bacillus*, CMC, production cost.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CMC e formação de micelas a partir de monômeros de biossurfactantes	20
FIGURA 2. Aplicações dos biossurfactantes nos principais setores industriais	21
FIGURA 3. Processo de MEOR realizado por biossurfactantes	22
FIGURA 4. Principais massas características e isoformas das famílias surfactina (a), iturina (b) e fengicina (c)	33
FIGURA 5. Mapa do perfil lipopeptídico das 15 estirpes de <i>Bacillus</i> sp.	35
FIGURA 6. Termogramas de DSC dos lipopeptídeos estudados.....	36
FIGURA 7. Percentuais de emulsificações do querosene promovido pelos biossurfactantes a 400 mg/L.	37
FIGURA 8. Dispersão de petróleo promovida pelos biossurfactantes na concentração de 400 mg/L e pelo SDS a 1 % (p/v) após 24 horas.	38
FIGURA 9. Emulsão água-querosene promovida pelos biossurfactantes e pelo SDS a 400 mg/L após passarem por pressão de 600 bar e autoclavação	38
FIGURA 10. Medidas de Redução da Tensão Superficial antes e depois do tratamento com pressão de 600 bar seguido por autoclavação	39
FIGURA 11. Redução da tensão superficial promovida pelos biossurfactantes deste estudo na concentração de 50 mg/L, em diferentes concentrações de NaCl.....	40
FIGURA 12. Tensão superficial (mN/m) em função da concentração dos biossurfactantes em (a); Valores de CMC dos biossurfactantes estudados (b)	41
FIGURA 13. Espectros dos biossurfactantes produzidos por estirpes dos manguezais Icapuí e Jaguaribe obtidos pelo FTIR.	61
FIGURA 14. Espectros dos biossurfactantes produzidos por estirpes isoladas do manguezal Timonha.	62
FIGURA 15. Espectros de massas (modo positivo), evidenciando os picos característicos dos lipopeptídeos comerciais (Sigma-Aldrich). Em (a) surfactina; (b) iturina; e (c) fengicina.	64
FIGURA 16. Espectros de Massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Icapuí.....	64
FIGURA 17. Espectros de Massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Jaguaribe	64
FIGURA 18. Espectros de Massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Timonha.	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.....	17
TABELA 2. Fórmulas e massas moleculares para Lipopeptídeos de espécies de <i>Bacillus</i> sp.	18
TABELA 3. Distribuição dos custos para produção de biossurfactantes.....	23
TABELA 4. Principais picos identificados nos espectros de FTIR dos biossurfactantes analisados	32
TABELA 5. Rendimento dos biossurfactantes após liofilização	42
TABELA 6. Custos da matéria-prima utilizada na produção dos biossurfactantes por litro ...	43
TABELA 7. Resumo dos custos operacionais para a produção de lipopeptídeos e do seu valor de mercado	44
TABELA 8. Atribuições dos principais íons detectados por ESI-Q-TOF MS dos metabólitos produzidos pelas 14 estirpes de <i>Bacillus</i> sp. após processamento dos dados no programa MetaboAnalyst.	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. SURFACTANTES	15
2.2. BIOSSURFACTANTES.....	15
2.2.1. <i>Classificação e métodos de caracterização</i>	<i>16</i>
2.2.2. <i>Propriedades e aplicações</i>	<i>19</i>
2.3. CUSTO E COMÉRCIO DE BIOSSURFACTANTES	22
3. OBJETIVOS	24
3.1. OBJETIVO GERAL.....	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES	25
4.2. PRODUÇÃO, PRECIPITAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	25
4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS BIOSSURFACTANTES.....	26
4.3.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR</i>	<i>26</i>
4.3.2. <i>Espectrometria de Massa com ionização por Eletrospray (ESI-Q-TOF MS)</i>	<i>26</i>
4.3.2.1. <i>Processamento dos dados e análise estatística.....</i>	<i>27</i>
4.3.3. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC</i>	<i>27</i>
4.4. ATIVIDADES TENSOATIVAS.....	28
4.4.1. <i>Redução de Tensão Superficial</i>	<i>28</i>
4.4.2. <i>Índice de Emulsão (IE24).....</i>	<i>28</i>
4.4.3. <i>Dispersão de óleo em água do mar.....</i>	<i>28</i>
4.5. EFEITO DA TEMPERATURA, PRESSÃO E SALINIDADE NAS ATIVIDADES TENSOATIVAS.....	29
4.6. CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA - CMC	29
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
4.8. ANÁLISE DO CUSTO DE PRODUÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES	30
5. RESULTADOS	31
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTES.....	31
5.1.1. <i>Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR.....</i>	<i>31</i>
5.1.2. <i>Espectrometria de Massas</i>	<i>33</i>

5.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC	36
5.2. ANÁLISES TENSOATIVAS	36
5.2.1. Efeito da Temperatura, Pressão e Salinidade nas atividades tensoativas.....	38
5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC).....	41
5.4. ANÁLISE DO RENDIMENTO E CUSTO DE PRODUÇÃO.....	42
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
9. ANEXO.....	61

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes ou compostos ativos de superfície permitem a interação com substâncias imiscíveis entre si (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Esses compostos são utilizados em diversos setores industriais, mas acarretam muitos problemas ambientais devido sua alta toxicidade e baixa biodegradabilidade. Assim, a busca por surfactantes de origem biológica, ambientalmente mais amigáveis tem aumentado (AL-SULAIMANI et al., 2011; FAKRUDDIN, 2012).

Derivados, em sua maioria, do metabolismo de fungos e bactérias, os biossurfactantes possuem características estruturais e propriedades tensoativas semelhantes aos surfactantes sintéticos. Classificados principalmente como glicolipídeos, soforolipídeos, lipopeptídeos e biossurfactantes poliméricos, podem apresentar diversas propriedades tensoativas tais como: redução de tensão superficial e interfacial, emulsificação e desemulsificação, dispersão de óleo, dentre outras atividades biológicas como inibição de biofilmes microbianos e atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral (MNIF; GHRIBI, 2015b; ROY, 2017). Devido a isso, essas moléculas podem ser aplicadas em vários setores industriais, como a indústria do petróleo, farmacêutica, agrícola, de limpeza e higiene pessoal.

A caracterização de sua estrutura quanto ao grupos que compõe suas porções polares e o tamanho da sua cadeia apolar é de extrema importância para definir o direcionamento de sua aplicação industrial, já que a composição tem influência nas atividades tensoativas (MNIF; GHRIBI, 2015a). Técnicas de espectroscopia, cromatografia, e de espectrometria de massas têm sido as mais utilizadas para caracterização dessas moléculas, sendo rápidas e precisas (SATPUTE et al., 2010). Além disso a estabilidade dessas moléculas em condições ambientais extremas de temperatura, pressão, pH e salinidade devem ser avaliados para garantir o sucesso da aplicação desses produtos em processos industriais que atuem nessas condições (BARROS et al., 2007; ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005).

Apesar de suas vantagens e larga aplicação na indústria, os biossurfactantes ainda não são competitivos com os surfactantes sintéticos, devido ao alto custo de produção. Para a substituição efetiva dos surfactantes convencionais pelos biológicos, é necessário um estudo dos custos de produção, para identificar os pontos do processo produtivo em que mudanças e otimizações acarretariam na diminuição no custo final do produto (CAMPOS-TAKAKI; SARUBBO; ALBUQUERQUE, 2010).

Em nosso grupo de estudo, tem-se como uma das principais linhas de pesquisa o estudo de biossurfactantes produzidos por microrganismos isolados de manguezais cearenses. Barreto (2011) e Lima (2013) isolaram microrganismos produtores de biossurfactantes de três manguezais cearenses: Icapuí, Jaguaribe e Timonha. Sabe-se que os manguezais são ecossistemas únicos, com alto teor de matéria orgânica, devido à alta densidade de microrganismos presentes. Expostos naturalmente a variações de pH, salinidade e temperatura devido às variações da maré, os manguezais tornam-se uma fonte de microrganismos e biomoléculas que resistam a essas condições, podendo ser de grande interesse industrial (THATOI et al., 2013). Desta maneira, o presente estudo visou responder as seguintes perguntas:

Seriam os surfactantes produzidos por bactérias isoladas de manguezais biomoléculas resistentes a variações ambientais como modificações na temperatura, pressão e salinidade? O custo-benefício dessas biomoléculas é melhor do que o de surfactantes sintéticos comumente utilizados na indústria?

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Surfactantes

Surfactantes (do inglês *Surface Active Agents*) são moléculas derivadas principalmente do petróleo, estruturalmente compostas por uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. Sua porção polar pode ser iônica (podendo ter carga negativa ou positiva), não-iônica ou anfotérica (com ambas as cargas), enquanto que sua porção apolar geralmente é uma cadeia carbonática (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). Essa característica estrutural possibilita sua distribuição em duas fases fluidas de polaridade diferente (NITSCHKE; PASTORE, 2002), além de poderem também formar agregados (chamados micelas), geralmente em baixas concentrações de água, conferindo-lhes várias propriedades tensoativas. Com isso, os surfactantes são aplicados em vários setores industriais incluindo: alimentos, detergentes e limpeza, recuperação de petróleo e remediação de ambientes contaminados (BARROS et al., 2007). Entretanto, devido a conscientização sobre os impactos negativos dos surfactantes sintéticos no ambiente, as atenções têm sido direcionadas para os surfactantes de origem biológica (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

2.2. Biosurfactantes

Os biosurfactantes são compostos químicos produzidos principalmente por bactérias e fungos, semelhantes aos surfactantes sintéticos tanto em estrutura quanto em suas propriedades tensoativas (BANAT, 1995; COOPER, 1986). Desde a descoberta da surfactina, biosurfactante lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis* nos anos 80, o estudo de novos microrganismos produtores de biosurfactantes ganhou força e significância.

Danos como a eutrofização e acidificação de lagos e rios, toxicidade ambiental, depleção da camada de ozônio e aquecimento global associadas ao uso e produção de surfactantes sintéticos podem ser evitados pelo uso de biosurfactantes (REBELLO et al., 2018). Dentre as inúmeras vantagens dos biosurfactantes podem ser citadas sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e maior seletividade e atividade (CAMEOTRA et al., 2010).

Como a estrutura do biosurfactante é composta por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, isso significa que sua síntese depende de duas rotas diferentes: uma levando à produção do componente hidrofóbico, que é realizada pelo metabolismo de lipídios; e outra ao

componente hidrofílico que, em particular, exibe uma maior complexidade estrutural, tendo uma variedade de vias envolvidas na sua síntese. Produzidas por vias independentes, as duas porções são posteriormente ligadas, podendo ser por ligação glicosídica, amina ou éster (SIÑERIZ et al., 2001).

Quatro princípios da biossíntese de biossurfactantes devem ser considerados: (1) tanto a porção hidrofílica como a hidrofóbica é sintetizada via *de novo*, ou seja, estruturas complexas são sintetizadas a partir de moléculas simples como aminoácidos, por caminhos independentes; (2) a porção hidrofílica é sintetizada *de novo* e o substrato utilizado no cultivo induz a porção hidrofóbica; (3) a síntese da porção hidrofílica é induzida pelo substrato enquanto que a porção hidrofóbica é sintetizada via *de novo*; e (4), onde a síntese das duas porções é dependente da fonte de carbono utilizada no processo (DESAI; BANAT, 1997; SYLDATK; WAGNER, 1987).

2.2.1. Classificação e métodos de caracterização

Os biossurfactantes podem ser classificados principalmente quanto ao microrganismo produtor e a composição da sua estrutura. Quanto à sua estrutura, a porção hidrofóbica é principalmente composta por cadeias hidrocarbonadas saturadas ou insaturadas, ou ácidos graxos de cadeia longa, enquanto a porção hidrofílica compreende principalmente carboidratos, aminoácidos, grupamentos fosfato ou peptídeos cíclicos (AL-SULAIMANI et al., 2011; SHARMA; SHARMA, 2018).

Em outras classificações, como sua carga total, podem ser considerados majoritariamente como aniônicos ou neutros. Já com base no seu peso molecular, são divididos em dois grupos: o de baixa massa molecular, como os glicolipídeos, lipopeptídeos e fosfolipídeos; e os de alta massa molecular, que compreende os agentes poliméricos e surfactantes particulados. Os biossurfactantes de baixo peso diminuem de forma eficaz a tensão superficial e interfacial de líquidos imiscíveis entre si, enquanto que os de alto peso molecular são considerados agentes emulsionantes e/ou estabilizantes (AL-SULAIMANI et al., 2011; SHARMA; SHARMA, 2018).

A **TABELA 1** apresenta as principais classes de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

TABELA 1. Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

Biossurfactante	Microrganismo produtor
Glicolipídeos	Ramnilipídeos <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolipídeos <i>Candida bombicola</i> ; <i>C. apícola</i> ; <i>Rhodotorula bogoriensis</i>
	Trehalolipídeos <i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Mycobacterium sp.</i> ; <i>Nocardia sp.</i> ; <i>Corynebacterium sp.</i>
	Peptídio-lipídio <i>Bacillus licheniformis</i>
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	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, Lipídeos neutros e Fosfolipídeos	Ácidos graxos <i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídeos neutros <i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídeos <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	Emulsan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan <i>Candida lipolytica</i>
	Carboidrato-lipídeo-proteína <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	manana-lipídio-proteína <i>Candida tropicalis</i>

Fonte: Adaptado (DESAI; BANAT, 1997; MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Os métodos para caracterização estrutural de biossurfactantes são utilizados de forma combinada. Técnicas como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE, Espectrometria de Massas – MS (FAB-MS, MALDI-TOF e ESI/MS-MS), Espectroscopia do Infravermelho (FTIR, RAMAN) ou de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) têm garantido a elucidação da composição estrutural dessas moléculas de forma rápida, fácil, utilizando baixas quantidades de amostra (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

Utilizando técnicas de espectroscopia, como a Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, é possível observar quais grupos funcionais compõe a estrutura do biossurfactante. Considerada uma espectroscopia de absorção, a técnica baseia-se no fato de que as ligações moleculares vibram de forma única, correspondendo a níveis de energia vibracionais. Quando submetida a diversos comprimentos de onda, guiados por um interferômetro, a luz é absorvida quando a energia da radiação é a mesma da energia vibracional, sendo capturados várias absorções de cada ligação, gerando um interferograma. A transformada de Fourier modifica esse interferograma, gerando um espectro de infravermelho comum. A partir desse espectro, são identificados os picos correspondentes as ligações

presentes na amostra, identificando a sua natureza química. Dentre as técnicas de espectroscopia, o FTIR possui maior reprodutibilidade e rapidez (GRIFFITHS; DE HASETH, 2007).

A espectrometria de massas analisa a razão massa/carga (m/z) de íons, permitindo a identificação de moléculas e podendo, de forma eficiente, diferenciar possíveis isótopos e isoformas existentes, calculando suas formas e massas moleculares. Sua composição é basicamente feita por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Os tipos de ionização mais utilizados são a ionização a laser assistida por matriz – MALDI, e a ionização por spray eletrostático – ESI. Para o analisador de massas, importante na acurácia e precisão do método, o quadrupolo e o tempo-de-voo (TOF) são os mais utilizados (GLISH; VACHET, 2003). Para os lipopeptídeos, por exemplo, várias isoformas com fórmula e massa molecular diferentes podem ser identificados por espectrometria de massas (PRICE et al., 2007). Algumas das isoformas de lipopeptídeos com suas respectivas fórmulas e massas moleculares podem ser observadas na **TABELA 2**.

TABELA 2. Fórmulas e massas moleculares para Lipopeptídeos de espécies de *Bacillus sp.*

Lipopeptídeo		Massa (Da)	Lipopeptídeo		Massa (Da)
Curstaquina	1. $C_{39}H_{64}N_{11}O_{12}$	878,47	Iturina	Asn-1, C_{10}	986,48
	2, 3. $C_{40}H_{66}N_{11}O_{12}$	892,41		Asn-1, C_{12}	1014,51
	4. $C_{41}H_{68}N_{11}O_{12}$	906,50		Asn-1, C_{14}	1042,54
Surfactina	Leu/Ile-7, C_{13}	1007,65	Fengicina	Asn-1, C_{15}	1056,56
	Leu/Ile-7, C_{14}	1021,66		Val-7, C_{16}	1462,80
	Leu/Ile-7, C_{15}	1035,68		Val-7, C_{17}	1476,82
Polimixina	B_1 , $C_{56}H_{98}N_{16}O_{13}$	1202,75		Val-7, C_{18}	1490,84
	B_2 , $C_{55}H_{96}N_{16}O_{13}$	1188,73	Bacitracina	A, $C_{66}H_{103}N_{17}O_{16}S$	1421,75
	D_1 , $C_{50}H_{93}N_{15}O_{15}$	1143,70		B, $C_{65}H_{101}N_{17}O_{16}S$	1407,73
	D_2 , $C_{49}H_{91}N_{15}O_{15}$	1129,68		C, $C_{64}H_{99}N_{17}O_{16}S$	1393,72
	E_1 , $C_{53}H_{100}N_{16}O_{13}$	1168,77		D, $C_{63}H_{97}N_{17}O_{16}S$	1379,70
	E_1 , $C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$	1154,75			

Fonte: Adaptado (PRICE et al., 2007).

Para uma melhor análise de possíveis isoformas de biossurfactantes, técnicas cromatográficas para separação e purificação são utilizadas, separadamente ou acopladas a espectrômetros de massas. Além disso, podem ser também utilizadas para quantificação das amostras. A cromatografia em camada delgada (TLC) é uma das variações cromatográficas

mais versáteis para a identificação de biossurfactantes microbianos (BINIARZ; ŁUKASZEWICZ; JANEK, 2017). A composição da estrutura dos biossurfactantes influencia diretamente no tipo e eficácia de suas atividades tensoativas, sendo então uma etapa essencial no estudo e direcionamento dessas moléculas para aplicações industriais (MNIF; GHRIBI, 2015a).

