



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**BÁRBARA CIBELLE SOARES FARIAS QUINTELA**

**BIOTECNOLOGIA APLICADA À RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO:  
INJEÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

**FORTALEZA**

**2018**

BÁRBARA CIBELLE SOARES FARIAS QUINTELA

BIOTECNOLOGIA APLICADA À RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO:  
INJEÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

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

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Cavalcante Hissa.

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)

---

Q71b Quintela, Bárbara Cibelle Soares Farias.  
Biotecnologia aplicada à recuperação avançada de petróleo : injeção de biossurfactantes / Bárbara Cibelle Soares Farias Quintela. – 2018.  
119 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.  
Coorientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Biossurfactantes. 2. Bacillus. 3. Lipopeptídeos. 4. MEOR. I. Título.

CDD 660.6

---

BÁRBARA CIBELLE SOARES FARIAS QUINTELA

BIOTECNOLOGIA APLICADA À RECUPERAÇÃO AVANÇADA DE PETRÓLEO:  
INJEÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 07/11/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Valéria Maia de Oliveira  
Universidade Estadual de Campinas (CPQBA)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marilene Henning Vainstein  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dávila Zampieri  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

A Deus.

À minha família, amigos e em especial, ao meu marido, Tiago Quintela, e minha filha Maria Cecília.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é um simples ato de valorização e reverência as pessoas que te fortaleceram e trilharam os caminhos da vida ao seu lado. Graças a Deus, tive a grandiosa oportunidade de cruzar caminhos de pessoas íntegras, competentes e companheiras. Logo, primeiramente, devo imensa gratidão a Deus por me conceder essa benevolência e por me conceder empoderamento e determinação para conquistar meus objetivos.

Agradeço imensamente à minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Vânia Melo**, pela paciência, confiança e pelos ensinamentos ao longo desses quase 10 anos. A senhora é muito mais que uma mãe científica para mim. Sempre se preocupou e cuidou de mim como uma filha legítima. Admiração é o maior sentimento que tenho pela senhora! O sucesso da família lembiotechiana é apenas um reflexo da sua competência. Meus sinceros agradecimentos! Vamos conquistar muitas coisas juntas ainda! Conte sempre comigo.

À minha co-orientadora e amiga, **Denise Hissa**, por acreditar em mim e pelo apoio incondicional, especialmente nos momentos mais difíceis. Muito obrigada pelo carinho, confiança, conversas e ensinamentos compartilhados.

Ao **Prof. Erivan Melo** pela disponibilidade e ajuda na obtenção dos dados físicos, pela construção da máquina de pressão e pela paciência.

Ao **Laboratório ThoMSom** na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e ao **Prof. Marcos Eberlin** e **Prof.<sup>a</sup> Dávila Zampieri** pelo acolhimento e auxílio com a espectrometria de massas.

Às professoras que aceitaram compor a banca desta tese: **Prof.<sup>a</sup> Valéria Maia**, **Prof.<sup>a</sup> Marilene Henning**, **Prof.<sup>a</sup> Valderez Rocha** e a **Prof.<sup>a</sup> Dávila Zampieri** agradeço desde já pela disponibilidade, zelo das correções e pelas sugestões valiosas. É um orgulho ter especialistas na área como avaliadoras do meu trabalho.

À minha **família, pais, irmãos** e especialmente minha **mãe** e **avó Clarice**, os alicerces que me sustentaram nos dias de indecisão e desânimo. Obrigada por acreditar no meu potencial e por não me deixar desistir dos meus sonhos.

Ao meu marido, **Tiago Quintela**, agradeço pela amizade, carinho, respeito, paciência e cumplicidade. Muito obrigada por me amparar, cuidar e me apoiar ao longo de tantos anos. Te amo!

À minha filha, **Maria Cecília**, obrigada por simplesmente existir! Você é o que tenho de mais belo e puro na minha vida. Seu sorriso e olhar me impulsionam a ser cada dia

melhor e a ter determinação para alcançar meus objetivos. Obrigada por ter me dado o privilégio de ser sua mãe. Te amo profundamente!

Aos atuais e ex-integrantes da família **LemBiotech**, pela amizade e companheirismo ao longo desta jornada. Esse caminho ao lado de vocês foi muito melhor, muito obrigada!

Em especial: aos meus pupilos - **Samuel Araújo, Gabrielly Oliveira, Brenda Gomes, João Alberto** - obrigada pela troca de experiências e por toda ajuda ao longo desse caminho; e às minhas amigas, **Mirella Leite e Walderly Melgaço**, por todo apoio, companheirismo, carinho, conversas, risadas e conselhos. Sem vocês não teria conseguido!

Às minhas eternas amigas, **Natália Falcão, Kizeane Fajardo e Vanessa Câmara** que mesmo trilhando caminhos tão diferentes e distantes mantivemos uma amizade verdadeira, carinho e cumplicidade durante todos esses anos. Muito obrigada por vocês existirem! Amo vocês.

Ao Sr. **Valdenor**, obrigada pelo sorriso sincero, motivação, dedicação e auxílio diário com a limpeza e conservação do nosso ambiente de trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (Bolsa de Doutorado de Demanda Social), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Bolsa Doutorado e auxílio financeiro, Processo nº. 407754/2013-0) e Petrobras (Termos de cooperação nº. 0050.0079828.12.9 e nº. 5850.0102772.16.9).

“Para criaturas tão pequenas como nós, a vastidão só é suportável através do amor”.

Carl Sagan.

## RESUMO

Surfactantes têm sido empregados na recuperação terciária de petróleo em reservatórios maduros. A injeção de surfactantes é utilizada para alterar a molhabilidade da rocha e reduzir a tensão interfacial entre óleo-água, aumentando o fator de recuperação de óleo do reservatório. O aumento da demanda por tecnologias verdes tem impulsionado o mercado mundial dos biossurfactantes e estimulado as pesquisas por novos compostos. Nesse contexto, este estudo avaliou as propriedades tensoativas de biossurfactantes produzidos por bactérias previamente isoladas de sedimentos de manguezais do Ceará, visando futuras aplicações na recuperação avançada de petróleo (MEOR). A partir de uma triagem guiada para a seleção de estirpes de bactérias produtoras de biossurfactantes foram identificadas 14 estirpes promissoras de *Bacillus*. Os biossurfactantes purificados foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho, calorimetria exploratória diferencial e espectrometria de massas, e tiveram suas propriedades tensoativas aferidas sob condições extremas de temperatura, salinidade e pressão e avaliados quanto a ecotoxicidade. Os biossurfactantes foram confirmados como lipopeptídeos das famílias surfactinas, iturinas e fengicinas. Detectou-se também um novo composto de  $m/z$  1629 com atividade desemulsificante. Oito estirpes se destacaram por produzirem majoritariamente isoformas de surfactina, que é um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos, e seis por produzirem bacilomicina e iturinas. Todos retiveram atividade de redução da tensão superficial, emulsificação e dispersão de óleo após autoclavação (121 °C/15 min) e pressão de 600 bar. A determinação da concentração micelar crítica de doze desses tensoativos variou de 5,34 a 26,78 mg/L. Nove desses produtos formaram emulsões água/óleo estáveis em presença de 100-150 g/L de NaCl e todos suportaram temperatura de até 250 °C. Dentre os quatorze biossurfactantes, doze foram capazes de inverter a molhabilidade de rocha carbonática a 50 mg/L, superando o surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (SDS). Os biossurfactantes não apresentaram toxicidade contra náuplios de *Artemia salina*. Com base nas características de emulsificação, redução de tensão, e molhabilidade, além da estabilidade sob condições de salinidade, temperatura e pressão comumente encontrados em reservatórios carbonáticos se destacaram aqueles produzidos pelas estirpes TIM 03 e TIM 96, identificadas como *B. amyloliquefaciens*, e ICA 24, identificada como *B. vallismortis*, para aplicações futuras em MEOR *ex situ*.

**Palavras-chave:** Biossurfactantes. *Bacillus*. Lipopeptídeos. MEOR.

## ABSTRACT

Surfactants have been used in the enhanced oil recovery of mature reservoirs. Injection of surfactants are used to alter rock wettability and reduce interfacial tension between oil and water, increasing the oil recovery factor of the reservoir. The increased demand for green technologies has boosted the world market for biosurfactants and stimulated research for new compounds. In this context, this study evaluated the tensioactive properties of biosurfactants produced by previously isolated bacteria from Ceará mangrove sediments, towards future applications in enhanced oil recovery (MEOR). A guided screening selected 14 biosurfactant-producing strains, identified as *Bacillus*. The purified biosurfactants were characterized by infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and mass spectrometry, their tensioactive properties were measured under extreme conditions of temperature, salinity and pressure and evaluated for ecotoxicity. The biosurfactants were confirmed as lipopeptides of the surfactin, iturin and fengycin families. A new compound of m/z 1629 with de-emulsifying activity was also detected. Eight strains have been shown to produce predominantly isoforms of surfactin, being considered one of the most potent biosurfactants known, and six for producing bacilomycin and iturins. All retained surface tension reduction, emulsification and oil dispersion activity after 121 °C/15 min and pressure of 600 bar. The determination of the critical micelle concentration of twelve of these surfactants ranged from 5.34 to 26.78 mg/L. Nine of these products formed stable water/oil emulsions in the presence of 100-150 g/L NaCl and all supported temperatures up to 250 °C. Among the fourteen biosurfactants, twelve were able to invert the wettability of carbonaceous rock at 50 mg/L, surpassing the synthetic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS). The biosurfactants did not present toxicity against *Artemia salina* nauplii. Based on the values of emulsification, surface tension reduction and inversion of wettability, summed to the stability under conditions of salinity, temperature and pressure commonly found in carbonate reservoirs, in this study two the biosurfactants produced by TIM 03 and TIM 96, identified as *B. amyloliquefaciens*, and ICA 24, identified as *B. vallismortis*, stood out towards *ex situ* MEOR applications.

**Keywords:** Biosurfactants. *Bacillus*. Lipopeptides. MEOR.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Visão geral das diferentes funções fisiológicas dos lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*..... 32
- Figura 2 – Estruturas dos principais homólogos da surfactina (C15), iturina (C13) e fengicina (C16). Isoformas: A) surfactina A; B) surfactina B; C) iturina A; D) iturina C; E) fengicina A; e F) fengicina B..... 36
- Figura 3 – Operons responsáveis pela biossíntese de lipopeptídeos em *Bacillus* spp. e suas respectivas configurações. Em (A) os módulos e operons responsáveis pela incorporação dos aminoácidos nas moléculas de iturina e bacilomicina, em (B) surfactina e (C) fengicina. .... 38
- Figura 4 – Representação esquemática da via biossintética da surfactina e os domínios do complexo multienzimático peptídeo sintetase (NRPS)..... 39
- Figura 5 – Agrupamento de 279 estirpes de bactérias isoladas de sedimentos de três manguezais do Ceará (Jaguaribe, Timonha e Icapuí) com base nas atividades de redução da tensão superficial e emulsificação do querosene, utilizando os sobrenadantes das culturas cultivadas em meio mineral por 48 h..... 54
- Figura 6 – Percentuais de emulsificações de querosene e hexadecano obtidos com os sobrenadantes das 14 estirpes selecionadas. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Tukey*. .... 56
- Figura 7 – Índices de emulsificações do querosene promovidos pelos sobrenadantes das culturas antes e após autoclavação a 121 °C por 15 min. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Sidak*..... 58
- Figura 8 – Emulsão do querosene promovido pelo sobrenadante da JAG 248 não autoclavado (à esquerda) e após autoclavação a 121 °C por 15 minutos (à direita)..... 58
- Figura 9 – Aspecto da emulsão A/O estabilizada por *Tween* 80 (controle) e sua completa dissolução após aplicação do sobrenadante bruto da cultura JAG 248..... 59

Figura 10 – Índices de emulsificações obtidos com as misturas dos sobrenadantes das culturas intra e inter manguezais. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de <i>Sidak</i> .....	60
Figura 11 – Emulsão do querosene promovida pelo SDS e pelos biossurfactantes na concentração de 400 mg/L após tratamento a 600 bar de pressão e autoclavação.....	61
Figura 12 – Redução da tensão superficial da água promovida por biossurfactantes e pelo SDS antes e após exposição a 600 bar de pressão seguido de autoclavação. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de <i>Tukey</i> .....	63
Figura 13 – Aspectos das emulsões do querosene promovidos por sobrenadantes da JAG 248 não autoclavados (A) e sobrenadantes autoclavados (B) em diferentes concentrações de NaCl. De 1 a 5, respectivamente: 0; 20; 100; 150 e 200 g/L de NaCl.....	64
Figura 14 – Efeito da concentração de NaCl (20, 100, 150 e 200 g/L) na emulsificação do querosene promovida por sobrenadantes das culturas cultivadas durante 48 h em meio mineral. Símbolos iguais significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de <i>Tukey</i> . ....	65
Figura 15 – Determinação da concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes....	66
Figura 16 – Dispersão de petróleo derramado em água do mar promovida por solução de SDS a concentração de 10.000 mg/L (A) e por soluções de biossurfactantes a concentração de 400 mg/L (B). ....	66
Figura 17 – Ensaio de inversão da molhabilidade de rocha carbonática com soluções surfactantes na concentração de 50 mg/L. Tubos da esquerda para direita: 1) controle negativo - água do mar; 2) JAG 248; 3) JAG 249; 4) JAG 255; 5) ICA 13; 6) ICA 24; 7) ICA 32; 8) ICA 36; 9) TIM 03; 10) TIM 10; 11) TIM 13; 12) TIM 27; 13) TIM 58; 14) TIM 68; 15) TIM 96; 16) SDS a 2.500 mg/L. ....	67

Figura 18 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo concatenado das sequências dos genes RNAr 16S, <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> das 14 estirpes produtoras de biossurfactantes. As relações evolutivas foram inferidas usando o método de Neighbor-Joining e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura-2 parâmetros no programa MEGA6. A estabilidade de cada ramo foi testada pelo método de <i>bootstrap</i> com 1.000 reamostragens e os valores estão próximos aos nós. ....	69
Figura 19 – Termogramas de DSC dos biossurfactantes estudados. ....	70
Figura 20 – Mapa ( <i>heatmap</i> ) do perfil lipopeptídico das 14 estirpes de <i>Bacillus</i> sp. (colunas) quando cultivadas em meio mineral por 48 h. Análise realizada no MetaboAnalyst 3.0 usando a distância Euclidiana e algoritmo de Ward através dos dados de <i>m/z</i> e respectivas intensidades obtidos por ESI(+)-Q-TOF MS. ....	76
Figura 21 – (A) Representação esquemática da projeção espacial dos 14 biossurfactantes analisados após análise multivariada por PLS-DA mostrando a forte correlação entre os grupos. (B) 25 principais íons ( <i>VIP scores</i> ) e suas respectivas magnitudes de contribuições para separação dos grupos. ....	78
Figura 22 – (A) Análise multivariada por OPLS-DA evidenciando a total segregação das amostras em 3 grupos coesos de cada manguezal, (B) <i>S-plot</i> mostrando as variáveis de maior contribuição para distinção entre os grupos. ....	80
Figura 23 – Ecotoxicidade dos biossurfactantes produzidos pelas 14 estirpes de bactérias contra náuplios de <i>Artemia salina</i> em comparação com surfactantes sintéticos, SDS e Triton X-100. ....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Produtos microbianos e seus papéis na recuperação melhorada de óleo.....	25
Tabela 2	– Classificação dos surfactantes e exemplos de surfactantes comerciais.....	28
Tabela 3	– Aplicações industriais de surfactantes químicos e biológicos.....	28
Tabela 4	– Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.....	30
Tabela 5	– Comparação de propriedades tensoativas e CMC de biossurfactantes com surfactantes sintéticos.....	30
Tabela 6	– Sequência peptídica e cadeias de ácidos graxos das diferentes variantes de cada família de lipopeptídeo produzidas por <i>Bacillus</i> spp.....	35
Tabela 7	– Caracterização das propriedades tensoativas e classe química de biossurfactantes produzidos por estirpes de <i>Bacillus</i> spp. isoladas de sedimentos de manguezais do Ceará.....	62
Tabela 8	– Identificação molecular consenso das estirpes bacterianas produtoras de biossurfactantes com base nas sequências dos genes codificadores para RNAr 16S, <i>gyrB</i> e <i>rpoB</i> com seus respectivos tamanhos e os números de acesso no GenBank.....	68
Tabela 9	– Descrição das bandas de FTIR nos dados comprimentos de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e seus respectivos modos de vibração.....	72
Tabela 10	– Principais massas características das isoformas de surfactina, iturina e fengicina descritas na literatura e encontradas nesse estudo.....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ATGE	Agar Triptona Glicose Extrato de Levedura
ATR	Reflecção Atenuada Total
b/d	Barris por dia
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CEOR	<i>Chemical Enhanced Oil Recovery</i>
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EOR	<i>Enhanced Oil Recovery</i>
ESI	Ionização por Eletrospray
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
<i>gyrB</i>	Subunidade $\beta$ da DNA girase
KS	$\beta$ -cetoacetil sintetase
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MEOR	<i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i>
MM	Meio Mineral
MS	Espectrometria de Massas
NRPS	Complexo Multienzimático Peptídeo Sintetase
OOIP	<i>Original Oil in Place</i>
OPEP	Organização dos Países Exportadores de Petróleo
OPLS-DA	Análise Discriminante por Projeções Ortogonais a Estruturas Latentes
PCP	Proteína Carreadora de Peptídeos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKS	Policetídeo Sintase
PLS-DA	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais
Q	Quadrupolo
Q <sup>2</sup>	Variância da Previsibilidade do Modelo
R <sup>2</sup>	Variância de Ajuste do Modelo
<i>rpoB</i>	Subunidade $\beta$ da RNA Polimerase
TOF	Tempo de Voo

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
2.1	<b>Petróleo: cenário atual</b> .....	21
2.2	<b>Recuperação de Petróleo</b> .....	22
2.2.1	<i>Métodos convencionais</i> .....	22
2.2.2	<i>Métodos Avançados de Recuperação de Petróleo (EOR)</i> .....	23
2.2.3	<i>Recuperação Microbiana Avançada de Petróleo (MEOR)</i> .....	24
2.3	<b>Surfactantes</b> .....	27
2.4	<b>Biossurfactantes</b> .....	29
2.5	<b>Lipopeptídeos</b> .....	31
2.5.1	<i>Família Surfactina</i> .....	33
2.5.2	<i>Família Iturina</i> .....	33
2.5.3	<i>Família Fengicina</i> .....	34
2.6	<b>Biossíntese de lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus</i> spp.</b> .....	37
2.7	<b>Regulação da via biossintética de lipopeptídeos em <i>Bacillus</i> spp.</b> .....	40
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	42
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
4.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	43
4.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	43
5	<b>METODOLOGIA</b> .....	44
5.1	<b>Prospecção de estirpes bacterianas promissoras para MEOR</b> .....	44
5.2	<b>Produção de biossurfactantes</b> .....	44
5.3	<b>Precipitação e purificação dos biossurfactantes</b> .....	45
5.4	<b>Índice de Emulsificação (IE24), Desemulsificação (ID24) e Redução da Tensão Superficial (TS)</b> .....	45
5.5	<b>Análise dos biossurfactantes após tratamento a alta temperatura e pressão</b> .....	47
5.6	<b>Concentração Micelar Crítica (CMC)</b> .....	47
5.7	<b>Ensaio de dispersão de óleo</b> .....	47
5.8	<b>Ensaio de inversão de molhabilidade de rochas carbonáticas</b> .....	48
5.9	<b>Identificação molecular das estirpes bacterianas</b> .....	48
5.9.1	<i>Extração do DNA genômico</i> .....	48

5.9.2	<i>Amplificação e sequenciamento dos genes 16S RNAr, rpoB e gyrB</i> .....	49
5.9.3	<i>Árvore Filogenética Concatenada</i> .....	50
5.10	<b>Caracterização dos surfactantes bacterianos</b> .....	50
5.10.1	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....	50
5.10.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> .	51
5.10.3	<i>Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-Q-TOF MS)</i> .....	51
5.10.3.1	<i>Processamento dos dados e Análise Estatística</i> .....	52
5.11	<b>Avaliação da ecotoxicidade dos biossurfactantes</b> .....	53
6	<b>RESULTADOS</b> .....	54
6.1	<b>Prospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes</b> .....	54
6.2	<b>Atividade Emulsificante (IE24) em diferentes fontes hidrofóbicas</b> .....	55
6.3	<b>Estabilidade dos biossurfactantes após exposição a altas concentrações de NaCl, pressão e temperatura</b> .....	57
6.3.1	<i>Efeito da temperatura na atividade emulsificante</i> .....	57
6.3.2	<i>Efeito combinado da alta temperatura e pressão nas atividades tensoativas</i> .....	60
6.3.3	<i>Efeito do sal na atividade emulsificante</i> .....	63
6.4	<b>Concentração Micelar Crítica (CMC) dos biossurfactantes</b> .....	65
6.5	<b>Ensaio de dispersão de óleo derramado em água do mar</b> .....	66
6.6	<b>Simulação de inversão da molhabilidade em rochas carbonáticas</b> .....	67
6.7	<b>Identificação Molecular e Análise Filogenética das estirpes bacterianas</b> .....	68
6.8	<b>Caracterização dos Lipopeptídeos</b> .....	70
6.8.1	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....	70
6.8.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> .	71
6.8.3	<i>Perfil de Lipopeptídeos por Espectrometria de Massas de Alta Resolução</i> .....	73
6.9	<b>Avaliação da ecotoxicidade dos biossurfactantes</b> .....	81
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	82
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	95
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96

<b>ANEXO A - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) EM FUNÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m) DOS BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS PELO CULTIVO DAS 14 ESTIRPES EM MEIO MINERAL.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO B - ESPECTROS DE FTIR (TRANSMITÂNCIA) DE BIOSURFACTANTES LIPOPEPTÍDEOS PRODUZIDOS POR 14 ESTIRPES DE BACTÉRIAS SELECIONADAS.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO C - 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.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO D - ESPECTROS DE MASSAS POR ESI-Q-TOF MS.....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A longevidade da utilização de petróleo na matriz energética mundial depende da descoberta de novos reservatórios e/ou do aumento do fator de recuperação de óleo dos reservatórios. Considerando as remotas chances de descobertas de novos grandes reservatórios, como os do pré-sal do Brasil, uma parte significativa da produção futura de óleo e gás virá de campos maduros, principalmente quando o declínio da produção for superado por meio de tecnologias mais eficientes de extração de óleo desses reservatórios.

A estratégia inicial de recuperação de petróleo envolve rendimentos naturalmente baixos, de 10 - 20%, e dependem basicamente da pressão natural do reservatório. O aumento desse rendimento para 40 - 50% envolve a injeção de fluidos no reservatório para a retirada do óleo, sendo nomeada recuperação secundária. No entanto, mesmo após estágios de recuperação primária e secundária, aproximadamente metade ou até 2/3 do petróleo continua inacessível, requerendo um terceiro estágio de recuperação. Atualmente, a recuperação melhorada do petróleo por métodos químicos (CEOR – do inglês *Chemical Enhanced Oil Recovery*) é a tecnologia mais utilizada, podendo aumentar a recuperação em até 30%. Esta tecnologia inclui o uso de gases, polímeros e surfactantes sintéticos. Além dessa, a indústria do petróleo pode se beneficiar com a recuperação avançada de petróleo por microrganismos (MEOR – do inglês *Microbial Enhanced Oil Recovery*), uma tecnologia ecologicamente sustentável para a recuperação terciária do petróleo, pois utiliza tanto microrganismos quanto seus produtos metabólicos, análogos aos usados no processo de CEOR, tais como gases, biossurfactantes, biopolímeros, solventes, biomassa e ácidos orgânicos.

Outro componente desafiador na recuperação de petróleo é que as reservas mais expressivas do mundo estão localizadas em reservatórios carbonáticos, onde se encontram grandes variações na permeabilidade do reservatório e uma molhabilidade de rocha desfavorável, ou seja, rocha molhável ao óleo. A molhabilidade da rocha do reservatório pode ser alterada, passando de molhável ao óleo para molhável à água, aumentando-se a absorção de água na rocha saturada de óleo, o que facilita o escoamento do óleo e aumenta a sua recuperação. Essa inversão de molhabilidade da rocha pode ser conseguida com a aplicação de surfactantes capazes de reduzir a tensão interfacial entre a rocha, o óleo e a água, como também pela alteração direta da molhabilidade da rocha.

Surfactantes são moléculas anfipáticas com atividade de superfície que podem ser obtidas por processos químicos (sintéticos) ou de fontes naturais (biossurfactantes). As propriedades dos surfactantes tornam-os adequados para uma ampla gama de aplicações industriais incluindo detergência, emulsificação, desemulsificação, lubrificação, capacidade

espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. Embora os biossurfactantes sejam potencialmente mais vantajosos do que os surfactantes sintéticos, a maioria deles ainda não é comercialmente competitiva devido ao alto custo de produção e o baixo rendimento nos processos de produção. A demanda da sociedade por produtos ecologicamente mais seguros justifica o crescente interesse do mercado global por biossurfactantes. Ressalta-se que para algumas aplicações, como a dispersão de óleo derramado no mar, os estudos são favoráveis à utilização de biossurfactantes como agentes dispersantes em substituição aos surfactantes químicos, tendo em vista a reconhecida ecotoxicidade destes últimos.

Os surfactantes são utilizados em praticamente todos os setores da indústria do petróleo, da extração do óleo ao seu refino. Além disso, estudos vêm confirmando o sucesso do emprego de biossurfactantes e/ou estirpes produtoras em MEOR. Portanto, o mercado global de biossurfactantes vem crescendo e alavancando a busca por novas estirpes produtoras, novas fontes de biossurfactantes e novos protocolos moleculares para a produção massiva desses compostos.

Um ambiente de alta produtividade biológica como os manguezais constitui fonte inestimável de novas estirpes e novos metabólitos microbianos. Os manguezais são ecossistemas costeiros encontrados apenas em regiões tropicais e subtropicais, caracterizados por seus sedimentos lamosos, anóxicos e salinos. A singularidade dos manguezais é reconhecida pelas adaptações de suas espécies de plantas para viverem nesses ambientes sujeitos a variações de temperatura, oxigênio, nutrientes e salinidade devido ao regime das marés. Supõe-se que os microbiomas associados aos sedimentos desses ecossistemas também apresentem adaptações a essas condições flutuantes e produzam metabólitos de valor biotecnológico.

Neste contexto, este estudo teve por objetivos avaliar a produção de biossurfactantes por estirpes de bactérias isoladas de sedimentos de manguezais e realizar a caracterização química, biológica e física destes compostos, visando aplicações em recuperação terciária de petróleo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Petróleo: cenário atual

O petróleo é o mais importante recurso energético e matéria-prima para a indústria química. Essa matriz energética impulsionou o desenvolvimento do mundo moderno e a economia global no século passado (DE ALMEIDA *et al.*, 2016) e ainda é a principal fonte de energia no mundo.

A teoria mais aceita é que o petróleo provém de transformações químicas e bacterianas da matéria orgânica acumulada por milênios em rochas de reservatórios de bacias sedimentares, submetida a altas temperaturas e pressão. Este óleo é constituído essencialmente por uma mistura de hidrocarbonetos, podendo conter outros elementos como enxofre, oxigênio, nitrogênio e elementos traços. Sua composição pode variar de acordo com o campo produtor e até entre poços do mesmo campo. Essa composição é com relação à proporção de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e não hidrocarbonetos, representados, respectivamente, por alcanos, benzenos e toluenos no estado líquido (CARDOSO, 2012).

De acordo com Anuário Estatístico de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2018), as reservas mundiais de petróleo atingiram a marca de 1,7 trilhões de barris, mantendo praticamente o mesmo patamar alcançado em 2016. Deste total, 71,8% das reservas pertencem aos membros da Organização dos Países Exportadores de Petróleo (OPEP), sendo o Oriente Médio o maior detentor de reservas petrolíferas do mundo (47,7% do total). As reservas das Américas Central e do Sul representam 19,5% do total mundial, o que configura algo em torno de 330,1 bilhões de barris. O volume de petróleo produzido no mundo em 2017 aumentou em relação a 2016, passando de 92 milhões de barris/dia para 92,6 milhões de barris/dia.

Os reservatórios do pré-sal estão entre as mais importantes descobertas de óleo na última década, colocando o Brasil numa posição estratégica no cenário global dos detentores de grandes reservas de petróleo. O pré-sal é composto por grandes acumulações de óleo leve, de excelente qualidade e com alto valor comercial. O Brasil ocupa a 10<sup>a</sup> posição no *ranking* mundial de produtores de petróleo, depois de um aumento de 4,2% na comparação anual, isto corresponde a 3% do total mundial e a um total de 957 milhões de barris (ANP, 2018).

A demanda mundial por energia continua crescendo a uma taxa elevada e a estimativa é que haja um aumento de 50% até 2030 (ALVAREZ *et al.*, 2015). De acordo com a Agência Internacional de Energia serão necessários mais de 100 milhões de barris por dia de petróleo para suprir a demanda energética mundial em 2021 (IEA, 2016). Para atender a essa crescente demanda energética há uma extrema necessidade de produzir cada vez mais petróleo

(SEN, 2008). Isso pode ser feito em virtude da exploração e descoberta de novos campos de petróleo ou pelo aumento do fator de recuperação de reservatórios maduros. Estima-se um aumento de 1,7% barris/ano entre os anos de 2000 a 2030. O consumo de petróleo deve chegar a 15,3 bilhões de toneladas anuais. Se os níveis atuais de consumo mundial forem mantidos, as reservas de petróleo disponíveis atendem a essa demanda por apenas 40 anos (DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

Diversos impactos ambientais negativos podem advir da atividade de perfuração de novos poços de petróleo, tais como: danos à fauna e flora devido à remoção da vegetação no local onde será perfurado o poço; erosão provocada pela destruição da vegetação; agressões ao meio ambiente causadas pelos resíduos dos fluidos de perfuração, fragmentos das rochas (cascalhos) perfuradas dispostos em diques de perfuração e/ou percolação de contaminantes para lençóis freáticos; e contaminação dos lençóis freáticos e aquíferos subterrâneos, causada por perdas dos fluidos de perfuração para as formações geológicas durante a perfuração; emissão de gases; geração de ruídos e vibrações, dentre outros (MARTINS *et al.*, 2015). Assim, novas metodologias de recuperação avançada de petróleo (EOR) precisam ser encontradas para explorar ao máximo as reservas petrolíferas (LI; ANASTAS, 2012) a de maneira sustentável. Esses métodos tentam superar os principais obstáculos à recuperação eficiente do petróleo, como a baixa permeabilidade de reservatórios, a alta viscosidade do petróleo bruto e as elevadas tensões interfaciais óleo-água que podem resultar em altas forças capilares que retém o óleo na rocha reservatório (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; RASHEDI; YAZDIAN; NAGHIZADEH, 2012).