2.2.2. Propriedades e aplicações

Diversas propriedades funcionais podem ser encontradas nos biossurfactantes, devido principalmente as suas porções hidrofílica e hidrofóbica, que permite a interação de substâncias imiscíveis. Isso faz com que o potencial dessas moléculas em aplicações industriais seja elevado, além de ser tão eficiente quanto os surfactantes sintéticos já utilizados comercialmente (ROY, 2017; SARI; KUSHARYOTO; ARTIKA, 2014). Algumas das principais propriedades em comum dos biossurfactantes são descritas abaixo:

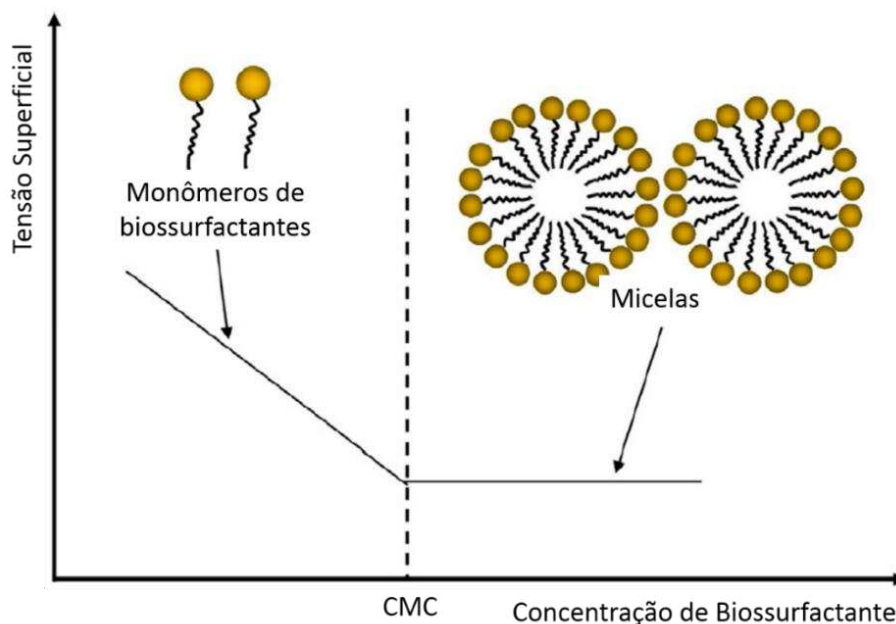
Redução de Tensão Superficial e Interfacial: as moléculas de água se mantêm juntas através das forças coesivas, que formam a tensão de superfície, denominada tensão superficial. Quando temos dois líquidos A e B, a força de atração exercida entre moléculas do líquido A é diferente da exercida entre as moléculas do líquido B, existindo então uma tensão na fronteira entre líquido/líquido, denominada tensão interfacial (MNIF; GHRIBI, 2015b). Os biossurfactantes são capazes de diminuir essa tensão. Um bom biossurfactante pode reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 35 mN/m, e a tensão interfacial entre a água e o N-hexadecano de 40 mN/m para 1 mN/m (MULLIGAN, 2005).

Capacidade emulsionante e desemulsionante: a emulsão refere-se a dispersão de um líquido em outro (gotas microscópicas, cujo diâmetro excede 0,1 mm), fazendo com que duas substâncias imiscíveis se misturem. Como essa emulsão é instável, moléculas como os biossurfactantes podem manter essas emulsões estáveis por muito tempo. Além de promover a estabilização de emulsões, alguns biossurfactantes também têm a capacidade de desestabilizá-las, rompendo a superfície estável entre a fase dispersa (líquido em forma de gotículas) e a fase contínua (líquido que acomoda as gotículas). (MNIF; GHRIBI, 2015b; VELIKONJA; KOSARIC, 1993; VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

Concentração Micelar Crítica - CMC: a formação de micelas ocorre quando, a partir de uma determinada concentração, os monômeros das moléculas tensoativas se aglomeram de forma não covalente em solução, denominada Concentração Micelar Crítica – CMC (**FIGURA 1**).

Cada biossurfactante pode ser caracterizado pelo valor de sua CMC, já que concentrações acima desse valor não aumentam a efetividade da atividade tensoativa. Então, quanto menor a CMC, mais efetivo o biossurfactante é (BARROS et al., 2007; MNIF; GHRIBI, 2015b).

FIGURA 1. CMC e formação de micelas a partir de monômeros de biossurfactantes



Fonte: Adaptado (AKBARI et al., 2018).

Mnif e Ghribi (2015b) descrevem outras propriedades tensoativas como dispersão de óleo, formação de espuma, adsorção, inibidor de corrosão, além de atividades biológicas como inibição da formação de biofilme, atividade antimicrobiana e hemolítica, indicando a variedade de aplicações de biossurfactantes. Além dos setores mais conhecidos (**FIGURA 2**), como a indústria do petróleo, de limpeza e cosméticos, alimentícia, agrícola e farmacêutica, os biossurfactantes podem ser utilizados em outros setores industriais, como a indústria de cerâmica, celulose e papel, processamento de carvão, biorremediação, dentre outros (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; FAKRUDDIN, 2012; MNIF; GHRIBI, 2015b). Em particular, o uso dos biossurfactantes na indústria do petróleo, sua maior área de atuação, é promissor e eficaz. Aplicado em toda a cadeia produtiva do petróleo (extração, transporte e armazenamento) para aumento da sua produção, os biossurfactantes podem também ser utilizados na recuperação de ambientes contaminados pelo petróleo bruto e/ou seus derivados (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; SILVA et al., 2014).

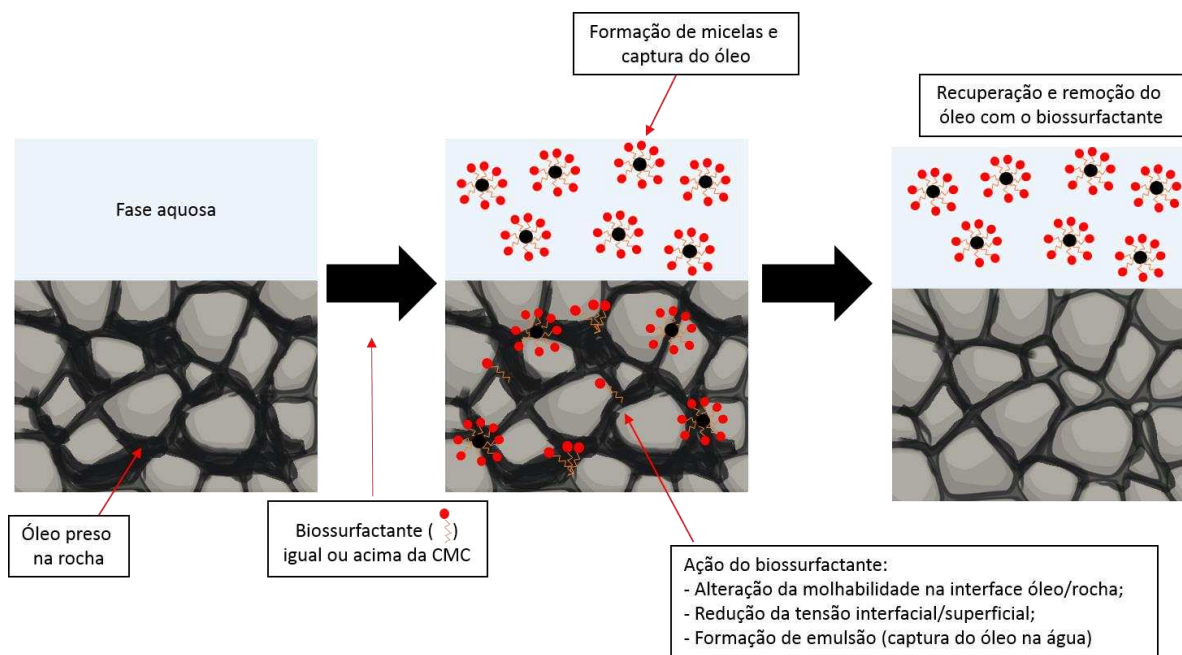
FIGURA 2. Aplicações dos biossurfactantes nos principais setores industriais



Fonte: Adaptado (FAKRUDDIN, 2012)

Na extração de petróleo, sua utilização é classificada como recuperação avançada de petróleo (*Microbial Enhanced Oil Recovery* - MEOR), apresentando-se como uma alternativa atraente em relação aos outros métodos térmicos e químicos devido seu baixo custo, baixo consumo de energia, melhor aplicabilidade e não dependência do preço global do petróleo (AL-SULAIMANI et al., 2011; SEN, 2008). Além disso, os biossurfactantes se destacam com resultados promissores e atraentes, devido ao alto impacto na molhabilidade do óleo, que aumenta o índice de recuperação de forma significativa (AL-SULAIMANI et al., 2011; PATEL et al., 2015; SAFDEL et al., 2017). Os biossurfactantes realizam a recuperação através da redução da tensão interfacial óleo/água e óleo/rocha, redução da viscosidade do óleo e aumento da permeabilidade absoluta pela dissolução de minerais na rocha (NIELSEN et al., 2010). A **FIGURA 3** demonstra a ação de um biossurfactante injetado no reservatório.

FIGURA 3. Processo de MEOR realizado por biossurfactantes



Fonte: Adaptado (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018)

2.3. Custo e comércio de biossurfactantes

O interesse comercial nos biossurfactantes é crescente. Em 2013, a produção global atingiu aproximadamente 344 mil toneladas e deverá aumentar, chegando a 462 mil toneladas até 2020, crescendo a uma CAGR (taxa de crescimento anual composta) de 4,3% de 2014 a 2020 (GRAND VIEW RESEARCH, 2015). Em 2016, a geração de receita foi de mais de US\$ 1,8 bilhão, podendo atingir US\$ 2,6 bilhões até 2023 (GLOBAL MARKETS INSIGHTS, 2018). Uma projeção do mercado global de biossurfactantes é de US\$ 5,52 bilhões até 2022 (MARKETS AND MARKETS, 2017).

Mesmo com a conscientização e crescente demanda por surfactantes naturais, eles não são competitivos comercialmente quando comparados aos sintéticos. O custo de produção é o fator limitante para a comercialização bem-sucedida dessas moléculas. Dentre os biossurfactantes, os glicolipídeos são os mais promissores para comercialização, devido sua alta produção e propriedades físico-químicas (DHANARAJAN; SEN, 2014). Estudos como o de Van Bogaert (2011), mostram que os sofrorolipídeos já são produzidos em concentrações maiores que 400 g/L, utilizados comercialmente em formulações de produtos de limpeza. O alto rendimento permite sua venda a preços menores, redirecionados a sua aplicação a partir do seu grau de pureza. Em contrapartida, os lipopeptídeos, outra classe de biossurfactantes, de alto valor comercial, são produzidos em quantidades menores. Muitos estudos têm sido

desenvolvidos para aumentar o rendimento dessas moléculas, adotando estratégias como a modificação dos componentes do meio de cultivo, substituindo substratos comumente utilizados por resíduos de baixo custo (SARUBBO et al., 2015), das condições de cultivo e também o melhoramento da estirpe produtora através de técnicas moleculares (DHANARAJAN; SEN, 2014; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006).

Sob uma perspectiva empreendedora, muitas variáveis devem ser consideradas, além dos fatores interferentes já citados, quando o objetivo é comercializar o biossurfactante. O preço unitário de produção de um biossurfactante pode ser estimado como a razão entre o custo operacional anual e a taxa anual de produção. Os custos operacionais de produção envolvem os custos de capital e os custos de produção (PETRIDES, 2015).

Os custos de capital englobam a compra de equipamentos, instalação, fiação e encanamento, o laboratório em si, além de possíveis instalações auxiliares. O preço dos equipamentos pode ser estimado com base em fornecedores, enquanto que as outras despesas dependem do custo e tipo de equipamento. A escala de produção dependerá da meta anual de produção. Custos como o tipo de material utilizado na construção do laboratório, como também o custo do terreno, da construção do estabelecimento também podem ser estimados (DHANARAJAN; SEN, 2014; PETRIDES, 2015).

Os custos de produção, por sua vez, englobam a matéria-prima, descartáveis, mão-de-obra, despesas com serviços públicos como água e energia, manutenção de equipamentos, tratamento e descarte de resíduos, dentre outros. A matéria-prima utilizada na produção, e os processos utilizados nas etapas de purificação costumam ser o custo principal no valor final do biossurfactante (DHANARAJAN; SEN, 2014). A percentagem que representa cada uma dessas variáveis no custo operacional do produto está disposta na **TABELA 3**.

TABELA 3. Distribuição dos custos para produção de biossurfactantes

Custos de produção	
Item	% do custo total de produção
Matéria-prima	10-80
Consumíveis	1-50
Serviços públicos	1-30
Mão-de-obra	5-30
Manutenção	1-40
Outros	0-20

Fonte: adaptado (PETRIDES, 2015)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Esse estudo teve como objetivo a caracterização físico-química de 15 amostras de biossurfactantes produzidos por estirpes de *Bacillus* sp., a análise da resistência dessas moléculas a elevadas temperaturas, pressão e salinidade, bem como o custo de produção visando selecionar os mais promissores para aplicação industrial.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificação dos biossurfactantes por FTIR e Espectrometria de Massas (ESI-Q-TOF MS);
- ✓ Avaliação da resistência térmica dos biossurfactantes por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC);
- ✓ Avaliação das propriedades tensoativas;
- ✓ Avaliação dos efeitos de altas temperaturas, pressão e concentração de NaCl nas atividades tensoativas;
- ✓ Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC);
- ✓ Avaliação do rendimento e custo de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos produtores de biossurfactantes

Foram utilizadas 15 estirpes previamente isoladas de sedimento de três manguezais cearenses: Icapuí (ICA13, ICA24, ICA32 e ICA36), Jaguaribe (JAG248, JAG249 e JAG255) e Timonha (TIM03, TIM10, TIM13, TIM27, TIM49, TIM58, TIM68 e TIM96) e identificadas como espécies de *Bacillus*. Essas estirpes estão preservadas na coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia – Lembiotech, da Universidade Federal do Ceará – UFC. As culturas estocadas em *ultrafreezer* -80 °C foram reativadas em placas contendo ATGE (15,0 g de Ágar; 5,0 g de Triptona; 1,0 g de Glicose e 2,5 g de Extrato de Levedura por litro) e incubadas a 30 °C (Shel Lab®, USA) até o aparecimento das colônias.

4.2. Produção, precipitação e purificação dos biossurfactantes

Para induzir a produção de biossurfactantes, as estirpes foram cultivadas isoladamente em meio mineral (MORÁN et al., 2000, com modificações) com composição por litro: 5,0 g de extrato de levedura, 2,7 g de NaCl, 1,0 g de (NH₄)₂SO₄, 6,0 g de Na₂HPO₄, 3,0 g de KH₂PO₄, 0,6 g de MgSO₄.7H₂O e 10 g de glicose, com pH 7,0. O meio foi suplementado com 0,1 % (v/v) de uma solução de micronutrientes composta por 10,95 g de ZnSO₄.7H₂O; 5,0 g de FeSO₄.7H₂O; 1,54 g de MnSO₄.H₂O; 0,39 g de CuSO₄.5H₂O; 0,25 g de Co(NO₃)₂.6H₂O e 0,17 g Na₂B₄O₇.10H₂O por litro.

As culturas foram incubadas sob agitação de 150 rpm, a 30 °C por 16 horas, quando tiveram suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro a 600 nm, e ajustadas para 0.150 ± 0.02 . Essas culturas em fase exponencial de crescimento foram então usadas como inóculo, na proporção de 10 % (v/v) e incubadas nas mesmas condições anteriores por 48 horas. Ao final, foram centrifugadas a 7.000 x g por 15 minutos, 4 °C e os sobrenadantes livres de células contendo os biossurfactantes foram recolhidos.

Para purificação dos biossurfactantes, os sobrenadantes isentos de células foram submetidos à precipitação ácida, metodologia proposta por Pereira (2013). Para tanto, os sobrenadantes foram ajustados a pH 2,0 com HCl 12 M e deixados em repouso por 24 horas a 4 °C. Os precipitados foram recolhidos por centrifugação a 15000 x g, 4 °C por 30 minutos e lavados duas vezes com água acidificada (pH 2,0), sob centrifugação. Os precipitados foram dissolvidos em água desmineralizada e o pH das soluções foi ajustado para 7,0, utilizando

NaOH 1 M. As soluções foram congeladas em *ultrafreezer* -80 °C e liofilizadas. As massas foram pesadas para cálculo do rendimento, e armazenadas a 25 °C para utilização nos ensaios posteriores.

4.3. Caracterização Físico-química dos biossurfactantes

4.3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

As análises de infravermelho foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional e Microscopia (LEVM) do Departamento de Física da UFC. Para sua caracterização, uma pequena quantidade dos biossurfactantes liofilizados foram utilizados, 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⁻¹ foram coletados em comprimentos de onda numa faixa de 400 a 4000 (cm⁻¹), realizado uma média de 128 *scans*, corrigidos e convertidos para transmitância. O software utilizado para geração e análise dos espectros foi o OriginPro 2016 (OriginLab®, Northampton, MA, USA).

4.3.2. Espectrometria de Massa com ionização por Eletrospray (ESI-Q-TOF MS)

Todas as análises de determinação de massas dos metabólitos produzidos pelas estirpes de *Bacillus* sp. foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, na Universidade Estadual de Campinas em São Paulo. Os biossurfactantes liofilizados foram solubilizados em água e metanol (proporção 1:1) para uma concentração em torno de 2 mg/mL (p/v). A determinação da massa molecular foi realizada através de um sistema HPLC (Agilent 1290 Infinity Sistema LC), consistindo de um desgaseificador, duas bombas binárias e autoamostrador termostatizado (4 °C) acoplado com o espectrômetro de massa Q-ToF-MS (6550 iFunnel, Agilent Technologies). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

As massas dos componentes foram obtidas por ionização por *eletrospray* em modo íon positivo, ESI (+), utilizando ácido fórmico (0,1 % p/v) para facilitar a protonação dos compostos. A solução da amostra foi infundida diretamente na fonte ESI com os seguintes parâmetros: modo centróide a uma taxa de 1,0 espectro por segundo (2 GHz). A voltagem do capilar foi ajustada para +2,8 kV; a voltagem do fragmentador foi ajustada em +110 V, a vazão de fluxo de gás N₂ de secagem foi de 6 L/min a 300°C e do gás nebulizador em 30 psi. Para garantir a precisão de massa, a calibração interna contínua foi realizada durante as análises pelo sistema de calibração automática utilizando uma solução de calibração, que compreende massa

de referência m/z 922,009798 (HP-0921, hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxi)phosphazine). A aquisição de dados foi realizada ao longo do intervalo de m/z 1000-1500 (*full scan*). Três lipopeptídeos comerciais, iturina A, surfactina e fengicina de *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) também foram analisados neste estudo, e usados como referências.

4.3.2.1. *Processamento dos dados e análise estatística*

Os dados foram adquiridos e controlados através do *software Agilent MassHunter Workstation LC-MS Data Acquisition* versão B.05.00 (*Agilent Technologies*). Os espectros foram analisados, reprocessados e exportados usando o *software Agilent MassHunter Qualitative Analysis* versão B.03.00 (*Agilent Technologies*). A princípio a análise espectral consistiu em reduzir os ruídos na linha de base, recalibrar os espectros após aquisição dos dados, e subtrair o *background* da análise. Por fim, os padrões isotópicos de cada lipopeptídeo analisado foram convertidos e exportados em razões massa/carga (m/z) e suas respectivas intensidades.

As análises estatísticas dos dados metabolômicos de todas as estirpes estudadas foram realizadas no programa MetaboAnalyst 3.0 (XIA et al., 2015). Plataforma disponível online (www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp). Os valores nulos ou ausentes foram substituídos pela metade do valor mínimo positivo a partir dos dados obtidos no pré-processamento. A normalização pela soma foi realizada a fim de evitar ou minimizar as diferenças na detecção entre as amostras resultantes da variação da concentração e da sensibilidade do detector ao longo da análise. Conjuntamente, os valores de intensidade de cada pico foram escalonados pelo método de Pareto (média dividida pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável) para que todas as variáveis possam exercer influência equivalente sobre os resultados (VAN DEN BERG et al., 2006; WIKLUND et al., 2008).

4.3.3. *Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC*

As análises de DSC foram realizadas no Laboratório de Propriedade e Caracterização de Cristais no Departamento de Física, localizado na UFC. Após a pesagem de 3,0 mg dos biossurfactantes purificados, e de um surfactante sintético (Dodecil Sulfato de Sódio – SDS), estes foram selados em cadinhos de platina com tampa, e foram submetidos à análise em equipamento DSC *Netzsch-Gerätebau GmbH* Maia® modelo 200 F3, numa taxa de aquecimento de 5 °C /min em atmosfera inerte (nitrogênio – N₂), com gradiente de temperatura

variando de 30 a 300 °C. Os termogramas de DSC foram obtidos através da representação gráfica do fluxo de calor em função da temperatura, gerados no *software* OriginPro 2016 (OriginLab©, Northampton, MA, USA).

4.4. Atividades Tensoativas

4.4.1. Redução de Tensão Superficial

A capacidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial da água foi medida em tensiômetro Krüss, modelo K20, utilizando o método do Anel Du Nöuy (DU NOÛY, 1925). Para cada amostra, foram necessários 20 mL das soluções na concentração de 400 mg/L. O tensiômetro foi previamente calibrado com água destilada (71 mN/m), a 25 °C. Foram realizadas pelo menos 5 medições para cada amostra.

4.4.2. Índice de Emulsão (IE24)

A determinação da atividade emulsificante foi avaliada segundo Iqbal e colaboradores (IQBAL; KHALID; MALIK, 1995). O método consistiu em adicionar na proporção 1:1 (v/v) de um hidrocarboneto, sendo utilizado o querosene (Esso®, BR), e de uma solução de biossurfactante na concentração de 400 mg/L em um tubo de ensaio com tampa rosqueada, agitando vigorosamente em *vortex* por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso por 24 horas, a 25 °C e o percentual de emulsificação (IE24) foi calculado pela razão segundo a equação: $IE24 = H_{FE} / H_{TOTAL} \times 100$, onde: H_{FE} é a altura da fase emulsificada e H_{TOTAL} é a altura total.

4.4.3. Dispersão de óleo em água do mar

Neste ensaio foi avaliada a capacidade do biossurfactante em dispersar o óleo derramado na superfície da água (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000 com adaptações). O ensaio foi realizado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, em triplicata para cada amostra, onde foram adicionados 15 mL de água do mar artificial contendo a seguinte composição por litro: 15,15 g de NaCl, 2,18 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2,85 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,65 g de $CaCl_2$, 0,116 g de $NaHCO_3$, 0,414 g de KCl (pH 7,8, salinidade 43), acrescidos de 20 µL de petróleo (cedido pela Petrobrás) derramado. Após a formação da camada de óleo sobre a água, 100 µL das soluções na concentração de 400 mg/L das amostras de biossurfactantes e do surfactante SDS foram adicionados, sendo observada a formação ou não de um halo de dispersão. O controle negativo utilizado foi a água ultrapura utilizada na preparação das amostras. O halo foi medido com paquímetro após 1, 5, 30, 60 minutos e 24 horas.

4.5. Efeito da temperatura, pressão e salinidade nas atividades tensoativas

Para verificar a resistências de biossurfactantes microbianos a alta temperatura e pressão, os biossurfactantes purificados e o surfactante sintético SDS foram submetidos a uma pressão de 600 bar, durante 3 minutos. Após isso, foram feitas soluções em água ultrapura de 400 mg/L de cada amostra, sendo em seguida submetidas ao calor úmido, numa temperatura de 121 °C durante 15 minutos. As amostras foram deixadas em repouso até chegar em temperatura ambiente e então foram utilizadas nos ensaios tensoativos, antes e após o tratamento, para verificar a perda ou não da atividade tensoativa.

Para verificar o efeito do NaCl, os biossurfactantes purificados foram solubilizados em solução salina para a concentração de 50 mg/L. As soluções salinas foram preparadas utilizando água ultrapura, sendo as concentrações testadas de 100 g/L e 150 g/L. Após isso, as soluções foram medidas pelo menos 5 vezes no tensiômetro, segundo o método do anel de Du Noüy (1925).

4.6. Concentração Micelar Crítica - CMC

A Concentração Micelar Crítica (CMC) dos tensoativos pode ser determinada através de mudanças na tensão superficial (TS) em função de diferentes concentrações dos biossurfactantes a 25 °C. Para tal, foram preparadas soluções numa concentração elevada e conhecida (400 mg/L) dos biossurfactantes em água ultrapura. Para a realização do ensaio, utilizou-se 20 mL de cada solução. Foram feitas diluições sucessivas da solução concentrada até concentrações bem baixas (200, 100, 50, 40, 30, 20, 25, 10 e 5 mg/L), atingindo valores de tensão superficial próximos aos da água (71 mN/m). As medidas de tensão foram realizadas no mínimo cinco vezes, utilizando o método do Anel Du Nöuy (DU NOÜY, 1925), obtendo-se as médias de TS e os desvios padrão. A CMC foi determinada pelo ponto de inflexão da curva do gráfico dado pela relação entre a variação da tensão superficial e a concentração da solução do biossurfactantes purificado, feito no programa GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA, EUA).

4.7. Análises Estatísticas

Todos dos ensaios foram analisados em experimentos independentes e pelo menos em triplicatas. Os dados foram sujeitos a análise de variância pelo método ANOVA com pós teste de *Tukey*, utilizando um nível de significância de 95 % ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism 6.01 (San Diego, CA, EUA).

4.8. Análise do custo de produção dos biossurfactantes

Os custos de produção dos biossurfactantes foram realizadas considerando o custo de matéria-prima utilizada (ASHBY et al., 2013 com modificações). Foi feita uma cotação dos reagentes em duas empresas, CEQUÍMICA e QUIMIFORT (Fortaleza - CE) e uma média dos valores obtidos de cada reagente. A média foi então utilizada para calcular o custo de produção para 1 litro, e para a purificação dos biossurfactantes produzidos nesse volume, sendo o valor estimado de venda por grama produzido. O valor do dólar utilizado para conversão do preço dos biossurfactantes foi de US\$ 3,86, cotado no dia 30 de junho de 2018 (Disponível em <https://economia.uol.com.br/cotacoes/cambio/>).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do biossurfactantes

5.1.1. Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier - FTIR

A caracterização dos biossurfactantes por FTIR foi capaz de demonstrar que todas pertencem ao grupo dos lipopeptídeos, uma vez que foram observados com muita clareza os picos nas faixas características de ligações peptídicas e de grupamentos carboxílicos, referentes à cadeia alifática, característicos da estrutura dos lipopeptídeos. Os espectros de todos os biossurfactantes estão dispostos no 9. ANEXO.

Picos característicos de ligações peptídicas foram identificados em bandas de absorção a aproximadamente 3300 cm^{-1} e 3060 cm^{-1} , indicando o padrão de estiramento da ligação N-H (picos encontrados numa faixa maior que 3000 cm^{-1}), além de picos característicos de ligações CO-N na faixa de 1640 cm^{-1} e do padrão de estiramento da ligação C-N na faixa de 1530 cm^{-1} , na faixa entre $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. A cadeia alifática pode ser observada nas bandas entre $2980\text{-}2840\text{ cm}^{-1}$ com um padrão de estiramento; e $1455\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$, com padrão de torção representando alcanos ($-\text{CH}_3$; $-\text{CH}_2-$), e picos representando alcenos ($=\text{C-H}$), na faixa de comprimento de onda $1000\text{-}675\text{ cm}^{-1}$, com padrão de torção. Foi observado com maior resolução um pico na faixa de 1736 cm^{-1} , representando o grupo carbonila. Em alguns gráficos é possível observar um pico na região de 2349 cm^{-1} , que representa a interferência do dióxido de carbono (CO_2) na análise. Essa interferência, no entanto, não compromete a estrutura da molécula (NAKANISHI; SOLOMON, 1977). Para os 15 biossurfactantes estudados, os espectros obtidos foram similares entre si, diferindo apenas na quantidade de picos encontrados na banda de absorção para as ligações C-N e C=C. A **TABELA 4** sumariza todos os picos encontrados em todos os espectros analisados.

TABELA 4. Principais picos identificados nos espectros de FTIR dos biossurfactantes analisados

PICOS FTIR									
Grupo Funcional	N-H	CO-N	C-N/N-H	C-N	(-CH ₃ ; -CH ₂ -)		-CO-	C=C	
Faixa de Absorção (cm ⁻¹)	3300-3060	~1640	~1530	1360-1080	2980-2840	1455-1350	~1736	1000-675	
Modo de Vibração	ν	ν	ν	ν	ν	δ	ν	δ	
Icapuí	ICA13	3282/3068	1643	1540	1233/1169/1128/1075	2957/2928/2863	1452/1399	1733	964/931/832
	ICA24	3282/3058	1647	1539	1312/1233/1170/1106/1060	2956/2926/2854	1460/1400	1734	835
	ICA32	3302/3059	1644	1527	1314/1207/1056	2957/2925/2856	1459/1395	1737	983/931/829
	ICA36	3287/3066	1643	1536	1317/1208/1175/1137	2959/2925/2855	1455/1395	1736	931/834
Jaguaribe	JAG248	3278/3061	1636	1536	1338/1316/1270/1226/1157/1068	2957/2925/2857	1450/1387	1721	951/858
	JAG249	3284/3058	1647	1532	1314/1232/1170/1126/1066	2957/2925/2860	1452/1398	1734	931/832
	JAG255	3284/3067	1648	1537	1313/1233/1169/1062	2956/2926/2854	1452/1399	1734	931/894/830
Timonha	TIM03	3281/3069	1636	1535	1314/1269/1228/1159/1064	2961/2925/2855	1452/1397	1723	966/903/832
	TIM10	3286/3057	1641	1532	1309/1232/1169/1131/1064	2955/2923/2855	1450/1400	1736	966/931/831
	TIM13	3299/3064	1643	1525	1215/1126/1057	2958/2923/2854	1454/1382	1736	999/899/830
	TIM27	3318/3064	1645	1517	1209/1125/1057	2956/2921/2856	1461/1367	1732	989/922/886/830
	TIM49	3284/3064	1640	1528	1338/1204/1168/1052	2956/2925/2856	1450/1385	1722	922/830
	TIM58	3313/3064	1645	1524	1316/1232/1171/1135/1060	2956/2923/2853	1450/1402	1737	983/927/886/830
	TIM68	3280/3064	1643	1538	1315/1231/1167/1073	2956/2927/2853	1452/1400	1739	931/840
	TIM96	3282/3072	1645	1531	1308/1236/1172/1055	2956/2925/2853	1542/1402	1741	984/926/886/828

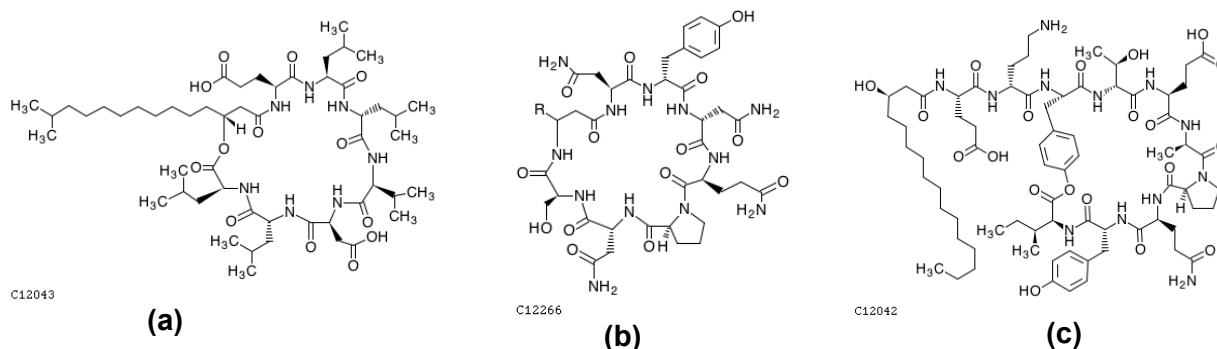
Fonte: Adaptado (NAKANISHI; SOLOMON, 1977)

5.1.2. Espectrometria de Massas

Para determinar as isoformas de lipopeptídeos produzidas por cada estirpe, os picos encontrados nos espectros de massa foram relacionados com lipopeptídeos descritos na literatura, além dos padrões comerciais. A análise espectral dos 15 biossurfactantes teve um total de 1435 picos analisados, com uma média de 95,7 picos por amostra, sendo considerada uma tolerância de massa de m/z 0,025. Foram observadas abundâncias de picos na região entre m/z 1000 a 1200, referente a isoformas de surfactina e iturina, e outra região entre m/z 1400 a 1500, referente a isoformas de fengicina. Séries homólogas de cada pico identificado também puderam ser observadas, diferindo em m/z 14, que corresponde a um grupamento metil. Os picos encontrados nos padrões comerciais foram condizentes com a literatura. Os picos majoritários encontrados nos padrões e as principais isoformas podem ser observados na **FIGURA 4**.

FIGURA 4. Principais massas características e isoformas das famílias surfactina (a), iturina (b) e fengicina (c)

Isoforma do lipopeptídeo	Íons característicos (m/z)	Referência
Surfactina	1008,66; 1016,66; 1030,64; 1044,66; 1058,68 e 1080,65	STEIN, 2008
Iturina	1043,56; 1057,56; 1065,54; 1079,56 e 1093,56	PUEYO et al., 2009
Fengicina	1449,90; 1463,80; 1477,82; 1491,83 e 1505,85	BIE; LU; LU, 2009



Disponível em <https://www.genome.jp/kegg/> (acessado em 26/10/2018).

Todas as estirpes estudadas produziram isoformas das três principais famílias de lipopeptídeos, que são comuns em espécies do gênero *Bacillus*. Porém, houve variação na composição estrutural das isoformas produzidas. A análise de agrupamento dos dados baseada na distância Euclidiana, considera a abundância dos picos, gerando uma matriz de dissimilaridade entre as amostras (**FIGURA 5**). A partir disso, foi observado a formação de dois grupos: o primeiro, que reúne a maioria dos biossurfactantes das estirpes isoladas do manguezal Timonha e Jaguaribe, com exceção da TIM03, TIM13 e JAG255; enquanto que o

segundo reúne os biossurfactantes do manguezal Icapuí. Nesse agrupamento, podemos ver que o grupo I é composto por biossurfactantes que apresentam íons intensos de surfactina A e B, e de fengicina A e B. No grupo II, os íons mais intensos são de iturina A e bacilomicina D e L.

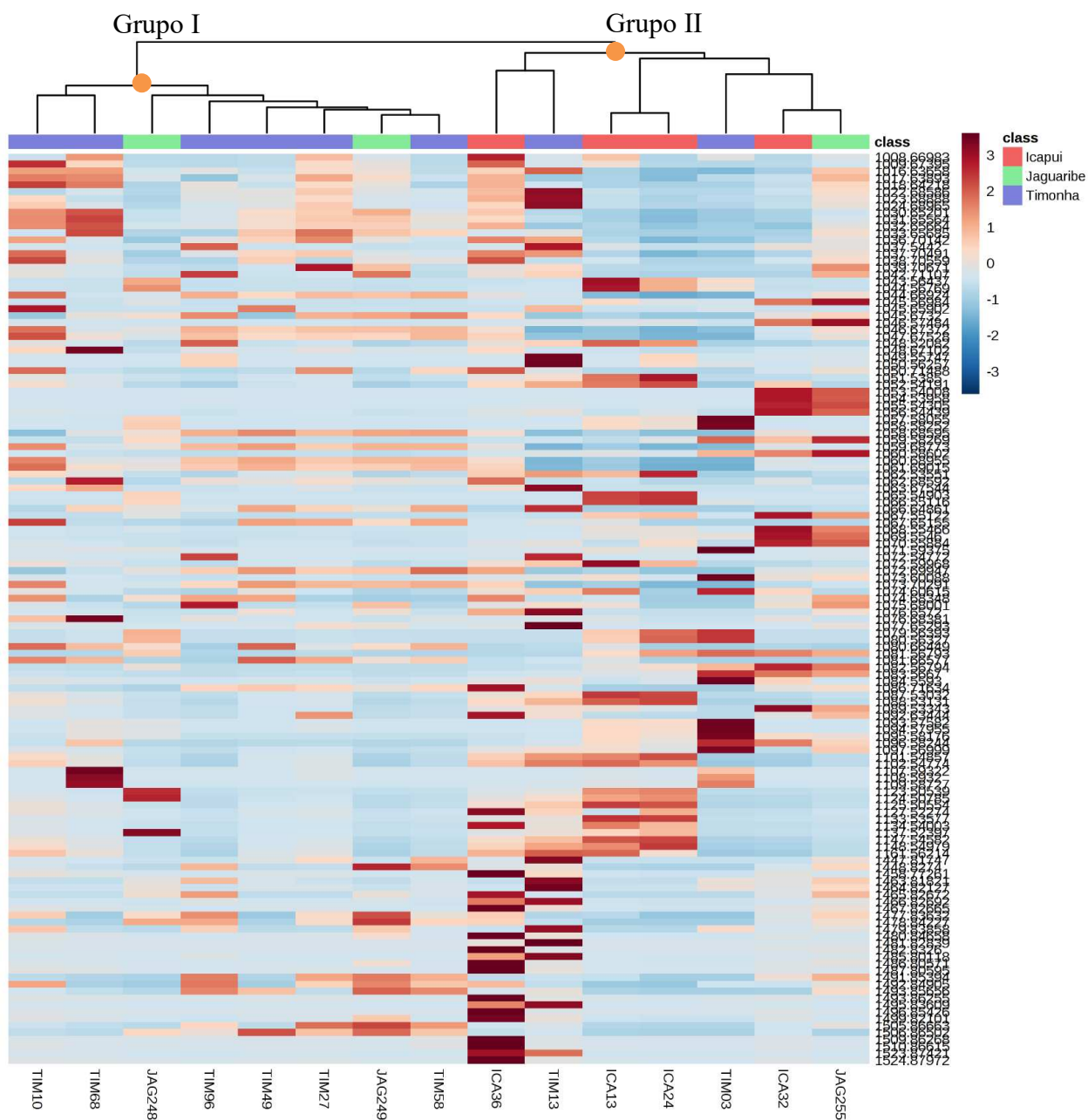
Dentro do grupo I, o primeiro cluster formados foram dos biossurfactantes das estirpes TIM10 e TIM68, principais produtores de surfactina A e B $[M+H]^+$ de 13 a 17 carbonos devido os íons de m/z 1008,66, 1022,68, 1036,70, 1050,71; assim como adutos de sódio de cadeia alifática pequena (C_{12} a C_{14}), de m/z 1016,63, 1030,65, 1044,66; e adutos de potássio $[M+K]^+$ de 15 carbonos (m/z 1074,68). As outras amostras que compõe o grupo (TIM27, TIM49, TIM58, TIM 96, JAG248 e JAG 249) exibiram íons mais intensos relacionados a surfactina A e B $[M+Na]^+$ acima de 14 carbonos na cadeia de ácidos graxos, identificados pelos íons de m/z 1044,66, 1058,68, 1072,69. Além disso, também coproduziram isoformas de fengicina A e B $[M+H]^+$ de 15 a 19 carbonos, de m/z 1477,83, 1491,85 e 1505,86. Especificamente, os biossurfactantes das estirpes JAG248 e TIM96 tiveram íons intensos para fengicina A e B $[M+H]^+$ de 14 a 16 carbonos (m/z 1463,81).