## **2.2 Recuperação de Petróleo**

### **2.2.1 Métodos convencionais**

Durante o processo de extração de petróleo bruto, algumas tecnologias são adotadas para recuperar o máximo de óleo dos reservatórios. Os métodos primários de recuperação usam a pressão natural dos reservatórios para conduzir óleo e gás para poços de produção, conseguindo recuperar geralmente de 5 até 20% do óleo original no local (OOIP) (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Esse método de recuperação depende da energia interna dos reservatórios, das características da rocha e das propriedades dos fluidos hidrocarbonados (RASHEDI; YAZDIAN; NAGHIZADEH, 2012).

À medida que a pressão se dissipa, é necessário empregar métodos secundários que forneçam energia adicional para remover o óleo residual. A estratégia mais comum é o método

de injeção de água (*waterflooding*). Este método tem ação puramente mecânica, deslocando o óleo na direção dos poços produtores e recuperando desta forma um volume de óleo que não seria produzido pelo método de recuperação primária (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; YERNAZAROVA *et al.*, 2016).

No entanto, após exaurir os métodos convencionais de recuperação primária e secundária, a taxa mundial de recuperação de óleo atinge de 30 até no máximo 50% do OOIP, permanecendo mais de 5 trilhões de barris de óleo ainda presos no reservatório (BROWN, 2010; AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; GUDIÑA *et al.*, 2012; SAFDEL *et al.*, 2017). A estimativa é que possa chegar até 80% com as técnicas avançadas de recuperação (EOR) (YERNAZAROVA *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Métodos Avançados de Recuperação de Petróleo (EOR)**

Dentre as principais tecnologias terciárias existentes de recuperação avançada de petróleo estão as que fazem uso de métodos miscíveis, térmicos e químicos através da injeção respectiva de gases, polímeros sintéticos (*polymer flooding*) e surfactantes (*surfactant flooding*) (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; GUDIÑA *et al.*, 2012; SAFDEL *et al.*, 2017; SHENG, 2015).

Os métodos miscíveis visam à redução da tensão na interface entre os fluidos, aumentando a mobilidade do óleo no meio poroso. A intensidade das tensões interfaciais depende das propriedades dos fluidos (injetado e deslocado) e da rocha-reservatório. Os fluidos que podem ser utilizados para deslocamento miscível são preferencialmente o gás natural (gás miscível aos fluidos de reservatório), o dióxido de carbono e o nitrogênio (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; SANDERSEN, 2012)

Os métodos térmicos visam diminuir a viscosidade do óleo com o aumento da temperatura. O calor fornecido ao reservatório pode ser através de um fluido previamente aquecido ou através da queima parcial do óleo dentro do reservatório, isto é, combustão *in situ* (RASHEDI; YAZDIAN; NAGHIZADEH, 2012).

Dentre as tecnologias de EOR, as baseadas em produtos químicos são amplamente empregadas devido à facilidade de aplicação e disponibilidade de ampla gama de produtos (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Nos métodos químicos são injetados compostos que interagem com o fluido residual dos reservatórios, tais como: tensoativos, microemulsão, solução álcali, polímeros, e até combinações de álcali-surfactante-polímeros (SANDERSEN, 2012).

A injeção de surfactantes é utilizada para alterar a molhabilidade da rocha e reduzir a tensão interfacial entre óleo-água. Embora os surfactantes estejam entre os agentes preferenciais para operações de EOR, são um dos reagentes mais caros além de terem alguns problemas associados, como a perda devido à adsorção a rochas, e a baixa biodegradabilidade, não sendo, portanto, ecologicamente corretos (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Surfactantes catiônicos têm sido mais efetivos em reservatórios carbonáticos, e os aniônicos em reservatórios de arenito (SOFLA; SHARIFI; SARAPARDEH, 2016).

Tecnologias mais avançadas como estímulos sísmicos/sônicos e métodos eletromagnéticos também estão sendo empregadas, no entanto, o custo é o principal impedimento desses métodos (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011).

A MEOR está ganhando atenção devido à sua natureza ecologicamente correta; não depende do preço do petróleo; bactérias e nutrientes injetados são de baixo custo e fáceis de obter e manusear no campo; os efeitos da atividade bacteriana no interior do reservatório são magnificados com o crescimento das mesmas, enquanto que tecnologias EOR os efeitos dos aditivos tendem a diminuir com o tempo e distância (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007).

### **2.2.3 Recuperação Microbiana Avançada de Petróleo (MEOR)**

MEOR é um processo alternativo de recuperação terciária de petróleo onde microrganismos e/ou seus metabólitos (biomassa, biopolímeros, gases, ácidos, solventes, enzimas e biosurfactantes) são potencialmente úteis para aumentar a recuperação de até dois terços do óleo residual em reservatórios maduros (SEN, 2008; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; SUTHAR *et al.*, 2008).

O conceito do papel microbiano em EOR foi introduzido por Beckman em 1926. Em 1940, ZoBell e pesquisadores iniciaram aplicações e elucidaram os principais efeitos causados pelo uso de microrganismos na recuperação de óleo, patenteando o processo em 1947. Os principais microrganismos e os mecanismos-chave envolvidos no processo estão listados na Tabela 1. A formação de gases e aumento da pressão interna do reservatório; produção de ácido e degradação da matriz calcária; inversão da molhabilidade da rocha; emulsificação, redução da viscosidade do óleo e da tensão interfacial pela produção de surfactantes microbianos; produção de solventes; e degradação de macromoléculas do óleo, resultam no aumento da fluidez e mobilidade do óleo (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; HALIM *et al.*, 2017; LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007; SEN, 2008).

Tabela 1 – Produtos microbianos e seus papéis na recuperação melhorada de óleo.

Produtos	Microrganismos	Aplicação em recuperação de óleo
Biomassa	<i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Xanthomonas campestris</i>	Deslocar fisicamente o óleo; inversão da molhabilidade; degradação parcial seletiva do petróleo; umectação, alteração da viscosidade do óleo, dessulfuração; modificação da permeabilidade microbiana (obstrução seletiva)
Biosurfactantes	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Emulsificação; redução da tensão interfacial entre óleo e rocha; redução da viscosidade; inversão da molhabilidade
Biopolímeros	<i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Brevibacterium viscogenes</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Enterobacter</i> sp.	Aumentar viscosidade da água em <i>waterflooding</i> , aumentando a eficiência ao conectar zonas de alta permeabilidade; controle da mobilidade dos fluidos de injeção
Bio-solventes (álcoois e cetonas que são cosurfactantes)	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	Emulsificação; redução da viscosidade; dissolver e remover os hidrocarbonetos pesados da entrada dos poros (aumenta a permeabilidade efetiva)
Bio-ácidos (acético, láctico e butírico)	<i>Clostridium</i> sp., <i>Enterobacter aerogenes</i>	Aumento da permeabilidade e porosidade dissolvendo os precipitados de carbonato, reduzindo a viscosidade do óleo e facilitando emulsificação
Biogases (H <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> )	<i>Clostridium</i> sp., <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Methanobacterium</i> sp.	Aumento da pressão; inchaço do óleo; redução da tensão interfacial; redução da viscosidade e aumento da permeabilidade

Fonte: Adaptado de LAZAR; PETRISOR; YEN (2007) e AL-SULAIMANI *et al.* (2011).

Em 1954, o primeiro teste em campo foi realizado no campo Lisbon, Arkansas, EUA. Desde então, 47 estudos de caso em campo em 21 diferentes países foram conduzidos e apresentaram resultados de aumentos de produção significativos (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007; MAUDGALYA; KNAPP; MCINERNEY, 2007; PORTWOOD, 1995; SAFDEL *et al.*, 2017).

As tecnologias de MEOR são empregadas em duas abordagens diferentes *ex situ* ou *in situ*. A abordagem *ex situ* consiste na produção de bioprodutos fora do reservatório e sua posterior injeção sem ou com a separação das células microbianas, enquanto a abordagem *in situ* consiste na produção de bioprodutos dentro dos poços através da injeção de microrganismos alóctones e/ou injeção de nutrientes no reservatório para estimular a produção desses produtos por bactérias autóctones (BANAT *et al.*, 2010; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007).

Para serem úteis na recuperação de petróleo *in situ* os microrganismos devem ser capazes de tolerar as condições ambientais extremas, incluindo altas temperaturas, pressão e salinidades, assim como baixo ou nenhum teor de oxigênio (GUDIÑA *et al.*, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002; PATEL *et al.*, 2015). Várias espécies de *Bacillus* e *Clostridium* têm sido utilizadas com sucesso em MEOR (BASS; LAPPIN-SCOTT, 1997), uma vez que

podem formar endósporos resistentes às condições extremas dos reservatórios, além de produzirem biossurfactantes lipopeptídeos (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011).

A produção *in situ* de metabólitos é realizada em duas etapas. Primeiro, a água e o oxigênio são bombeados juntamente com sais minerais, nitrogênio e fósforo para ativar a microbiota indígena. Na presença de água e ar, as bactérias aeróbias oxidam hidrocarbonetos produzindo ácidos orgânicos de baixo peso molecular (acético, propiônico, butírico), álcoois (metanol e etanol), biossurfactantes e dióxido de carbono, aumentando a pressão no reservatório. No segundo passo, injeta-se água isenta de oxigênio no reservatório para ativar bactérias nativas anaeróbicas que metabolizam petróleo bruto em ácidos e gases (isto é, metano, dióxido de carbono). A acumulação desses biogases aumenta a pressão do reservatório. Se a pressão no reservatório for suficientemente alta, o metano pode ser dissolvido na fase de hidrocarboneto líquido, reduzindo a sua viscosidade. De forma semelhante, o dióxido de carbono também pode reduzir a viscosidade do óleo se a pressão na formação permitir a miscibilidade do CO<sub>2</sub> na fase oleosa. Uma redução da viscosidade melhora as propriedades de deslocamento do óleo através do reservatório aumentando a recuperação. Além disso, o CO<sub>2</sub> pode reagir com os minerais na rocha e dissolver o carbonato aumentando a permeabilidade da rocha de formação (YERNAZAROVA *et al.*, 2016).

Particularmente, a MEOR *ex-situ* mediada por biossurfactante é uma das tecnologias mais potentes, tendo várias patentes emitidas para o uso de biossurfactantes e microrganismos produtores relevantes (DE ALMEIDA *et al.*, 2016; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018). Grandes quantidades de óleo residual são recuperadas de campos de petróleo maduros devido à capacidade desses compostos em reduzir a tensão interfacial entre duas fases imiscíveis, de inverter a afinidade do óleo pela rocha matriz aumentando assim a mobilidade do óleo nos poros das rochas, facilitando a recuperação (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; AL-WAHAIBI *et al.*, 2016; GUDIÑA *et al.*, 2012; KHIRE; KHAN, 1994; PATEL *et al.*, 2015; SUTHAR *et al.*, 2008).

Embora existam muitas estratégias possíveis de MEOR, nem todas são viáveis na prática. Para processos mais eficientes devem ser considerados os custos de produção e desempenho do produto (SEN, 2008). Além disso, as estratégias de MEOR enfrentam o desafio inerente de avaliação individual de cada poço para selecionar o método mais adequado. As características físico-químicas de cada reservatório como litologia, porosidade, permeabilidade, salinidade, pH, temperatura e pressão, molhabilidade da rocha, densidade e viscosidade do óleo bruto, disponibilidade de nutrientes e as comunidades microbianas nativas devem ser avaliadas, pois, variam bastante e influenciam diretamente na recuperação melhorada de petróleo e no

sucesso da MEOR (BANAT, 1995; PATEL *et al.*, 2015). Safdel *et al.* (2017) compilaram os parâmetros ambientais de diversos campos petrolíferos de diferentes países que usaram MEOR, mostrando poços que a temperatura variou de 19-155 °C, salinidade de <10 até mais de 300 g/L e pressão <294 até aproximadamente 2.940 bar. Entretanto, alguns critérios mínimos devem ser atendidos para a prática de MEOR ser bem-sucedida, isto inclui que a permeabilidade do reservatório seja superior a 0,1 D, que a temperatura seja de até 90 °C, pressão interna menor que 300 bar e, de preferência, que o total de sólidos dissolvidos não exceda uma salinidade de 100 g/L (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; PATEL *et al.*, 2015).

De acordo com a Petrobras, dos dez poços com maior produção no Brasil, nove estão localizados na bacia de Santos. O Campo de Lula (ex-Tupi) pertence à província do pré-sal, está localizado a 290 km da costa e é considerado o maior campo produtor de petróleo do Brasil. Recuperar óleo no Campo de Lula significa enfrentar vários desafios, pois são carbonáticos, apresentam um potencial enorme de volume de óleo recuperável (estimado de 5 a 8 milhões de barris), profundidade de 5.000 a 5.500 m, a partir do nível do mar, espessura da camada de sal de até 2.000 m, pressão inicial do reservatório em torno de 568 bar e temperatura de 64 °C (NAKANO *et al.*, 2009).

Apesar disso, muitos métodos MEOR realmente prometem relevantes recuperações de petróleo e muitos dos bioprodutos (os biossurfactantes em particular) podem ter usos que transcendem as operações de recuperação de petróleo, o que pode tornar sua produção valiosa para uma infinidade de indústrias.

### 2.3 Surfactantes

Os surfactantes (**SURFace ACTIVE AgeNTS**) são compostos anfifílicos, orgânicos ou organometálicos, que se caracterizam por apresentar em sua estrutura um grupo apolar ou hidrofóbico (cauda) e um polar ou hidrofílico (cabeça) (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

A porção apolar é formada por hidrocarbonetos de cadeias alifáticas (linear ou ramificada), grupos aromáticos ou cíclicos. A porção polar contém átomos que apresentam cargas, como por exemplo: grupamentos éster, fosfato, aminoácidos, carboxilato ou carboidrato, formando pólos eletrostáticos (BANAT, 1995; MULLIGAN, 2009). A carga total do grupamento polar confere maior ou menor solubilidade da molécula em água e permite classificar os surfactantes em: aniônico (carga negativa); catiônico (carga positiva); não iônico (não possui carga) e zwitteriônico ou anfótero (ambas as cargas) (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2006). A Tabela 2 apresenta tipos de surfactantes sintéticos de diferentes grupos.

Tabela 2 – Classificação dos surfactantes e exemplos de surfactantes comerciais.

Tipo	Surfactante
<b>Aniônico</b>	Estearato de Sódio; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); Dihexadecil Fosfato; Brometo de Dodeciltrimetil Amônio
<b>Catiônico</b>	Cloreto de laurilamida; Cloreto de trimetil dodecilamônio; sais Quaternários de Amônio
<b>Não iônico</b>	Polioxietileno Dodecanol; Polioxietileno p-ter-octil fenol (Triton X-100); Aquilfenol Etoxilato; Polisorbatos (Tween 80)
<b>Zwitteriônico</b>	Dodecilbetaina; Lauramidopropil Betaina; Dodecildimetil Amônio Propano Sulfato

Fonte: VAN HAMME; SINGH; WARD (2006).

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, esses compostos tendem a se distribuir nas interfaces com diferentes graus de polaridade, reduzindo a tensão superficial e interfacial, aumentando a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou compostos orgânicos insolúveis (BANAT *et al.*, 2010; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007). Baseado nessas propriedades, os surfactantes são amplamente utilizados em diversos ramos industriais pois apresentam propriedades como adsorção, formação de micelas, formação de macro ou microemulsões, dispersão ou agregação de sólidos, ação espumante ou antiespumante, solubilidade, umectância ou detergência (SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; TADROS, 2009). A Tabela 3 traz uma compilação das aplicações e funções de surfactantes sintéticos e naturais.

Tabela 3 – Aplicações industriais de surfactantes químicos e biológicos.

Ramo	Aplicações	Função do surfactante
<b>Petróleo</b>	Extração, Transporte e Tratamento de Resíduos	Redução da viscosidade de óleo; inversão da molhabilidade da rocha; controle deposição de parafina/asfalto; estabilização de emulsões; solubilização, dispersão e mobilização de óleo
	Limpeza de Tanques	Redução da viscosidade de óleo; emulsificação borra oleosa; dispersão de hidrocarbonetos
	Recuperação de Petróleo (MEOR)	Redução da viscosidade de óleos, recuperação de óleo residual; inversão da molhabilidade da rocha
	Desemulsificante	Desemulsificação de emulsões, solubilização, redução da viscosidade, agente umectante
<b>Ambiental</b>	Anti-corrosivo e Biocida	Condicionamento e adsorção em superfícies metálicas; controle de bactérias redutoras de sulfato – atividade antimicrobiana
	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos, agente sequestrante de metais
	Remediação <i>Soil washing and flushing</i>	Emulsificação por aderência ao hidrocarboneto, dispersante, agente espumante, detergente
<b>Biológico</b>	Microbiologia	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular; acesso a nutrientes; competição contra patógenos
	Farmacêutica e Terapêutica	Anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, agentes penetrantes e umectantes; moléculas imunomoduladoras, vacinas; terapia gênica
<b>Agricultura</b>	Biocontrole	Facilita mecanismos associados ao microrganismo como parasitismo, competição, resistência sistêmica induzida e hipovirulência
<b>Cosmética</b>	Cosmética	Emulsificantes, agentes de espuma, solubilizadores, umectantes, agentes de limpeza
<b>Alimentos</b>	Ingrediente Funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos, agente protetor
	Alimentos	Emulsificantes, desemulsificantes e dispersantes; espessante; removedor de ceras de frutas e vegetais

Fonte: Adaptada de DE ALMEIDA *et al.* (2016); SINGH; VAN HAMME; WARD (2007).

Desde a sua introdução no cenário industrial, o uso de surfactantes sintéticos tem aumentado continuamente e, como resultado, os surfactantes estão atualmente entre os produtos químicos sintéticos mais comercializados em termos de volume produzido globalmente. As matérias-primas para a produção de surfactantes sintéticos é majoritariamente de origem petroquímica (LI; ANASTAS, 2012). No entanto, o aumento da demanda por soluções verdes, aliada a regulamentos mais restritivos sobre o uso de surfactantes sintéticos, têm impulsionado o mercado mundial de biossurfactantes.

O mercado global de biossurfactantes deve ultrapassar 2,7 bilhões de dólares até 2024 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, Inc., 2018b). Para atender a demanda global, espera-se produzir 462 toneladas de biossurfactantes em 2020, com um crescimento médio anual de 4,3% de 2014 a 2020 (GRAND VIEW RESEARCH Inc., 2016). A demanda do mercado de biossurfactantes na Ásia-Pacífico, liderada pela China, Índia e Japão é a que mais cresce, devido aos avanços tecnológicos e busca por produtos ecologicamente corretos. A China foi o maior mercado regional de biossurfactantes em 2017, seguido pela América do Norte (Estados Unidos) e Europa (Reino Unido, França, Espanha e Alemanha). Os segmentos de cosméticos, cuidados pessoais, detergentes para uso doméstico e produtos químicos para campos petrolíferos são os que mais impulsionam o consumo de biossurfactantes (GLOBAL MARKET INSIGHTS, Inc., 2018a).

## 2.4 Biossurfactantes

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, denominados de biossurfactantes, incluindo plantas (ex. saponinas etc), animais (ex. ranaspuminas), microrganismos (ex. glicolipídeos, lipopeptídeos) e o homem (ex. sais biliares e surfactantes pulmonares), sendo utilizados para atividades intra e extracelulares como a emulsificação de nutrientes, transporte de materiais através das membranas celulares e no reconhecimento celular. Esses compostos são classificados por sua composição química em duas classes principais: compostos de baixo peso molecular, chamados também de biossurfactantes, capazes de reduzir eficientemente a tensão superficial e interfacial, tais como lipopeptídeos, glicolipídeos e proteínas; e os polímeros de alto peso molecular, também denominados de bioemulsificantes como os polissacarídeos ou lipoproteínas, que são mais eficientes em estabilizar emulsões de óleo em água (BANAT *et al.*, 2010). A Tabela 4 sumariza os principais tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

Tabela 4 – Principais tipos de biossurfactantes e seus microrganismos produtores.

Biossurfactante	Microrganismo Produtor
<b>Glicolipídeos</b>	Ramnolipídeos <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Soforolipídeos <i>Candida bombicola</i> ; <i>C. apicola</i> ; <i>Rhodotorula bogoriensis</i>
	Trehalolipídeos <i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Mycobacterium sp.</i> ; <i>Nocardia sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e Lipoproteínas</b>	Peptídeo-Lipídeo <i>Bacillus licheniformis</i>
	Viscosina <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Serravetina <i>Serratia marcescens</i>
	Subtilisina <i>Bacillus subtilis</i>
	Iturina A <i>Bacillus subtilis</i>
	Surfactina/ Subtilisina <i>Bacillus subtilis</i>
	Gramicidina <i>Bacillus brevis</i>
	Polimixina <i>Bacillus polymyxa</i>
	Artrofactina <i>Artrobacter sp.</i>
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	Ácidos graxos <i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídeos neutros <i>Nocardia erythropolis</i>
	Fosfolipídeos <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes Poliméricos</b>	Emulsan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Biodispersan <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	Liposan <i>Candida lipolytica</i>
	Carboidrato-lipídeo-proteína <i>Pseudomonas fluorescens</i>

Fonte: Adaptado de NITSCHKE; PASTORE (2002); MULLIGAN; YONG; GIBBS (2001); BANAT *et al.*, (2010).

Quando comparados aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam várias vantagens, destacando-se a baixa ou nenhuma toxicidade, maior compatibilidade ambiental, biodegradabilidade, síntese a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo, eficiência em condições extremas de temperatura, salinidade e pH, além de exibirem alta atividade de superfície em baixas concentrações. A comparação das atividades tensoativas e das concentrações micelares críticas entre surfactantes sintéticos e biológicos estão listados na Tabela 5 (BANAT, 1995; HAZRA; KUNDU; CHAUDHARI, 2015).

Tabela 5 – Comparação de propriedades tensoativas e CMC de biossurfactantes com surfactantes sintéticos.

Surfactante	Tensão superficial (mN/m)	Tensão interfacial (mN/m)	CMC (mg/L)
Complexo de glicolipídeo de <i>Rhodococcus ruber</i>	26,8	0,9	54
Trealose dicorinomicolato de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	36,0	17,4	4
Trealose tetraester de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	26,0	<1,0	15
Ramnolipídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29,0	0,25	50-200
Soforolipídeos de <i>Torulopsis bombicola</i>	33,0	1,8	82
Surfactina de <i>Bacillus subtilis</i>	27,0	1,0	23
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	37,0	0,02	2120
Bromato de Cetiltrimetilamônio (CTAB)	30,0	5,0	1300
Tween 20	30,0	4,8	600
Sulfonato de Alquilbenzeno	47,0	<1,0	590

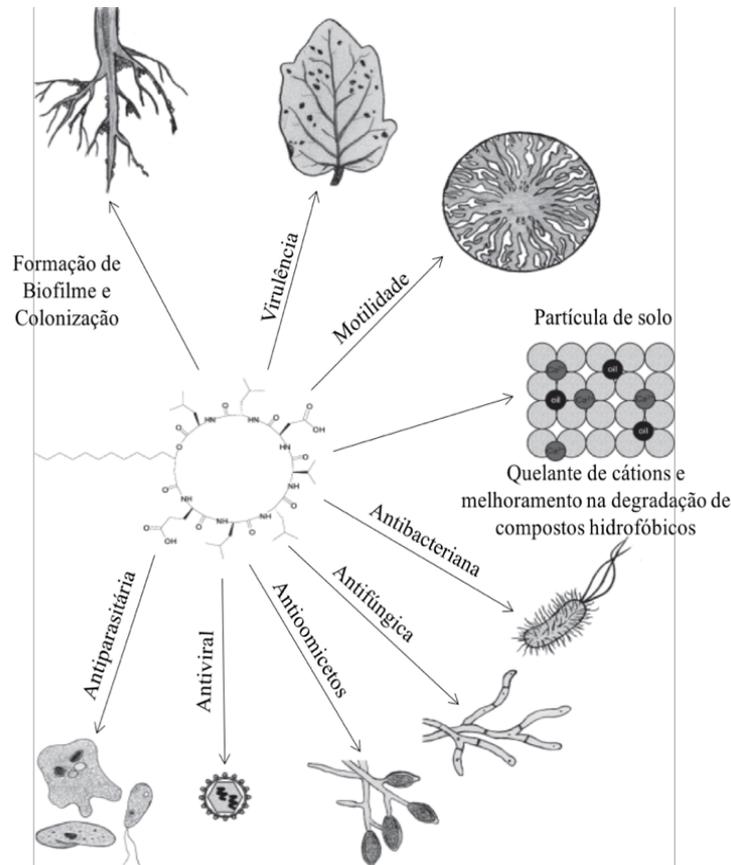
Legenda: CMC: Concentração Micelar Crítica. Fonte: CHRISTOFI; IVSHINA (2002).

O rendimento e classe biossurfactante produzido está sob influência genética e ambiental, isto é, depende tanto do microrganismo, como da fonte de carbono, dos demais nutrientes (N, P,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{3+}$ ) e das condições de cultivo, incluindo temperatura, pH, oxigenação e taxa de diluição (BANAT, 1995). Portanto, apesar do potencial desses compostos em diversas aplicações industriais, a comercialização ainda é limitada pelo custo considerado elevado de produção e também pelos baixos rendimentos (BANAT *et al.*, 2010; SINGH; PATIL; RALE, 2019). As estratégias para superar esses gargalos incluem: (i) bioprospecção por estirpes microbianas de alto rendimento ou estirpes recombinantes hiperprodutoras (GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018); (ii) o uso de substratos de baixo custo ou resíduos para a formulação de meios de fermentação (APARECIDA GIRO *et al.*, 2009); (iii) desenvolvimento de bioprocessos eficazes, incluindo a otimização dos parâmetros operacionais de produção e recuperação máxima do produto (LI; ANASTAS, 2012; SAHARAN *et al.*, 2011); e (iv) síntese química ou modificações estruturais de biossurfactantes (BOXLEY; PEMBERTON; MAIER, 2015).

## 2.5 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são compostos tensoativos produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Os mesmos são constituídos por uma cadeia de ácido graxo ligados a um anel peptídico. As isoformas desses lipopeptídeos diferem pela composição de aminoácidos, pelo comprimento e ramificação da cadeia do ácido graxo e pela ligação química entre as duas partes (INÈS; DHOUHA, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008). Os lipopeptídeos são naturalmente sintetizados nos organismos produtores, onde desempenham uma série de funções biológicas que auxiliam na motilidade, aderência e colonização de superfícies, e no antagonismo contra outros organismos, constituindo um importante mecanismo de defesa contra vírus, micoplasmas, bactérias e fungos (RAAIJMAKERS *et al.*, 2010; RON; ROSENBERG, 2001). Alguns lipopeptídeos são ainda capazes de quelar íons metálicos e melhorar a degradação de substratos hidrofóbicos (Figura 1).

Figura 1 –Visão geral das diferentes funções fisiológicas dos lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*.



Fonte: RAAIJMAKERS *et al.* (2010).

Espécies de *Bacillus* normalmente co-produzem misturas de determinados congêneres das famílias de lipopeptídeos e a composição dessas misturas pode ser crucial para o sucesso da MEOR (FARIAS *et al.*, 2018). Até o presente momento, três famílias principais foram identificadas: (1) a família da iturina, que compreende moléculas de iturina A e C, bacilomicina D, F e L, micosubtilina e mojavensina A (MA *et al.*, 2012; ONGENA; JACQUES, 2008); (2) a família da surfactina, que envolve as liquenisinas, pumilacidinas, esperinas e surfactinas; e (3) a família da fengicina, que compreende a fengicina A e B e plipastina A e B (JACQUES, 2011; KIM *et al.*, 2010; ROONGSAWANG *et al.*, 2002). As fengicinas e as iturinas demonstram forte atividade antifúngica, enquanto que as surfactinas são consideradas potentes biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

A atividade biológica dos lipopeptídeos depende tanto da composição e sequência de aminoácidos quanto da natureza da parte lipídica, acarretando diferenças na capacidade hemolítica, emulsificante, na CMC e na atividade superficial (YOUSSEF; DUNCAN; MCINERNEY, 2005). Estas variações dependem do microrganismo (HSIEH *et al.*, 2004) e das

condições nutricionais e ambientais (INÈS; DHOUHA, 2015). Jacques (2011) compilou as diferenças nas porções peptídicas e hidrofóbicas das principais classes de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp. que estão sumarizadas na Tabela 6.

### 2.5.1 Família *Surfactina*

Arima; Kakinuma; Tamura (1968) identificaram o primeiro composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis* com alto poder surfactante. A estrutura geral da surfactina está demonstrada na Figura 2. Surfactina é constituída por um peptídeo cíclico de sete aminoácidos (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu) com a sequência quiral LLDLLDL, ligados a uma cadeia de ácido graxo  $\beta$ -hidróxi por uma ligação éster. A cadeia alifática pode variar de 11 a 17 átomos, comumente compostos pelos tipos, *n*, *iso* e *anteiso* bem como a composição de aminoácidos da porção peptídica também varia de acordo com as condições de cultivo, gerando isoformas distintas (Tabela 6). Há três isoformas distintas de surfactina que variam na substituição do sétimo aminoácido do anel peptídico, entre Leu (surfactina A), Val (surfactina B) e Ile (surfactina C). Aminoácidos hidrofóbicos de surfactinas estão localizados nas posições 2, 3, 4, 6 e 7 enquanto que os resíduos ácidos, Glu e Asp, estão localizados nas posições 1 e 5, respectivamente (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968; MEENA; KANWAR, 2015; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

A surfactina é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água a 20 °C de 72 para 27 mN/m (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968) em concentrações menores de 20 mM (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água-hexadecano de 43 para valores menores que 1 mN/m. Além disso, a surfactina tem diversas atividades biológicas tais como anti-inflamatória, anticâncer, antifúngica, antibacteriana e antiviral (COCHRANE; VEDERAS, 2016).

### 2.5.2 Família *Iturina*

Os compostos de iturina também são lipopeptídeos cíclicos contendo resíduos de aminoácidos sintetizados não ribossomalmente, com massa molecular de 1042 Da, aproximadamente. A cadeia de ácido graxo pode conter de 13 a 17 átomos de carbono e é ligada por uma ponte amida a um resíduo de aminoácido no anel lactona. Compõem essa estrutura, três aminoácidos D (Tyr, Asn e Asn) e quatro aminoácidos L (Pro, Ser, Asn e Gln), distribuídos na sequência quiral LDDLLDL (MEENA; KANWAR, 2015; ONGENA; JACQUES, 2008). Esses compostos têm potente atividade antibiótica, hemolítica e antifúngica (ONGENA *et al.*,

2007; ROMERO *et al.*, 2007; VATER *et al.*, 2002). Mojavensina A, a mais recente adição à família iturina, exibe atividade antifúngica contra um amplo espectro de fitopatógenos, atividade fraca contra *Staphylococcus aureus* e surpreendente atividade citotóxica contra a linhagem celular de leucemia humana HL-60 (COCHRANE; VEDERAS, 2016).

### 2.5.3 Família Fengicina

A fengicina consiste de compostos bioativos com forte atividade surfactante e antifúngica, especialmente contra fungos filamentosos, porém tem atividade limitada frente a bactérias, leveduras e baixa atividade hemolítica (KAUR *et al.*, 2017; ONGENA; JACQUES, 2008). Esta família, também denominada de plipastatina, consiste de duas classes principais, A e B, que se diferenciam pela substituição do resíduo de aminoácido D-Ala por D-Val, respectivamente, na posição 6 (Figura 2). Em ambas as isoformas, há uma ligação lactona conectando Tyr<sub>3</sub> a Ile<sub>10</sub>, cuja estrutura é composta por um ácido graxo β-hidróxi ligado a uma porção peptídica de 10 aminoácidos, sendo 8 em ciclo. Esse ácido graxo pode variar de 13 a 19 átomos de carbono, distribuídos nas formas *n*, *iso*, *anteiso*, podendo ser saturado ou insaturado (PATHAK *et al.*, 2012; PATHAK; KEHARIA, 2014; VANITTANAKOM *et al.*, 1986; VATER *et al.*, 2002).

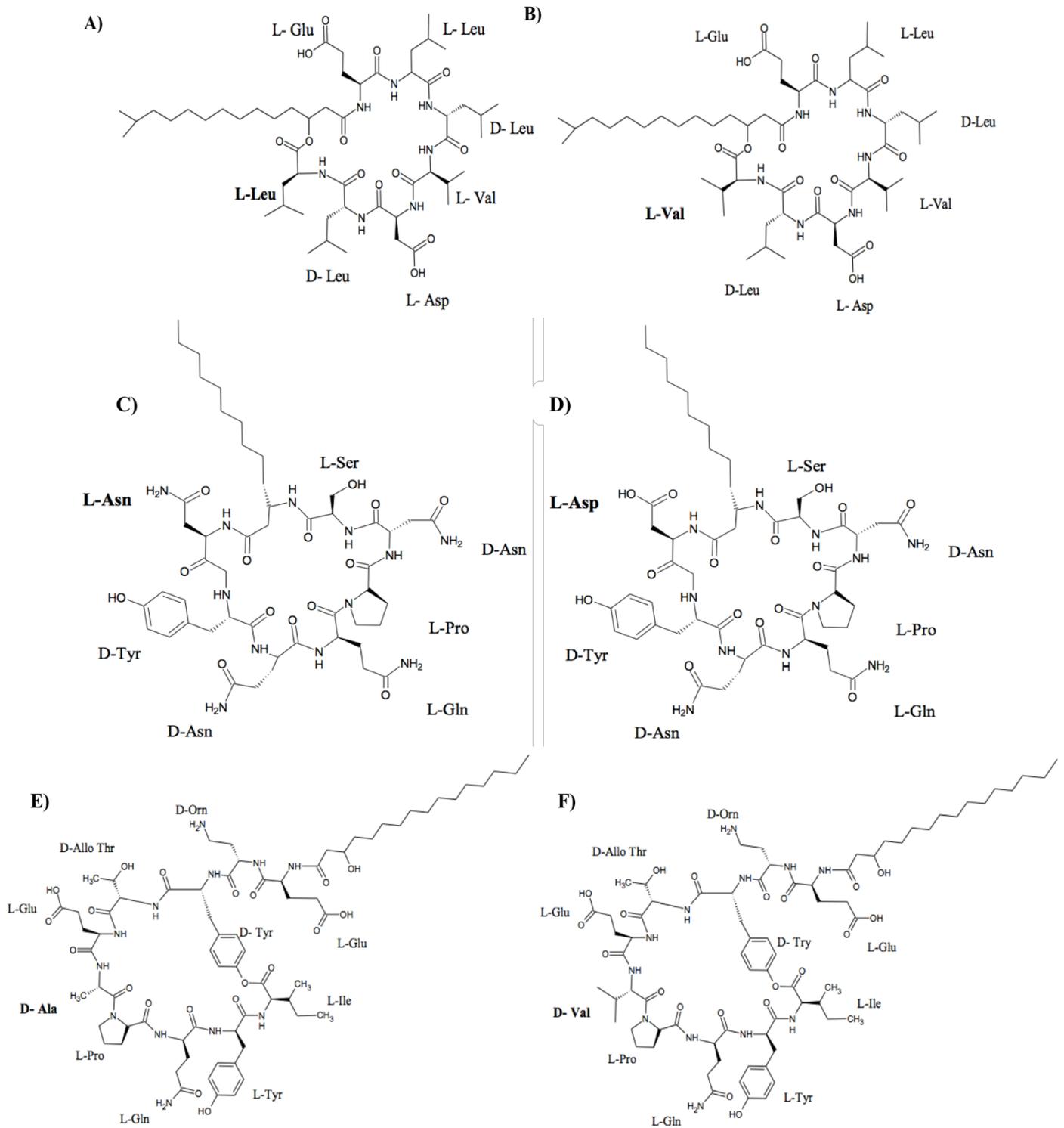
Tabela 6 – Sequência peptídica e cadeias de ácidos graxos das diferentes variantes de cada família de lipopeptídeo produzidas por *Bacillus* spp.

Nome	Estutura Primária da porção peptídica	Principal Cadeia de Ácido Graxo	Referências
<b>Família Fengicina</b>	Decapeptídeo com anel lactona entre grupo carboxila terminal de Ile <sub>10</sub> e grupo OH da Tyr <sub>3</sub>	Ácidos graxos β-OH	
Fengicina A	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	*aC15, **iC16, ***nC16	Schneider <i>et al.</i> , 1999
Fengicina B	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	aC15, iC16, nC16, C17	Schneider <i>et al.</i> , 1999
Plipastatina A	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile	nC16, aC17	Nishikiori <i>et al.</i> , 1986
Plipastatina B	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-a Thr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile	nC16, aC17	Nishikiori <i>et al.</i> , 1986
<b>Família Iturina</b>	Heptapeptídeo fechado por um anel lactona com um grupo β-NH <sub>2</sub> da cadeia de ácidos graxos	Ácidos graxos β-NH <sub>2</sub>	
Bacilomicina D	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Pro-L-Glu-D-Ser-L-Thr	nC14, iC15, aC15	Peypoux <i>et al.</i> , 1981
Bacilomicina F	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Thr	nC16, iC17, aC17	Peypoux <i>et al.</i> , 1985
Bacilomicina L ou Lc	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Ser-L-Glu-D-Ser-L-Thr	nC14, iC15, aC15	Volpon <i>et al.</i> , 2007
Iturina A	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC14, iC15, aC15	Peypoux, 1978
Iturina AL	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC16, iC16	Winkelmann <i>et al.</i> , 1983
Iturina C	L-Asp-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Asn-L-Ser	nC14, iC15, aC15	Peypoux <i>et al.</i> , 1986
Micosubtilina	L-Asn-D-Tyr-D-Asn-L-Gln-L-Pro-D-Ser-L-Asn	nC16, iC16, aC17	Peypoux <i>et al.</i> , 1986
<b>Família Kurstakin</b>	Heptapeptídeo com um anel lactona entre o grupo carboxila terminal de Gln <sub>7</sub> e grupo OH de Ser <sub>4</sub>	Ácidos graxos β-OH	
<i>Kurstakin</i>	D-Thr-Gly-D-Ala-Ser-His-D-Gln-Gln	iC11, nC12, iC12, iC13	Hathout <i>et al.</i> , 2000
<b>Família Surfactina</b>	Heptapeptídeo fechado por um anel lactona com um grupo β-OH da cadeia de ácidos graxos	Ácidos graxos β-OH	
Bamilocina A	Glu-Leu-Met-Leu-Pro-Leu-Leu-Leu	C13	Lee <i>et al.</i> , 2007
Esperina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-XE7-COOH	C13, C14, C15	Thomas & Ito, 1969
Liquenisina	L-XL1-L-XL2-D-Leu-L-XL4-L-Asp-D-Leu-L-XL7	iC13, aC13, nC14 iC15, aC15	Lin <i>et al.</i> , 1994
Pumilacidina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-XP7	aC15, iC15, nC16, iC16, aC17, iC17	Naruse <i>et al.</i> , 1990
Surfactina	L-Glu-L-XS2-D-Leu-L-XS4-L-Asp-D-Leu-L-XS7	iC14, nC14 iC15, aC15	Peypoux <i>et al.</i> , 1999

XL1= Gln ou Glu; XL2 = Leu ou Ile; XL4 e XL7 =Val ou Ile; XP7 =Val ou Ile; XS2 = Val, Leu ou Ile; XS4 = Ala, Val, Leu ou Ile; XS7 = Val, Leu ou Ile. \*a=anteiso, \*\*i=iso, \*\*\*n=normal

Fonte: JACQUES (2011).

Figura 2 – Estruturas dos principais homólogos da surfactina (C15), iturina (C13) e fengicina (C16).  
 Isoformas: A) surfactina A; B) surfactina B; C) iturina A; D) iturina C; E) fengicina A; e F) fengicina B.



## 2.6 Biossíntese de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* (Filo Firmicutes) compreende bactérias gram-positivas, em formato de bastonete, mesofílicas, formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, normalmente não patogênicas, naturalmente encontradas no solo ou associadas com plantas e reconhecidamente produtoras de biossurfactantes lipopeptídicos (RAAIJMAKERS *et al.*, 2010).

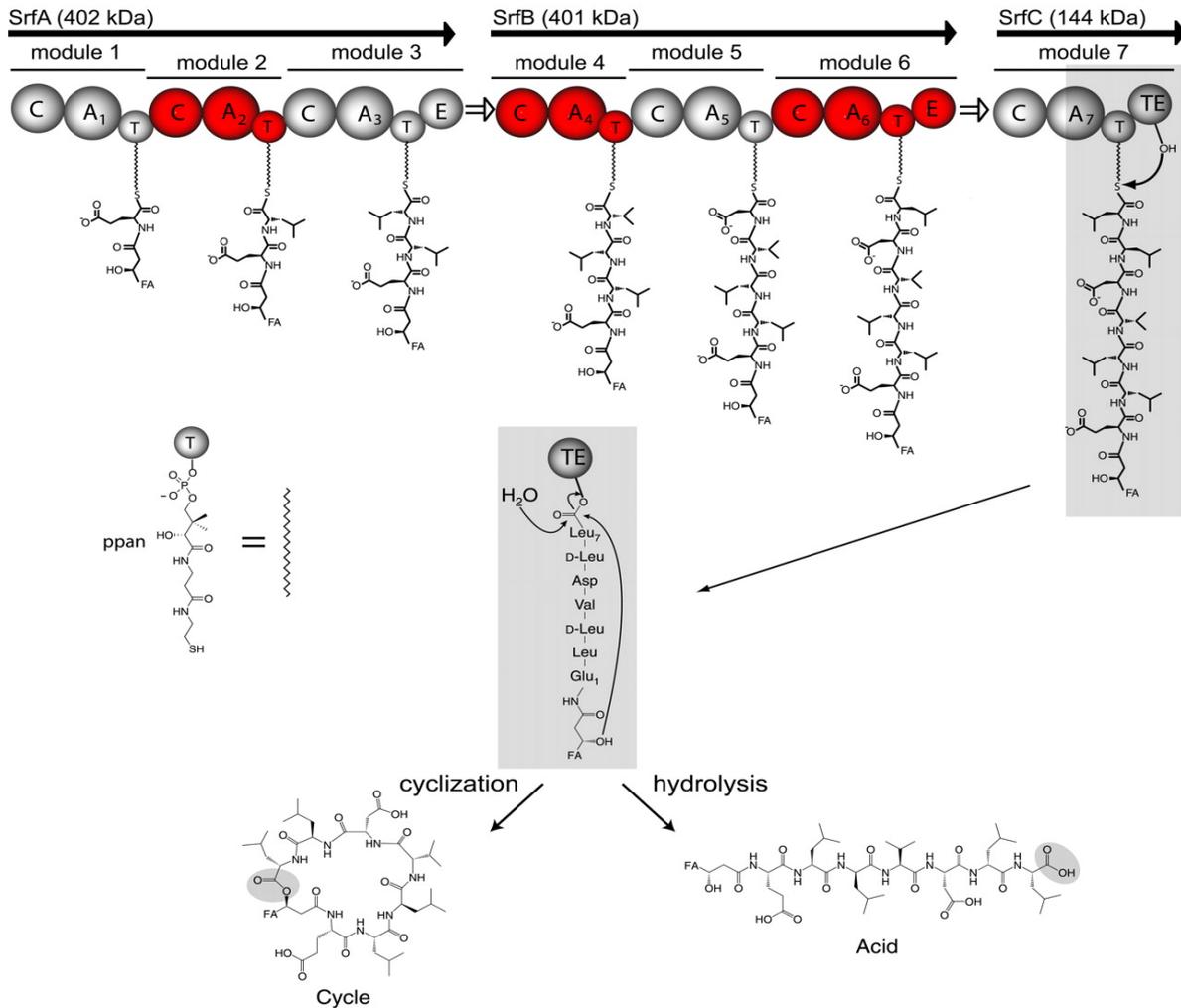
A biossíntese de vários lipopeptídeos difere da tradicional síntese ribossômica de peptídeos, onde a formação das ligações peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o mRNA funciona como molde. Ao invés disso, a síntese lipopeptídica é catalisada não-ribossomicamente e a rota enzimática para a síntese desses peptídeos se desenrola através de um complexo multienzimático peptídeo sintetase (NRPS) ou híbrido com policetídeo sintase (PKS) (ONGENA; JACQUES, 2008; SIEBER; MARAHIEL, 2003). O NRPS é organizado em módulos e subdivididos em domínios catalíticos (Figura 3). Cada módulo é responsável por um ciclo reacional envolvendo reconhecimento do substrato e incorporação de um aminoácido específico na porção peptídica.

O módulo de iniciação é constituído por um domínio de adenilação (A), responsável pela seleção e ativação de aminoácidos através de uma reação de adenilação, que converte o aminoácido em aminoacil adenilato, e pelo domínio T, também denominado de PCP (proteína carreadora de peptídeos), responsável pela fixação do aminoácido ativado à sintetase de maneira covalente, através de uma ligação tioéster (tioesterificação). Na biossíntese de lipopeptídeo, o primeiro módulo também contém um domínio de condensação (C) que catalisa a N-acilação do primeiro aminoácido da molécula de LP, ligando assim o lipídeo ao oligopeptídeo. Os módulos de alongamento contêm os domínios A, T e C, nos quais o domínio C catalisa a formação da ligação peptídica entre 2 aminoácidos. Na maioria dos casos, os módulos possuem também o domínio de epimerização (E) responsável por determinar a configuração (L ou D) do aminoácido incorporado. Coletivamente, esses domínios geram um lipopeptídeo que é clivado e assim liberado no final da linha de montagem por uma tioesterase (TE) (DUITMAN *et al.*, 2007; INÈS; DHOuha, 2015; RAAIJMAKERS *et al.*, 2010).

A biossíntese da porção lipídica dos lipopeptídeos é realizada por numerosos módulos consecutivos que permitem o acoplamento, a ativação e a ligação do ácido graxo à porção peptídica. Inicialmente, o domínio AcilCoA ligase (AL) acopla uma coenzima A a um ácido graxo, ativando-o. O ácido graxo ativado é depois transferido para o cofator 4-fosfopanteteína do primeiro domínio da proteína transportadora de acil (ACP1) e similarmente um malonil-CoA é fixado ao domínio ACP2. A condensação do grupo malonil e acil tioésteres



Figura 4 – Representação esquemática da via biossintética da surfactina e os domínios do complexo multienzimático peptídeo sintetase (NRPS).



Legenda: A surfactina sintetase consiste em 24 domínios individuais responsáveis pela catálise das reações químicas. Estes domínios catalisam a ativação (domínio A), ligação covalente (domínio T), alongamento (domínio C), epimerização (domínio E) e liberação (domínio TE) por ciclização ou hidrólise. Os domínios estão organizados em módulos (indicados em cinza e vermelho), onde cada módulo incorpora um bloco de construção na cadeia peptídica em crescimento. A cadeia peptídica está ligada covalentemente à multienzima através do cofator fosfopanteteína (ppan), e a síntese prossegue de acordo com o molde enzimático da extremidade N-terminal para a extremidade C-terminal. FA, cadeia de ácidos graxos. A ciclização ocorre via uma transesterificação da hidroxila, presente na cadeia do ácido graxo, com o grupo acila, resultando na formação do macrociclo surfactina.

Fonte: SIEBER; MARAHIEL (2003).

A fengicina é sintetizada por 5 NRPS (Fen1 a Fen5) codificadas por um operon com 5 ORFs – *fen A-E* (KOUMOUTSI *et al.*, 2004). Fen1 ativa e incorpora Glu na posição 1 e Orn na posição 2, formando a cadeia lateral da porção peptídica da fengicina. Fen2 é responsável pela ativação e incorporação da Tyr na posição 3 e Thr na posição 4; Fen3 pelo Glu

na posição 5 e Ala ou Val na posição 6; Fen4 pela Pro na posição 7, Gln na posição 8 e Tyr na posição 9 e Fen5 permite a incorporação do último resíduo de aminoácido Ile na posição 10 (Figura 3). Tal como na biossíntese de surfactina, a cadeia de ácidos graxos é adicionada ao aminoácido ativado no primeiro módulo por via de um domínio de condensação inicial. A tioesterase presente no último módulo catalisa a liberação do peptídeo e a formação de uma ligação éster entre o grupo carboxílico do último aminoácido (Ile) e o grupo hidroxila da Tyr na posição 3. Os domínios de epimerização foram identificados nos módulos 2, 4, 6 e 9.

Ao contrário da surfactina e fengicina, os derivados de iturina são sintetizados por um complexo multienzimático híbrido NRPS-PKS. O operon de síntese é constituído de quatro ORFs denominadas de *ituD*, *ituA*, *ituB* e *ituC* para iturina e *bmyD*, *bmyA*, *bmyB* e *bmyC* para bacilomicina D. Os últimos três genes codificam os NRPSs responsáveis pela incorporação do primeiro resíduo de Asn (*ituA* e *bmyA*), seguidos pelos próximos 4 aminoácidos (Tyr, Asn, Gln e Pro (*ituB*) ou Tyr, Asn, Pro e Glu (*bmyB*) e os últimos dois resíduos Asn, Ser (*ituC*) ou Ser, Thr (*bmyC*). Os domínios de epimerização foram identificados nos módulos 2, 3 e 6 e o domínio da tioesterase no módulo 7. O gene *ituD* codifica malonil-CoA transacilase (domínio MCT). Os genes comumente utilizados para pesquisa das estirpes produtoras de iturina são *ituD* e *lpa14*, que codificam respectivamente a coenzima malonil A transacilase, sem a qual a iturina não pode ser sintetizada e fosfopanteteinil transferase, requerida para a maturação da iturina após sua síntese.

## 2.7 Regulação da via biossintética de lipopeptídeos em *Bacillus* spp.

Bactérias do gênero *Bacillus*, possuem sistemas de sinalização e regulação gênica para biossíntese de lipopeptídeos. Essa regulação é mediada principalmente pelo mecanismo de *quorum-sensing* (RON; ROSENBERG, 2002), isto é, pelo mecanismo de comunicação através do qual bactérias regulam a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular. Esta percepção do *quorum* é capaz de promover a diferenciação multicelular, desenvolvimento de corpos de frutificação e esporulação, biossíntese de antibióticos, transferência de plasmídeos por meio de conjugação e produção de fatores de virulência, assim como a ativação de processos do metabolismo secundário, através de moléculas sinalizadoras, conhecidas como autoindutores.

A expressão de genes da surfactina está associada tanto a composição nutricional do meio de cultivo quanto ao aumento da densidade celular. O ápice de produção da surfactina ocorre especialmente na transição da fase exponencial de crescimento para estacionária,

enquanto a biossíntese de fengicina e iturina usualmente ocorrem no final da fase estacionária (DUITMAN *et al.*, 2007; RAAIJMAKERS *et al.*, 2010).

A complexidade da síntese não ribossomal dos biossurfactantes lipopeptídeos aliada à regulação multifatorial dessa síntese são fatores que explicam as dificuldades da produção heteróloga eficiente desses compostos e justificam o investimento em pesquisas que buscam descobrir novas estirpes produtoras e/ou novos biossurfactantes.

### 3 JUSTIFICATIVA

O funcionamento da sociedade moderna ainda é altamente dependente do petróleo e seus derivados. Entretanto, as reservas mundiais dessa matéria-prima não acompanham o crescimento populacional e sua crescente demanda por energia. Como agravante desse quadro tem-se ainda que o volume original de petróleo (*original oil in place*, OOIP) que jorra pela pressão natural de um reservatório (recuperação primária de óleo) corresponde apenas 10-20% do OOIP. Portanto, a indústria do petróleo investe muitos recursos em tecnologias para extrair esse óleo residual. Existem vários métodos químicos e físicos aplicados à recuperação secundária de petróleo que conseguem aumentar o rendimento de óleo extraído para 40-50% do OOIP. O restante do óleo residual pode potencialmente ser extraído por tecnologias de recuperação terciária que se baseiam na aplicação de polímeros, gases, ácidos e surfactantes ou microrganismos produtores desses compostos. Essa tecnologia tem sido aplicada com sucesso em alguns países e os bons resultados têm impulsionado as pesquisas visando o aperfeiçoamento dessa tecnologia. Dentre as suas vantagens, destacam-se a melhora no fator de recuperação de óleo em campos petrolíferos (até 350%) e sua aceitação ambiental, por ser mais sustentável. Como obstáculo para sua aplicação em larga escala, tem-se o baixo rendimento e custo elevado de produção das culturas/metabólitos. Portanto, as pesquisas se concentram na utilização de matérias-primas mais baratas como fonte de carbono para o cultivo de estirpes convencionalmente usadas em MEOR, melhoramento dos bioprocessos e prospecção de novas estirpes de bactérias com alto rendimento.

Várias espécies de bactérias têm sido testadas em MEOR, com destaque para o gênero *Bacillus*, que reúne espécies produtoras de exopolímeros, gases e biosurfactantes utilizados nessa tecnologia. O emprego de biosurfactantes na recuperação de petróleo têm se destacado como promissor devido às habilidades tensoativas dessas moléculas, que facilitam a mobilidade do óleo nos poros das rochas do reservatório, aumentando sua recuperação.

Nesse contexto, este trabalho se concentrou na avaliação de estirpes de *Bacillus* spp. isoladas de sedimentos de manguezais do Ceará, produtoras de biosurfactantes lipopeptídeos, com o intuito de descobrir aquelas mais promissoras para aplicação na recuperação de petróleo. Os manguezais são ecossistemas costeiros caracterizados pela variação diária de pH, oxigênio, temperatura e salinidade devido ao regime das marés e, portanto, devem abrigar uma microbiota bem adaptada à essas condições flutuantes e cuja diversidade genética deva ser fonte de biomoléculas de interesse para MEOR. Ressalte-se que qualquer avanço em MEOR significa redução de impactos ambientais negativos advindos da perfuração de novos poços petrolíferos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Este estudo teve por objetivo avaliar estirpes de *Bacillus* spp. produtoras de biossurfactantes e realizar a caracterização desses compostos visando selecionar as estirpes mais promissoras para futura aplicação na recuperação avançada de petróleo (MEOR).

### 4.2 Objetivos Específicos

- Triar estirpes bacterianas produtoras de biossurfactantes;
- Determinar atividade emulsificante e de redução de tensão superficial;
- Avaliar a capacidade de dispersão de óleo dos biossurfactantes;
- Identificar as estirpes;
- Determinar a concentração micelar crítica dos biossurfactantes;
- Testar a capacidade dos biossurfactantes de inverter a molhabilidade da rocha;
- Avaliar o efeito de altas temperaturas, pressão e concentrações de NaCl nas atividades tensoativas dos biossurfactantes;
- Caracterizar os biossurfactantes por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Espectrometria de Massas (ESI-Q-TOF MS);
- Avaliar a ecotoxicidade dos biossurfactantes;
- Eleger as estirpes mais promissoras para futura aplicação em MEOR.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Prospecção de estirpes bacterianas promissoras para MEOR

A princípio foi realizada uma triagem de bactérias produtoras de biossurfactantes pertencentes ao acervo de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) da Universidade Federal do Ceará (UFC), isoladas de sedimentos de manguezais do Ceará. Nesta coleção constam 279 estirpes isoladas de sedimentos dos manguezais Jaguaribe (JAG), Timonha (TIM) e Icapuí (ICA) por Barreto (2011) e Lima (2013), utilizando a estratégia do aquecimento (*heat-test*) dos sedimentos a 80 °C por 30 min. Essa estratégia tem por objetivo inativar a microbiota sensível ao calor e selecionar espécies produtoras de esporos, como aquelas do gênero *Bacillus*, produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos.

Para selecionar as melhores estirpes produtoras de biossurfactantes foram empregados três critérios. O primeiro avaliou a capacidade das estirpes produzirem emulsões estáveis (maior ou igual a 50%); o segundo avaliou a capacidade de redução da tensão superficial (menor ou igual a 35 mN/m); e o terceiro critério foi a pesquisa-guiada de genes para surfactina (*sfp*) ou iturina (*ituD* e *lpa14*), dois dos principais lipopeptídeos com potenciais aplicações na indústria do petróleo. A pesquisa foi feita por amplificação desses genes por reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme reportado por Barreto (2011) e Lima (2013). A obediência aos critérios permitiu a seleção de 14 estirpes promissoras que são objetos deste trabalho. As estirpes selecionadas foram: JAG 248, JAG 249, JAG 255, ICA 13, ICA 24, ICA 32, ICA 36, TIM 03, TIM 10, TIM 13, TIM 27, TIM 58, TIM 68 e TIM 96, denominadas pelo prefixo do manguezal de origem e o número de catalogação de cada estirpe.

Inicialmente, as culturas estocadas em *ultrafreezer* -80 °C foram reativadas em placas contendo o meio de cultivo ATGE (15,0 g/L de Ágar; 5,0 g/L de Triptona; 1,0 g/L de Glicose; 2,5 g/L de Extrato de Levedura) e incubadas a 30 °C (Shel Lab<sup>®</sup>, USA) até o aparecimento das colônias. Após confirmação visual da pureza das culturas, colônias isoladas de cada estirpe foram submetidas à coloração de Gram (kit comercial Laborclin, Brasil) e foram fotografadas em estereomicroscópico em um aumento de 30 x (Nikon Instruments Inc., modelo SMZ745).

### 5.2 Produção de biossurfactantes

Para induzir a produção de biossurfactantes, as estirpes foram cultivadas isoladamente em Meio Mineral (MM) (MORÁN *et al.*, 2000) contendo a seguinte composição

por litro: 5 g extrato de levedura; 2,7 g NaCl; 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,6 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 10 g glicose; pH 7,0; esterilizado a 110 °C por 15 min. O MM foi suplementado com 0,1% (v/v) de uma solução de micronutrientes composta por 10,95 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5,0 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,54 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,39 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g de  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 0,17 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  por litro de água e esterilizada por filtração em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA). As culturas foram incubadas sob agitação contínua de 150 rpm, a 30 °C por 16 h (incubadora Tecnal<sup>®</sup>, modelo TE-420), quando tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro (Genesys<sup>™</sup>, EUA) a 600 nm, e ajustadas para  $0.150 \pm 0.020$ . Essas culturas em fase exponencial de crescimento foram então usadas para inocular 600 mL de MM contendo glicose como fonte de carbono na proporção de 10% (v/v). As culturas foram incubadas nas mesmas condições anteriores por 48 h. Ao final, foram centrifugadas a 7.000 g por 15 min, 4 °C e os sobrenadantes livres de células recolhidos para utilização em ensaios posteriores.