Dentro do grupo 2, podemos observar um *cluster* isolado, dos biossurfactantes produzidos pelas estirpes ICA36 e TIM13 que, além de produzirem as isoformas características do grupo (iturina e bacilomicina), se aproximam do grupo I por produzirem também de forma intensa isoformas de surfactina e principalmente de fengicina, sendo as amostras mais intensas para íons dessa isoforma. ICA24 e ICA13 produzem de forma mais intensa íons de bacilomicina L de 16 carbonos sendo um aduto de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 1071,59 e um aduto de potássio $[M+K]^+$ de m/z 1087,53; de 17 carbonos, sendo um $[M+K]^+$ de m/z 1101,54; e iturina A $[M+K]^+$ de 17 carbonos, com m/z 1123,50. De forma isolada, ICA24, ICA13 e TIM03 agrupou os principais produtores de iturina A $[M+H]^+$ e bacilomicina L $[M+Na]^+$, identificado pelos íons de m/z 1043,56 (C_{14}) e 1057,58 (C_{15}). Além disso, exibiram também picos com m/z 1065,55, 1079,56, 1093,57, 1107,59 os quais foram atribuídos a adutos de sódio $[M+Na]^+$ de iturina A com cadeia alifática variando de 14 a 17 carbonos. Apesar de estar no grupo um, a JAG248 também apresenta esses íons.

O último *cluster* agrupou as estirpes JAG255 e ICA32, principais produtores de bacilomicina D, com íons mais intensos de m/z $[M+H]^+$ 1045,56 (C_{15}) e 1059,58 (C_{16}) e os adutos de sódio $[M+Na]^+$ com m/z 1053,54 (C_{14}) e 1067,55 (C_{15}). Essas duas linhagens também produziram adutos de potássio $[M+K]^+$ de iturina A com 15 carbonos, identificado pela m/z 1081,56. As amostras ICA 24 (grupo I), TIM 96, TIM 13 (grupo II) foram as únicas a

apresentarem o íon m/z 1049,55, atribuído a C_{16} bacilomicina L $[M+H]^+$. Os espectros de todas as amostras e dos padrões comerciais podem ser observados no 9. ANEXO. Os principais picos e as estirpes produtores referentes podem ser encontrados na **TABELA 8** (9. ANEXO).

FIGURA 5. Mapa do perfil lipopeptídico das 15 estirpes de *Bacillus* sp.

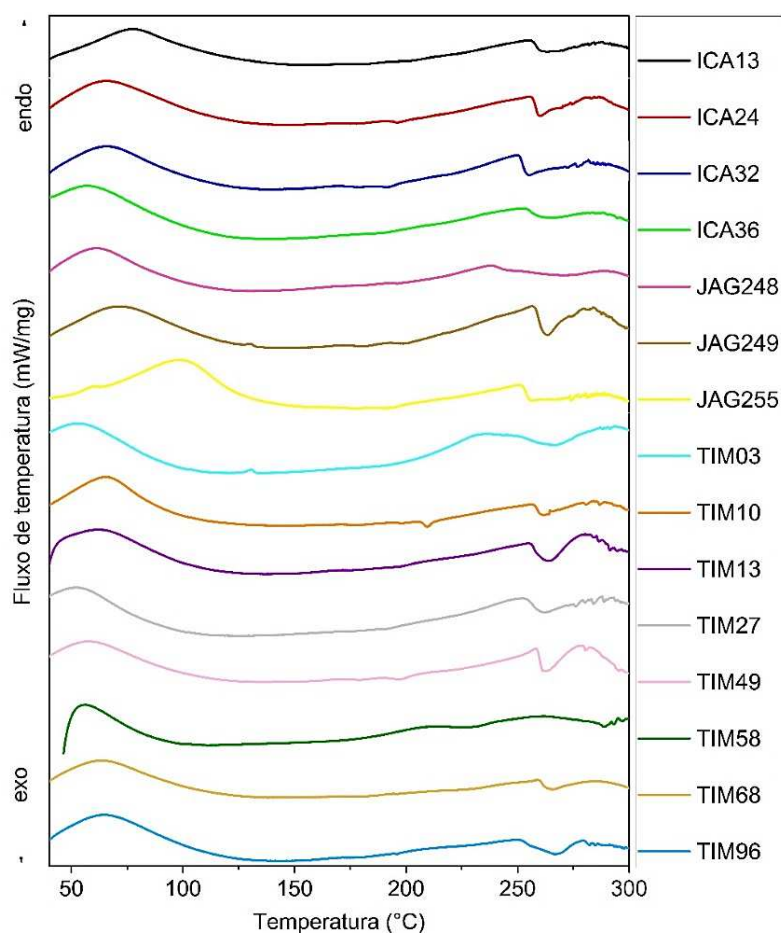


Fonte: Elaborado pela autora. Análise realizada usando a distância euclidiana e algoritmo de Ward através dos dados obtidos por ESI (+)-Q-TOF MS.

5.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC

As análises de DSC revelaram dois picos, um endotérmico, numa faixa entre 62 e 97 °C, correspondente a uma possível perda de água intramolecular que evaporou; e um pico exotérmico, referente a decomposição das amostras, numa faixa de 255 a 289 °C (**FIGURA 6**).

FIGURA 6. Termogramas de DSC dos lipopeptídeos estudados

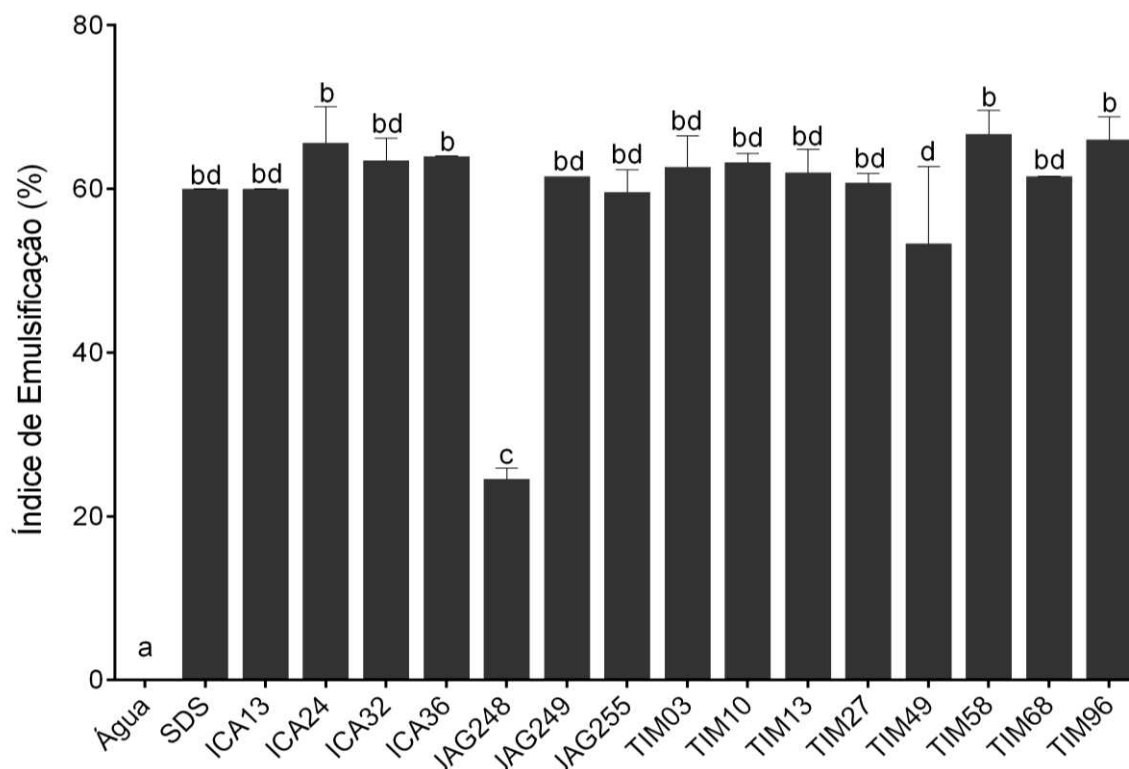


Fonte: Elaborado pela autora

5.2. Análises Tensoativas

Os biossurfactantes produziram emulsões água-querosene estáveis (**FIGURA 7**), com percentuais de emulsão igual ou superior a 60 %, exceto as amostras de JAG248 e TIM49 cujos índices de emulsificação foram mais baixos. O índice de emulsificação do SDS foi 60 %.

FIGURA 7. Percentuais de emulsificações do querosene promovido pelos biossurfactantes a 400 mg/L.

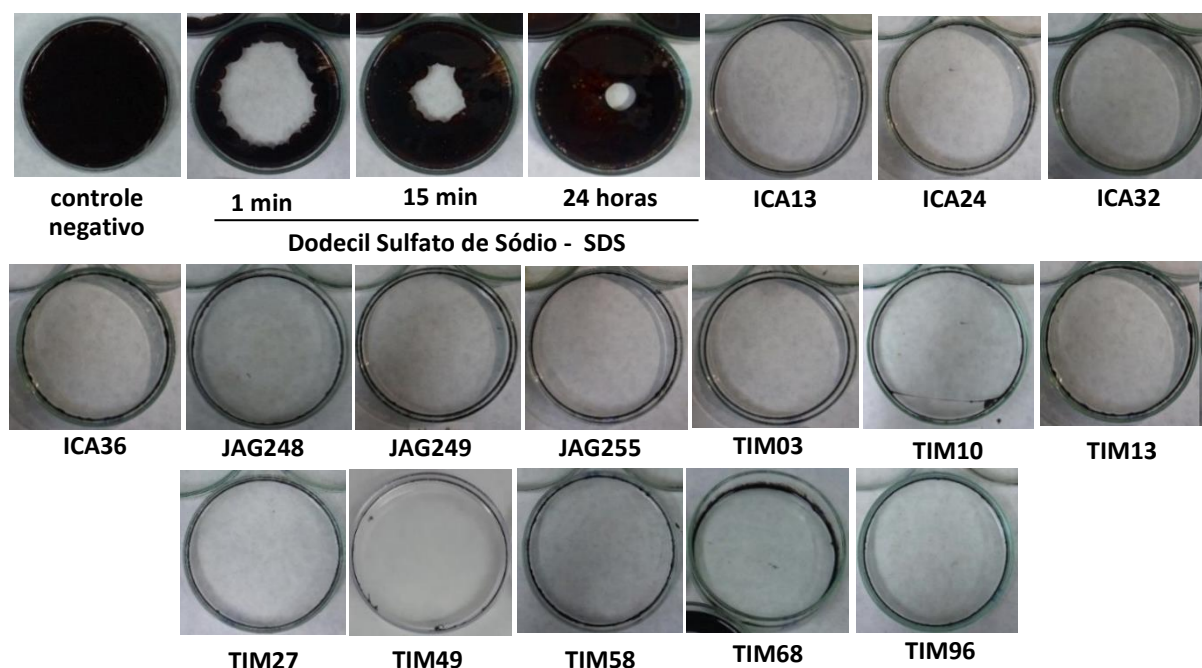


Fonte: Elaborado pela autora. Teste de variância (ANOVA) com valor de $p < 0,05$, com pós teste de múltipla comparação (Tukey).

Todas as moléculas na concentração de 400 mg/L foram capazes de reduzir a tensão superficial da água de 71 mN/m para valores entre 27 e 32 mN/m. Entre os biossurfactantes, a maior redução foi produzida por TIM49, com valor de $27,13 \pm 0,05$, enquanto que a menor redução foi obtida pela TIM13, com valor de $31,33 \pm 0,15$. O SDS reduziu a tensão superficial para $57,93 \pm 1,95$.

Os biossurfactantes, também a 400 mg/L, mostraram atividade de dispersão de óleo, sendo a abertura do halo de dispersão instantânea e estável. Em contrapartida, o SDS foi capaz de dispersar rapidamente o óleo, havendo a abertura total do halo, porém esta atividade não foi estável e a camada se refez. Com isso, é possível observar a instabilidade do SDS em dispersar o óleo (**FIGURA 8**).

FIGURA 8. Dispersão de petróleo promovida pelos biossurfactantes na concentração de 400 mg/L e pelo SDS a 1 % (p/v) após 24 horas.

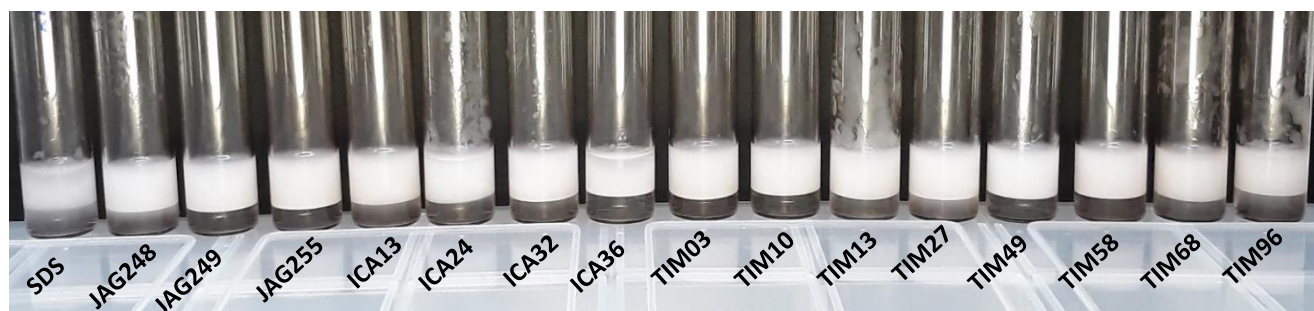


Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.1. Efeito da Temperatura, Pressão e Salinidade nas atividades tensoativas

Os biossurfactantes não tiveram suas atividades tensoativas prejudicadas após serem submetidos a pressão de 600 bar seguido de aquecimento a 121 °C por 15 min. Para a atividade emulsificante (**FIGURA 9**), os índices continuaram acima ou igual a 60%, utilizando a concentração de 400 mg/L. Para as moléculas produzidas pela estirpe JAG248 e TIM49, que tiveram os menores índice de emulsão antes do tratamento, houve um aumento significativo, com índice de emulsão final de aproximadamente 69%. Para o surfactante sintético SDS, no entanto, houve uma diminuição da atividade, tendo valor final de 25%.

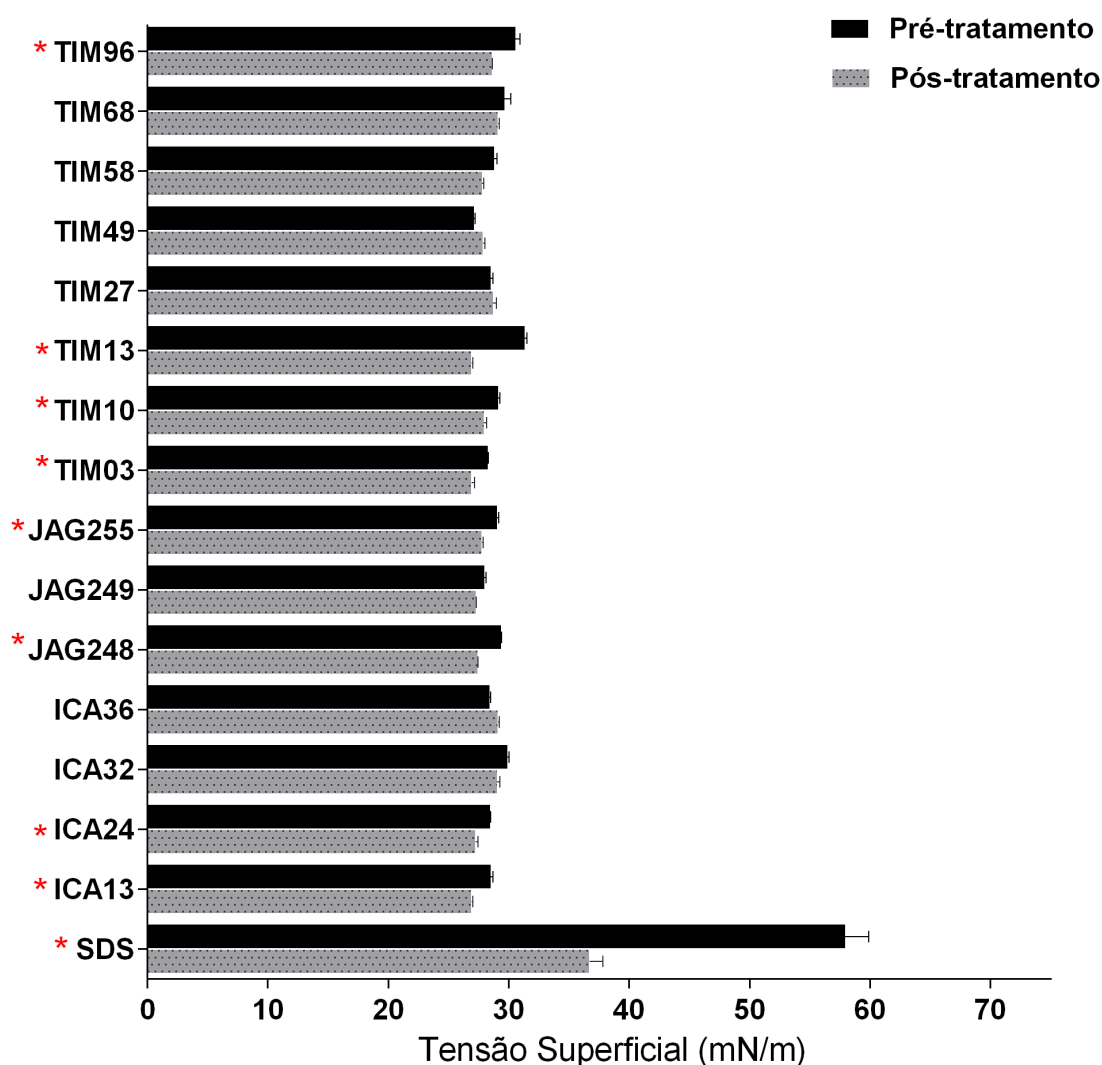
FIGURA 9. Emulsão água-querosene promovida pelos biossurfactantes e pelo SDS a 400 mg/L após passarem por pressão de 600 bar e autoclavação



Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores de redução da tensão superficial (**FIGURA 10**) promovidos pelos biossurfactantes após os tratamentos de pressão e temperatura permaneceram baixos, reduzindo a tensão superficial da água de 72 mN/m para uma faixa entre 27 a 31 mN/m. Foi observado que, para os biossurfactantes das estirpes ICA13, ICA24, JAG248, JAG255, TIM03, TIM10, TIM13 e TIM 96, os valores antes e pós tratamento foram significativamente diferentes, destacados com um asterisco vermelho na figura. Porém, essa diferença foi positiva, pois a capacidade redutora aumentou, com valores finais em torno de 28 mN/m. Para o SDS, houve também uma redução significativa positiva após o tratamento, com valor de 37 mN/m.

FIGURA 10. Medidas de Redução da Tensão Superficial antes e depois do tratamento com pressão de 600 bar seguido por autoclavação

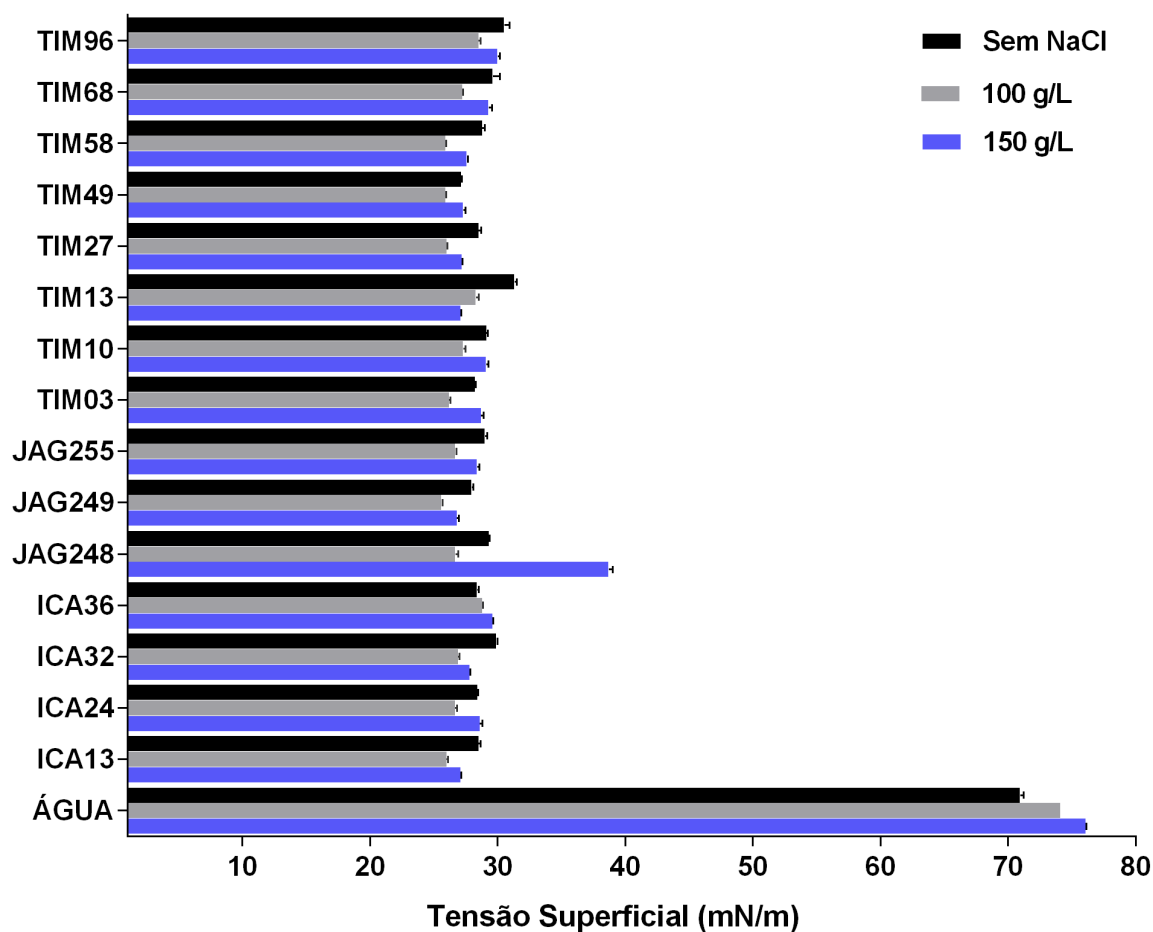


Fonte: Elaborado pela autora. Teste de variância (ANOVA), com pós teste de múltipla comparação (*Tukey*). Amostras com asterisco vermelho apresentaram diferença significativa entre os tratamentos.

Não foi observada nenhuma diferença significativa quanto a eficiência da atividade dispersante para todos os biossurfactantes testados. O SDS também permaneceu com atividade instável após o tratamento.

Utilizando altas concentrações de NaCl (100 e 150 g/L) não mostrou influência na atividade de redução de tensão superficial, para todos os biossurfactantes testados. Os valores de redução de tensão da água permaneceram abaixo de 30 mN/m (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Entretanto, é importante salientar que houve diferença significativa quando comparados os valores de tensão entre os tratamentos para cada biossurfactante. Na concentração de 100 g/L, os biossurfactantes reduziram ainda mais a tensão superficial, para valores abaixo de 29 mN/m. Na concentração de 150 g/L, também é possível observar essa maior redução, exceto para o biossurfactante produzido pela estirpe JAG248, que reduziu a tensão para $38,7 \pm 0,10$.

FIGURA 11. Redução da tensão superficial promovida pelos biossurfactantes deste estudo na concentração de 50 mg/L, em diferentes concentrações de NaCl



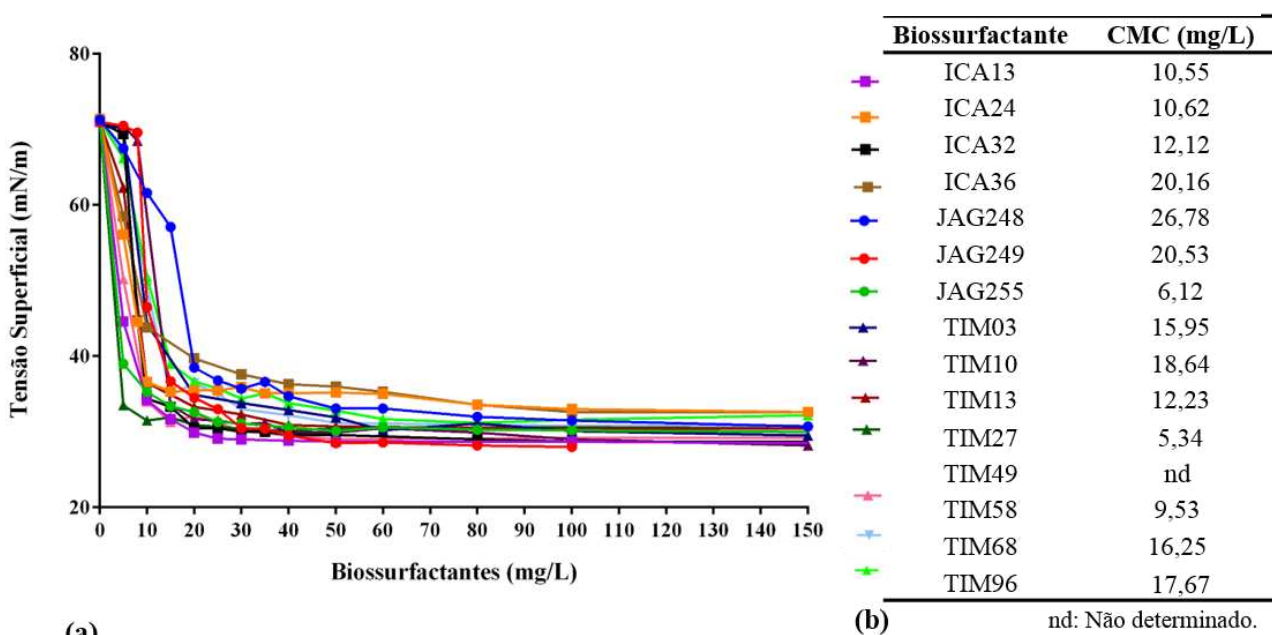
Fonte: Elaborado pela autora.

5.3. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A partir das medidas de redução da tensão superficial da água, em diferentes concentrações dos biossurfactantes, foi possível observar a eficácia dos mesmos em baixas concentrações (**FIGURA 12**).

Todas as estirpes deste estudo produziram biossurfactantes com CMC abaixo de 30 mg/L. Os biossurfactantes produzidos pelas estirpes JAG255 e TIM27 tiveram as menores CMCs, com valores respectivos de 6,12 e 5,34 mg/L. A CMC do biossurfactante produzido pela estirpe TIM49 não foi determinada pois os resultados foram inconsistentes, e deverá ser repetido.

FIGURA 12. Tensão superficial (mN/m) em função da concentração dos biossurfactantes em (a); Valores de CMC dos biossurfactantes estudados (b)



Fonte: Elaborado pela autora.

5.4. Análise do Rendimento e custo de produção

Os rendimentos dos biossurfactantes estão dispostos na **TABELA 5**. A produção por litro variou de 450 a 850 mg/L, destacando-se as estirpes JAG248, JAG255 e ICA24 como as maiores produtoras, com valores de 802, 846 e 720 mg/L. A estirpe TIM68 foi a menos produtiva, com rendimento final de 469 mg/L. O rendimento do biossurfactante produzido pela TIM49 não apresentou valores compatíveis com os demais, sendo preciso sua reavaliação.

TABELA 5. Rendimento dos biossurfactantes após liofilização

Estirpe	Rendimento (mg/L)
ICA13	535 ± 27
ICA24	720 ± 10
ICA32	564 ± 6
ICA36	602 ± 26
JAG248	802 ± 64
JAG249	627 ± 33
JAS255	846 ± 14
TIM03	609 ± 19
TIM10	598 ± 22
TIM13	647 ± 23
TIM27	588 ± 38
TIM49	nd
TIM58	618 ± 0
TIM68	469 ± 27
TIM96	593 ± 11

Fonte: Elaborada pela autora. nd: não determinado

Considerando os rendimentos obtidos, foi realizado um estudo de avaliação dos custos de produção desses biossurfactantes, de forma estimada. A **TABELA 6** sumariza os custos da matéria-prima utilizada para a produção e obtenção dos biossurfactantes liofilizados. O valor do custo da matéria-prima foi estimado em R\$ 7,21 para cada litro produzido.

TABELA 6. Custos da matéria-prima utilizada na produção dos biossurfactantes por litro

Matéria-prima	Custo (R\$/L)
Meio ATGE	0,26
Meio Mineral	
Cloreto de Sódio	0,11
Sulfato de Magnésio	0,02
Sulfato de Amônio	0,06
Fosfato de Potássio Monobásico	0,50
Fosfato de Sódio Bibásico	0,95
Extrato de Levedura	3,21
Glicose	0,50
Solução de Micronutrientes	
Sulfato de Zinco	1,33
Sulfato de Manganês	< 0,01
Sulfato de Ferro	< 0,01
Sulfato de Cobre	< 0,01
Nitrato de Cobalto	< 0,01
Tetraborato de Sódio	< 0,01
Precipitação	
Ácido Clorídrico	0,26
Hidróxido de Sódio	0,01
Total	7,21

Fonte: Elaborado pela autora.

A **TABELA 7** mostra os valores de venda dos biossurfactantes lipopeptídeos deste estudo por grama produzido. Considerando a matéria-prima, os valores comerciais dos biossurfactantes foram estimados para em média R\$ 11,69 (US\$ 3,02). O biossurfactante produzido pela estirpe JAG255 apresentou o menor valor de produção, explicado pelo seu maior rendimento comparado as demais amostras, com valor de R\$ 8,52 (US\$ 2,20) por grama comercializado.

TABELA 7. Resumo dos custos operacionais para a produção de lipopeptídeos e do seu valor de mercado

Estirpe	Custo biossurfactante (R\$/g)
ICA13	13,47
ICA24	10,01
ICA32	12,78
ICA36	11,97
JAG248	8,99
JAG249	11,49
JAG255	8,52
TIM03	11,84
TIM10	12,05
TIM13	11,14
TIM27	12,26
TIM49	nd
TIM58	11,66
TIM68	15,37
TIM96	12,16

Fonte: Elaborado pela autora. nd: não determinado

6. DISCUSSÃO

Os biossurfactantes são moléculas versáteis e promissoras, que ganham cada vez mais espaço no mercado e na indústria. Muitos pesquisadores ao redor do mundo procuram encontrar, classificar, avaliar e melhorar seu rendimento, para torná-los cada vez mais competitivos com sua contrapartida sintética. O laboratório de pesquisa Lembiotech tem como uma das principais linhas de pesquisa os biossurfactantes, buscando o entendimento da estrutura, funcionamento dessas moléculas e o escalonamento de produção.

Após a produção dos biossurfactantes analisados nesse estudo, suas características físico-químicas, sua estabilidade, bem como seu rendimento de produção e custo foram avaliados. A partir da análise por FTIR, A presença de picos característicos para os grupamentos carboxílicos, assim como característicos para peptídeos e ligações peptídicas demonstram com muita clareza que as moléculas estudadas pertencem ao grupo de biossurfactantes lipopeptídicos. Padrões semelhantes foram encontrados para moléculas da mesma classe, isoladas de diferentes organismos (BEZZA; CHIRWA, 2015; CHAKRABORTY; CHAKRABARTI; DAS, 2014; FANAEI; EMTIAZI, 2018; MEENA et al., 2018; PEREIRA et al., 2013; SHARAFI et al., 2014).

Os biossurfactantes lipopeptídeos são sintetizados de forma não ribossomal, onde é possível obter várias isoformas, que podem diferir quanto a composição e quantidade de aminoácidos presentes na porção peptídica, e também quanto ao comprimento da cadeia carbônica. As três principais famílias de lipopeptídeos são a surfactina, iturina e fengicina, podendo homólogos de cada família serem coproduzidos na mesma estirpe (COUTTE et al., 2010; PATHAK; KEHARIA, 2013; PHILIPPE, 2011). Os biossurfactantes lipopeptídeos são conhecidos por sua baixa concentração micelar crítica (CMC) e também pela sua capacidade de redução de tensão superficial (MNIF; GHRIBI, 2015c), além de outras propriedades funcionais, como emulsificação/desemulsificação, dispersão, formação de espuma, redutores de viscosidade, agentes de solubilização e mobilização, permitindo seu uso em muitos domínios industriais (MUTHUSAMY et al., 2008).

Além da análise por FTIR, técnicas como a cromatografia e espectrometria de massas, são utilizadas não apenas identificar a molécula como lipopeptídeo, mas para diferenciar as isoformas presentes numa amostra (FANAEI; EMTIAZI, 2018; FARIAS et al., 2018; YANG et al., 2015). A partir dos espectros obtidos através da espectrometria de massas, foi observado que todas as estirpes produzem as três famílias principais de lipopeptídeos. Além

disso, variações das isoformas, quanto ao número de carbonos da porção apolar, além da composição de aminoácidos da porção polar puderam ser observadas. O agrupamento permitiu observar que a maioria dos biossurfactantes produzidos por estirpes isoladas do manguezal Timonha e Jaguaribe produzem majoritariamente isoformas de surfactina e fengicina, enquanto que os produzidos pelas estirpes do manguezal Icapuí contém em maior intensidade isoformas de iturina e bacilomicina. A compreensão das isoformas presentes na amostra é de extrema importância para o seu direcionamento industrial, já que sua estrutura influencia no tipo de atividade tensoativa presente na amostra (MORIKAWA et al, 2000).

Quando avaliados por suas atividades tensoativas, os biossurfactantes se destacaram. Considera-se uma boa atividade emulsificante acima de 50% de emulsificação (DAS; DAS; MUKHERJEE, 1998). Excetuando-se os biossurfactantes produzidos por JAG248 e TIM49, os biossurfactantes produziram índices de emulsificação iguais ou maiores do que 60%. Os biossurfactantes também se mostraram tão bons quanto a Surfactina comercial (Sigma), usada como referência, em reduzir a tensão superficial da água. A maioria reduziu a tensão superficial para 30 mN/m enquanto a surfactina reduz para 28 mN/m (BARROS et al., 2007). Os resultados de redução de tensão superficial obtidos os biossurfactantes analisados neste estudo também são melhores do que os relatados por Batista et al. (2006) e Mnif et al. (2016).

A atividade dispersante de um biossurfactante nos mostra a sua capacidade de reduzir a atração coesiva entre partículas semelhantes, fazendo com que as mesmas se mantenham em suspensão, impedindo que se agreguem novamente (MNIF; GHRIBI, 2015b). Aqui, todos os biossurfactantes conseguiram dispersar o óleo de forma eficaz e rápida, mantendo estabilidade após o tempo de medição. Em contrapartida, o surfactante sintético testado (SDS) não mostrou bom desempenho, já que após 24 horas a camada de óleo voltou a se fechar. Geralmente, os biossurfactantes tem essa capacidade dispersante de óleo (DE SOUSA; BHOSLE, 2012; MNIF; GHRIBI, 2015b; SRIRAM et al., 2011), tendo aplicação na indústria petrolífera, pois levam a dessorção das moléculas hidrofóbicas nas superfícies rochosas do poço de petróleo, aumentando a mobilidade e a recuperação, além de estimular a sua biodegradação através dos microrganismos autóctones. Outras aplicações podem ser dadas a moléculas dispersantes, como em processos cerâmicos, farmacêuticos e coloidais (MNIF; GHRIBI, 2015b).

Outra característica importante para a indústria é a Concentração Micelar Crítica (CMC) do biossurfactante de interesse. Os biossurfactantes apresentam baixas CMCs, menores do que 30 mg/L. Geralmente, a CMC de biossurfactantes varia de 1 a 200 mg/L, enquanto que a de surfactantes sintéticos comumente utilizados como o SDS e o Corexit, tem valores entre 2000-2500 mg/L e 15-30 mg/L, respectivamente (FU et al., 2015; MULLIGAN; GIBBS, 2004). As CMCs dos biossurfactantes produzidos pelas estirpes TIM27, JAG255, ICA13 e ICA24 foram as mais baixas, com valores de 5,34, 6,12, 10,62 e 10,55 mg/L, respectivamente.

A CMC tem seus valores influenciados pelo comprimento da cadeia de ácidos graxos. Quanto maior a cadeia de ácidos graxos, menor será o valor da CMC, devido ao aumento da hidrofobicidade (LIU et al., 2015; MNIF; GHRIBI, 2015a). Quando analisamos a composição da amostra com menor CMC, vemos que a TIM27 possui isoformas de surfactina A e B de cadeias com 14 carbonos ou mais, e também fengicina com cadeias de 15 a 19 carbonos, que podem ter influenciado na sua baixa CMC. Assim como a TIM27, outras estirpes produziram isoformas com cadeias carbônicas longas. Porém, além da cadeia carbônica, a composição do anel peptídico também deve ser considerada. Biossurfactantes contendo grupos carregados em sua parte polar, têm CMC mais alta do que aqueles contendo grupos não carregados (zwitteriônicos). Isso deve-se a repulsão causada por esses grupos iônicos entre monômeros, dentro da micela (MNIF; GHRIBI, 2015a; ROSEN, 2004). Com isso, podemos inferir que a composição da porção polar, como também a concentração de cada isoforma produzida, podem ter sido fatores determinantes na CMC das amostras.