### 5.3 Precipitação e purificação dos biossurfactantes

Para purificação dos biossurfactantes, os sobrenadantes foram submetidos à precipitação ácida de acordo com a metodologia proposta por (PEREIRA *et al.*, 2013). Para tanto, os sobrenadantes foram ajustados a pH 2,0 com HCl 12 M e deixados em repouso por 24 h a 4 °C. Os precipitados foram recolhidos por centrifugação a 15.000 g, 4 °C por 20 min e lavados duas vezes com água destilada acidificada (pH 2,0), sob centrifugação (Hettich<sup>®</sup>, 420R). Os precipitados foram dissolvidos em água desmineralizada o suficiente para ressolubilização e os pHs das soluções foram ajustados para 7,0 usando NaOH 1 M. Essas soluções concentradas de biossurfactantes foram congeladas em *ultrafreezer* -80 °C e submetidas ao processo de liofilização até a completa secagem. As massas foram pesadas em balança analítica e armazenadas a 25 °C para posterior utilização em ensaios tensoativos e caracterizações química, física e cálculo de rendimento.

### 5.4 Índice de Emulsificação (IE24), Desemulsificação (ID24) e Redução da Tensão Superficial (TS)

A determinação da atividade emulsificante foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por (IQBAL; KHALID; MALIK, 1995). O método consiste em adicionar 2,0 mL de hidrocarboneto à mesma quantidade de solução de biossurfactante em um tubo de ensaio com tampa rosqueada e agitar vigorosamente em *vortex* por 2 min. Cada análise foi realizada no mínimo em triplicata. Os tubos foram deixados em repouso por 24 h, a 25 °C e o

percentual de emulsificação (IE24) foi calculado pela razão entre a altura da fase emulsionada ( $H_{FE}$ ) e altura total ( $H_{TOTAL}$ ) do sistema multiplicado por 100. Nos ensaios de emulsificação foram utilizadas querosene (Esso<sup>®</sup>, BR) e *n*-hexadecano (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). Foram testados os sobrenadantes das culturas, os sobrenadantes das culturas autoclavados (121 °C por 15 minutos) e soluções dos lipopeptídeos purificados na concentração final de 400 mg/L. Para os ensaios de IE24 em diferentes concentrações de sal foram utilizados 2 mL de querosene e 2 mL de sobrenadante suplementado com NaCl a 20, 100, 150 e 200 g/L.

Os ensaios de desemulsificação foram realizados através da observação da capacidade das culturas em desestabilizar emulsões água em óleo (ANGELIM, 2012). Para obter as emulsões, foram misturados 2 mL do sobrenadante da cultura, 2 mL de querosene e 4,0 µL de *Tween*<sup>®</sup>80 (mono-oleato de polioxietileno-sorbitano, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA). Os tubos foram agitados por 2 minutos em *vortex* e deixados em repouso por um período de 24 h. Experimentos controles foram realizados com a mesma metodologia utilizando-se meio mineral, querosene e *Tween* 80 nas mesmas proporções. Em seguida, foi verificada a persistência total, parcial ou desemulsificação das emulsões. Foram considerados negativos os resultados de persistência total da emulsão, e positivos os resultados nos quais houve diminuição da camada emulsificada ou a completa desemulsificação, tendo o controle como referência.

A capacidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial da água foi medida em tensiômetro Kruss (Hamburgo, Alemanha, modelo K20) utilizando o método do Anel Du Nöuy (DU NÖUY, 1925). Nesse método se observa a resistência do anel de platina em romper a tensão de superfície do líquido testado, medindo a energia livre da superfície por unidade de área, isto é, energia necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície. Para cada amostra foram utilizados 20 mL dos sobrenadantes ou soluções surfactantes dos lipopeptídeos purificados. O tensiômetro foi previamente calibrado com água destilada (72 mN/m) e meio mineral estéril (60 mN/m), a 25 °C. Foram realizadas pelo menos 5 medições para cada amostra. Os valores foram expressos em porcentagem, de acordo com a equação abaixo:

$$TS = \frac{(TSi - Tf)}{TSi} \times 100$$

Onde:

TS= Tensão superficial

TSi = Valor da tensão superficial do meio de cultura antes do inóculo, correspondente a 60 mN/m;

TSf = Valor da tensão superficial após cultivo de 48 h.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo método ANOVA com pós-teste de *Tukey* ou *Sidak*, utilizando um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ) no programa *Graph Pad Prism* 6.01 (San Diego, CA, EUA).

### **5.5 Análise dos biossurfactantes após tratamento a alta temperatura e pressão**

Para verificar a resistência das biomoléculas a alta temperatura e pressão, os biossurfactantes purificados e o surfactante sintético, dodecil sulfato de sódio (SDS), foram submetidos a uma pressão de 600 bar (8,702 psi) durante 3 min em uma máquina de pressão uniaxial. Posteriormente, os biossurfactantes foram pesados e suspensos em água ultrapura para uma concentração final de 400 mg/L e na sequência foram autoclavados por 15 min a 121 °C. As propriedades tensoativas foram avaliadas antes e após a exposição dos biossurfactantes aos tratamentos.

### **5.6 Concentração Micelar Crítica (CMC)**

A CMC foi calculada a partir das medidas de redução da tensão superficial (TS) em diferentes concentrações de biossurfactantes a 25 °C. Inicialmente foi preparada uma solução surfactante de concentração elevada e conhecida (400 mg/L), dissolvendo o lipopeptídeo purificado em água Milli-Q<sup>®</sup>. Essa solução inicial foi diluída seriadamente em água (200, 100, 50, 40, 30, 25, 20, 16, 12, 8 e 4 mg/L) e as medidas de tensão foram realizadas no mínimo cinco vezes, obtendo-se as médias de TS e os desvios padrão. A CMC corresponde ao ponto de inflexão da curva construída com as medidas de tensão superficial (eixo y) e concentração do biossurfactante (eixo x).

### **5.7 Ensaio de dispersão de óleo**

O teste de dispersão de óleo é frequentemente usado para identificar de forma rápida e simples a produção de biossurfactantes e estabilidade dos mesmos (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000). O experimento foi realizado em placas de Petri de 100 mm de diâmetro, em triplicata, onde foram adicionados 40 mL de água do mar (pH 7,8; salinidade 43) e derramado 0,15 g de petróleo (cedido pela Petrobras). Em seguida, as placas foram agitadas para espalhar o óleo formando um fino filme na superfície, logo após foram aplicados 100 µL das soluções dos biossurfactantes purificados na concentração de 400 mg/L. Também foram testados os biossurfactantes após terem sido submetidos a alta pressão e temperatura. Como controle negativo foi usado água grau Milli-Q esterilizada e como controle positivo uma

solução de 1% de SDS (dodecil sulfato de sódio), um surfactante sintético. O halo de dispersão foi medido com paquímetro após 1, 5, 30, 60 min e 24 h.

## 5.8 Ensaio de inversão de molhabilidade de rochas carbonáticas

O ensaio de inversão de molhabilidade foi realizado com intuito de inferir a capacidade dos biossurfactantes para inverter a molhabilidade da rocha em reservatórios carbonáticos, que juntamente com a redução da tensão interfacial, é um dos parâmetros importantes para mensurar o potencial dessas moléculas para MEOR. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Goddard *et al.* (2005) e validada por técnicos do CENPES/PDISO/BIO – RJ (Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello - Petrobras).

Inicialmente a rocha carbonática foi ativada com uma solução de hidrocarbonetos a fim de torná-la molhada com óleo (*oil-wet*). Para cada grama de carbonato de cálcio em pó, com granulometria menor que 5  $\mu\text{m}$  e previamente seca em estufa por 2 h a 120 °C até peso constante, foram adicionados 20 mL de uma solução 1,5% (m/m) de ácido ciclohexanopentanóico em *n*-decano. A mistura foi mantida em agitação de 120 rpm por 24 h à temperatura ambiente, de forma a se atingir o equilíbrio de adsorção do ácido naftênico à rocha. A mistura foi mantida em repouso até decantação de toda calcita da solução de ácido naftênico. Posteriormente, a calcita molhada com óleo foi seca em estufa com exaustão de ar a 70 °C por 24 h, para remover todo o *n*-decano. Para o teste, foram pesados em tubos de vidro com tampas rosqueadas 0,25 g da rocha ativada e foram adicionados 5 mL da solução de biossurfactante previamente submetido a alta pressão e temperatura, na concentração de 50 mg/L. Os tubos foram agitados manualmente por 2 min e deixados em repouso por 24 h, quando foi analisada qualitativamente a inversão da molhabilidade da rocha promovida pelos biossurfactantes em comparação aos controles. O ensaio foi feito em duplicata e como controles negativo e positivo foram usados água do mar sintética e SDS nas concentrações de 50 mg/L e 2500 mg/L, respectivamente. Foram considerados negativos os resultados onde a calcita flutuou no topo da solução aquosa (*oil-wet*) após agitação e positivos os resultados nos quais houve precipitação parcial ou total da calcita no fundo do tubo (*water-wet*).

## 5.9 Identificação molecular das estirpes bacterianas

### 5.9.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico das estirpes foi extraído usando o protocolo do brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) (WARNER, 1996). Ao final da extração, o DNA obtido foi eluído em

50 µL de Tris-HCl (10 mM; pH 8,0) com 20 µg/µL de RNase. As concentrações e qualidades das extrações de DNA foram avaliadas por medidas da absorbância a 260 nm, 280 nm e 230 nm, em espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

### 5.9.2 Amplificação e sequenciamento dos genes 16S RNAr, *rpoB* e *gyrB*

A identificação molecular das estirpes de bactérias foi realizada pelo sequenciamento do gene codificador do RNAr 16S, e pelos genes constitutivos que codificam a subunidade β da RNA polimerase (*rpoB*) e a subunidade β da DNA girase (*gyrB*).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 50 ng de DNA genômico; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (GoTaq, Promega, USA). O 16S rDNA foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os iniciadores universais para bactérias 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCARCC-3') (MARCHESI *et al.*, 1998). As PCRs foram feitas em termociclador (Eppendorf Mastercycler® Hamburgo, Alemanha) programado para uma etapa de desnaturação inicial (4 min 94 °C), seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Os genes *gyrB* e *rpoB* foram amplificados e sequenciados utilizando os iniciadores UP1-F (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') e UP2-R (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCRTCNGCRTCNGTCAT-3') para *gyrB*; e *rpoB* – F (5'-AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC-3') e *rpoB* – R (5'-AAGAACCGTAACCGGCAACTT-3') para *rpoB* (AHAOTU *et al.*, 2013). A amplificação de *gyrB* consistiu de uma etapa inicial de desnaturação de 2 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 66 °C e 2 min a 72 °C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final de 7 min a 72 °C. A amplificação de *rpoB* foi realizada utilizando desnaturação de 2 min a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 30s a 94 °C, 45s a 51 °C, 50s a 68 °C, e uma extensão final de 68 °C durante 90s. *Bacillus subtilis subs. spizizenii* ATCC® 6633™ (Manassas, VA, USA) foi utilizada como controle positivo.

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com SYBR® Safe DNA (Invitrogen, EUA). Os produtos foram purificados usando o Wizard® SV Gel e PCR Clean-up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A concentração dos produtos purificados foi determinada medindo-se a absorbância a 260 nm (A260) em espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000.

O sequenciamento de DNA foi realizado pela empresa Macrogen Inc., Seul, Coréia. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os iniciadores 27F, 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') e 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') para rDNA 16S; UP1-F, UP2-R para *gyrB*; rpoB-F, rpoB-R para *rpoB* genes e o kit *ABI PRISM<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, CA, EUA). As sequências parciais fornecidas pela empresa Macrogen Inc. foram de alta qualidade (Phred >20) e utilizadas para gerar sequências consenso usando o programa *Codon Code Aligner* versão 6.0.2 (Codon Code Corp, USA). Todas as sequências obtidas neste estudo foram depositadas no *GenBank* e os números de acesso estão listados na Tabela 8.

### 5.9.3 *Árvore Filogenética Concatenada*

Todas as análises filogenéticas foram realizadas usando os programas Geneious<sup>®</sup> versão 9.1.6 (KEARSE *et al.*, 2012) e MEGA versão 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013). As sequências consenso (rDNA 16S, *gyrB* e *rpoB*) foram alinhadas e comparadas com outras sequências depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)), usando o *Basic Local Alignment Search Tool – BLAST* (ALTSCHUL *et al.*, 1997). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com a ferramenta *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) para cada gene separadamente, em seguida, os alinhamentos foram trimados e concatenados. O alinhamento múltiplo concatenado foi então utilizado para construir árvores filogenéticas usando o algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) e o modelo de evolução Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) para estimar as distâncias evolutivas. A estabilidade dos clados gerados foi avaliada pelo teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 reamostragens.

## 5.10 Caracterização dos surfactantes bacterianos

### 5.10.1 *Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

As análises de DSC foram realizadas no Laboratório de Propriedade e Caracterização de Cristais no Departamento de Física da UFC. Este ensaio mede a diferença entre a entalpia da amostra e do material de referência enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Este ensaio foi realizado com o intuito de obter informações sobre as temperaturas de transição dos biosurfactantes como a temperatura de transição vítrea, a temperatura de cristalização e de fusão cristalina.

Os ensaios consistiram em pesar 3,0 mg dos biossurfactantes purificados selá-los em cadinhos de platina com tampa e submetê-los à análise em equipamento DSC *Netzsch-Gerätebau GmbH* Maia<sup>®</sup> modelo 200 F3, numa taxa de aquecimento de 5 °C /min em atmosfera inerte (nitrogênio – N<sub>2</sub>), 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* Origin Pro 2016 (Northampton, MA, USA).

### **5.10.2 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. Os biossurfactantes purificados liofilizados foram caracterizados em um espectrômetro de absorção infravermelho por transformada de Fourier FT-IR (Vertex 70 v, Bruker) operando em modo de reflexão atenuada total (ATR) à vácuo. Os espectros de FTIR com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup> foram coletados em comprimentos de onda entre 400 a 4000 (cm<sup>-1</sup>), tendo sido realizado uma média de 128 *scans*, corrigidos e convertidos para transmitância.

### **5.10.3 Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-Q-TOF MS)**

Todas as análises de determinação de massas dos metabólitos produzidos pelas estirpes bacterianas foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, na Universidade Estadual de Campinas em São Paulo. Os lipopeptídeos purificados liofilizados foram solubilizados em água e metanol (proporção 1:1), para a concentração final em torno de 2 mg/mL (m/v). A determinação da massa molecular dos compostos foi realizada utilizando-se um espectrômetro de massas 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 (+). Ácido fórmico a 0,1% foi adicionado 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; voltagem do fragmentador foi ajustado em +110 V, a vazão de fluxo de gás N<sub>2</sub> de secagem foi de 6 L min<sup>-1</sup> a 300 °C e 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 tetrafluoro propoxi fosfazine). A aquisição de dados foi realizada ao longo do intervalo de *m/z* 900-1700 (*full scan*). Três

lipopeptídeos comerciais, surfactina, iturina A e fengicina de *Bacillus subtilis* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) também foram analisados neste estudo e usados como referências.

#### 5.10.3.1 Processamento dos dados e Análise Estatística

Todos os dados foram adquiridos e controlados através do *software Agilent Mass Hunter Workstation LC-MS Data Acquisition* versão B.05.00 (*Agilent Technologies*). Os espectros foram analisados, reprocessados e exportados usando o *software Agilent Mass Hunter 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 de ESI-MS de todas as estirpes estudadas foram realizadas no programa *MetaboAnalyst 3.0* (XIA *et al.*, 2009, 2012, 2015) plataforma disponível online - <http://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 (que usa a 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).

A análise de componentes principais (PCA) e as análises discriminantes por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) e por projeções ortogonais a estruturas latentes (OPLS-DA) foram usadas para mostrar a máxima covariância entre os dados e comparar os perfis dos metabólitos de cada estirpe bacteriana. PLS-DA proporciona um método gráfico de fácil compreensão para identificar as observações (metabólitos) que fazem a separação entre os grupos e a significância estatística do resultado. As variáveis que mais contribuíram para diferenciar os grupos (VIP – *Variable Importance in the Projection*) foram identificadas pela análise ANOVA seguida pelo teste de *Tukey*. Quanto à validação estatística, esta foi verificada pelos valores das qualidades dos modelos  $R^2$  (variância, qualidade do modelo) e  $Q^2$  (preditor da variância, previsibilidade do modelo) verificados para PLS-DA e OPLS-DA. E por fim, foi

realizada uma análise de agrupamento usando distância Euclidiana e o algoritmo *Ward* para mostrar a correlação entre os vários tipos de lipopeptídeos produzidos entre as estirpes.

### 5.11 Avaliação da ecotoxicidade dos biossurfactantes

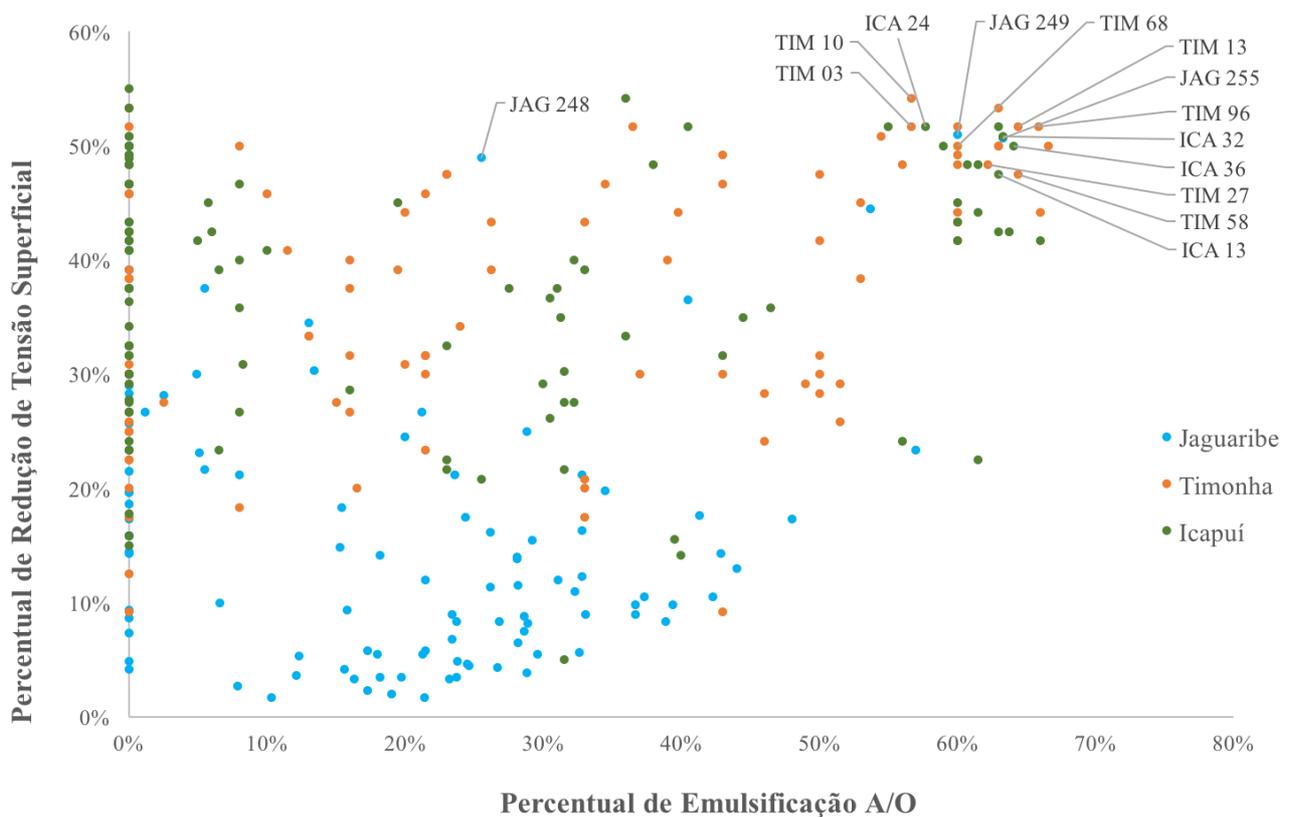
A avaliação da ecotoxicidade dos biossurfactantes foi avaliada contra náuplios do microcrustáceo *Artemia salina* (CARVALHO *et al.*, 1988; MEYER *et al.*, 1982). Antes de iniciar o ensaio, uma pequena porção de cistos foi posta para eclodir em um tanque aerado contendo 2 L de água do mar artificial, contendo a seguinte composição por litro: 15,15 g de NaCl; 2,18 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 2,85 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,65 g de CaCl<sub>2</sub>; 0,116 g de NaHCO<sub>3</sub>; 0,414 g de KCl sob iluminação artificial constante. Náuplios (n = 10 náuplios/amostra/concentração), eclodidos em água do mar artificial (3,5% de salinidade; pH 7,8) e com 48 h de vida foram transferidos para tubos de ensaio contendo 3 mL de soluções de biossurfactantes e surfactantes sintéticos SDS e Triton™ X-100 (t – octilfenoxipolietoxietanol, Sigma-Aldrich® , Saint Louis, USA) como controles positivos, diluídos em água do mar, nas concentrações de 50, 150 e 300 mg/L. No controle negativo continha apenas água do mar artificial. As amostras foram observadas após 24 h para o cálculo da taxa de mortalidade em cada concentração das amostras testadas. Foram considerados mortos os náuplios que permaneceram imóveis após agitação suave dos tubos. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas e os resultados expressos como média ± desvio padrão. Os resultados foram plotados em um gráfico para correlacionar mortalidade *versus* concentração da amostra a fim de estimar a concentração letal para 50% dos indivíduos (CL50).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Prospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes

Baseado nos trabalhos prévios de Barreto (2011) e Lima (2013), foi feita uma prospecção-guiada a fim de selecionar as estirpes produtoras de biossurfactantes de melhor desempenho. Os resultados obtidos a partir da combinação dos dois primeiros critérios de seleção (emulsões estáveis e redução da tensão superficial) estão mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Agrupamento de 279 estirpes de bactérias isoladas de sedimentos de três manguezais do Ceará (Jaguaribe, Timonha e Icapuí) com base nas atividades de redução da tensão superficial e emulsificação do querosene, utilizando os sobrenadantes das culturas cultivadas em meio mineral por 48 h.



Os resultados mostraram que dos 279 isolados analisados, 33 (3 Jaguaribe; 14 Icapuí; 16 Timonha) produziram tensoativos que reduziram a tensão superficial do meio mineral em mais de 50%, e 69 (2 Jaguaribe; 34 Icapuí; 33 Timonha) que reduziram a tensão superficial em mais de 40%. Em relação à atividade emulsificante, apenas 52 foram capazes de promover emulsões água-óleo estáveis com índices superiores a 50%, sendo 4 estirpes do Jaguaribe, 18 do Icapuí e 30 do Timonha (Figura 5).

O terceiro critério adotado para seleção das estirpes foi a presença de genes para surfactina (*sfp*) e iturina (*ituD* e *lpa14*). A análise dos *amplicons* detectou 6 estirpes como potenciais produtoras de surfactina (JAG 249, ICA 24, ICA 32, TIM 10, TIM 27, TIM 68), 7 como potenciais produtoras de iturina (JAG 248, JAG 255, ICA 13, ICA 36, TIM 03, TIM 13, TIM 96), e 1 estirpe foi positiva para o gene da surfactina e para um dos genes de iturina (TIM 58) (Barreto, 2011; Lima, 2013).

A partir dessa prospecção-guiada 14 estirpes foram selecionadas, sendo três provenientes do manguezal do Jaguaribe (JAG 248, JAG 249, JAG 255), quatro do Icapuí (ICA 13, ICA 24, ICA 32 e ICA 36) e sete do Timonha (TIM 03, TIM 10, TIM 13, TIM 27, TIM 58, TIM 68 e TIM 96).

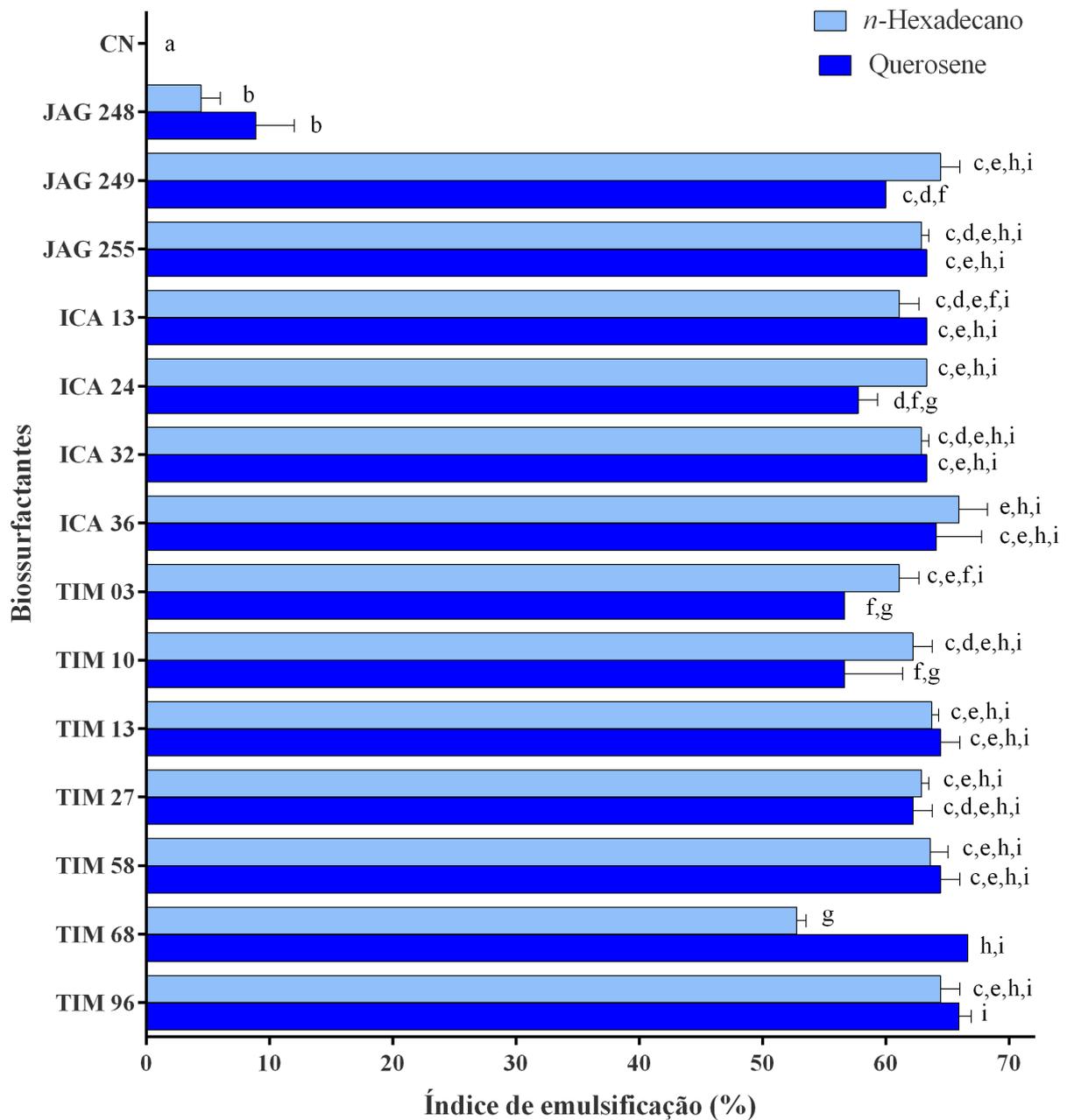
Apesar de JAG 248 ter sido selecionada, sua atividade emulsificante não se mostrou estável, já que a emulsão se desfez dentro de 24 h, ao contrário das emulsões produzidas pelas demais estirpes que permaneceram estáveis por pelo menos um mês de monitoramento. Esse comportamento diferente da JAG 248 levantou a hipótese de que essa estirpe produzisse tensoativos diferentes das demais, e por isso continuou no estudo para se testar essa hipótese.

## 6.2 Atividade Emulsificante (IE24) em diferentes fontes hidrofóbicas

A Figura 6 apresenta a média dos índices de emulsificação do querosene e *n*-hexadecano promovida pelos sobrenadantes brutos das 14 estirpes selecionadas. Todos os biossurfactantes produzidos foram capazes de formar emulsões estáveis tanto em misturas com querosene quanto com *n*-hexadecano, tendo IE24 maior do que 55%, com exceção de JAG 248. Os tipos de emulsões não diferiram entre as fontes hidrofóbicas, sendo todas as emulsões do tipo água/óleo (A/O).

A análise estatística de múltipla comparação (ANOVA com pós-teste de *Tukey*) indicou que o sobrenadante da estirpe TIM 96 foi o que apresentou maior índice de emulsificação dentre as amostras testadas e que somente JAG 248, JAG 249, ICA 24, TIM 03, TIM 10 e TIM 68 foram estatisticamente diferentes, promovendo IE24 menores, porém, ainda bons emulsificantes. ICA 24, TIM 03 e TIM 10 emulsionaram melhor o *n*-hexadecano do que o querosene, enquanto TIM 68 apresentou IE24 maior para o querosene.

Figura 6 – Percentuais de emulsificações de querosene e hexadecano obtidos com os sobrenadantes das 14 estirpes selecionadas. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Tukey*.