A estabilidade da estrutura da amostra é uma característica importante para a sua utilização comercial (JAIN et al., 2012a). Aqui, os biossurfactantes tiveram sua resistência térmica estrutural comprovada, através do DSC, corroborando com trabalhos de outros autores. Lipopeptídeos com termoestabilidade similares produzidos por *Nesterenkonia* sp. MSA31; *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 (KIRAN et al., 2017; SHARAFI et al., 2014) e biossurfactantes de outras classes produzidos por *Cronobacter sakazakii*, *Klebsiella* sp. RJ-03, *Bacillus methylotrophicus* USTBa e *Pleurotus djamor* também já foram reportados (CHANDANKERE et al., 2014; JAIN et al., 2012a, 2012b; VELIOGLU; UREK, 2016).

Além da resistividade estrutural dos biossurfactantes a altas temperaturas, é imprescindível que suas atividades tensoativas de interesse também permaneçam eficientes nessas condições. Geralmente, os biossurfactantes são vantajosos, permanecendo ativos em extremas condições de temperatura, pH e salinidade (KAPADIA; YAGNIK, 2013). Nesse

estudo, quando comparados os valores obtidos antes e após o tratamento com alta temperatura e pressão foi visto que, para a maioria dos biossurfactantes aqui estudados, não houve diferença significativa nas atividades tensoativas testadas, permanecendo eficientemente igual.

Bharali et al. (2011) estudaram o efeito não só da temperatura, mas também do pH e salinidade na atividade do biossurfactante produzido pela espécie *Alcaligenes faecalis*. Semelhante, Moro et al. (2018) testaram os mesmos efeitos para biossurfactantes produzidos por 5 estirpes de *Bacillus* sp. Como resultado, viram que na temperatura de 121 °C não houve alteração na capacidade emulsificante e redutora de tensão superficial, semelhante aos resultados aqui obtidos. Outros trabalhos também testaram o efeito da temperatura nas atividades tensoativas dos seus respectivos biossurfactantes de estudo, observando também a resistência dos mesmos (DING et al., 2017; KIM et al., 2000; WANG et al., 2018).

O efeito da salinidade, outro parâmetro importante já citado, também foi avaliado neste estudo. Nas concentrações testadas, os biossurfactantes permaneceram eficientes em 15% de NaCl. Além disso, o sal interferiu de forma positiva na atividade tensoativa testada. Nitschke e Pastore (2006) testaram diferentes concentrações de NaCl e viram que o biossurfactante produzido por uma estirpe de *Bacillus subtilis* foi eficiente até 20% de sal, com valores de redução abaixo de 30 mN/m. Semelhante, um lipopeptídeo derivado de *Leucobacter komagatae* mostrou forte estabilidade de sua propriedade de redução de tensão na adição de sal até 16% (SAIMMAI et al., 2012). É possível observar que o NaCl *per si*, em altas concentrações, aumenta a tensão superficial da água. Isso deve-se a interação das moléculas de água com os íons Na^+ e Cl^- dissociados. Essa interação iônica, juntamente com a interação água-água, aumenta a força coesiva e consequentemente a tensão superficial (OKUR et al., 2017). Mesmo assim, os biossurfactantes mantêm sua eficácia, diminuindo a tensão superficial.

No seu principal setor de aplicação, a indústria do petróleo, a utilização de biossurfactantes na extração de petróleo já é realizado com resultados satisfatórios (GAO; ZEKRI, 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Geralmente, os reservatórios de petróleo variam quanto as suas características físico-químicas sendo que, para a prática de MEOR ser eficiente, a temperatura deve ser entre 19 – 155 °C, a pressão menor que 295 bar e a salinidade menor que 15% (AWAN; TEIGLAND; KLEPPE, 2008; GUO et al., 2015; PATEL et al., 2015). Um dos reservatórios de pré-sal mais produtivos do Brasil, o campo de Lula (ANP, 2018), tem temperatura e pressão inicial de 64 °C e 569 bar, respectivamente (NAKANO et al., 2009). Diante disto, sabendo que todos os biossurfactantes aqui testados foram capazes de suportar

temperatura de 121 °C e pressão de 600 bar, além de salinidade de até 150 g/L permanecendo eficientes, estes seriam potenciais candidatos a recuperar o petróleo nesses reservatórios.

Para a sua comercialização, o rendimento de produção é a peça chave para diminuição dos custos. Dentre as classes de biossurfactantes, espécies produtoras de glicolipídeos, como soforolipídeos e ramnolipídeos possuem os mais altos rendimentos, o que diminui o preço de comercialização. Em contrapartida, estirpes produtoras de lipopeptídeos tem rendimentos baixos, mas seus lipopeptídeos possuem alto valor de mercado devido suas propriedades tensoativas excepcionais (DHANARAJAN; SEN, 2014).

O rendimento dos biossurfactantes foi em média de 700 mg/L. A partir do valor gasto com matéria-prima para produção e extração dos biossurfactantes, estimado em R\$ 7,21, temos que o preço por cada grama de lipopeptídeos produzidos seria em torno de R\$ 11,69 (US\$ 3,02). Isso demonstra que o custo de produção, considerando apenas a matéria-prima utilizada, já torna o preço de comercialização desses biossurfactantes alto. Porém, deve-se levar em consideração que nenhum processo de otimização das condições de cultivo foi realizado afim de obter um melhor rendimento.

Quando esses valores são comparados com o preço dos lipopeptídeos comercializados pela Sigma-Aldrich, com 98% de pureza (HPLC), como Surfactina (198.300,00 R\$/g), Iturina A (1.081.000,00 R\$/g) e Fengicina (563.600,00 R\$/g), vemos que os biossurfactantes deste estudo, mesmo sendo uma mistura de isoformas de lipopeptídeos, são muito mais baratos que os já comercializados. Além disso, vale salientar que os biossurfactantes aqui estudados possuem propriedades tensoativas e estabilidade semelhantes aos biossurfactantes purificados comerciais. Biossurfactantes com alto grau de pureza são necessários principalmente nas indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos. Entretanto, para utilização na extração do petróleo ou biorremediação de ambientes contaminados essas moléculas podem estar semipurificadas ou até mesmo utilizado o sobrenadante livre de células (SANTOS et al., 2016).

O SDS, também comercializado pela Sigma, tem preço estimado em 2,25 R\$/g comercializado. Mesmo tendo um preço maior que os surfactantes sintéticos comercializados, o custo-benefício dos biossurfactantes deste estudo é maior. Levando em consideração que a CMC do SDS é em torno de 2000 mg/L, e que a CMC dos biossurfactantes desse estudo é em torno de 30 mg/L, podemos observar que os biossurfactantes podem render cerca de 60 vezes

mais, sendo mais rentável sua utilização para a indústria e para o consumidor, mostrando que esses biossurfactantes são mais vantajosos, tanto em preço, quanto em estabilidade e eficácia.

O rendimento de produção dos biossurfactantes é influenciado diretamente por parâmetros como estirpe produtora, composição do meio e condições de cultivo. Como a matéria-prima possui impacto de até 80% no valor final dos biossurfactantes produzidos a partir de espécies de *Bacillus*, muitas estratégias como a utilização de resíduos industriais são utilizadas para aumentar o rendimento e diminuir os custos de produção (ABDELMAWGOUD; ABOULWafa; HASSOUNA, 2008; AKPA et al., 2001; KAUR et al., 2017; MEDEOT et al., 2017). Resíduos agroindustriais como licor de milho, farelo de soja, hidrolisado de soja, suco de caju, melaço, arroz, macarrão, mandioca e batata foram empregados com sucesso na produção de lipopeptídeos (DHANARAJAN; SEN, 2014; RANGARAJAN; CLARKE, 2015).

Dentre os componentes utilizados como matéria-prima, o extrato de levedura possui maior influência no preço final dos biossurfactantes deste estudo. Em sua composição contém proteínas, peptídeos de cadeia curta, carboidratos, aminoácidos livres e ácidos nucleicos, sendo uma fonte rica de carbono e nitrogênio, além de fonte de vitaminas e elementos traços essenciais (QAZI et al., 2013). Além do extrato de levedura, é utilizada uma fonte inorgânica de nitrogênio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, sendo também fornecidos elementos traços na solução de micronutrientes. Assim, estratégias futuras para estudar a influência do extrato de levedura na produção dos biossurfactantes, além dos outros componentes, podem ser empregadas, para diminuir os custos e também aumentar o rendimento de produção, tornando-os cada vez mais aptos a competir com os surfactantes sintéticos.

7. CONCLUSÃO

Os biossurfactantes de estirpes isoladas foram classificados como lipopeptídeos, sendo as isoformas surfactina, iturina, fengicina e bacilomicina produzidas. Sendo bons agentes redutores de tensão superficial, emulsionantes e dispersantes, apresentaram eficiência mesmo em condições extremas de pressão, temperatura e salinidade, se tornando aptos a aplicação industrial, principalmente na indústria do petróleo. A partir dos custos da matéria-prima utilizada, os biossurfactantes tiveram o seu valor estimado para em torno de R\$ 11,69/g. O biossurfactante produzido pela estirpe JAG255 mostra-se como o mais promissor, por apresentar uma das menores CMCs, maior rendimento e menor valor de mercado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAWGOUD, A.; ABOULWABA, M.; HASSOUNA, N. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305–325, 2008.

AKBARI, S. et al. Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, 2018.

AKPA, E. et al. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 91, n. 1–9, p. 551–561, 2001.

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

ANP. **Produção do pré-sal cresce 3,3% em julho e corresponde a 55,1% do total do Brasil**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/noticias/anp-e-p/4721-producao-do-pre-sal-cresce-3-3-em-julho-e-corresponde-a-55-1-do-total-do-brasil>>. Acesso em: 12 set. 2018.

ASHBY, R. D. et al. A Process Model for Approximating the Production Costs of the Fermentative Synthesis of Sophorolipids. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 16, n. 5, p. 683–691, 2013.

AWAN, A. R.; TEIGLAND, R.; KLEPPE, J. A Survey of North Sea Enhanced-Oil-Recovery Projects Initiated During the Years 1975 to 2005. **SPE Reservoir Evaluation & Engineering**, v. 11, n. 03, p. 497–512, 1 jun. 2008.

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

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 15 maio 2000.

BARRETO, R. V. G. **Prospecção de micro-organismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes em solo de manguezal**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, 2011.

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.

BEN AYED, H. et al. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1699–1707, out. 2014.

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, 2015.

BHARALI, P. et al. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 682–690, 1 ago. 2011.

BIE, X.; LU, Z.; LU, F. Identification of fengycin homologues from *Bacillus subtilis* with ESI-

MS/CID. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 3, p. 272–278, 1 dez. 2009.

BINIARZ, P.; ŁUKASZEWICZ, M.; JANEK, T. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 393–410, 2017.

CALDEIRA, A. et al. An artificial intelligence approach to *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051 cultures: Application to the production of anti-fungal compounds. **Bioresource technology**, v. 102, n. 2, p. 1496–1502, 2011.

CAMEOTRA, S. S. et al. Synthesis of Biosurfactants and Their Advantages to Microorganisms and Mankind. In: **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 261–280.

CAMPOS-TAKAKI, G. M.; SARUBBO, L. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C. Environmentally Friendly Biosurfactants Produced by Yeasts. In: **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 250–260.

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, 2014.

CHANDANKERE, R. et al. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. **Fuel**, v. 122, p. 140–148, 15 abr. 2014.

CHEN, H. et al. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 180–186, 2008.

CHEN, L. et al. Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8822–8827, nov. 2010.

CHEN, X. et al. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biology and Technology**, v. 115, p. 113–121, 2016.

CHO, S. et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS microbiology letters**, v. 223, n. 1, p. 47–51, 2003.

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

COOPER, D. G. Biosurfactants. **Microbiological sciences**, v. 3, n. 5, p. 145–149, 1986.

COUTTE, F. et al. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 499–507, 2010.

DAS, M.; DAS, S. K.; MUKHERJEE, R. K. Surface active properties of the culture filtrates of a *Micrococcus* species grown on n-alkanes and sugars. **Bioresource Technology**, v. 63, n. 3, p. 231–235, 1 mar. 1998.

DE SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem.

Bioresource Technology, v. 123, p. 256–262, 1 nov. 2012.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1 mar. 1997.

DHANARAJAN, G.; SEN, R. Cost analysis of biosurfactant production from a scientist's perspective. In: **Biosurfactants**. [s.l: s.n.]. p. 153–162.

DING, M. et al. Potential application of biosurfactants mixtures in high-temperature and high-salinity reservoirs. **Petroleum Science and Technology**, v. 35, n. 12, p. 1189–1195, 18 jun. 2017.

DU NOÛY, P. L. AN INTERFACIAL TENSIO METER FOR UNIVERSAL USE. **The Journal of general physiology**, v. 7, n. 5, p. 625–31, 1925.

FAKRUDDIN, M. Biosurfactant: production and application. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 124, p. 2, 2012.

FANAEI, M.; EMTIAZI, G. Microbial assisted (*Bacillus mojavensis*) production of biosurfactant lipopeptide with potential pharmaceutical applications and its characterization by MALDI-TOF-MS analysis. **Journal of Molecular Liquids**, 2018.

FARIAS, B. C. S. et al. Cyclic lipopeptide signature as fingerprinting for the screening of halotolerant *Bacillus* strains towards microbial enhanced oil recovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 3, p. 1179–1190, 2018.

FU, J. et al. A new technique for determining critical micelle concentrations of surfactants and oil dispersants via UV absorbance of pyrene. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 484, n. 5, p. 1–8, 2015.

GAO, C. H.; ZEKRI, A. Applications of Microbial-Enhanced Oil Recovery Technology in the Past Decade. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 33, n. 10, p. 972–989, 14 mar. 2011.

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23–32, 1 abr. 2018.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. THE BASICS OF MASS SPECTROMETRY IN THE TWENTY-FIRST CENTURY. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140, 2003.

GLOBAL MARKETS INSIGHTS. **Biosurfactants Market Size By Product, By Application, Industry Analysis Report, Regional Outlook, Application Potential, Price Trend, Competitive Market Share and Forecast, 2017 – 2024**, 2018. Disponível em: <www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report>

GONG, A.-D. et al. Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from Wheat Spikes against *Fusarium graminearum*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 2, p. e0116871, 2015.

GRAND VIEW RESEARCH. **Biosurfactants Market Analysis By Product And Segment Forecast To 2020**, 2015. Disponível em: <www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry>

GRIFFITHS, P. R.; DE HASETH, J. A. **Fourier transform infrared spectrometry**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2007.

GUO, H. et al. **Progress of Microbial Enhanced Oil Recovery in China**. SPE Asia Pacific Enhanced Oil Recovery Conference. **Anais...**Society of Petroleum Engineers, 11 ago. 2015Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.2118/174697-MS>>

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, n. 7, p. 985–992, 2005.

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. 176–179, 1995.

ISOGAI, A. et al. Structure of B-amino acids in antibiotics iturin A. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 30, p. 3065–3068, 1982.

JAIN, R. M. et al. Isolation and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium *Cronobacter sakazakii* isolated from oil contaminated wastewater. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 3, p. 2320–2326, 14 fev. 2012a.

JAIN, R. M. et al. Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1110–1116, 1 ago. 2012b.

KAPADIA, S. G.; YAGNIK, B. N. Current trend and potential for microbial biosurfactants. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8, 2013.

KAUR, P. K. et al. Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 1, p. 139–152, 2017.

KIM, P. I. et al. Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, p. 138–145, 2010.

KIM, S. H. et al. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 249, 1 jun. 2000.

KIRAN, G. S. et al. Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. and Its Application in Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1138, 28 jun. 2017.

KOUMOUTSI, A. et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. **journal of bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1084–1096, 2004.

LEE, M.-H. et al. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 12–18, 2016.

LI, L. et al. Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. **Crop protection**, v. 35, p. 29–35, 2012.

LIMA, L. B. **Frequência de bactérias produtoras de biosurfactantes lipopeptídicos em sedimentos de manguezais do ceará**. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, 2013.

LIU, Q. et al. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 93, p. 31–37, 2015.

LIU, W. et al. Isolation, identification and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BZ-6, a bacterial isolate for enhancing oil recovery from oily sludge. **Chemosphere**, v. 87, n. 10, p. 1105–1110, jun. 2012.

MA, Y. et al. Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC–ESI–MS/MS. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 79, 2016.

MARKETS AND MARKETS. **Biosurfactants Market by Type, Application and Region - Global Forecast to 2022**, 2017. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>>

MEDEOT, D. et al. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture. **Biological control**, v. 115, p. 119–128, 2017.

MEENA, K. R. et al. Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 03, p. 91-098, 2018.

MNIF, I. et al. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6690–6699, 9 abr. 2016.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Microbial derived surface active compounds: properties and screening concept. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 1001–1020, 2015a.

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, 1 maio 2015b.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 1 set. 2015c.

MORÁN, A. C. et al. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, n. 1, p. 65–71, 2000.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211–218, 2000.

MORO, G. V. et al. Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 759–769, 1 jul. 2018.

- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509–515, 2006.
- MULLIGAN, C. .; YONG, R. .; GIBBS, B. . Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 1 jun. 2001.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 1 jan. 2005.
- MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings-Indian National Science Academy Part B**, v. 70, n. 1, p. 31–56, 2004.
- MUTHUSAMY, K. et al. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**, v. 94, p. 736–747, 2008.
- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P. H. **Infrared Absorption Spectroscopy**. 2. ed. [s.l.] Emerson-Adams Press, 1977.
- NAKANO, C. M. F. et al. **Pre-Salt Santos Basin -Extended Well Test and Production Pilot in the Tupi Area - The Planning Phase**. Offshore Technology Conference. **Anais...Offshore Technology Conference**, 8 abr. 2009Disponível em: <<http://www.onepetro.org/doi/10.4043/19886-MS>>
- NIELSEN, S. M. et al. 1D Simulations for Microbial Enhanced Oil Recovery with Metabolite Partitioning. **Transport in Porous Media**, v. 85, n. 3, p. 785–802, 2010.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. BIOSSURFACTANTES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 336–341, 2006.
- OKUR, H. et al. The Jones-Ray effect reinterpreted: Surface tension minima of low ionic strength electrolyte solutions are caused by electric field induced water-water. **Chemical Physics Letters**, v. 684, p. 433–442, 2017.
- PATEL, J. et al. Recent developments in microbial enhanced oil recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 1539–1558, 1 dez. 2015.
- PATHAK, K. V. et al. Lipopeptides from the Banyan Endophyte, *Bacillus subtilis* K1: Mass Spectrometric Characterization of a Library of Fengycins. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 23, n. 10, p. 1716–1728, 2012.
- PATHAK, K. V.; KEHARIA, H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist, *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) tree using mass spectrometry. **3 Biotech**, v. 4, n. 3, p. 283–295, 2013.
- PECCI, Y. et al. LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 772–778, 2010.
- 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, 2013.

PETRIDES, D. Bioprocess design and economics. In: **Bioseparations Science and Engineering**. 2. ed. [s.l: s.n.].

PEYPOUX, F. et al. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. **The Journal of antibiotics**, v. 37, n. 12, p. 1600–1604, 1984.

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, 31 maio 1999.

PHILIPPE, J. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: **Biosurfactants: From Genes to Applications**. 1. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. p. 57–91.

PRICE, N. et al. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. **FEMS microbiology letters**, v. 271, n. 1, p. 83–89, 2007.

PUEYO, M. T. et al. Lipopeptides Produced by a Soil *Bacillus Megaterium* Strain. **Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 367–378, fev. 2009.

QAZI, M. A. et al. Yeast Extract as the Most Preferable Substrate for Optimized Biosurfactant Production by rhl B Gene Positive *Pseudomonas putida* SOL-10 Isolate. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 4, n. 7, 2013.

RANGARAJAN, V.; CLARKE, K. G. Process development and intensification for enhanced production of *Bacillus* lipopeptides. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 31, n. 1–2, p. 46–68, 3 jul. 2015.

REBELLO, S. et al. Biosynthesis and Technological Advancements of Biosurfactants. In: **Biosynthetic Technology and Environmental Challenges**. Singapore: Springer, 2018. p. 167–183.

ROONGSAWANG, N. et al. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. **Extremophiles**, v. 6, n. 6, p. 499–506, 2002.

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

ROY, A. A Review on the biosurfactants: properties, types and applications. **Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications**, v. 8, n. 248, p. 2, 2017.

SAFDEL, M. et al. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 159–172, 2017.

SAIMMAI, A. et al. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 2973–2986, 2012.

SANTOS, D. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **Internacional journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SARI, M.; KUSHARYOTO, W.; ARTIKA, I. M. Screening for Biosurfactant-producing Yeast:

- Confirmation of Biosurfactant Production. **Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 106–111, 1 mar. 2014.
- SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 8, p. 707–723, 2015.
- SATPUTE, S. K. et al. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.
- SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 6, p. 714–724, 2008.
- 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.
- SHARMA, V.; SHARMA, D. Microbial Biosurfactants: Future Active Food Ingredients. In: **Microbial Bioprospecting for Sustainable Development**. Singapore: Springer Singapore, 2018. p. 265–276.
- 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.
- SIÑERIZ, F. et al. PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS. In: **Encyclopedia of Life Support Systems**. [s.l: s.n.]. v. 5p. 386.
- SRIRAM, M. I. et al. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 174–181, 1 jul. 2011.
- STEIN, T. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 8, p. 1146–1152, 30 abr. 2008.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. In: **Biosurfactants and biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1987. p. 89–120.
- THATOI, H. et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 1–19, 2 mar. 2013.
- VAN BOGAERT, I.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 821–833, 2011.
- VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 142, 8 jun. 2006.
- VATER, J. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 Isolated from Petroleum Sludge. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.
- VELIKONJA, J.; KOSARIC, N. Biosurfactants : production, properties, applications. In: **Biosurfactants: Production: Properties: Applications**. New York: CRC Press, 1993. p. 419–

448.

VELIOGLU, Z.; UREK, R. O. Physicochemical and structural characterization of biosurfactant produced by *Pleurotus djamor* in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 3, p. 430–438, 22 jun. 2016.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants - types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 181, 2015.

WANG, X. et al. A thermotolerant surfactant-producing strain XT-1 applied for exogenous microbial enhanced oil recovery. **Petroleum Science and Technology**, v. 36, n. 8, p. 609–617, 18 abr. 2018.

WATROUS, J. et al. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. E1743–E1752, jun. 2012.

WIKLUND, S. et al. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 115–122, 2008.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–W257, 1 jul. 2015.

YANG, H. et al. Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 9, p. 2529–2542, 2015.

YUAN, J. et al. Recovery of several cell pellet-associated antibiotics produced by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 169–176, 2014.

ZHANG, S. et al. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 8, p. 1747–1755, 2012.

9. ANEXO

FIGURA 13. Espectros dos biossurfactantes produzidos por estirpes dos manguezais Icapuí e Jaguaribe obtidos pelo FTIR.

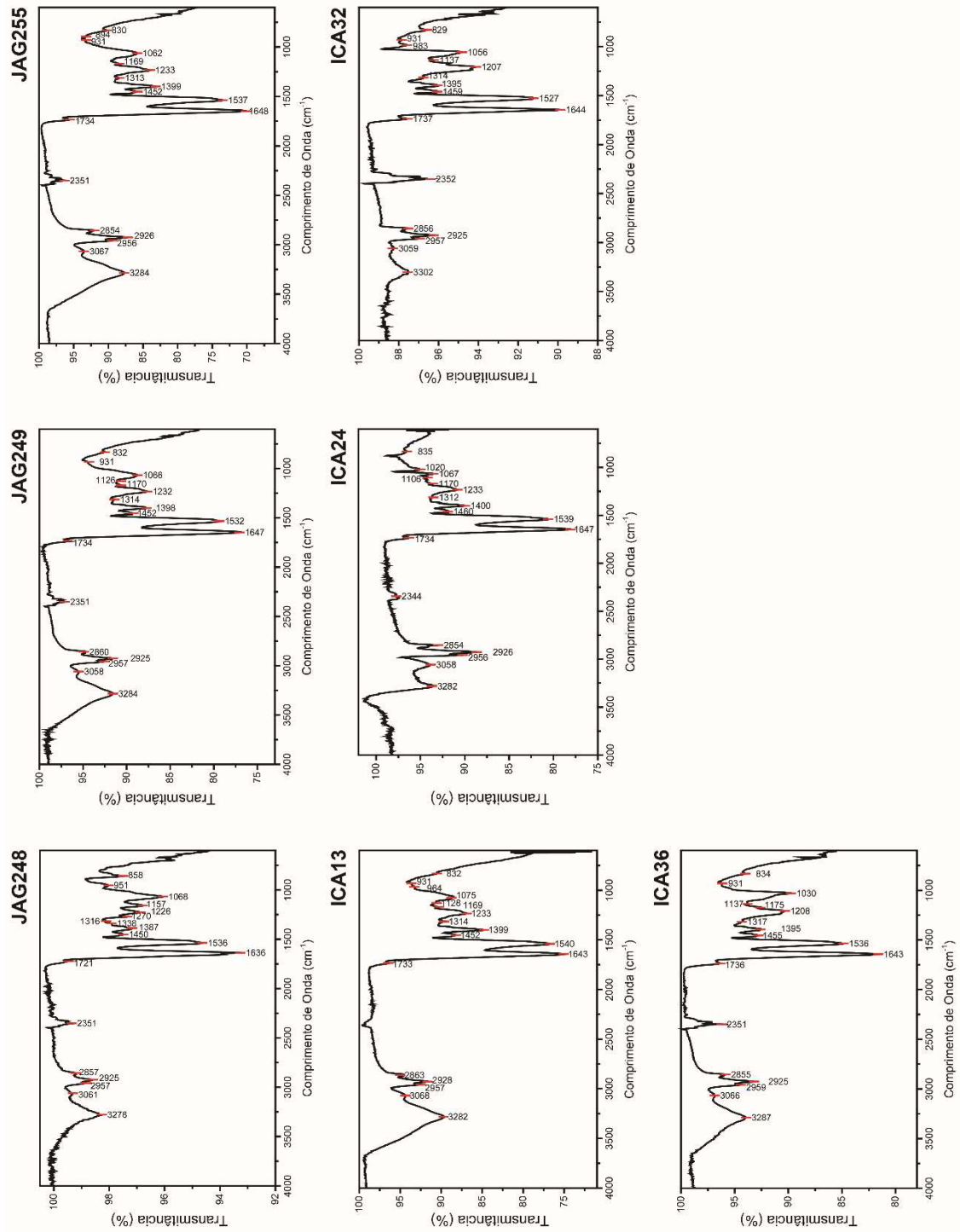


FIGURA 14. Espectros dos biossurfactantes produzidos por estirpes isoladas do manguezal Timonha.

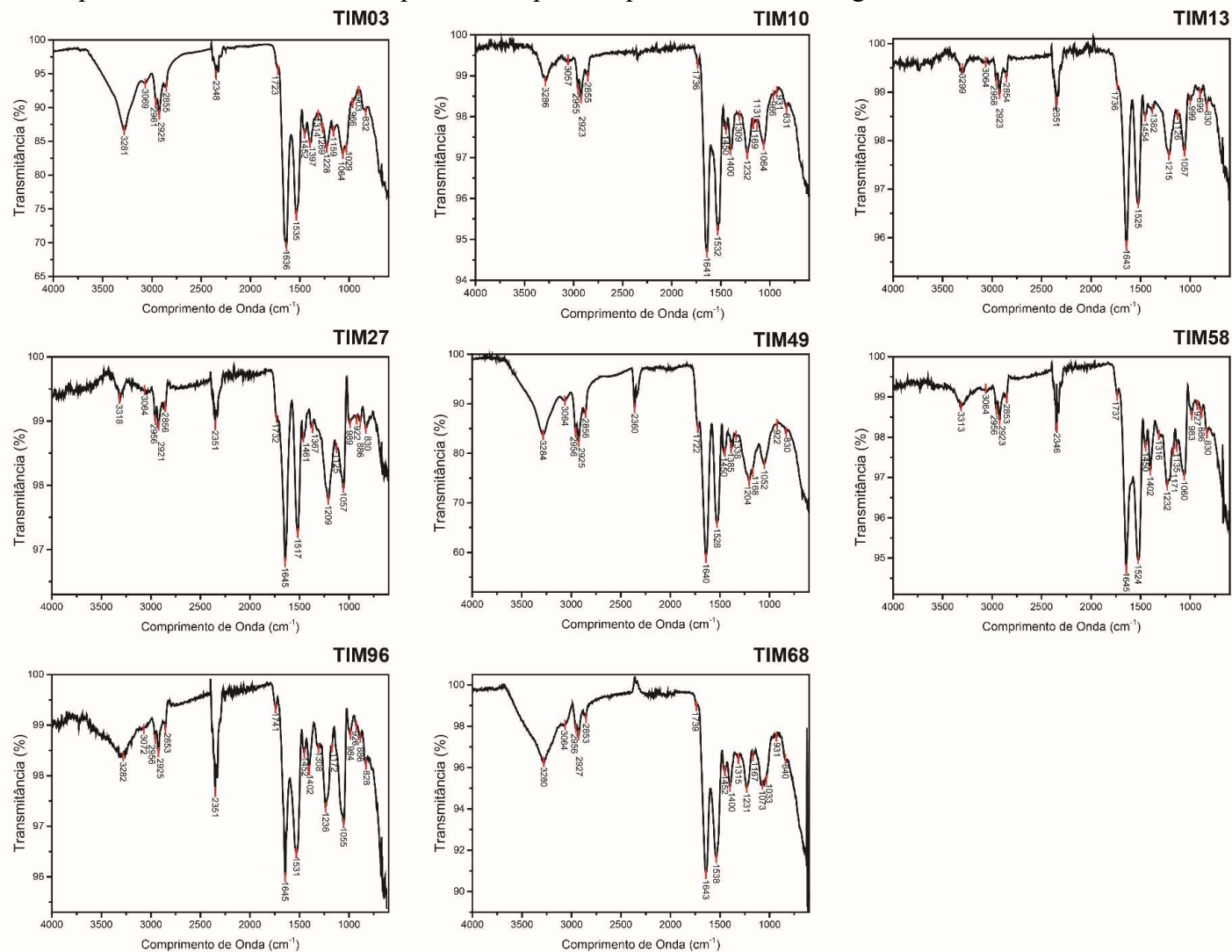


TABELA 8. Atribuições dos principais íons detectados por ESI-Q-TOF MS dos metabólitos produzidos pelas 14 estirpes de *Bacillus* sp. após processamento dos dados no programa MetaboAnalyst.

<i>m/z</i>	Tipo de Lipopeptídeo	Linhagens Produtoras	Referências
1008,66	C13 surfactina A [M+H] ⁺ /Leu7 C14 surfactina B [M+H] ⁺ /Val7	ICA13, TIM27, TIM10, TIM68, ICA36, TIM13	(BIE; LU; LU, 2009; GONG et al., 2015; LEE et al., 2016; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008; YANG et al., 2015)
1016,63	C12 surfactina A [M+Na] ⁺ /Leu7 C13 surfactina B [M+Na] ⁺ /Val7	JAG255, TIM96, TIM27, JAG249, TIM10, TIM68, ICA36, TIM13	(CHEN et al., 2008; KIM et al., 2010; STEIN, 2008)
1021,53	C14 bacilomicina L [M+H] ⁺	TIM96	(PEYPOUX et al., 1984; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008)
1022,68	C14 surfactina A [M+H] ⁺ /Leu7 C15 surfactina B [M+H] ⁺ /Val7 C13 bamilocina A [M+H] ⁺	JAG255, TIM96, TIM27, JAG249, TIM10, ICA36, TIM13	(BIE; LU; LU, 2009; GONG et al., 2015; LEE et al., 2016; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008)
1030,65	C13 surfactina A [M+Na] ⁺ /Leu7 C14 surfactina B [M+Na] ⁺ /Val7	TIM27, JAG249, TIM10, TIM68, ICA36, TIM13, TIM96, TIM58, JAG255	(CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; KIM et al., 2010; KOUMOUTSI et al., 2004; PECCI et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; STEIN, 2008; VATER et al., 2002; YANG et al., 2015)
1035,55	C15 bacilomicina L [M+H] ⁺	TIM96	(PEYPOUX et al., 1984; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008)
1036,70	C15 surfactina A [M+H] ⁺ /Leu7 C16 surfactina B [M+H] ⁺ /Val7	JAG255, TIM96, TIM27, JAG249, TIM10, ICA36, TIM13	(BIE; LU; LU, 2009; CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; LEE et al., 2016; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008; YANG et al., 2015)
1043,56	C14 iturina A [M+H] ⁺ /Asn1 C14 bacilomicina L [M+Na] ⁺	TIM03, JAG248, ICA13, ICA24	(BIE; LU; LU, 2009; CALDEIRA et al., 2011; CHEN et al., 2008, 2016; CHO et al., 2003; GONG et al., 2015; ISOGAI et al., 1982; PEYPOUX et al., 1984; STEIN, 2008; YANG et al., 2015; YUAN et al., 2014; ZHANG et al., 2012)
1044,66	C14 surfactina A [M+Na] ⁺ /Leu7 C15 surfactina B [M+Na] ⁺ /Val7	JAG255, JAG248, TIM96, TIM27, JAG249, TIM58, TIM10, TIM68, ICA36	(CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; KIM et al., 2010; KOUMOUTSI et al., 2004; PECCI et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; STEIN, 2008; VATER et al., 2002)
1045,56	C15 bacilomicina D (M+H) ⁺	ICA32, JAG255, ICA13	(PEYPOUX et al., 1984)
1046,62	C13 surfactina A [M+K] ⁺ /Leu7 C14 surfactina B [M+K] ⁺ /Val7	TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10	(STEIN, 2008)
1049,56	C16 bacilomicina L [M+H] ⁺	ICA 24, TIM 96, TIM 13	(PEYPOUX et al., 1984; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008)
1050,71	C16 surfactina A [M+H] ⁺ /Leu7 C17 surfactina B [M+H] ⁺ /Val7	JAG 255, TIM 27, TIM 58, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(WATROUS et al., 2012)

1053,54	C14 bacilomicina D [M+Na] ⁺	ICA 32, JAG 255	(PEYPOUX et al., 1984)
1057,58	C15 iturina A [M+H] ⁺ /Asn1 C15 bacilomicina L [M+Na] ⁺	TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24	(BIE; LU; LU, 2009; CALDEIRA et al., 2011; CHEN et al., 2008, 2016; CHO et al., 2003; GONG et al., 2015; ISOGAI et al., 1982; PEYPOUX et al., 1984; PUEYO et al., 2009; STEIN, 2008; YANG et al., 2015; YUAN et al., 2014; ZHANG et al., 2012)
1058,68	C15 surfactina A [M+Na] ⁺ /Leu7 C16 surfactina B [M+Na] ⁺ /Val7	ICA 32, JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 68, ICA 36	(CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; KOUMOUTSI et al., 2004; PECCI et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; STEIN, 2008; YANG et al., 2015)
1059,58	C16 bacilomicina D [M+H] ⁺ C14 bacilomicina L [M+K] ⁺	ICA 32, JAG 255, TIM 03, JAG 248	(PEYPOUX et al., 1984)
1060,63	C14 surfactina A [M+K] ⁺ /Leu7 C15 surfactina B [M+K] ⁺ /Val7	TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10	(STEIN, 2008)
1065,54	C14 iturina A [M+Na] ⁺ /Asn1	JAG 248, ICA 13, ICA 24	(CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; PUEYO et al., 2009; VATER et al., 2002; YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2012)
1066,64	C14 iturina A [M+Na] ⁺ /Asn1 C13 iturina [M+K] ⁺ /Asn1	JAG 248, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 68, TIM 13	(KIM et al., 2010; YUAN et al., 2014)
1067,55	C15 bacilomicina D [M+Na] ⁺	ICA 32, JAG 255, ICA 13, ICA 24	(PEYPOUX et al., 1984)
1071,59	C16 iturina A [M+H] ⁺ /Asn1 C16 bacilomicina L [M+Na] ⁺	ICA 32, JAG 255, TIM 03, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(CALDEIRA et al., 2011; CHO et al., 2003; ISOGAI et al., 1982; STEIN, 2008; YUAN et al., 2014)
1072,69	C16 surfactina A [M+Na] ⁺ /Leu7 C17 surfactina B [M+Na] ⁺ /Val7	ICA 32, JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, ICA 36	(CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; YANG et al., 2015)
1074,68	C15 surfactina A [M+K] ⁺ /Leu7 C16 surfactina B [M+K] ⁺ /Val7	ICA 32, JAG 255, JAG 248, TIM 96, JAG 249, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	(BEN AYED et al., 2014)
1079,56	C15 iturina A [M+Na] ⁺ /Asn1	ICA 32, JAG 255, TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24	(CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; PRICE et al., 2007; PUEYO et al., 2009; VATER et al., 2002; YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2012)
1080,66	C15 iturina A [M+Na] ⁺ /Asn1 C14 iturina A [M+K] ⁺ /Asn1	JAG 248, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	(GONG et al., 2015; KIM et al., 2010; YUAN et al., 2014)