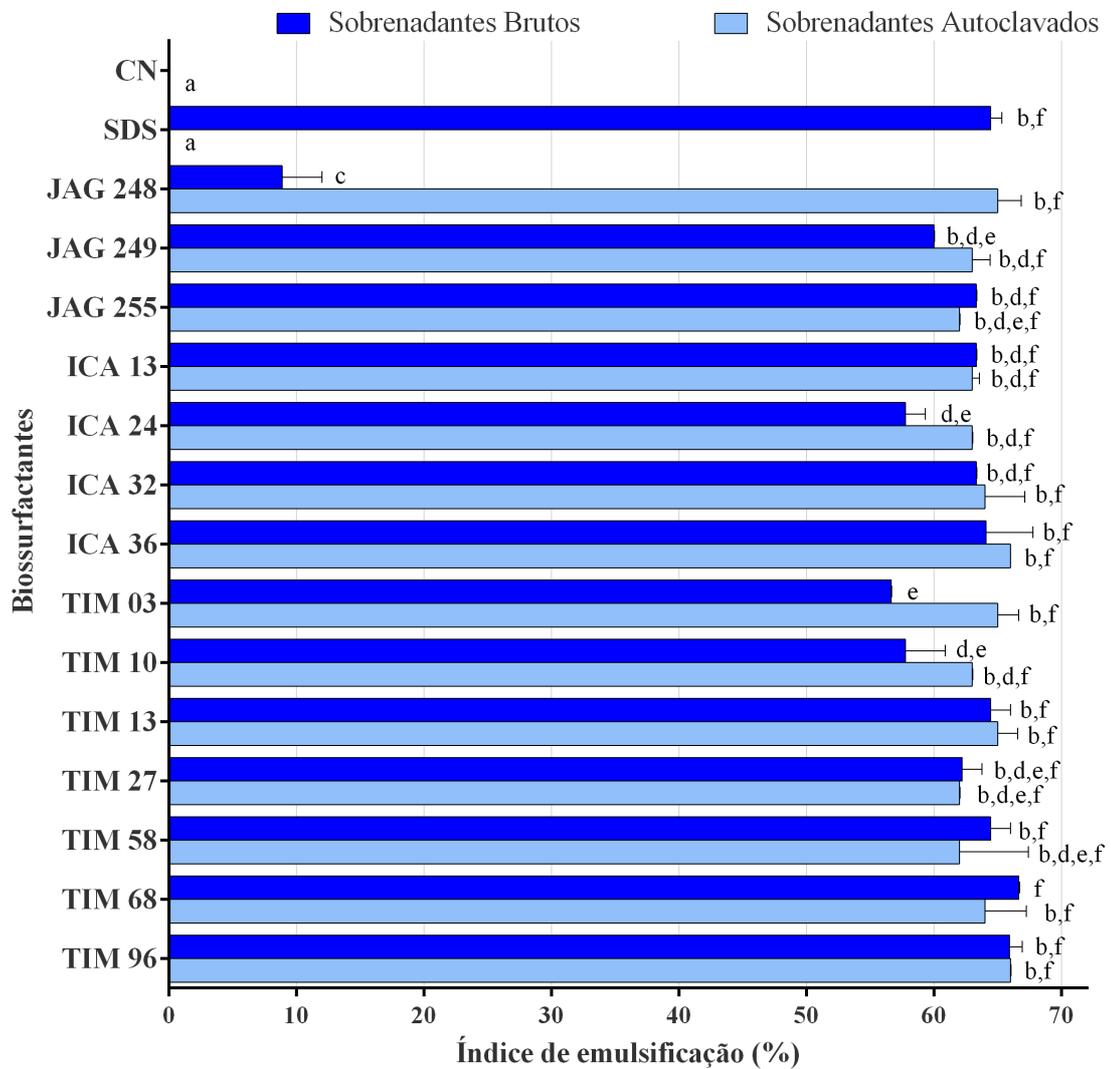
### **6.3 Estabilidade dos biossurfactantes após exposição a altas concentrações de NaCl, pressão e temperatura**

#### **6.3.1 Efeito da temperatura na atividade emulsificante**

Os resultados dos testes de emulsificação do querosene com os sobrenadantes das culturas antes e após autoclavação a 121 °C por 15 min estão mostrados na Figura 7. Treze estirpes (JAG 249, JAG 255, ICA 13, ICA 24, ICA 32, ICA 36, TIM 03, TIM 10, TIM 13, TIM 27, TIM 58, TIM 68, TIM 96) se destacaram por produzirem biossurfactantes capazes de emulsionar querosene com IE24 superiores a 55%, independentemente de terem ou não sido submetidas à autoclavação, confirmando a estabilidade térmica destas biomoléculas. Ao comparar os resultados obtidos com biossurfactantes e com o surfactante sintético SDS, observa-se que apenas os sobrenadantes das estirpes JAG 248, ICA 24, TIM 03 e TIM 10 produziram IE24 menores do que o SDS não autoclavado, enquanto todas as outras amostras foram estatisticamente iguais ao SDS. As emulsões promovidas pelos biossurfactantes das estirpes JAG 248 e TIM 03 tiveram aumento significativo após a autoclavação, enquanto o SDS perdeu completamente sua atividade emulsificante.

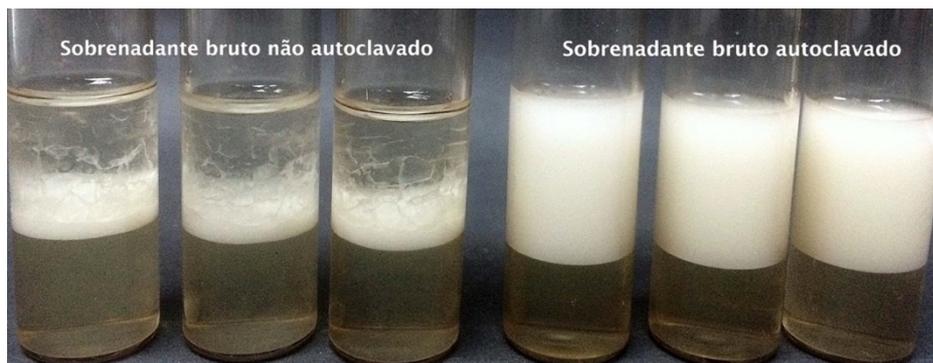
Interessantemente, o sobrenadante de JAG 248 que praticamente não apresentou atividade emulsificante (IE24 < 25%); após autoclavação, apresentou elevada atividade emulsificante (65%), como mostrado na Figura 7 e Figura 8. A partir desse resultado foi levantada a hipótese de que essa estirpe produz pelo menos duas moléculas com atividades tensoativas diferentes, uma molécula termoestável (emulsificante) e uma molécula termolábil (desemulsificante). Portanto, apenas após o desemulsificante ter sido inativado pelo calor, a atividade emulsificante foi revelada.

Figura 7 – Índices de emulsificações do querosene promovidos pelos sobrenadantes das culturas antes e após autoclavação a 121 °C por 15 min. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Sidak*.



Legenda: CN: controle negativo; SDS: 1% dodecil sulfato de sódio.

Figura 8 – Emulsão do querosene promovido pelo sobrenadante da JAG 248 não autoclavado (à esquerda) e após autoclavação a 121 °C por 15 minutos (à direita).



Fonte: autor.

A fim de comprovar a presença de um composto capaz de desestabilizar emulsões, o sobrenadante da JAG 248 foi utilizado sobre uma emulsão estável preparada com querosene e *Tween* 80, que foi totalmente desfeita, como evidenciado na Figura 9. Esse resultado confirmou a hipótese inicial de que JAG 248 produz um composto diferente, no caso, um desemulsificante.

Figura 9 – Aspecto da emulsão A/O estabilizada por *Tween* 80 (controle) e sua completa dissolução após aplicação do sobrenadante bruto da cultura JAG 248.



Fonte: autor.

Para analisar um possível efeito sinérgico entre os biossurfactantes e ratificar a atividade desemulsificante da JAG 248 mesmo na presença de outros tensoativos, foram preparadas e testadas as seguintes combinações, sem e com a presença do sobrenadante desta cultura (Figura 10):

1 – Misturas dos sobrenadantes das culturas do mesmo manguezal:

- JAG's (JAG 248, JAG 249 e JAG 255);
- JAG's (-JAG 248);
- ICA's (ICA 13, ICA 24, ICA 32 e ICA 36);
- TIM's (TIM 03, TIM 10, TIM 13, TIM 27, TIM 58, TIM 68 e TIM 96);

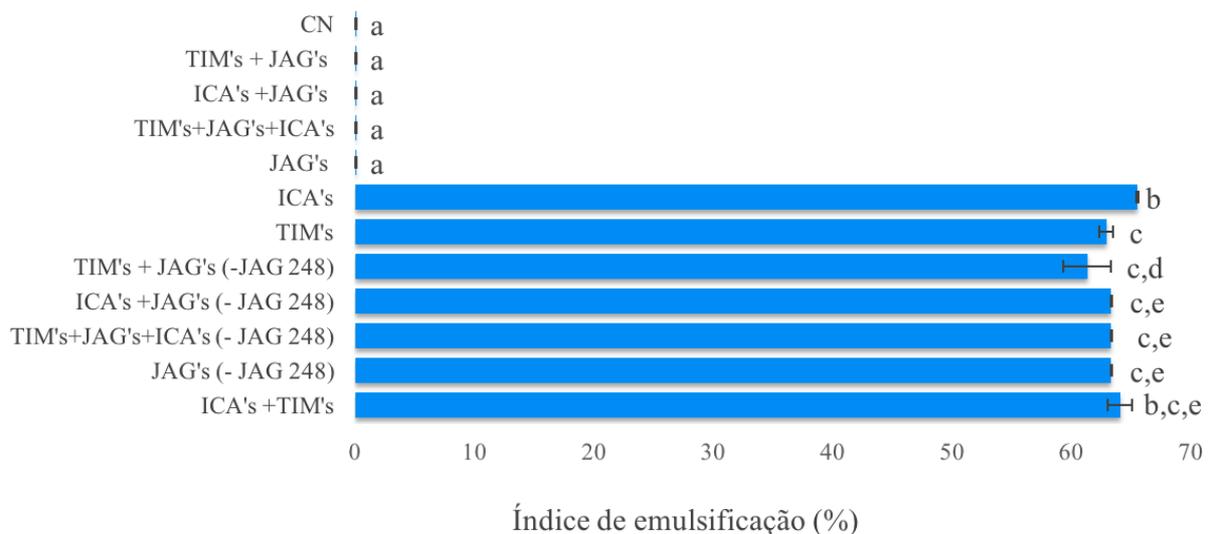
2 – Misturas dos sobrenadantes entre manguezais:

- TIM's + JAG's;
- TIM's + JAG's (-JAG 248);
- ICA's + JAG's;
- ICA's + JAG's (-JAG 248);
- ICA's + TIM's;

### 3 – Misturas dos sobrenadantes de todas as estirpes:

- ICA's + TIM's + JAG's;
- ICA's + TIM's + JAG's (-JAG 248).

Figura 10 – Índices de emulsificações obtidos com as misturas dos sobrenadantes das culturas intra e inter manguezais. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de *Sidak*.



Dentre as misturas testadas, o *pool* dos sobrenadantes das ICAs produziu IE24 mais elevado. Entretanto, no geral, os valores de IE24 não foram significativamente superiores àqueles obtidos com os sobrenadantes isoladamente, demonstrando que não há sinergismos entre as moléculas. Além disso, ficou provado que a presença do sobrenadante da cultura JAG 248 desestabiliza totalmente as emulsões promovidas pelas outras estirpes.

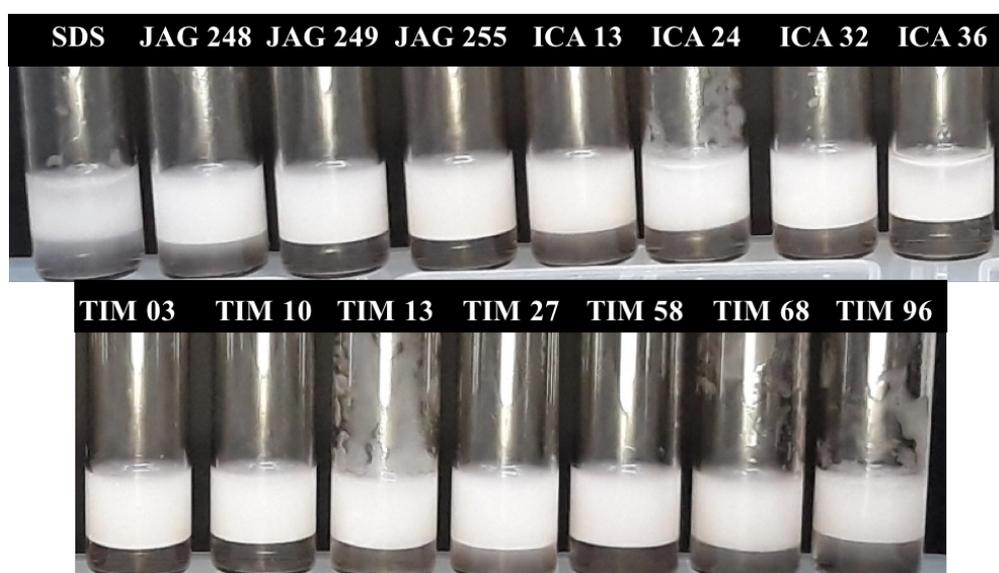
#### 6.3.2 Efeito combinado da alta temperatura e pressão nas atividades tensoativas

Dando continuidade ao estudo de estabilidade dos biossurfactantes, desta vez os biossurfactantes foram secos por liofilização e os pós foram submetidos a uma ação combinada de alta temperatura e pressão. Primeiro, foram submetidos a pressão de 600 bar por 3 min e então ressolubilizados em água ultrapura constituindo soluções surfactantes na concentração final de 400 mg/L. Na sequência, essas soluções foram autoclavadas por 15 min a 121 °C e então investigadas quanto à capacidade de emulsionar o querosene, reduzir a tensão superficial da água, dispersar petróleo e inverter a molhabilidade de rochas carbonáticas.

Quanto à atividade emulsificante, apenas o biossurfactante produzido por JAG 248 apresentou uma diferença significativa, com índice de emulsão final maior que o inicial, como

já esperado devido à inatividade do desemulsificante pelo calor. O SDS após os mesmos tratamentos mostrou uma redução significativa de sua atividade emulsificante. Todos os demais biossurfactantes retiveram suas atividades emulsificantes como pode ser visualizado na Figura 11. É importante frisar que a média dos valores de IE24 (58%) e de TS (28 mN/m) promovidos pelos biossurfactantes purificados, submetidos a alta pressão e autoclavagem, foram melhores do que àqueles apresentados pelos sobrenadantes brutos das culturas (Tabela 7). A Tabela 7 sumariza a caracterização das propriedades tensoativas, classe química, CMC e produção de biossurfactantes isolados de estirpes de *Bacillus* spp.

Figura 11 – Emulsão do querosene promovida pelo SDS e pelos biossurfactantes na concentração de 400 mg/L após tratamento a 600 bar de pressão e autoclavagem.



Fonte: autor.

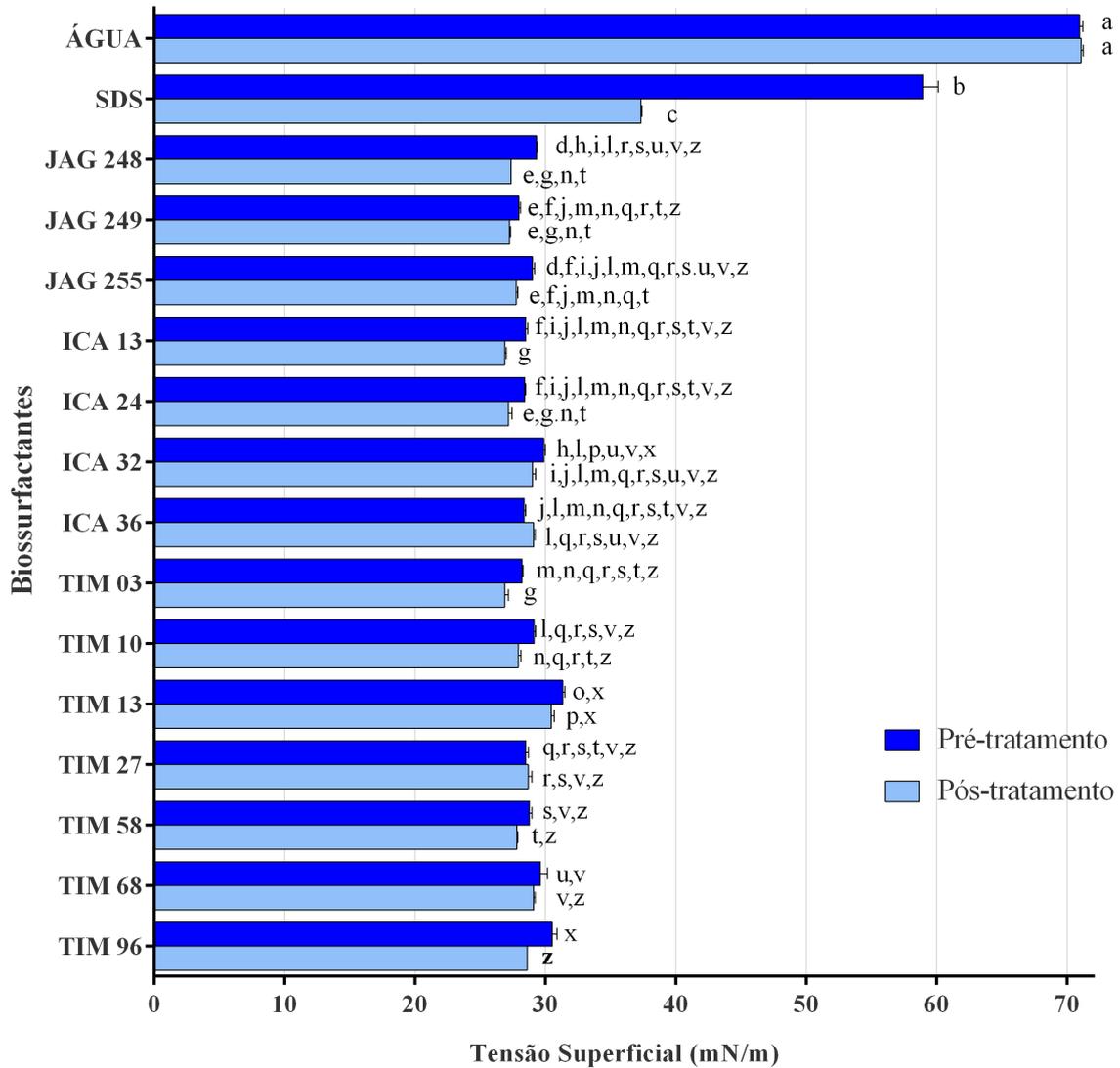
Na Figura 12 são mostrados os resultados das medidas de redução da tensão superficial antes e após os tratamentos de alta pressão e temperatura. Observa-se que os biossurfactantes purificados retiveram suas atividades, reduzindo a tensão superficial da água de 72 mN/m para valores entre 26,9 e 30,4 mN/m, valores bem próximos aos obtidos pela surfactina comercial purificada. A análise de múltipla comparação indica que a pressão e o calor exerceram um efeito positivo na tensoatividade dos biossurfactantes, já que as melhores reduções superficiais foram significativamente menores após exposição ao tratamento, em especial ICA 13, TIM 03, TIM 58 e TIM 96. O surfactante sintético (SDS) apresentou o mesmo comportamento, tendo significativa redução da TS após exposição ao calor e pressão, entretanto, o valor de TS foi bem mais alto (37 mN/m) e significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) dos valores alcançados pelos biossurfactantes purificados (Figura 12).

Tabela 7 – Caracterização das propriedades tensoativas e classe química de biossurfactantes produzidos por estirpes de *Bacillus* spp. isoladas de sedimentos de manguezais do Ceará.

Estirpe	Parâmetros Tensoativos						Composição do biossurfactante	CMC (mg/L)	Produção (mg/L)	
	Biossurfactante não autoclavado		Biossurfactante submetido a 600 bar de pressão e autoclavação 121 °C/15 min							
	Tensão Superficial (mN/M)	Emulsificação IE24%	Tensão Superficial (mN/M)	Emulsificação IE24%	Dispersão do óleo (%)	Inversão Molhabilidade	FTIR bandas	Família Lipopeptídeo		
<i>B. amyloliquefaciens</i> JAG 248	29,3 ± 0,06	25,5 ± 1,9	27,4 ± 0,09	68,7 ± 0	100 ± 0	+	Ag+AA	B+I	26,78	802
<i>B. subtilis</i> JAG 249	27,9 ± 0,15	61,5 ± 0	27,2 ± 0,07	65,6 ± 3,1	100 ± 0	+	Ag+AA	S	20,53	627
<i>B. amyloliquefaciens</i> JAG 255	29 ± 0,17	59,6 ± 2,7	27,7 ± 0,08	65,6 ± 3,1	100 ± 0	+	Ag+AA	B+I	6,12	846
<i>B. amyloliquefaciens</i> ICA 13	28,5 ± 0,17	60 ± 0	26,9 ± 0,08	65,6 ± 3,1	100 ± 0	+++	Ag+AA	B+I	10,55	535
<i>B. vallismortis</i> ICA 24	28,4 ± 0,06	68,7 ± 0	27,1 ± 0,08	68,7 ± 0	100 ± 0	+	Ag+AA	B+I	10,62	720
<i>B. subtilis</i> ICA 32	29,9 ± 0,10	63,4 ± 2,7	29,0 ± 0,07	59,3 ± 3,1	100 ± 0	+	Ag+AA	B+I	12,12	564
<i>B. amyloliquefaciens</i> ICA 36	28,4 ± 0,10	64,1 ± 3,7	29,1 ± 0,04	56,6 ± 3,1	100 ± 0	-	Ag+AA	S+F	20,16	602
<i>B. amyloliquefaciens</i> TIM 03	28,2 ± 0,06	62,6 ± 0	26,9 ± 0,08	68,7 ± 0	100 ± 0	+	Ag+AA	B+I	15,95	609
<i>B. subtilis</i> TIM 10	29,1 ± 0,12	63,2 ± 1,0	27,9 ± 0,07	67,7 ± 1	100 ± 0	+	Ag+AA	S	18,64	598
<i>B. amyloliquefaciens</i> TIM 13	31,3 ± 0,15	62 ± 2,8	30,4 ± 0,08	65,6 ± 3,1	100 ± 0	+	Ag+AA	B+S+F	12,23	647
<i>B. subtilis</i> TIM 27	28,5 ± 0,20	60,7 ± 1,1	26,8 ± 0,05	68,7 ± 0	100 ± 0	++	Ag+AA	S	5,34	588
<i>B. subtilis</i> TIM 58	28,8 ± 0,20	66,7 ± 2,8	27,8 ± 0,06	68,7 ± 0	100 ± 0	+	Ag+AA	S	9,53	618
<i>B. vallismortis</i> TIM 68	29,6 ± 0,40	61,5 ± 0	29,1 ± 0,04	67,7 ± 1	100 ± 0	-	Ag+AA	S	16,29	469
<i>B. amyloliquefaciens</i> TIM 96	30,5 ± 0,38	66 ± 2,8	28,6 ± 0,04	68,7 ± 0	100 ± 0	+++	Ag+AA	B+S	17,67	593

Legenda: IE24 = índice de emulsificação promovido pelos lipopeptídeos antes e após exposição a autoclavação 121 °C por 15 min (1atm) e a 600 bar de pressão; FTIR=Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier; Ag=ácidos graxos; AA=aminoácidos; Famílias de lipopeptídeos majoritárias (B=Bacilomicina; F=Fengicina; I=Iturina A; S=Surfactina); Símbolos: (+++) inversão molhabilidade total; (++) inversão molhabilidade parcial; (-) não inversão da molhabilidade; (nd): parâmetro não determinado, CMC= concentração micelar crítica.

Figura 12 – Redução da tensão superficial da água promovida por biossurfactantes e pelo SDS antes e após exposição a 600 bar de pressão seguido de autoclavagem. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey.

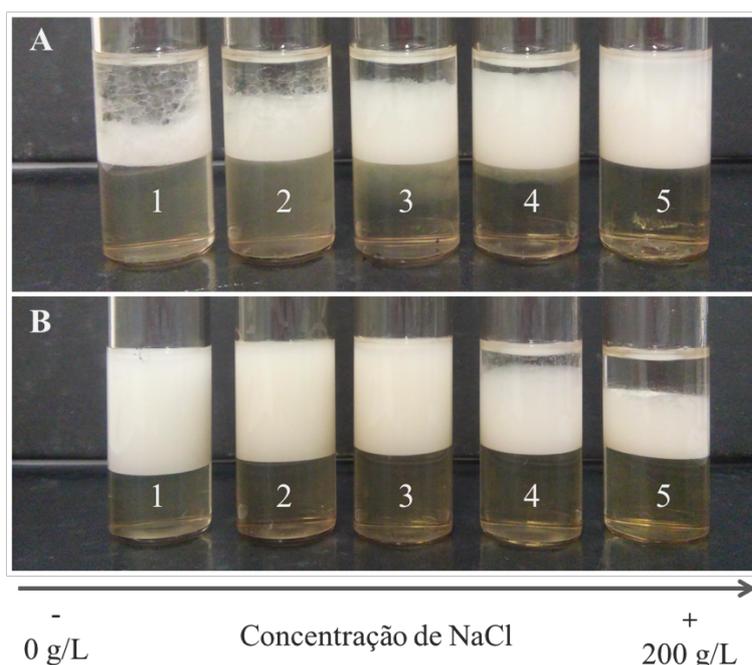


### 6.3.3 Efeito do sal na atividade emulsificante

Os resultados dos testes de emulsificação do querosene com os sobrenadantes das culturas em presença de diferentes concentrações de NaCl (20, 100, 150 e 200 g/L) estão mostrados na Figura 14. Todos os sobrenadantes emulsionaram querosene na presença de 20 g/L de NaCl, com valores similares àqueles obtidos na ausência de sal. Diferente dos demais, o sobrenadante da JAG 248, que normalmente não apresenta atividade emulsificante, apresentou atividade com o aumento da concentração de sal (Figura 13 e Figura 14). Considerando que essa estirpe produz pelo menos duas moléculas com atividades tensoativas diferentes, emulsificante e desemulsificante, é possível que somente após o desemulsificante ir perdendo

atividade com o aumento da concentração de sal que o emulsificante se tornou efetivo. Desse modo, aproveitando que o desemulsificante é termolábil, reavaliamos o potencial apenas do emulsificante testando o sobrenadante desta cultura autoclavado a 121 °C por 15 min (JAG 248\*). Dessa vez, o bioemulsificante produzido pela estirpe JAG 248 emulsionou o querosene até a concentração de 150 g/L de NaCl.

Figura 13 – Aspectos das emulsões do querosene promovidos por sobrenadantes da JAG 248 não autoclavados (A) e sobrenadantes autoclavados (B) em diferentes concentrações de NaCl. De 1 a 5, respectivamente: 0; 20; 100; 150 e 200 g/L de NaCl.

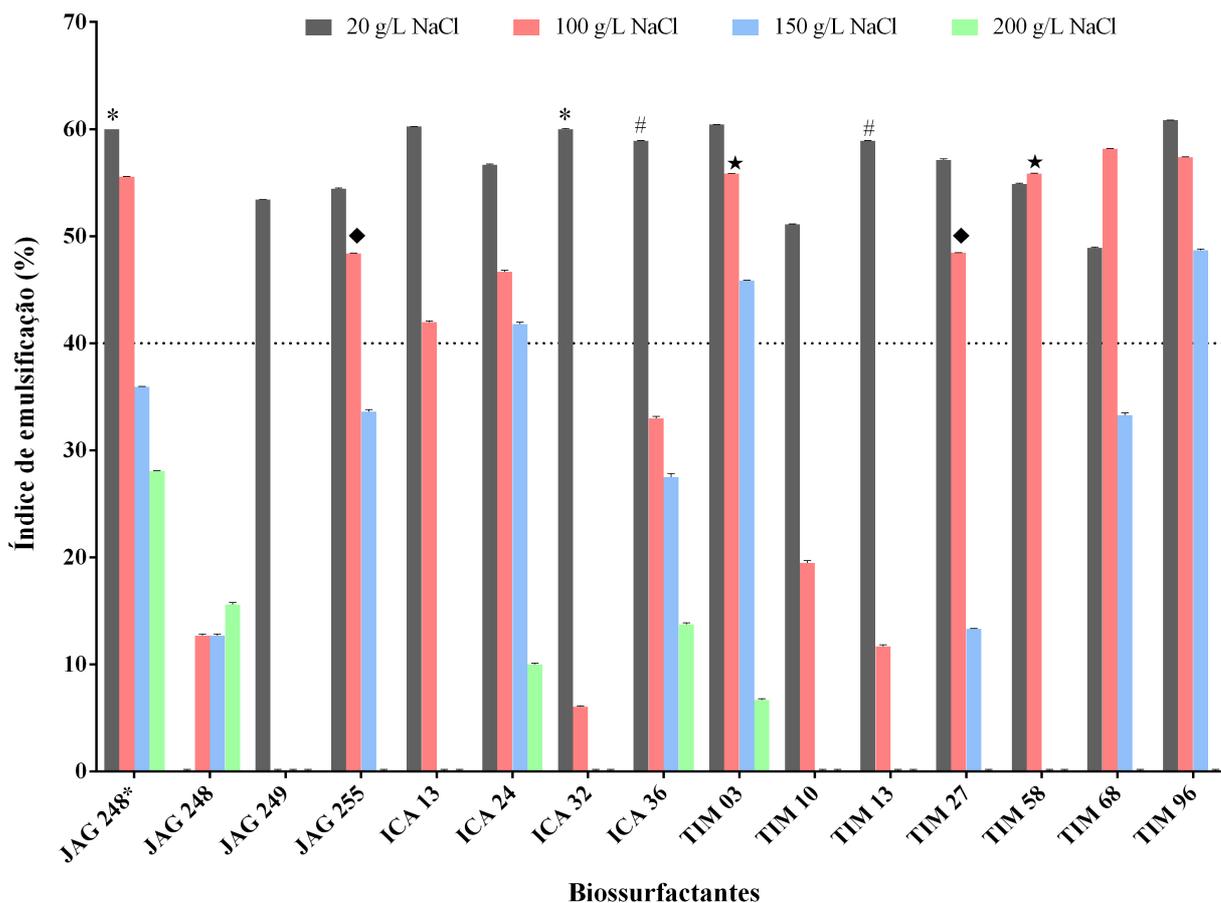


Em resumo, os sobrenadantes de nove das 14 estirpes (JAG 248\*, JAG 255, ICA 13, ICA 24, TIM 03, TIM 27, TIM 58, TIM 68, TIM 96) destacaram-se por promoverem emulsificação do tipo água/óleo (A/O), com índices superiores a 40% na presença de 100 g/L de NaCl, enquanto três (ICA 24, TIM 03 e TIM 96) mantiveram essa atividade na presença de 150 g/L de NaCl. Em presença de 200 g/L de NaCl a atividade foi completamente perdida ou muito baixa (Figura 14). Assim, é importante ressaltar que houve uma correlação negativa entre a salinidade e o IE24.

As análises estatísticas foram realizadas apenas com as amostras que apresentaram IE24 acima de 40%. O primeiro teste de análise de variância revelou que em 20 g/L de NaCl apenas as emulsões produzidas pelos biossurfactantes de JAG 248\* e ICA 32 foram estatisticamente iguais entre si, assim como ICA 36 e TIM 13. Em 100 g/L de NaCl, foram iguais: JAG 255 e TIM 27; TIM 03 e TIM 58. Nas demais concentrações, todas as estirpes

foram estatisticamente diferentes entre si. A manutenção da atividade tensoativa de alguns sobrenadantes em concentrações tão elevadas quanto 100 e 150 g/L é promissora para MEOR.

Figura 14 – Efeito da concentração de NaCl (20, 100, 150 e 200 g/L) na emulsificação do querosene promovida por sobrenadantes das culturas cultivadas durante 48 h em meio mineral. Símbolos iguais significam resultados estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ). Múltipla comparação com análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey.

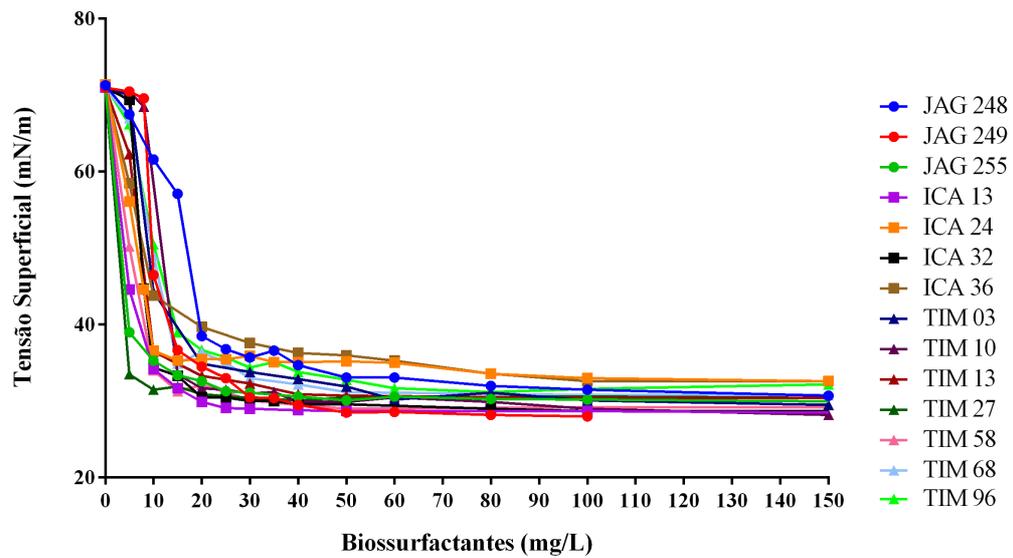


Legenda: JAG 248\*: sobrenadante autoclavado a 121 °C por 15 minutos; os demais foram realizados com os sobrenadantes brutos sem passar por tratamento térmico.

#### 6.4 Concentração Micelar Crítica (CMC) dos biossurfactantes

Os biossurfactantes produzidos pelas 14 estirpes de bactérias se revelaram promissores tensoativos, considerando suas baixas CMCs (Figura 15). A regressão não linear dos dados de tensão superficial x concentração dos biossurfactantes revelou que o ponto de inflexão dos gráficos foi entre 5 e 26 mg/L para todos os biossurfactantes, ponto no qual é atingida a CMC. A Tabela 7 e Anexo A apresentam a concentração micelar crítica de cada biossurfactante.

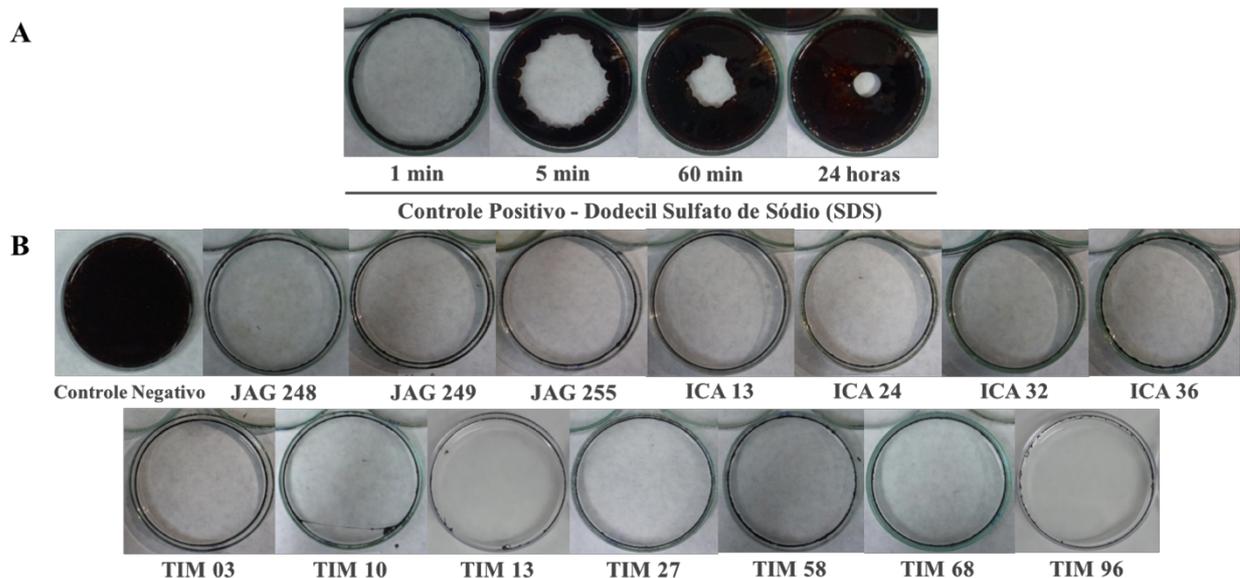
Figura 15 – Determinação da concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes.



### 6.5 Ensaio de dispersão de óleo derramado em água do mar

Os biossurfactantes após serem expostos à alta pressão e temperatura foram capazes de dispersar o filme de petróleo na superfície da água instantaneamente, promovendo halos equivalentes ao diâmetro da placa de Petri (10 cm). Ademais, a dispersão foi estável, ou seja, não regrediu ou se desfez após 24 h de observação. Os resultados estão mostrados na Figura 16. Para fins comparativos com um surfactante sintético foi utilizado o SDS. O SDS dispersou imediatamente o petróleo, demonstrando halos equivalentes ao diâmetro da placa, entretanto esta dispersão foi altamente instável e regrediu dentro de 60 min (Figura 16A).

Figura 16 – Dispersão de petróleo derramado em água do mar promovida por solução de SDS a concentração de 10.000 mg/L (A) e por soluções de biossurfactantes a concentração de 400 mg/L (B).



Fonte: autor.

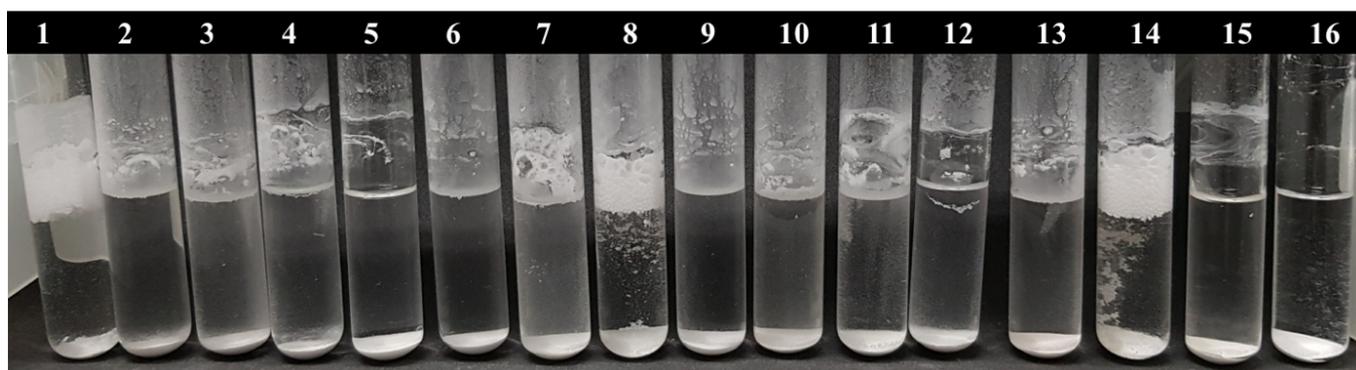
## 6.6 Simulação de inversão da molhabilidade em rochas carbonáticas

O teste de inversão da molhabilidade de rocha revelou que apenas os biossurfactantes produzidos por ICA 36 e TIM 68 não foram capazes de inverter a molhabilidade da rocha (Figura 17). O SDS só foi capaz de inverter a molhabilidade na concentração de 2.500 mg/L, que é mais alta do que a sua CMC. Na concentração testada para os biossurfactantes (50 mg/L), o SDS não teve atividade.

Os biossurfactantes produzidos por ICA 13 e TIM 96 destacaram-se por inverter completamente a molhabilidade da calcita molhável a óleo que flutuava na superfície água/ar para o fundo do tubo, tornando-a assim molhável a água. Nos demais tratamentos foi verificada apenas uma película de pó na superfície da água ou na parede do tubo após 24 h, havendo precipitação parcial da calcita para o fundo do tubo.

Desse modo, a maioria dos biossurfactantes aqui estudados é potencialmente capaz de reduzir a afinidade da rocha calcária pelo petróleo aumentando assim a mobilidade do óleo nos poros das rochas, auxiliando assim, na recuperação de óleo residual aprisionado no reservatório.

Figura 17 – Ensaio de inversão da molhabilidade de rocha carbonática com soluções surfactantes na concentração de 50 mg/L. Tubos da esquerda para direita: 1) controle negativo - água do mar; 2) JAG 248; 3) JAG 249; 4) JAG 255; 5) ICA 13; 6) ICA 24; 7) ICA 32; 8) ICA 36; 9) TIM 03; 10) TIM 10; 11) TIM 13; 12) TIM 27; 13) TIM 58; 14) TIM 68; 15) TIM 96; 16) SDS a 2.500 mg/L.



Fonte: autor.

## 6.7 Identificação Molecular e Análise Filogenética das estirpes bacterianas

A Tabela 8 sumariza a identificação consenso entre os três genes, os tamanhos das sequências, assim como seus números de acesso no *GenBank*. A posição filogenética de cada estirpe está mostrada na Figura 18.

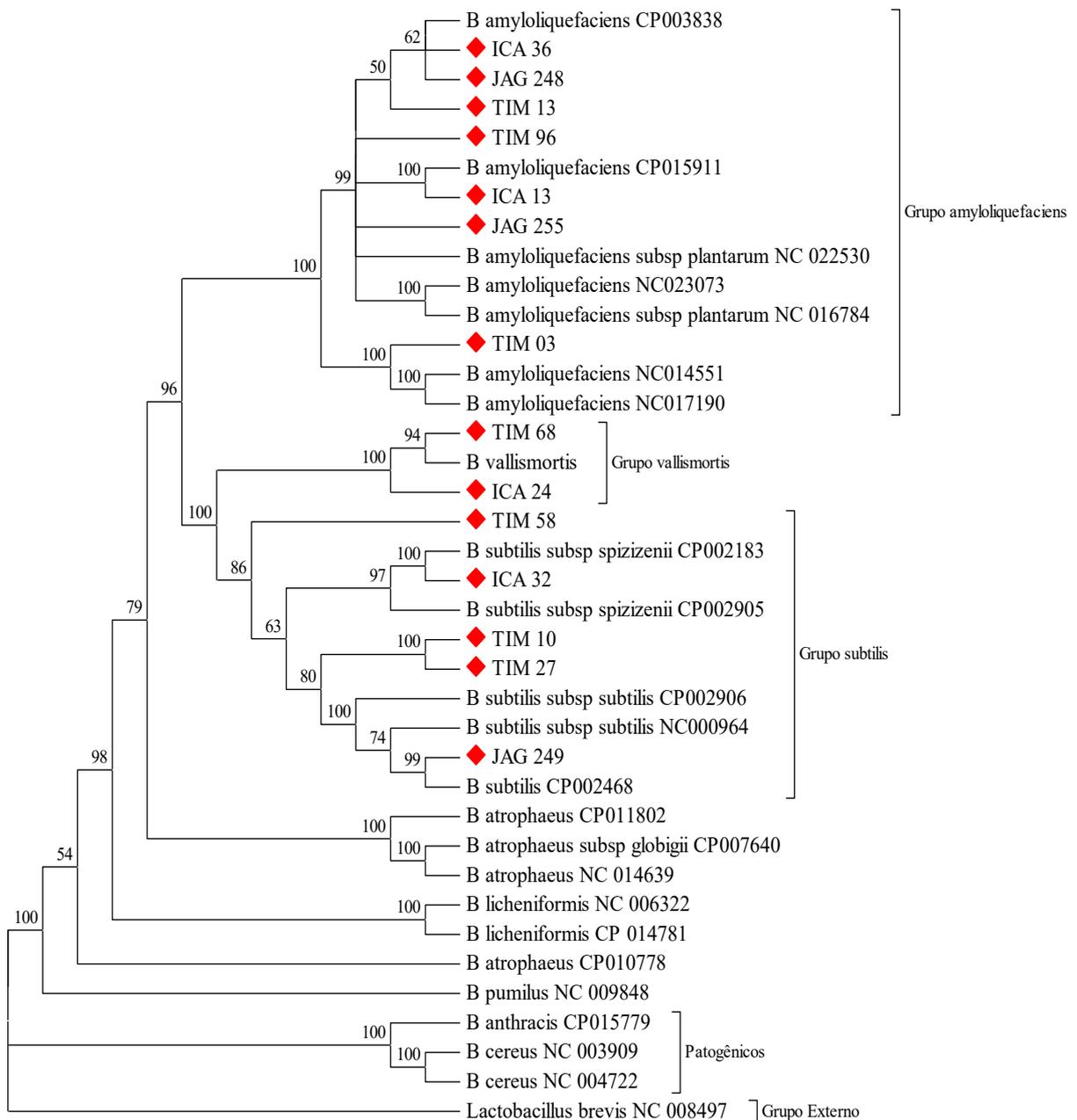
Tabela 8 – Identificação molecular consenso das estirpes bacterianas produtoras de biossurfactantes com base nas sequências dos genes codificadores para RNAr 16S, *gyrB* e *rpoB* com seus respectivos tamanhos e os números de acesso no GenBank.

Estirpe	Espécie mais relacionada no GenBank (Consenso ID)	16S rRNA		<i>gyrB</i>		<i>rpoB</i>		Números de Acesso GenBank		
		ID (%)	Tamanho (pb)	ID (%)	Tamanho (pb)	ID (%)	Tamanho (pb)	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoB</i>
JAG 248	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	1508	99	1110	99	556	KU556313	KY126809	KY126795
JAG 249	<i>B. subtilis</i>	100	1516	99	1061	99	553	KU556314	KY126810	KY126796
JAG 255	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99	1516	99	1102	99	553	KU556315	KY126811	KY126797
ICA 13	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	1442	100	1064	100	553	KU556327	KY126812	KY126798
ICA 24	<i>B. vallismortis</i>	99	1514	97	1054	99	551	KU556328	KY126813	KY126799
ICA 32	<i>B. subtilis</i>	100	1510	100	927	99	551	KU556329	KY126814	KY126800
ICA 36	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	1506	99	1071	99	554	KU556330	KY126815	KY126801
TIM 03	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	1501	98	1097	100	554	KU556316	KY126816	KY126802
TIM 10	<i>B. subtilis</i>	99	1505	99	1046	99	554	KU556318	KY126817	KY126803
TIM 13	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	1510	99	1102	100	554	KU556320	KY126818	KY126804
TIM 27	<i>B. subtilis</i>	99	1507	99	1072	99	555	KU556321	KY126819	KY126805
TIM 58	<i>B. subtilis</i>	99	1512	98	1003	99	554	KU556324	KY126820	KY126806
TIM 68	<i>B. vallismortis</i>	99	1507	99	1065	99	550	KU556325	KY126821	KY126807
TIM 96	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100	1504	99	1085	99	554	KU556326	KY126822	KY126808

Após a análise das sequências e da filogenia as estirpes JAG 249, ICA 32, TIM 10 e TIM 27 foram identificadas como *Bacillus subtilis*, que é uma espécie de biossegurança classe I, isto é, que não apresenta risco individual e coletivo. As estirpes JAG 248, JAG 255, ICA 13, ICA 36, TIM 03, TIM 13 e TIM 96 foram agrupadas em diferentes clados de *B. amyloliquefaciens*, enquanto ICA 24 e TIM 68 foram agrupadas com *B. vallismortis*. TIM 58

foi a única que apresentou alta similaridade com *Bacillus subtilis* e *B. mojavensis*, entretanto como o genoma de *B. mojavensis* ainda não se encontrava disponível no momento da análise, então não foi possível fazer essa discriminação. Nenhuma das estirpes mostrou similaridade (< 80% identidade) com espécies patogênicas, como *B. anthracis* e *B. cereus* (Figura 18).

Figura 18 – Árvore filogenética construída a partir do alinhamento múltiplo concatenado das seqüências dos genes RNAr 16S, *gyrB*, *rpoB* das 14 estirpes produtoras de biossurfactantes. As relações evolutivas foram inferidas usando o método de Neighbor-Joining e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura-2 parâmetros no programa MEGA6. A estabilidade de cada ramo foi testada pelo método de *bootstrap* com 1.000 reamostragens e os valores estão próximos aos nós.

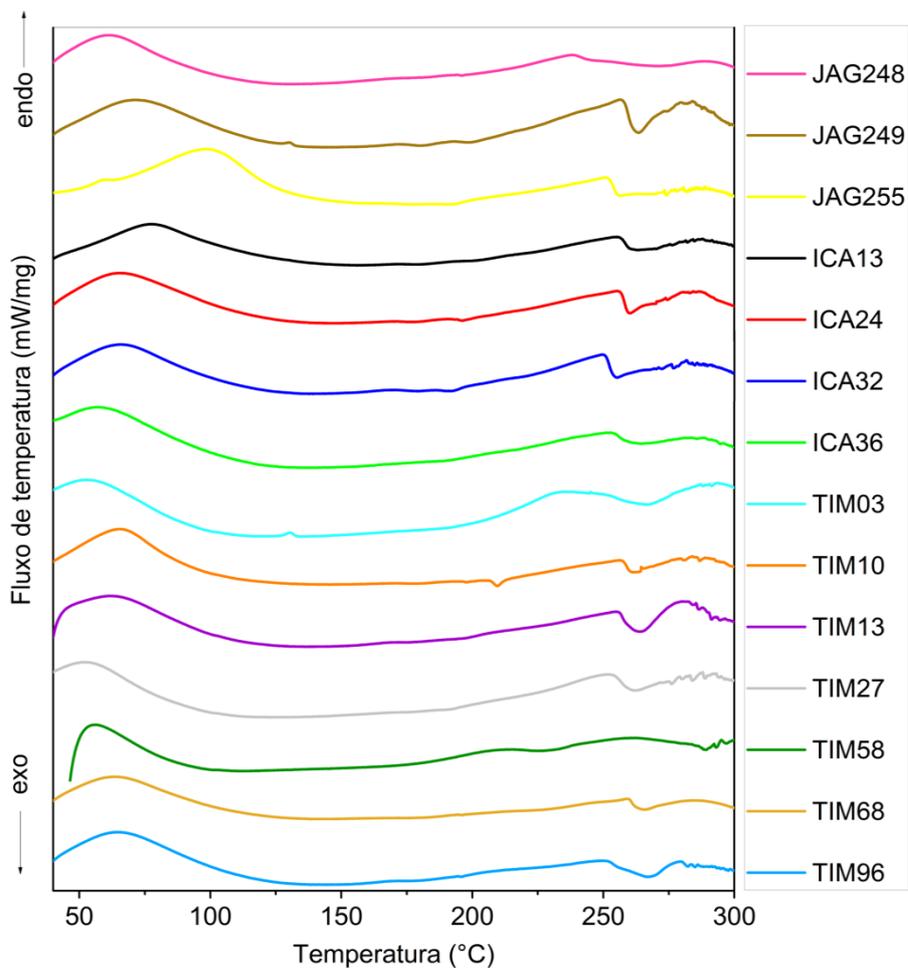


## 6.8 Caracterização dos Lipopeptídeos

### 6.8.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A estabilidade térmica do biossurfactante é uma característica importante para aplicações em MEOR. A análise por DSC, possibilita observar a estabilidade, modificações ou transições das biomoléculas quando submetidas a um aumento gradual de temperatura. Nos termogramas de DSC dos biossurfactantes é possível observar que os eventos térmicos foram bastante regulares entre si, havendo sempre dois eventos de temperatura característicos (Figura 19). O primeiro relacionado a um pico endotérmico, na faixa de 62 a 97 °C, atribuído à temperatura de desidratação do material e, o segundo, um pico exotérmico entre 255 – 289 °C que se refere à decomposição das amostras. Estes dados permitem afirmar que todos os biossurfactantes são termoestáveis até aproximadamente 250 °C.

Figura 19 – Termogramas de DSC dos biossurfactantes estudados.



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

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi utilizada para elucidar a estrutura química das amostras, identificando os tipos de grupos funcionais existentes.

De um modo geral, os perfis espectrais dos biossurfactantes mostram uma grande similaridade estrutural entre si, sendo observados picos de ligações peptídicas e de grupamentos carboxílicos, indicando a presença de hidrocarbonetos alifáticos combinados a um domínio peptídico, característico de biossurfactantes lipopeptídicos (Tabela 9 e Anexo B). Dentre as bandas características de peptídeos merecem destaque as bandas de absorção de aproximadamente  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $3060\text{ cm}^{-1}$ , resultante de estiramento das ligações N-H; a banda em torno de  $1640\text{ cm}^{-1}$  de estiramento das ligações OC-N; e a banda  $1530\text{ cm}^{-1}$  da deformação do N-H combinado com estiramento C-N, indicando a presença de grupamentos amins e de ligações peptídicas. Os espectros também mostram a presença de cadeias alifáticas (-CH<sub>3</sub>-; -CH<sub>2</sub>-), representadas pelas bandas entre  $2980 - 2840\text{ cm}^{-1}$  com um padrão de estiramento;  $1455 - 1350\text{ cm}^{-1}$  com padrão de torção, além dos picos nas faixas entre  $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$ , característicos dos grupamentos éster (C-O). Foi observado com clareza um pico na faixa de  $\sim 1736\text{ cm}^{-1}$ , representando o grupo carbonila. Também foi possível observar um grupo funcional representando alcenos, na faixa de absorbância entre  $990 - 960\text{ cm}^{-1}$ , com padrão de torção nos espectros obtidos para as todas as moléculas isoladas, exceto nas produzidas pelas estirpes JAG 249, JAG 255, ICA 24, TIM 13 e TIM 68.

A identificação dos picos foi feita mediante comparação com a literatura e confirmada em trabalhos como (DOMINGOS *et al.*, 2015; NAKANISHI; SOLOMON, 1977; PEREIRA *et al.*, 2013; PUEYO *et al.*, 2009).

Merece destaque a menor quantidade de picos relacionados a grupamentos amina comparado à quantidade de picos referentes à cadeia alifática. Isto pode estar relacionado à composição e tamanho do peptídeo cíclico e da cadeia carbônica, que está diretamente relacionado às atividades tensoativas e sua eficiência. Assim, torna-se importante a caracterização mais refinada das moléculas produzidas, a fim de se identificar qual tipo/classe de lipopeptídeo é produzido por cada estirpe e assim correlacionar a estrutura às suas atividades biológicas. Por esse motivo, as moléculas foram analisadas por espectrometria de massas.

Tabela 9 – Descrição das bandas de FTIR nos dados comprimentos de onda (cm<sup>-1</sup>) e seus respectivos modos de vibração.

		PICOS FTIR							
Grupo Funcional	N-H	CO-N	C-N/N-H	C-N	(-CH <sub>3</sub> ; -CH <sub>2</sub> -)	-CO-	C=C		
Faixa de Absorção (cm <sup>-1</sup> )	3300-3060	~1640	~1530	1360-1080	2980-2840	1455-1350	~1736	1000-675	
Modo de Vibração	v	v	v	v	v	δ	v	δ	
Jaguaribe	JAG 248	3278/3061	1636	1536	1338/1316/1270/1226/1157/1068	2957/2925/2857	1450/1387	1721	951/858
	JAG 249	3284/3058	1647	1532	1314/1232/1170/1126/1066	2957/2925/2860	1452/1398	1734	931/832
	JAG 255	3284/3067	1648	1537	1313/1233/1169/1062	2956/2926/2854	1452/1399	1734	931/894/830
Icapuí	ICA 13	3282/3068	1643	1540	1233/1169/1128/1075	2957/2928/2863	1452/1399	1733	964/931/832
	ICA 24	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
Timonha	TIM 03	3281/3069	1636	1535	1314/1269/1228/1159/1064	2961/2925/2855	1452/1397	1723	966/903/832
	TIM 10	3286/3057	1641	1532	1309/1232/1169/1131/1064	2955/2923/2855	1450/1400	1736	966/931/831
	TIM 13	3299/3064	1643	1525	1215/1126/1057	2958/2923/2854	1454/1382	1736	999/899/830
	TIM 27	3318/3064	1645	1517	1209/1125/1057	2956/2921/2856	1461/1367	1732	989/922/886/830
	TIM 58	3313/3064	1645	1524	1316/1232/1171/1135/1060	2956/2923/2853	1450/1402	1737	983/927/886/830
	TIM 68	3280/3064	1643	1538	1315/1231/1167/1073	2956/2927/2853	1452/1400	1739	931/840
	TIM 96	3282/3072	1645	1531	1308/1236/1172/1055	2956/2925/2853	1542/1402	1741	984/926/886/828

\*(v) *stretch – stretching mode* – modo de estiramento, \*(δ) *bend – bending mode* – modo de flexão

### 6.8.3 Perfil de Lipopeptídeos por Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Com o intuito de determinar as diferenças relativas entre a composição de lipopeptídeos das 14 estirpes e verificar sua relação com as propriedades tensoativas foi realizada a análise de espectrometria de massas.

A análise espectral dos 14 biossurfactantes purificados rendeu um total de 1361 picos analisados, tendo uma média de 97,2 picos por amostra, considerando uma tolerância de massa de  $m/z$  0,025. Todos os espectros de massa apresentaram aglomerados com picos principais em duas regiões distintas, uma compreendendo um intervalo entre  $m/z$  1000 e 1200, que corresponde à isoformas de surfactina e iturina, e a outra entre  $m/z$  1400 a 1500, correspondente à fengicina. Observou-se que cada um dos picos está acompanhado de sua série homóloga, diferindo em  $m/z$  14, correspondente a um grupo metil.

A identificação das entidades moleculares foi realizada com base nos íons e espectros descritos na literatura (Anexo C e Tabela 10). Os espectros de massas dos padrões comerciais (Anexo D i) também foram usados como referência, exibindo picos consonantes com os descritos na literatura, tendo como picos majoritários com  $m/z$  1030,64; 1044,66 e 1058,68 relativos à surfactina, picos com  $m/z$  1065,54 e 1079,54 relativos à iturina e com  $m/z$  1499,79; 1513,81 e 1527,83 relativos à fengicina.

Tabela 10 – Principais massas características das isoformas de surfactina, iturina e fengicina descritas na literatura e encontradas nesse estudo.

Classe do Lipopeptídeo	Íons característicos ( $m/z$ )
<b>Surfactina</b>	1008,66; 1016,66; 1030,64; 1044,66; 1058,68 e 1080,65 (STEIN, 2008)
<b>Iturina</b>	1043,56; 1057,56; 1065,54; 1079,54 e 1093,56 (PUEYO <i>et al.</i> , 2009)
<b>Fengicina</b>	1449,79; 1463,80; 1477,82; 1491,83; 1499,79; 1505,85; 1513,81; 1527,83; 1535,79 e 1549,81 (BIE; LU; LU, 2009)

Todas as estirpes co-produziram vários congêneres das três famílias de lipopeptídeos comumente produzidas por espécies do gênero *Bacillus*. Entretanto, as isoformas e a magnitude da contribuição de cada uma variaram entre as amostras, o que pode refletir nas suas atividades biológicas.

A análise de agrupamento baseada na distância Euclidiana para os dados de espectrometria de massas está mostrada na Figura 20. O perfil de lipopeptídeos produzidos por

cada estirpe (colunas) foi construído a partir das diferentes isoformas ( $m/z$ ) (linhas) e suas respectivas intensidades (gradiente de cor).

Considerando a matriz de dissimilaridade entre as amostras foi possível observar a formação de dois grandes grupos; o primeiro compreendendo amostras de JAG e ICA, mais TIM 03, e o segundo contendo majoritariamente amostras de TIM, mais JAG 249 e ICA 36. Essa classificação foi baseada claramente pelo tipo de lipopeptídeo produzido. O grupo I reuniu as amostras que apresentaram íons intensos de iturina A e/ou bacilomicina D e L. Em contrapartida, o grupo II foi constituído por amostras com forte contribuição de isoformas A e B de surfactina e fengicina.

No grupo I, um subgrupo reuniu as estirpes JAG 255 e ICA 32 por serem os principais produtores de bacilomicina D. Os íons mais intensos atribuídos a esta classe foram os 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 estirpes também produziram adutos de potássio  $[M+K]^+$  de iturina A com 15 carbonos, identificado pela  $m/z$  1081,56. O segundo subgrupo do grupo I reuniu as estirpes TIM 03, JAG 248, ICA 13 e ICA 24, principais produtores de iturina A  $[M+H]^+$  e bacilomicina L  $[M+Na]^+$ , identificado pelos íons de  $m/z$  1043,56  $C_{14}$ ; 1057,58  $C_{15}$  e 1071,59  $C_{16}$ . 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  $C_{14}$  a  $C_{17}$ . ICA 24 (grupo I), TIM 13 e TIM 96 (grupo II) foram as únicas a apresentarem o íon  $m/z$  1049,55, atribuído a  $C_{16}$  bacilomicina L  $[M+H]^+$ .