C16 bacilomicina D [M+Na] ⁺			
1086,71	C17 surfactina A [M+Na] ⁺ /Leu7	ICA 32, JAG 255, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(VATER et al., 2002; WATROUS et al., 2012)
1087,53	C16 bacilomicina L [M+K] ⁺	ICA 32, JAG 255, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(PEYPOUX et al., 1984; STEIN, 2008)
1088,6	C16 surfactina A [M+K] ⁺ /Leu7	ICA 13, ICA 24, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(STEIN, 2008)
1093,57	C16 iturina A [M+Na] ⁺ /Asn1	TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24, TIM 68	(GONG et al., 2015; KIM et al., 2010; PUEYO et al., 2009; VATER et al., 2002; YUAN et al., 2014)
1097,57	C16 bacilomicina D [M+K] ⁺	JAG 255, TIM 03, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, TIM 13, ICA 36	(PEYPOUX et al., 1984)
1101,54	C17 bacilomicina L [M+K] ⁺	JAG 255, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	(PEYPOUX et al., 1984)
1107,59	C17 iturina A [M+Na] ⁺ /Asn1	TIM 03, TIM 68	(PRICE et al., 2007)
1123,50	C17 iturina A [M+K] ⁺ /Asn1	JAG 248, ICA 13, ICA 24, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(KAUR et al., 2017; WATROUS et al., 2012)
1447,82	C15 fengicina A [M+H] ⁺ /Ala6 Ácido graxo β-hidroxi mono-insaturado	JAG 255, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	(PATHAK et al., 2012)
1463,81	C16 fengicina A [M+H] ⁺ /Ala6 C14 fengicina B [M+H] ⁺ /Val6	ICA 32, JAG 255, TIM 03, JAG 248, ICA 13, TIM 96, JAG 249, TIM 68, ICA 36, TIM 13	(BIE; LU; LU, 2009; CHEN et al., 2008; GONG et al., 2015; KOUMOUTSI et al., 2004; LI et al., 2012; PATHAK et al., 2012; PECCI et al., 2010; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008; VATER et al., 2002; YANG et al., 2015)
1477,83	C17 fengicina A [M+H] ⁺ /Ala6 C15 fengicina B [M+H] ⁺ /Val6	JAG 255, TIM 03, JAG 248, ICA 13, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(BIE; LU; LU, 2009; CHEN et al., 2008, 2010; GONG et al., 2015; KOUMOUTSI et al., 2004; LI et al., 2012; PATHAK et al., 2012; PECCI et al., 2010; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008; VATER et al., 2002; YANG et al., 2015)
1485,80	C16 fengicina A [M+Na] ⁺ /Ala6 C14 fengicina B [M+ Na] ⁺ /Val6	JAG 255, TIM 96, JAG 249, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	(GONG et al., 2015; PATHAK et al., 2012)

1491,85	C18 fengicina A [M+H] ⁺ /Ala6 C16 fengicina B [M+H] ⁺ /Val6	ICA 32, JAG 255, ICA 13, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(BIE; LU; LU, 2009; CHEN et al., 2008; KOUMOUTSI et al., 2004; LI et al., 2012; PATHAK et al., 2012; PECCI et al., 2010; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008; VATER et al., 2002)
1495,86	C17 fengicina A [M+H] ⁺ /Ala6 C15 fengicina B [M+H] ⁺ /Val6 Cadeia Linear	ICA 36, TIM 13	(MA et al., 2016; PATHAK et al., 2012)
1499,82	C17 fengicina A [M+Na] ⁺ /Ala6 C15 fengicina B [M+Na] ⁺ /Val6	JAG 249, TIM 10, ICA 36, TIM 13	(GONG et al., 2015)
1505,86	C19 fengicina A [M+H] ⁺ /Ala6 C17 fengicina B [M+H] ⁺ /Val6	JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 13	(BIE; LU; LU, 2009; KOUMOUTSI et al., 2004; LI et al., 2012; PATHAK et al., 2012; PECCI et al., 2010; ROONGSAWANG et al., 2002; STEIN, 2008; VATER et al., 2002; YANG et al., 2015)
1510,86	C17 fengicina B [M+H] ⁺ /Ala6 Cadeia Linear	ICA 36	(LIU et al., 2012; PATHAK et al., 2012)

FIGURA 15. Espectros de massas (modo positivo), evidenciando os picos característicos dos lipopeptídeos comerciais (Sigma-Aldrich). Em (a) surfactina; (b) iturina; e (c) fengicina.

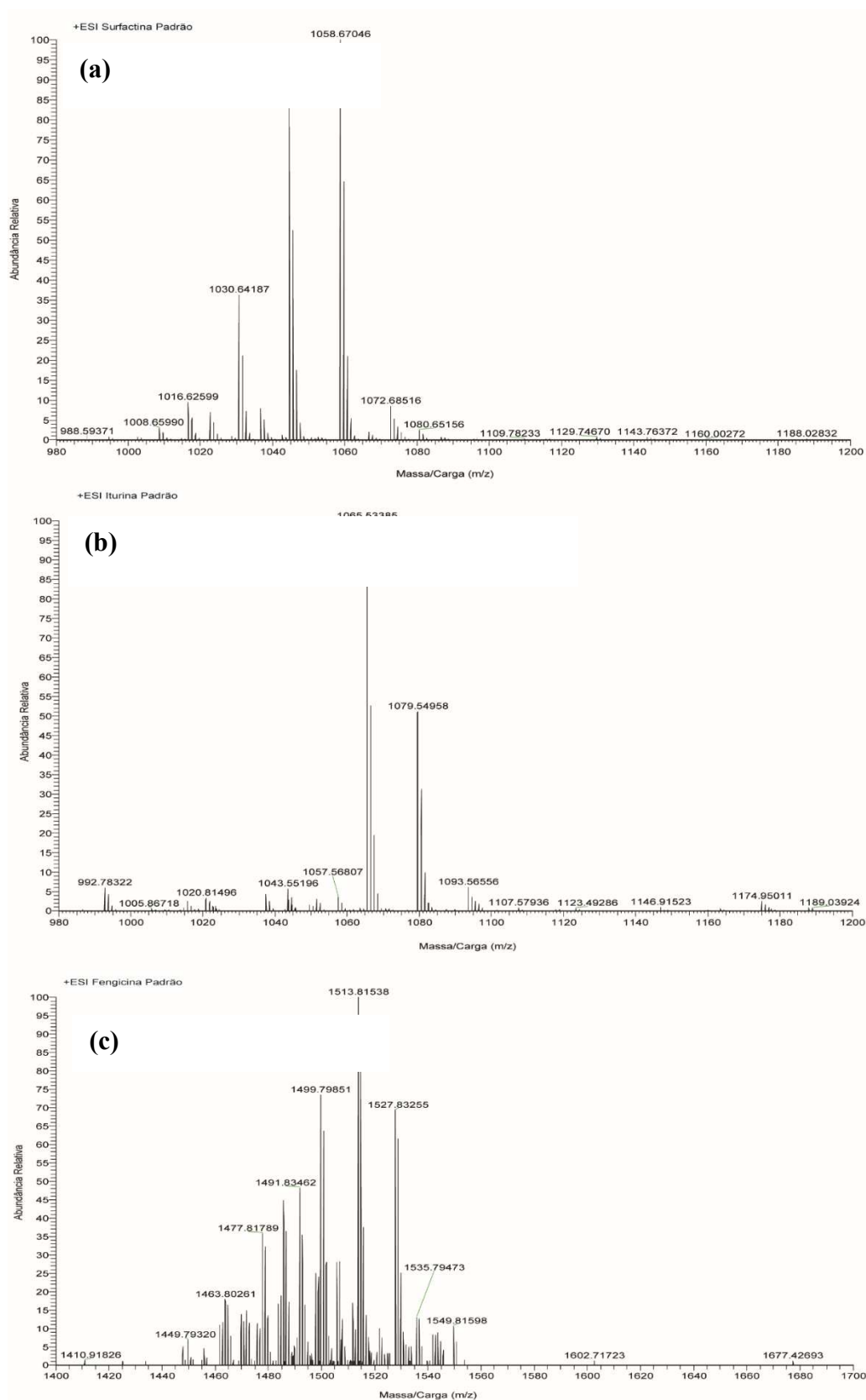


FIGURA 16. Espectros de Massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Icapuí.

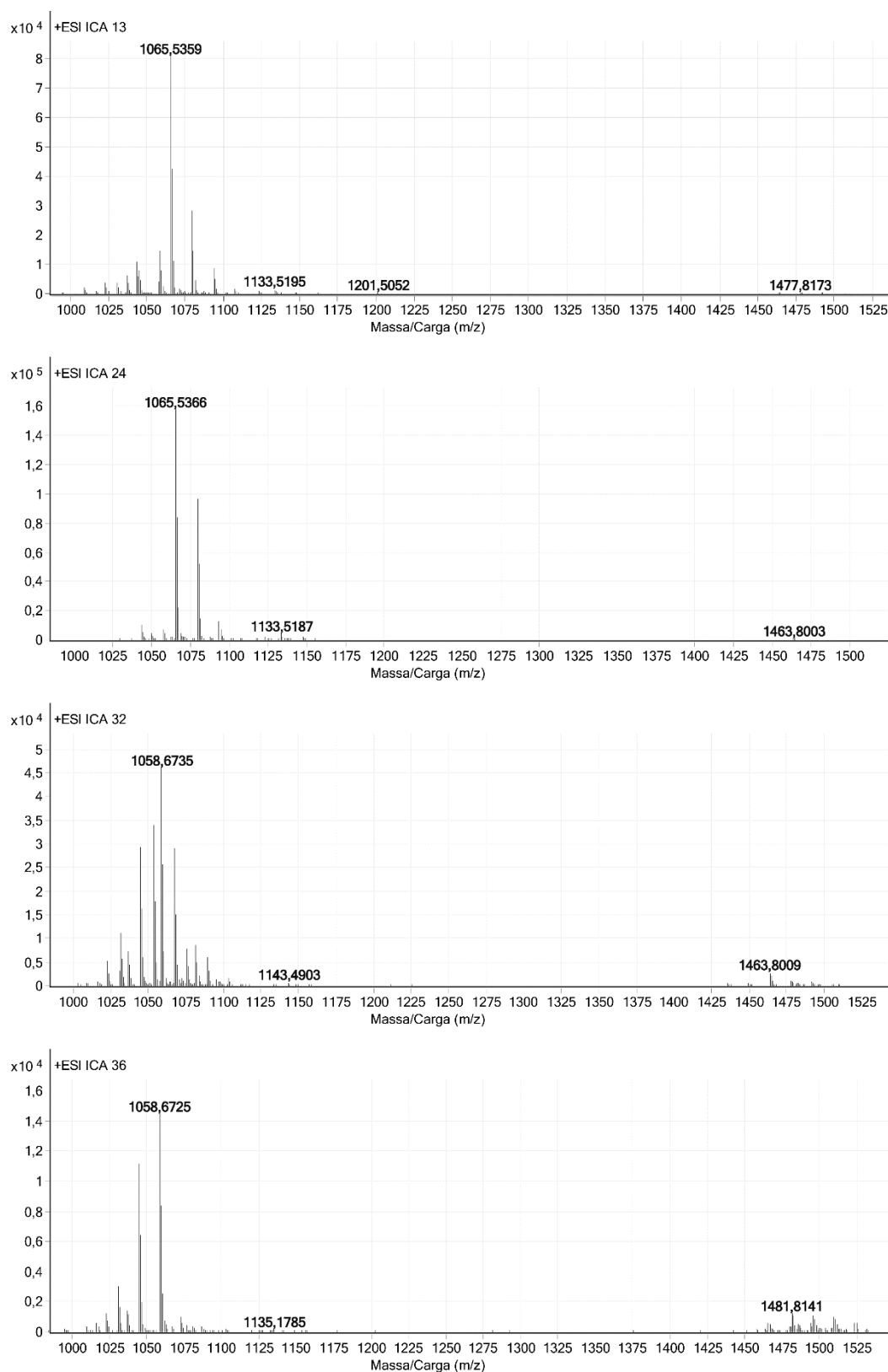


FIGURA 17. Espectros de Massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Jaguaribe

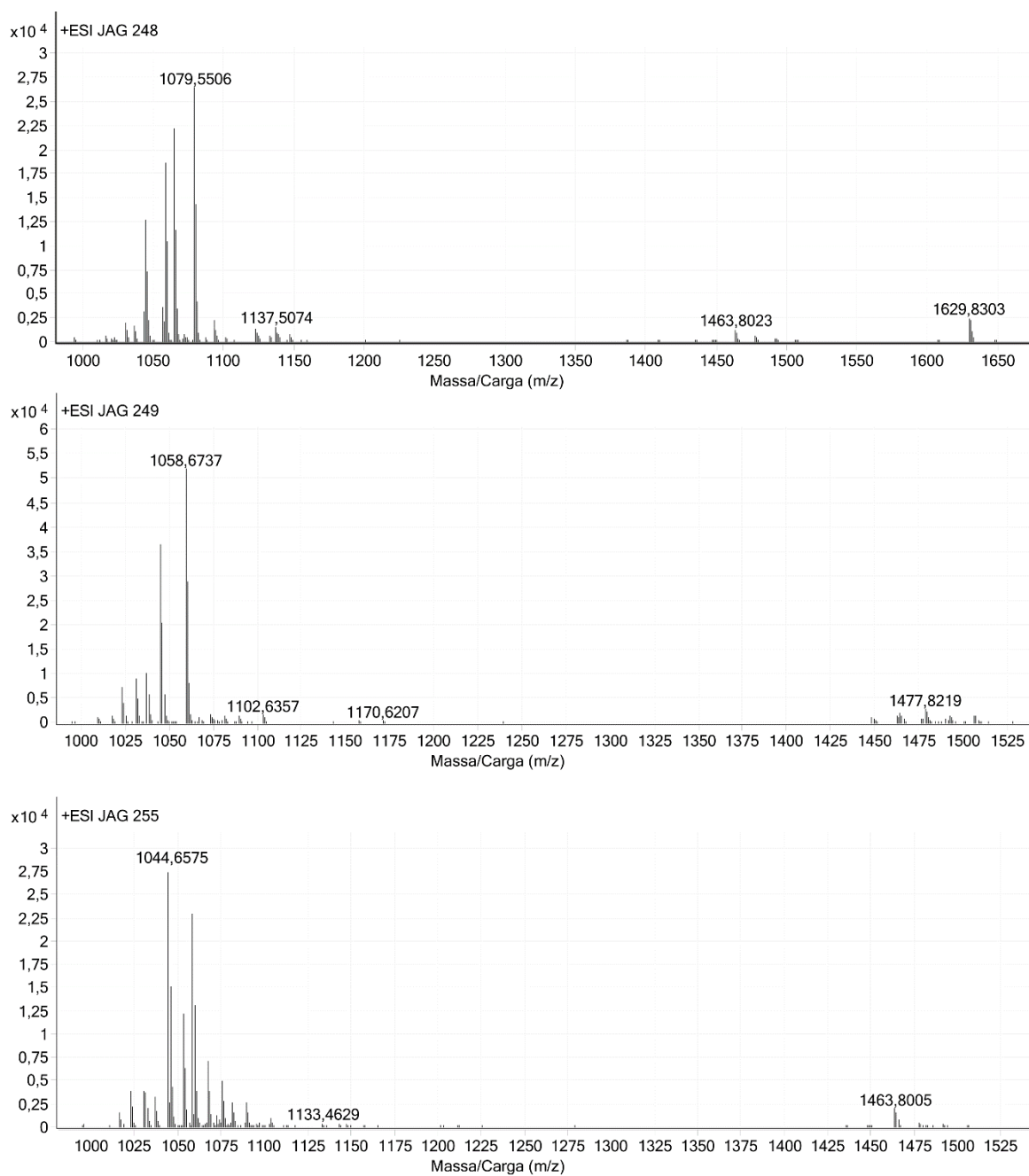
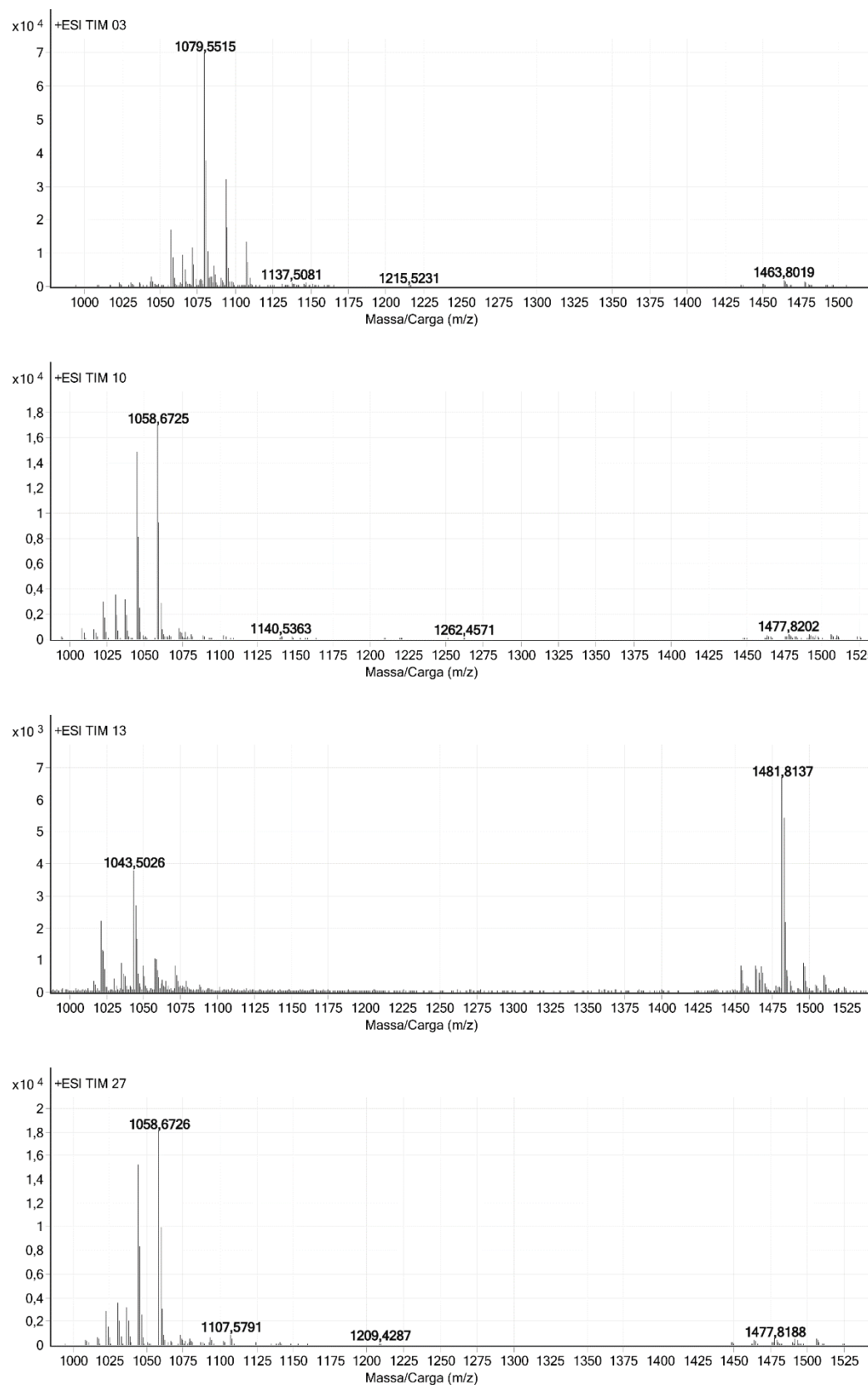


FIGURA 18. Espectros de Massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Timonha.



Continuação.