No grupo II, as amostras TIM 10, TIM 13, TIM 68 e ICA 36 destacaram-se por produzir intensamente isoformas A e B de surfactina  $[M+H]^+$  de 13 a 17 carbonos ( $m/z$  1008,66; 1022,68; 1036,70; 1050,71), assim como adutos de sódio de cadeia alifática pequena,  $C_{12}$  a  $C_{14}$ , com  $m/z$  1016,63; 1030,65; 1044,66, respectivamente, e adutos de potássio  $[M+K]^+$  de 15 carbonos ( $m/z$  1074,68). Já as amostras TIM 96, TIM 27, JAG 249 e TIM 58 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.

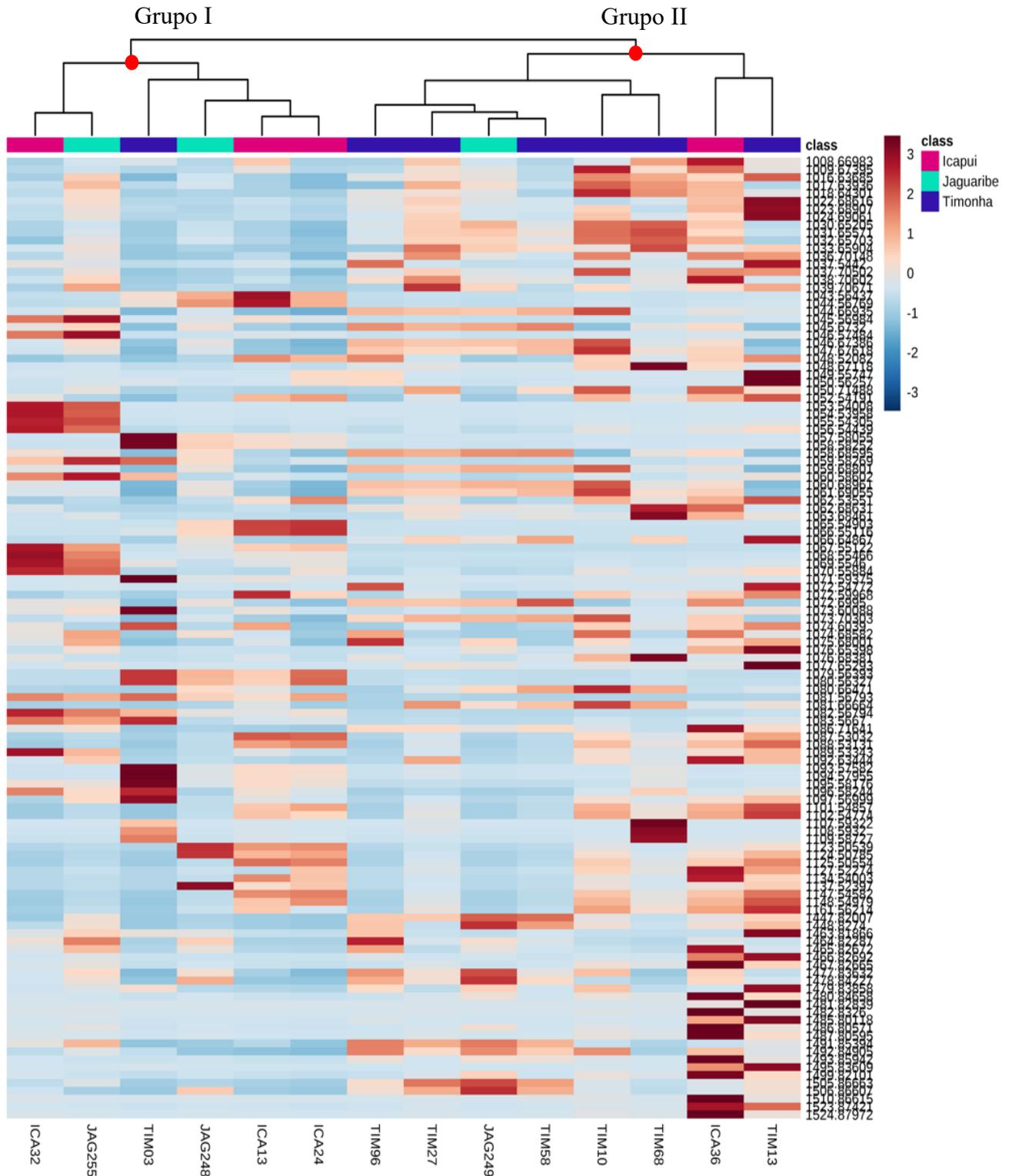
Analisando as isoformas de fengicina produzidas pelas 14 estirpes é possível constatar que a maioria (TIM 03, TIM 10, TIM 27, TIM 58, TIM 96, JAG 248, JAG 249, JAG 255 e ICA 32) exibiu íons de  $m/z$  1447,82; 1463,81; 1477,83; 1491,85 e 1505,86 atribuídos a fengicina A ou B de  $C_{14}$  a  $C_{19}$  carbonos. Duas amostras, ICA 36 e TIM 13, destacaram-se por serem as representantes mais versáteis e expressivas em termos de produção de fengicina (Figura 20). ICA 13, ICA 24, ICA 32 e TIM 68 mostraram baixa riqueza e abundância de íons de fengicina.

Por fim, é importante destacar que todas as amostras produziram fengicina A e B, contendo cadeias de ácido graxo variando de C<sub>14</sub> a C<sub>19</sub> (Tabela 10 e Anexo C), sendo o grupo II majoritário na produção desta família de lipopeptídeos.

Em linhas gerais, a análise espectral dos 14 biossurfactantes revelou a presença de íons das três famílias de lipopeptídeos, provando que todas as estirpes produzem de fato mais de um tipo de tensoativo. Além disso, as amostras exibiram diferenças quanto à composição de ácidos graxos e/ou de aminoácidos, evidenciando assim a presença de várias isoformas. Essa variação pode explicar as diferenças observadas em suas atividades tensoativas, principalmente no que se refere à inversão de molhabilidade. Das quatorze amostras, apenas ICA 36 e TIM 03 não mostraram atividade de inversão de molhabilidade. Os perfis de lipopeptídeos dessas estirpes se diferenciam das demais, a ponto delas não se agruparem entre si e nem com as outras estirpes, o que provavelmente explique o resultado negativo de molhabilidade. ICA 36 se diferencia pela presença de íons intensos de fengicina e TIM 03 pela presença de bacilomicina L [M+Na]<sup>+</sup> e iturinas A [M+H]<sup>+</sup> e [M+Na]<sup>+</sup>, todos contendo 15 ou 16 carbonos na cadeia de ácido graxo.

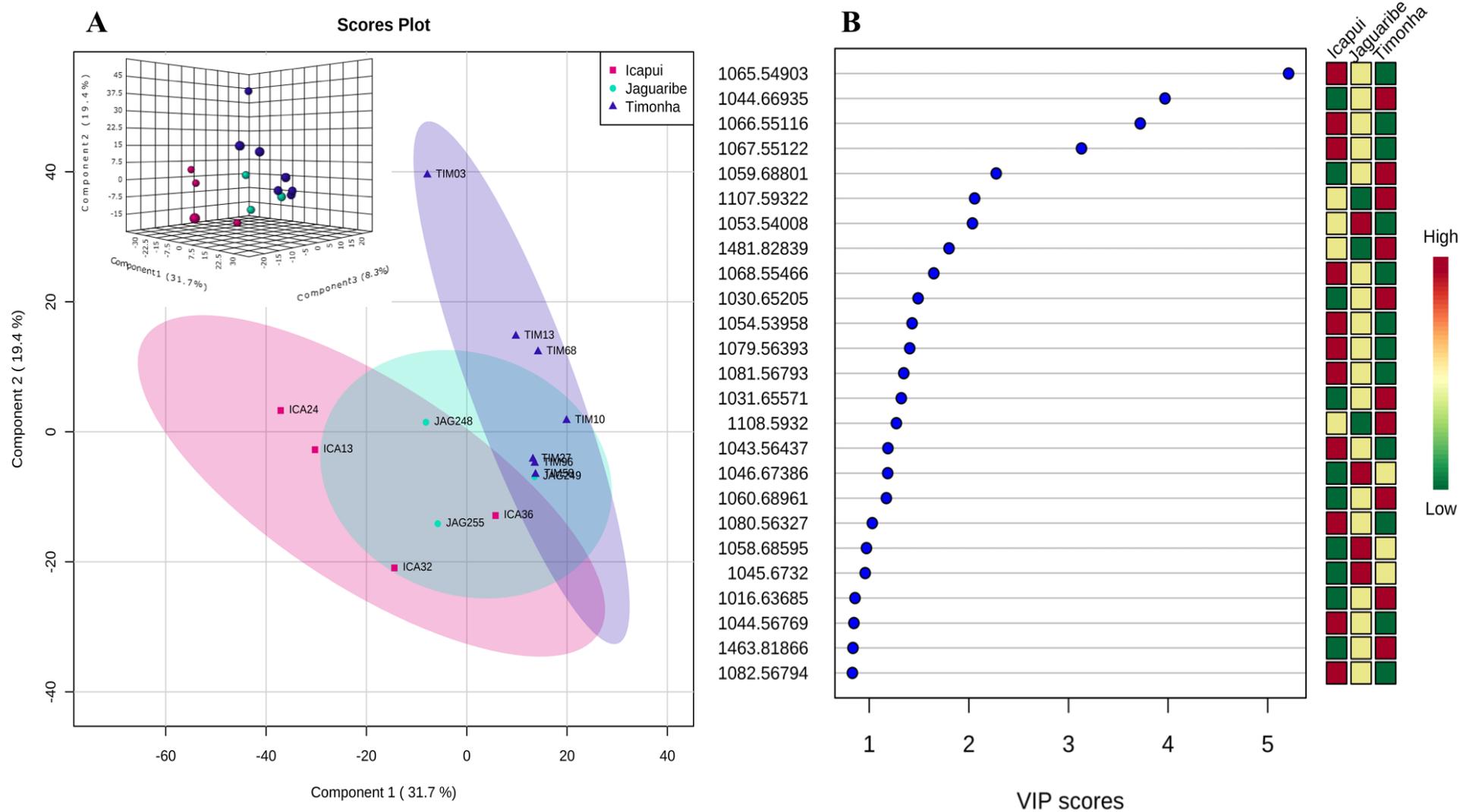
Sumarizando, os 14 perfis metabólicos revelaram que os principais produtores de cada família de lipopeptídeo são: ICA 36, TIM 10, TIM 13 e TIM 68 para surfactinas de cadeias curtas; JAG 249, TIM 27, TIM 58 e TIM 96 para surfactinas de cadeias longas; ICA 24 e TIM 03 para iturinas; JAG 255 e ICA 32 para bacilomicinas D e JAG 249, ICA 36 e TIM 13 para fengicinas.

Figura 20 – Mapa (*heatmap*) do perfil lipopeptídico das 14 estirpes de *Bacillus* sp. (colunas) quando cultivadas em meio mineral por 48 h. Análise realizada no MetaboAnalyst 3.0 usando a distância Euclidiana e algoritmo de Ward através dos dados de  $m/z$  e respectivas intensidades obtidos por ESI(+)-Q-TOF MS.



A análise supervisionada de discriminação dos dados multivariados por PLS-DA mostrou que 51% do total de variância nos dados correlacionam-se aos dois primeiros componentes principais e que há uma tendência de separação das amostras pelo manguezal de origem (Figura 21A), possivelmente em resposta a pressões ambientais diferentes. As 25 *features* com o maior índice VIP (Variável de Importância em Projeção) se destacam como potenciais biomarcadores, pois são os principais picos responsáveis pela diferenciação das amostras e representam assim as isoformas mais significativas para explicar os resultados biológicos obtidos (Figura 21B). Dentre as entidades moleculares mais importantes estão o íon  $m/z$  1065,54 e sua série homóloga, majoritários nas amostras do manguezal de Icapuí, enquanto o íon  $m/z$  1044,66 foi detectado principalmente nas amostras do manguezal Timonha. Esses dois íons foram identificados como C14 surfactina A ou C15 surfactina B  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  1044,66) e C14 iturina A  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  1065,54).

Figura 21 – (A) Representação esquemática da projeção espacial dos 14 biossurfactantes analisados após análise multivariada por PLS-DA mostrando a forte correlação entre os grupos. (B) 25 principais íons (VIP scores) e suas respectivas magnitudes de contribuições para separação dos grupos.



Nem todas as variáveis contribuem para classificação dada pelo PLS-DA, logo, com intuito de testar qual a magnitude das variáveis que influenciam na distinção dos grupos, foi realizada a análise de OPLS-DA (Figura 22). O modelo OPLS-DA é rotacionado de modo que a máxima variação entre os grupos esteja na componente preditiva (horizontal) e a máxima variação dentro da classe é visto na componente ortogonal Y (vertical) (WIKLUND *et al.*, 2008).

A Figura 22A ilustra a segregação total dos lipopeptídeos em três grupos distintos, de acordo com seu manguezal de origem. Este resultado revela que a pressão seletiva do ambiente influenciou na produção diferencial das isoformas de lipopeptídeos produzidas pelas estirpes bacterianas como já comentado anteriormente. Na Figura 22B é possível confirmar entidades moleculares que tiveram forte contribuição para distinção dos grupos, sendo consideradas biomarcadores putativos ( $m/z$  1044,66 e  $m/z$  1065,54 acompanhado de sua série homóloga). Para dados biológicos, os valores de parâmetros de qualidade,  $R^2$  e  $Q^2$ , são menos restritivos, sendo aceitáveis  $R^2$  acima de 0,7 (70%) e  $Q^2$  acima de 0,4 (40%) para dados metabolômicos (WORLEY; POWERS, 2012). Neste estudo, os valores de  $R^2$  ( $R^2=0,986$ ) e  $Q^2$  ( $Q^2=0,445$ ) seguiram o recomendado, descartando, portanto, a possibilidade de a classificação ter sido obtida de forma fortuita.

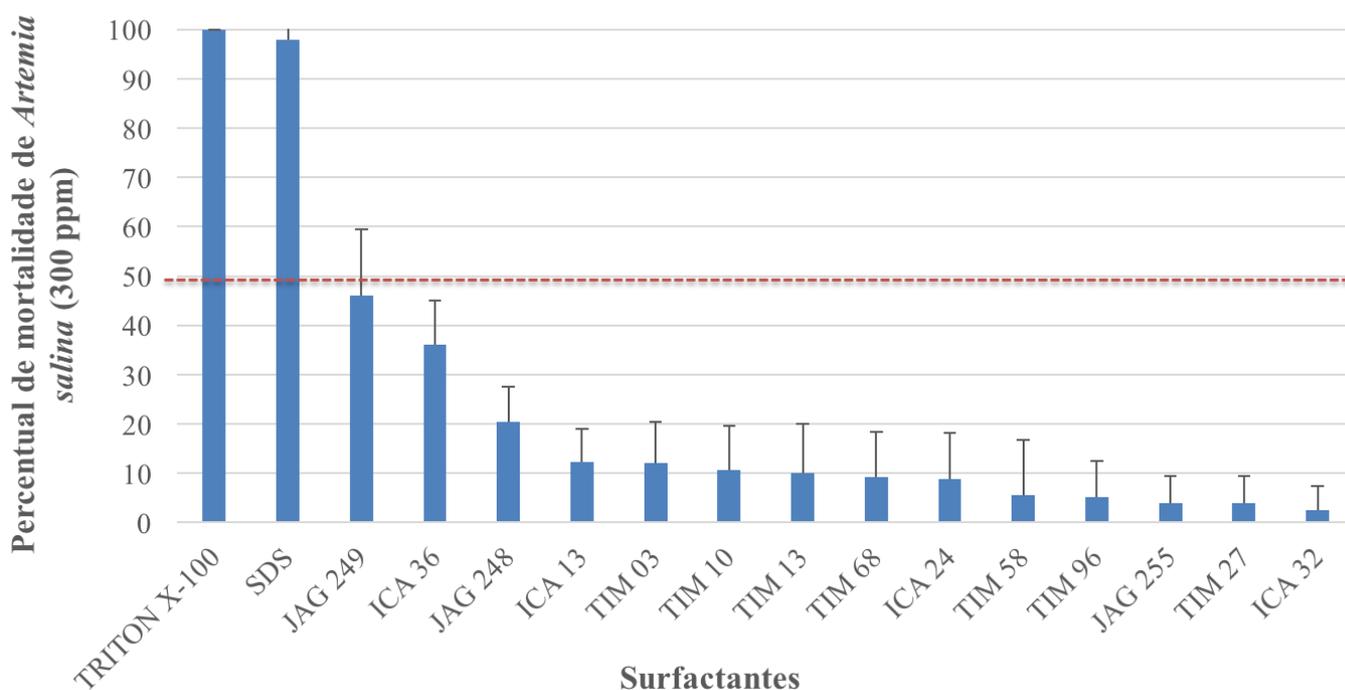


Analisando cuidadosamente o espectro de massa dos lipopeptídeos produzidos por JAG 248 (Anexo D ii) observa-se que além dos picos principais na região de  $m/z$  1000-1500 há um pico de  $m/z$  1629,83 que não aparece nos espectros das demais estirpes (Anexo 4D iii-v). Provavelmente esse pico está relacionado à sua atividade desemulsificante, mas isso precisa ser confirmado.

## 6.9 Avaliação da ecotoxicidade dos biossurfactantes

O teste de ecotoxicidade revelou que os biossurfactantes purificados não foram tóxicos aos náuplios de *Artemia* sp., e mesmo na mais alta concentração testada (300 mg/L), que representa mais de 10 vezes a CMC, a dose requerida para causar a morte de 50% dos náuplios,  $CL_{50}$ , ainda assim não foi atingida (Figura 23). Apenas os biossurfactantes produzidos pela estirpe JAG 249 e ICA 36 aproximaram-se da  $CL_{50}$ , apenas em 300 mg/L. Ao contrário, a  $CL_{50}$  dos surfactantes sintéticos, SDS e Triton X-100 foi atingida em baixas concentrações, 17,29 mg/L para o SDS e 87,89 mg/L para o Triton X-100, confirmando a reconhecida toxicidade desses compostos.

Figura 23 – Ecotoxicidade dos biossurfactantes produzidos pelas 14 estirpes de bactérias contra náuplios de *Artemia salina* em comparação com surfactantes sintéticos, SDS e Triton X-100.



## 7 DISCUSSÃO

Os biossurfactantes desempenham papéis fundamentais que os tornam adequados para MEOR, como detergência, emulsificação, desmemulsificação, lubrificação, capacidade de redução da tensão superficial e interfacial, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases, inversão de molhabilidade, atividade biocida e anti-incrustantes. Além disso, são equivalentes ou melhores em vários aspectos aos sintéticos, incluindo: melhor compatibilidade ambiental, produção a partir de resíduos ou substratos de baixo custo, manutenção da atividade em condições adversas, eficientes em baixas concentrações e não tóxicos.

Devido a excelentes aumentos no fator de recuperação de óleo, diversos estudos estão obstinados a procurar microrganismos produtores de biossurfactantes que tolerem as condições específicas dos reservatórios e que superem os surfactantes sintéticos convencionalmente utilizados para essa prática (KHEIRALLA *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2013).

A emulsificação, o poder de redução de tensão entre duas fases imiscíveis e a molhabilidade são propriedades que afetam diretamente a mobilidade do óleo nos poros das rochas do reservatório, facilitando sua recuperação (KASTER *et al.*, 2012). A busca por biossurfactantes que preenchessem esses requisitos motivou a realização desse estudo.

De acordo com Willumsen; Karlson (1997), um bom agente emulsificante é aquele que apresenta um índice de emulsificação (IE24) superior a 50%; já Mulligan (2005) afirma que um bom tensoativo é aquele capaz de reduzir a tensão superficial (TS) da água de 72 mN/m para 35 mN/m e a tensão interfacial entre água e *n*-hexadecano de 40 para 1 mN/m (SOBERÓN-CHÁVEZ ; MAIER, 2011). Baseado nessas premissas, após triar 279 isolados bacterianos, provenientes de três manguezais do Ceará, guiado pela atividade emulsificante, tensão superficial, dispersão de óleo e pesquisa de genes para biossurfactantes lipopeptídeos, foi possível selecionar 14 estirpes de *Bacillus* (JAG 248, JAG 249, JAG 255; ICA 13, ICA 24, ICA 32, ICA 36; TIM 03, TIM 10, TIM 13, TIM 27, TIM 58, TIM 68, TIM 96), como boas produtoras de biossurfactantes. Todas as estirpes selecionadas foram capazes de produzir bons agentes emulsificantes e bons tensoativos, já que todos promoveram emulsificação do tipo A/O, acima de 55%, mesmo em presença de alta concentração de NaCl (100 g/L NaCl), temperatura (121 °C) e pressão (600 bar). Os compostos também foram eficientes em reduzir a tensão superficial da água para até 26,8 mN/m, e carregam genes para surfactina e/ou iturina, duas classes importantes de biossurfactantes lipopeptídeos. Além disso, produzem biossurfactantes estáveis como confirmado em ensaios de simulação de derrame de óleo em água do mar.

Farias e colaboradores (2018) mostraram que a análise de correlação entre o perfil lipopeptídico e as propriedades tensoativas nas condições esperadas do reservatório pode ser uma abordagem útil para identificar estirpes de *Bacillus* mais adequadas para MEOR. Sendo assim, os biossurfactantes foram testados frente às condições peculiares de reservatórios e caracterizados.

A temperatura é um dos fatores mais importantes para MEOR, devido à sua influência significativa na sobrevivência de microrganismos, crescimento e produção de seus metabólitos. Temperaturas muito baixas podem retardar o metabolismo e temperaturas muito altas podem afetar enzimas e proteínas ao interromper atividades celulares vitais (SAFDEL *et al.*, 2017). A mudança na temperatura causa alterações na tensão interfacial, na natureza e viscosidade do filme interfacial, na solubilidade relativa do emulsificante, na pressão de vapor e viscosidade das fases, e na agitação térmica das partículas dispersas. A solubilidade dos surfactantes aumenta com o aumento da temperatura para os tensoativos iônicos, enquanto o inverso ocorre para os tensoativos não iônicos. Os surfactantes iônicos têm uma temperatura conhecida como ponto *Krafft* na qual o tensoativo passa a ser solúvel o suficiente para que suas moléculas livres estejam em concentração adequada para formação de agregados micelares (NEGIN; ALI; XIE, 2016). Abaixo dessa temperatura, o surfactante torna-se ineficaz e sai da solução aquosa. A temperatura de *Krafft* depende da estrutura do surfactante e afeta a redução da tensão e a concentração micelar crítica (CMC). Consequentemente, mudanças de temperatura causam alterações consideráveis na estabilidade da emulsão; isso pode inverter a emulsão ou fazer com que ela se quebre (TADROS *et al.*, 2004).

Todos os biossurfactantes estudados foram termoestáveis, ou seja, suas propriedades tensoativas não foram alteradas após aquecimento a 121 °C durante 15 min. O ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) também foi realizado com intuito de determinar a temperatura de decomposição das moléculas. Com este ensaio, tornou-se possível afirmar com segurança que todas as moléculas estudadas se mantêm íntegras até 240 °C, e que suportariam as temperaturas elevadas da maioria dos reservatórios de petróleo. Destaque-se que a maioria dos surfactantes sintéticos é degradado ou precipitado em temperaturas acima de 120 °C (NEGIN; ALI; XIE, 2016), o que serve para mostrar a vantagem dos biossurfactantes lipopeptídeos neste quesito.

A pressão é outro parâmetro importante a ser considerado em MEOR. Altas pressões hidrostáticas têm efeitos contraditórios sobre o crescimento bacteriano e na ação dos surfactantes, podendo afetar a concentração micelar crítica (SAFDEL *et al.*, 2017). Ademais, tem que se levar em consideração o efeito combinado da pressão e temperatura. Todas as

estirpes avaliadas nesse estudo retiveram suas atividades emulsificantes e de tensão superficial inalteradas após serem submetidas à pressão de 600 bar e temperatura de autoclavação, o que reforça o valor dos biossurfactantes para aplicações em MEOR.

A salinidade é crucial nos reservatórios e tem um efeito notável na redução da viscosidade. A concentração de sal nos reservatórios varia de 100 mg/L a mais de 300 g/L de acordo com a profundidade. Em geral, a alta salinidade tem um impacto adverso na eficiência dos surfactantes (NEGIN; ALI; XIE, 2016). A surfactina, por exemplo, sofre mudanças em suas propriedades de conformação e automontagem com o aumento da força iônica (KNOBLICH *et al.*, 1995).

Neste trabalho foi observada uma influência negativa do aumento da salinidade na atividade emulsificante dos sobrenadantes brutos das culturas. Ainda assim, nove das quatorze estirpes produziram tensoativos capazes de emulsionar o querosene (IE24 > 40%) na presença de 100 g/L de NaCl, enquanto três (ICA 24 e TIM 03 – produtoras majoritárias de bacilomicina e iturina; e TIM 96 – produtora majoritária de bacilomicina e surfactina) se destacaram por manter essa atividade na presença de 150 g/L de NaCl, provando que esses biossurfactantes seriam eficazes em salinidades de reservatórios do pré-sal.

Farias *et al.* (2018) detalharam o efeito da presença de baixas e altas concentrações de NaCl na síntese diferencial de lipopeptídeos produzidos por estirpes de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. vallismortis*. O aumento da salinidade favoreceu a síntese de surfactinas e fengicinas em detrimento de iturinas, o que influenciou significativamente nas atividades biológicas desejadas. Esses achados sugerem que a composição das misturas de biossurfactantes lipopeptídeos pode guiar a escolha daquela mais adequada para MEOR.

A estabilidade de biossurfactantes lipopeptídeos já foi relatada em diversos estudos (AL-WAHAIBI *et al.*, 2014; ALVAREZ *et al.*, 2015; GHOJAVAND; VAHABZADEH; SHAHRAKI, 2012), assim como seu potencial para MEOR (AL-WAHAIBI *et al.*, 2014).

As emulsões são sistemas heterogêneos, não-espontâneos, formados por uma fase dispersa emulsionada dentro de uma fase contínua devido ao fornecimento de energia mecânica para expandir a área interfacial e formar gotículas. Esta propriedade está relacionada com o tamanho da cadeia hidrofóbica e com a porção hidrofílica, sendo assim, nem todos os surfactantes apresentam capacidade emulsionante (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). A formação de emulsões do tipo A/O ou O/A depende dos volumes presentes no sistema das duas fases e da natureza do agente emulsificante, sendo empiricamente determinada. A fase de maior volume tende a ser a fase contínua, enquanto a de menor volume tende a ser a fase dispersa.

Além disso, a fase onde a solubilidade do emulsificante é maior, também tende a ser a fase contínua da emulsão (TADROS, 2009).

A orientação das emulsões e o tipo de comportamento esperado dos tensoativos são dependentes das propriedades físico-químicas, traduzidas principalmente pelo seu equilíbrio hidrofílico/lipofílico (HLB) (TADROS, 2009). O HLB é calculado pela diferença do número de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos da molécula mais 7. De um modo geral, se o  $HLB > 7$  tendem a formar emulsões do tipo O/A e  $HLB < 7$  do tipo A/O; 7-9 molhabilidade; 3-15, detergência e 15-18, solubilização (TADROS, 2009). São requeridos diferentes valores de HLB para emulsificação de diferentes tipos de óleo. As emulsões do querosene e *n*-hexadecano promovidas pelos sobrenadantes brutos das culturas estudadas aqui foram principalmente do tipo A/O, sugerindo um balanço hidrofílico-lipofílico baixo ( $HLB < 7$ ) das moléculas, e consequentemente contendo porções hidrofóbicas maiores. Além disso, a maior eficiência de emulsificação de alcanos de cadeia longa em detrimento de outras fontes hidrofóbicas, como relatado por Liu *et al.* (2015), pode justificar os altos índices de emulsificação com querosene e *n*-hexadecano.

Uma vez formadas, as emulsões de petróleo são normalmente estáveis, um dos principais problemas para a indústria do petróleo (DE ALMEIDA *et al.*, 2016) Durante a produção, é essencial remover a água e os sais orgânicos do óleo cru, objetivando reduzir o potencial de corrosão das linhas. Usualmente emulsões estáveis podem ser quebradas utilizando métodos físico-químicos, como aumento do tempo de sedimentação, por aquecimento, utilização de agentes desemulsificantes, tratamento eletrostático, de centrifugação e de filtração. O poder desemulsificante de alguns biossurfactantes encontra importante aplicabilidade na extração de petróleo ao refino, desfazendo emulsões água/óleo que são formadas durante a recuperação de óleo do reservatório, além de encontrarem demanda na limpeza de fundo de tanques, no qual a fração pesada do óleo associada a sólidos e água fica impregnada (ABDEL AZIM *et al.*, 2011; BANAT *et al.*, 2010). A quebra da emulsão (desemulsificação) ocorre através do rompimento das condições termodinâmicas na interface que leva ao rompimento das superfícies estáveis, aproximação das gotas e coalescência das mesmas (DE ALMEIDA *et al.*, 2016).

Neste estudo, apenas JAG 248 apresentou atividade desemulsificante, sendo capaz de desfazer emulsões estabilizadas por biossurfactantes e surfactantes sintéticos. Interessante destacar que quando esse desemulsificante foi inativado pela autoclavação, JAG 248 prontamente mostrou atividade emulsificante. Portanto, a mistura de lipopeptídeos produzidos por JAG 248 contém um desemulsificante termolábil e um emulsificante termoestável, podendo

ser empregado em diferentes aplicações. Li *et al.* (2012b) estudaram a atividade desemulsificante de uma estirpe de *B. mojavensis* isolada de um solo contaminado com petróleo no campo petrolífero Daqing, na China. trabalho revelou que a atividade desemulsificante estava atribuída a metabólitos extracelulares de natureza lipopeptídica que mantinham atividade estável até 75 °C. Acima desta temperatura (75–120 °C), a atividade era drasticamente diminuída. Os resultados indicaram que o desemulsificante era composto por dois componentes distintos, um termicamente estável (lipopeptídico) e outro instável (protéico). Resultados similares foram observados por Janiyani *et al.* (1994) ao encontrarem compostos com atividade desemulsificante produzidos por *B. subtilis*.

É importante distinguir entre um biossurfactante eficaz e um eficiente. A eficácia é medida pelo valor mínimo ao qual a tensão superficial pode ser reduzida, enquanto que a eficiência é medida pela concentração de biossurfactante necessária para produzir uma redução significativa na tensão superficial da água. Este último pode ser determinado a partir da determinação da concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes.

Em geral, as CMCs para biossurfactantes são muito baixas (APARECIDA GIRO *et al.*, 2009; MARIN *et al.*, 2015). Neste estudo, os lipopeptídeos foram altamente eficazes diminuindo a tensão superficial da água de 72 mN/m para até 26,8 mN/m a ~30 mg/L, valores similares aos relatados para surfactina, um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos, que reduz a tensão superficial da água para 27 mN/m a 21,3 mg/L (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). A surfactina comercial, produzida por *B. subtilis* e com pureza de 98% comercializada pela Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, possui uma CMC na faixa de 7,5 – 20 mg/L. Para fins comparativos, surfactantes sintéticos como TRITON X-100 e SDS apresentam CMC de 268 mg/L e 2120 mg/L, respectivamente (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

Em muitos casos, os biossurfactantes têm se mostrado mais efetivos que os surfactantes sintéticos em experimentos de recuperação de óleo. Testes de injeção combinada de surfactantes, polímeros e biossurfactantes na água de injeção conseguiram recuperar em torno de 60% de OOIP (óleo original do local) de reservatórios carbonáticos (GHOJAVAND; VAHABZADEH; SHAHRAKI, 2012) enquanto usando uma combinação sintética de álcali-surfactante-polímero (NaOH-SDS-poliacrilamida parcialmente hidrolisada) recuperaram de 23-33% do OOIP (SAMANTA *et al.*, 2012). Em outro estudo desenvolvido por Pornsunthorntawee *et al.* (2008) compararam a eficiência de biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* com a de três surfactantes sintéticos em MEOR. Os resultados obtidos em experimentos de *sand-pack column* comprovaram que além das

vantagens intrínsecas dos biossurfactantes, os surfactantes microbianos foram mais eficazes do que os três tensoativos sintéticos avaliados, removendo 62% (*B. subtilis*) e 57% (*P. aeruginosa*) de óleo, enquanto *Tween* 80, SDBS, Alfoterra 145-5PO removeram 53%, 51%, 55%, respectivamente.

O sucesso na utilização de bactérias produtoras de biossurfactantes *in situ* e *ex situ* em MEOR já foi demonstrada de fato em campo, sendo aplicada desde 1954 em reservatórios de petróleo em diversos países. Nos últimos 50 anos, 47 estudos de caso em 21 países foram conduzidos e apresentaram resultados estrondosos, com impactantes aumentos no fator de recuperação de óleo, de até 350% (AL-SULAIMANI *et al.*, 2011; GEETHA; BANAT; JOSHI, 2018; LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007; MAUDGALYA; KNAPP; MCINERNEY, 2007; PATEL *et al.*, 2015; SAFDEL *et al.*, 2017).

Os fatores responsáveis por este grande aumento na recuperação de petróleo envolvem quatro mecanismos, produção de gás, produção de ácidos resultando na fragmentação de rochas carbonáticas com liberação de CO<sub>2</sub>, produção de surfactante e redução da viscosidade do óleo. Além disso, a retificação na permeabilidade pode ser alcançada por entupimento seletivo de zonas inacessíveis (PATEL *et al.*, 2015).

Um estudo feito por Maudgalya; Knapp; Mcinerney (2007) lista o número de ensaios de campo bem-sucedidos e fracassados com base na permeabilidade do reservatório, temperatura, salinidade, tipo de mecanismo de recuperação e tipo de teste de campo em 314 reservatórios de arenito e 89 carbonáticos. Espécies de *Bacillus* e *Clostridium* foram os microrganismos mais comumente usados e o melaço foi utilizado na maioria dos ensaios como fonte de nutrientes. Bass; Lappin-Scott (1997) reportaram tentativas bem-sucedidas da utilização de biossurfactantes, ácidos e gases produzidos por bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, e *Pseudomonas* utilizando estratégias *in situ* e *ex situ* de MEOR em poços de petróleo (Delaware-Childers, 1987; Chelsea-Alluwe, 1990; Caldararu, 1987 e 1990; Bragadiru, 1989 e 1990). Banat (1995) reportou casos de sucesso em MEOR em reservatórios carbonáticos, ao injetar melaço e microrganismos anaeróbicos produtores de ácidos e gases. Na Romênia, após estimulações dos poços *in situ*, pesquisadores conseguiram incremento de 100-200% na produção de petróleo (SAFDEL *et al.*, 2017). Foram relatados aumentos de 60-126% na produção de óleo na Hungria (HITZMAN, 1983) e de 200% na Alemanha (WAGNER, 1991). Nos Estados Unidos diversos estudos em campo foram realizados conseguindo eficiência na recuperação de óleo em 78% dos 322 projetos de MEOR (PORTWOOD, 1995) com fatores de recuperação de óleo variando de 13 a 350% (SAFDEL *et al.*, 2017)

A China é um dos líderes no tocante aos estudos em MEOR devido aos inúmeros casos de sucesso nos últimos anos, principalmente usando biopolímeros produzidos por diversas bactérias (LAZAR; PETRISOR; YEN, 2007). Recentemente, Ke *et al.* (2018) usando uma mistura de *B. licheniformis* e *Rhodococcus* sp. isoladas do reservatório Baolige na China, conseguiram um efeito sinérgico e recuperaram 210.000 toneladas de petróleo em 169 poços fazendo 4 ciclos de injeções microbianas ao longo de 43 meses. Comparando com outros projetos de MEOR realizados entre 1998 a 2012 em reservatórios chineses, onde tiveram um incremento de 57.000 toneladas na produção de petróleo, os resultados de Ke e colaboradores (2018) foram excepcionais.

Em escala nacional, em 2010, a recuperação microbiana avançada de petróleo foi realizada em cinco poços em um campo petrolífero terrestre, localizado no nordeste do Brasil, a fim de reduzir problemas associados a zonas altamente permeáveis no reservatório. A perspectiva deste trabalho foi estimular bactérias indígenas que produziram biomassa e biopolímeros, em temperatura de 40-55 °C e salinidade acima de 10%, resultando no aumento da pressão interna do reservatório de 14 para 50 bar e diminuição da vazão de injeção culminando na obstrução de zonas de alta permeabilidade e consequente melhora na eficiência da recuperação de óleo (REKSIDLER *et al.*, 2010).

Informação sobre molhabilidade é fundamental para se entender os problemas com fluxo multifásico, desde a migração de óleo na rocha de origem até os mecanismos de produção primária e os processos de recuperação de óleo. A molhabilidade é a tendência da rocha reservatório preferencialmente estar em contato com um determinado fluido em um sistema bifásico ou multifásico. No caso de um sistema rocha/óleo/água a molhabilidade descreve a preferência da rocha de estar em contato com a água ou com o óleo na presença do outro fluido. As rochas carbonáticas em sua grande maioria apresentam molhabilidade favorável ao óleo, lhe concedendo grande permeabilidade, o que impede a água de injeção embeber a rocha e expulsar o óleo, diminuindo o fator de recuperação.

Métodos de recuperação avançada reduzem a pressão capilar de entrada, a tensão interfacial do óleo ou mudam o ângulo de contato, e/ou aumentam os gradientes de pressão ou forças viscosas (FAERSTEIN, 2010). Muitos desses métodos envolvem tensoativos (*surfactant flooding*) que devido à natureza anfifílica são capazes de se adsorver em interfaces e superfícies conforme suas afinidades, diminuindo a energia livre interfacial, podendo inverter a molhabilidade da rocha, facilitando o fluxo de óleo e assim, melhorando sua recuperação.

Um biossurfactante de natureza lipopeptídica produzido por uma estirpe de *B. licheniformis*, isolada de um reservatório iraniano, foi avaliada quanto à capacidade de melhorar

a produção de petróleo em sistemas carbonáticos molháveis a óleo. Resultados das medidas do ângulo de contato revelaram que os biossurfactantes produzidos reduziram efetivamente a tensão interfacial e alteraram a molhabilidade de rochas saturadas de óleo (BIRIA; MAGHSOUDI; ROOSTAAZAD, 2013). Al-Sulaimani *et al.* (2012) também mostraram o valor do biossurfactante produzido por uma estirpe de *B. subtilis* para recuperação de petróleo. Esses autores confirmaram a capacidade do biossurfactante em diminuir a tensão interfacial e alterar a molhabilidade da rocha, tornando-a molhável a água. A perda máxima de biossurfactante causada por adsorção foi de 1,2 mg/g de rocha, comparável com os valores de surfactantes químicos.

Testes de flotação também simulam o sistema rocha/óleo/água ao misturar calcita impregnada em óleo e soluções surfactantes dentro de um recipiente e agitar. Após um período de repouso é observado se a calcita flutua ou não. Se o sistema se tornar molhável à água, a calcita se depositará no fundo do recipiente, porém, se o sistema continuar molhável ao óleo, a calcita ficará suspensa no topo da solução.

O ensaio de flotação realizado neste estudo revelou que dos quatorze lipopeptídeos avaliados, doze inverteram a molhabilidade da calcita na concentração de 50 mg/L. Os biossurfactantes produzidos pelas estirpes *B. vallismortis* TIM 68 e *B. amyloliquefaciens* ICA 36 foram os únicos que não apresentaram atividade. Dentre os doze biossurfactantes positivos, aqueles produzidos pelas estirpes TIM 96 e ICA 13 se destacaram como os mais promissores por tornarem 100% da calcita molhável à água, sendo, portanto, potenciais candidatas para aplicações em MEOR. A título de comparação, o surfactante sintético, SDS, só foi capaz de inverter a molhabilidade da calcita em 2.500 mg/L, concentração próxima a sua CMC.

Surfactantes de origem microbiana têm sido intensamente pesquisados para substituir os surfactantes químicos, na tentativa de atenuar os efeitos deletérios que estes causam no ambiente (ALONGI, 2008). Além disso, a diversidade estrutural, biodegradabilidade, estabilidade, seletividade e baixa concentração micelar crítica são os principais atrativos dos biossurfactantes (BANAT *et al.*, 2010).

Outro fator imprescindível é o nível de biossegurança do microrganismo usado em MEOR, requerendo ser de baixo risco biológico. A alta similaridade devido à proximidade filogenética (ROBERTS; NAKAMURA; COHAN, 1996) entre as espécies de *Bacillus* dificultam a identificação exata da espécie. Wang *et al.* (2007) indicaram que os genes que codificam a subunidade beta da DNA topoisomerase tipo II (*gyrB*) e da RNA polimerase (*rpoB*) são marcadores filogenéticos mais adequados do que o gene 16S rRNA para o estudo de relações filogenéticas e taxonômicas em nível de espécie. De fato, em nosso estudo, essas

análises adicionais foram decisivas para a identificação das estirpes. Nesse contexto, identificamos as 14 estirpes selecionadas através das sequências desses genes. Todas as estirpes pertencem ao gênero *Bacillus*. JAG 249, ICA 32, TIM 10, TIM 27 e TIM 58 foram afiliadas mais intimamente com *B. subtilis*, sete com *B. amyloliquefaciens*, e duas com *B. vallismortis*, espécies reconhecidamente produtoras de lipopeptídeos com grande potencial para aplicações biotecnológicas (STEINBÜCHEL, 2011; VATER *et al.*, 2002).

Vários estudos reportam o uso de lipopeptídeos produzidos por essas espécies em MEOR, com exceção de *B. vallismortis*, que não tem estudos publicados nesse tema (ALVAREZ *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2016; GHOJAVAND; VAHABZADEH; SHAHRAKI, 2012). Kaur *et al.* (2017) e Zhao *et al.* (2010) enfatizaram a forte atividade antifúngica dos compostos antimicrobianos produzidos por *B. vallismortis*, ressaltando sua importância no biocontrole de doenças em plantas.

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (filo Firmicutes) são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, em forma de bastonetes, Gram-positivas, formadoras de endósporos e produtoras de inúmeros metabólitos secundários. Endósporos são estruturas que exibem resistência a estresses ambientais, como altas temperaturas e pressão, tolerância a sal e ácidos. Muitas das espécies de *Bacillus* são amplamente utilizadas na produção de antibióticos, enzimas e biossurfactantes (FEKETE, 2009), ou como probióticos (CASULA; CUTTING, 2002) e inseticidas (DOS SANTOS *et al.*, 2009). Poucas são as espécies que constituem ameaça a saúde pública, como por exemplo, as espécies *B. anthracis* e *B. cereus*. Entretanto, de acordo com a árvore filogenética construída, descartou-se a possibilidade de as estirpes estudadas pertencerem ao grupo de espécies patogênicas, pois apresentaram menos de 80% de similaridade com bactérias deste grupo. A avaliação da ecotoxicidade dos biossurfactantes contra larvas de *Artemia salina* confirmou a segurança desses produtos, devido à baixa toxicidade.

Espécies de *Bacillus* geralmente produzem uma mistura de lipopeptídeos de diferentes classes e a composição dessa mistura interfere diretamente nas suas propriedades tensoativas (ONGENA; JACQUES, 2008). Dentre as famílias de biossurfactantes comumente produzidas por este gênero estão a surfactina, iturina e a fengicina (KIM *et al.*, 2010; ROONGSAWANG *et al.*, 2002; STANKOVIC *et al.*, 2012). Estas famílias compreendem isoformas que diferem na composição de aminoácidos. As isoformas podem ainda apresentar uma subdivisão em séries homólogas, que variam no número de átomos de carbono que compõem a cadeia lipídica. Tendo em vista esta ampla variedade de possibilidades de moléculas lipopeptídicas produzidas, torna-se importante a caracterização dos biossurfactantes

produzidos, a fim de catalogar o tipo de molécula produzida por cada estirpe e assim correlacionar com suas atividades.

A caracterização por espectroscopia de infravermelho (FTIR) dos biossurfactantes produzidos pelas 14 estirpes de bactérias selecionadas confirmou que estes são bastante similares entre si, indicando a presença de hidrocarbonetos alifáticos combinado a um domínio peptídico, característicos de biossurfactantes lipopeptídicos (DOMINGOS *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2013; PUEYO *et al.*, 2009). De acordo com os resultados de Al-Wahaibi *et al.* (2014), as bandas encontradas neste estudo estão em consonância com as bandas da surfactina comercial, classe com grande potencial biotecnológico especialmente na indústria petroquímica. Um detalhe a ser destacado dos dados de FTIR é a menor quantidade de bandas relacionadas a porções peptídicas quando comparadas à quantidade de bandas referentes à cadeia alifática, resultado este que corrobora a hipótese de um balanço hidrofílico-lipofílico baixo das moléculas estudadas. Isso explica a predominância de emulsões do tipo A/O, e consequentemente confirma porções hidrofóbicas maiores nessas biomoléculas.

A análise por espectrometria de massas revelou uma mistura complexa de iturinas, surfactinas e fengicinas em todos os 14 biossurfactantes analisados, apresentando íons intensos em duas regiões distintas, de  $m/z$  1000 a 1200 e entre  $m/z$  1400 e 1500. Resultados similares foram obtidos por Caldeira *et al.* (2011) com produção de vários compostos com  $m/z$  entre 1000 e 1100 (compatível com iturina e surfactina) e entre  $m/z$  1436 e 1478 (compatível com fengicina) por uma estirpe de *B. amyloliquefaciens*.

Cada estirpe exibiu sua própria assinatura de lipopeptídeos, apresentando alta riqueza e abundância relativa de isoformas de cada família de lipopeptídeos. É bem conhecido que estirpes de *Bacillus* podem simultaneamente produzir lipopeptídeos de diferentes famílias, bem como múltiplos análogos estruturais de um lipopeptídeo em particular (BEN AYED *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2008; ONGENA; JACQUES, 2008; ROONGSAWANG *et al.*, 2002; ZHU *et al.*, 2013). Esta característica é devido principalmente à flexibilidade na seleção de aminoácidos, um fenômeno comum na síntese de peptídeos não-ribossômicos, e é influenciada por inúmeros fatores genéticos e ambientais (CAGRI-MEHMETOGLU; KUSAKLI; VAN DE VENTER, 2012; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

A secreção diferencial de lipopeptídeos é considerada extremamente relevante, uma vez que cada família exibe vocação para atividades biológicas específicas, o que pode explicar as diferenças observadas em suas atividades tensoativas. As vias biossintéticas dos lipopeptídeos estão sob regulação complexa e o conhecimento sobre os fatores que influenciam

a expressão de genes essenciais para produção de biossurfactantes podem ser úteis para controlar a biossíntese seletiva destes compostos.

Sabendo-se que a síntese preferencial de uma determinada família de biossurfactante lipopeptídeo, como surfactina ou iturina, e até mesmo o tipo de uma isoforma em particular, é altamente influenciada por fatores ambientais (temperatura de incubação, pH do meio de cultivo e aeração) e nutricionais (fontes de carbono e de nitrogênio, relação C/N, micronutrientes) (BANAT, 1995), necessita-se otimizar todos os parâmetros envolvidos, desde a seleção da estirpe microbiana, preparo do inóculo, condições e condução do processo fermentativo, para tornar a sua produção um processo economicamente viável, inclusive os procedimentos relativos à etapa de recuperação do produto e sua posterior purificação (*downstream*).

De acordo com Inès; Dhouha (2015) temperaturas próximas de 30 °C favorecem a produção máxima de surfactina por *B. subtilis* e temperaturas próximas de 25 °C são ótimas para iturina A, pH entre 6,5 e 6,8 também favorecem a produção de lipopeptídeos. Além do mais, a fonte de carbono, adição de íons bivalentes ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) e alguns sais como  $ZnSO_4$  e  $MnSO_4$  foram relatados como estimuladores da produção de surfactina e iturina por *B. subtilis*. Há evidências de que a frutose e a glucose são efetivas fontes de carbono para produção de surfactina, iturina, bacilomicina e piplostatina, sugerindo uma regulação de sistema semelhante para expressão dos genes responsáveis pela síntese de biossurfactantes (ROONGSAWANG *et al.*, 2002).

A atividade dos biossurfactantes depende do arranjo dos resíduos de aminoácidos, dos tipos de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que compõem as moléculas e da orientação espacial das mesmas (LIU *et al.*, 2015). Um exemplo disso é que geralmente, mudanças nas posições 2, 4 e 7 da surfactina por resíduos mais hidrofóbicos aumentam a atividade superficial e diminuem a concentração micelar crítica da surfactina. Youssef; Duncan; Mcinerney (2005) comprovaram que a composição de ácidos graxos afeta diretamente as atividades biológicas dos lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* e *B. mojavensis*; mostrando uma correlação positiva entre o aumento da proporção de ácidos graxos de cadeias lineares pares (*normal* e *iso-3-OH-C14*) e o aumento significativo das atividades específicas dos lipopeptídeos. Os autores alteraram a composição de ácidos graxos adicionando aminoácidos de cadeia ramificada precursores na síntese da cadeia alifática ao meio de cultivo. Akpa *et al.* (2001) e Liu *et al.* (2015) também demonstraram que modificações no meio de cultivo, principalmente no fornecimento diferencial de alguns tipos de aminoácidos, tais como treonina, leucina, isoleucina e valina, alteram a proporção de homólogos de surfactina, iturina e fengicina, influenciando

especialmente no tamanho da cadeia de ácidos graxos e conseqüentemente nas atividades biológicas, aumentando a afinidade por compostos hidrofóbicos e diminuindo a CMC. Esse fenômeno foi observado de forma mais notável na produção de surfactinas do que iturinas.

A análise dos dados obtidos por ESI/MS agrupou as amostras por manguezal de origem e pelos tipos de lipopeptídeos produzidos. As condições de cultivo utilizadas neste estudo ativaram simultaneamente diferentes complexos de síntese de lipopeptídeo, favorecendo, assim, a coprodução de diversas isoformas de surfactina, iturina e fengicina. De forma geral, as isoformas de surfactina mostraram-se preponderantes para o manguezal do Timonha, especialmente o íon  $m/z$  1044,66 identificado como adutos de sódio de surfactina A C<sub>14</sub> ou surfactina B C<sub>15</sub>. As estirpes provenientes do manguezal do Icapuí produziram preponderantemente isoformas de iturina, especialmente iturina A C<sub>14</sub> [M+Na]<sup>+</sup>. Como mostrado anteriormente, lipopeptídeos com cadeia carbônica contendo 14 carbonos são os que apresentam melhores propriedades tensoativas e conseqüentemente os de maior potencial biotecnológico.

Youssef *et al.* (2007) também relataram que certas misturas de lipopeptídeos ou misturas de lipopeptídeos e ramnolipídeos podem ser mais eficazes na redução da tensão interfacial e na mobilização de hidrocarbonetos aprisionados. A contribuição de cada molécula para a atividade global é muito importante para preparar formulações de surfactante mais eficazes. Além disso, o conhecimento sobre o sinergismo entre as moléculas é crucial, uma vez que na maioria das aplicações práticas misturas são usadas em vez de componentes individuais.

Price *et al.* (2007) mostraram uma correlação entre o perfil de produção de lipopeptídeos e a origem geográfica em um estudo comparativo de mais de 50 estirpes de *B. subtilis* e *Bacillus licheniformis* isoladas de sete habitats extremos que vão da gelaria ao deserto. Portanto, acreditamos que as condições ambientais peculiares aos manguezais estudados exerçam pressões seletivas distintas sobre as populações microbianas, tendo reflexo na produção diferencial de lipopeptídeos de cada comunidade e conseqüentemente nas atividades tensoativas. Interessantemente, o manguezal do Icapuí encontra-se numa região vulnerável dentro de uma região de extração de petróleo *on shore* e detém um histórico de acidentes de derramamento de óleo (LOTTA; MARTINS, 2003), o que pode ter contribuído para seleção de certos compostos tensoativos pela comunidade bacteriana.

Os perfis lipopeptídicos das 14 estirpes analisadas revelaram que os principais produtores de cada classe de lipopeptídeo foram: JAG 249, TIM 27, TIM 58 e TIM 96 para surfactina, ICA 24 e TIM 03 para iturina A, ICA 32 e JAG 255 para bacilomicina D; e finalmente, ICA 36 e TIM 13 para fengicina. Além disso, foi detectada uma nova isoforma de

lipopeptídeo com  $m/z$  1629, que ainda não foi descrita na literatura, produzida por JAG 248 que apresenta atividade desemulsificante.

Por fim, ensaios de monitoramento da produção destes compostos ao longo da curva de crescimento dos microrganismos precisam ser realizados a fim de avaliar as melhores condições de cultivo para otimizar a produção das moléculas de interesse. O uso de técnicas de UHPLC-MS/MS (MORO *et al.*, 2018) e/ou Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (PEREIRA *et al.*, 2013) poderiam fornecer novos dados a fim de elucidar a estrutura da nova molécula desemulsificante ou a presença de novas possíveis isoformas. Em adição, pretende-se investir no desenvolvimento de formulações personalizadas, guiadas pelos perfís metabólicos dos bio surfactantes, compatíveis com as características dos reservatórios maduros onde serão aplicados, visando aumentar a eficiência do processo de extração de petróleo.

## 8 CONCLUSÃO

A prospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes em uma coleção de isolados de sedimentos de manguezais levou a seleção de 14 novas estirpes produtoras de biossurfactantes. Os tensoativos foram caracterizados por FTIR e espectrometria de massas como lipopeptídeos das famílias surfactina, iturina e fengicina, com perfil de isoformas distinto e característico para cada estirpe, o que se reflete em suas propriedades tensoativas.

A maioria dos biossurfactantes apresenta atividades emulsificante e dispersante de óleo, sendo que apenas um apresenta atividade desemulsificante quando aplicado na temperatura ambiente. Quando aquecido a 121 °C este perde sua atividade desemulsificante e passa a apresentar atividade emulsificante. Embora precise ser confirmado, a atividade desemulsificante parece relacionada ao íon  $m/z$  1629 de fengicina detectado neste estudo, sugerindo tratar-se de uma nova isoforma dessa família. Os biossurfactantes reduzem eficientemente a tensão superficial da água e a maioria é capaz de inverter a molhabilidade de rochas carbonáticas, deixando-as molháveis à água, o que é bastante interessante para recuperação de petróleo de reservatórios.

As estirpes foram identificadas por análises das sequências dos genes codificadores do RNAr 16S, *gyrB* e *rpoB* como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. vallismortis*, sendo este o primeiro estudo a descrever o potencial de biossurfactantes lipopeptídeos produzidos por *B. vallismortis* para MEOR.

Todos os biossurfactantes atuam em baixas concentrações, ou seja, apresentam baixas CMCs e não são tóxicos para náuplios de *Artemia salina*, mesmo se utilizados numa concentração 10 vezes maior do que a sua CMC.

Dentre os quatorze biossurfactantes analisados, aqueles produzidos pelas estirpes TIM 03 e TIM 96, identificadas como *B. amyloliquefaciens*, e ICA 24, identificada como *B. vallismortis*, destacaram-se por reterem suas propriedades tensoativas na presença de 150 g/L de NaCl, 600 bar de pressão e temperatura de até 250 °C, condições encontradas em alguns reservatórios de petróleo, sendo esses biossurfactantes potenciais candidatos para testes de MEOR *ex situ*.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL AZIM, A. A. A. *et al.* Demulsifier systems applied to breakdown petroleum sludge. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [s.l.], v. 78, n. 2, p. 364–370, ago. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: ANP, ISSN 1983-5884, 2018.
- AHAOTU, I. *et al.* Molecular identification and safety of *Bacillus* species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla* Benth) for production of Ugba. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 162, n. 1, p. 95–104, mar. 2013.
- AKPA, E. *et al.* Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 91–93, n. 1–9, p. 551–562, 2001.
- AL-SULAIMANI, H. *et al.* Microbial biotechnology for enhancing oil recovery : Current developments and future prospects. **Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 147–158, 2011.
- AL-SULAIMANI, H. *et al.* Residual-oil recovery through injection of biosurfactant, chemical surfactant, and mixtures of both under reservoir temperatures: Induced-wettability and interfacial-tension effects. **SPE Reservoir Evaluation and Engineering**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 210–217, 2012.
- AL-WAHAIBI, Y. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 114, p. 324–333, fev. 2014.
- AL-WAHAIBI, Y. *et al.* Injection of biosurfactant and chemical surfactant following hot water injection to enhance heavy oil recovery. **Petroleum Science**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 100–109, 10 fev. 2016.
- ALONGI, D. M. Mangrove forests: resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [s.l.], v. 76, n. 1, p. 1–13, jan. 2008.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, [s.l.], v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ALVAREZ, V. M. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 136, p. 14–21, dez. 2015.
- ANGELIM, A.L. **Seleção e imobilização de consórcios de bactérias hidrocarbonoclasticas e produtoras de compostos ativos de superfície para aplicações em processos de biorremediação**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- APARECIDA GIRO, M. E. *et al.* Clarified cashew apple juice as alternative raw material for

biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 738–747, 2009.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 488–494, 1968.

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

BANAT, I. M. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied microbiology and biotechnology**, [s.l.], v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied microbiology and biotechnology**, [s.l.], v. 53, n. 5, p. 495–508, maio 2000.

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

BASS, C.; LAPPIN-SCOTT, H. The bad guys and the good guys in petroleum microbiology. **Spring**, [s.l.], v. 10, n. October 1996, p. 17–25, 1997.

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

BIE, X.; LU, Z.; LU, F. Identification of fengycin homologues from *Bacillus subtilis* with ESI-MS/CID. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 272–278, dez. 2009.

BIRIA, D.; MAGHSOUDI, E.; ROOSTAAZAD, R. Application of biosurfactants to wettability alteration and IFT reduction in enhanced oil recovery from oil-wet carbonates. **Petroleum Science and Technology**, [s.l.], v. 31, n. 12, p. 1259–1267, 2013.

BOXLEY, C. J.; PEMBERTON, J. E.; MAIER, R. M. Rhamnolipids and related biosurfactants for cosmetics and cosmeceutical markets. **INFORM- International News on Fats, Oils and Related Materials**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 206–215, 2015.

BROWN, L. R. Microbial enhanced oil recovery ( MEOR ). **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 316–320, 2010.

CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; VAN DE VENTER, M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 95, n. 7, p. 3643–3649, jul. 2012.

CALDEIRA, A. T. *et al.* An artificial intelligence approach to *Bacillus amyloliquefaciens*

CCMI 1051 cultures: application to the production of anti-fungal compounds. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p. 1496–502, jan. 2011.

CARDOSO, Luis Cláudio. **Petróleo: do poço ao posto**. Rio de Janeiro, Qualitymark, 2012.

CARVALHO, A.F.F.U., *et al.* Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina*. **Leach. Cienc. Cult.**, [s.l.], v. 40, p. 1109-1111, 1988.

CASULA, G.; CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 5, p. 2344–2352, 1 maio 2002.

CHEN, H. *et al.* Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], 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**, [s.l.], 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**, [s.l.], v. 115, p. 113–121, maio 2016.

CHO, S.-J. *et al.* Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 223, n. 1, p. 47–51, jun. 2003.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 93, n. 6, p. 915–929, dez. 2002.

COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. **Medicinal Research Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 4–31, jan. 2016.

DE ALMEIDA, D. G. *et al.* Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 7, n. OCT, p. 1–14, 2016.

DOMINGOS, D. F. *et al.* Genomic and chemical insights into biosurfactant production by the mangrove-derived strain *Bacillus safensis* CCMA-560. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], p. 3155–3167, 2015.

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

DU NÖUY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 625–631, 20 maio 1925.

DUITMAN, E. H. *et al.* Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 11, p. 3490–3496, 1 jun. 2007.

FAERSTEIN, M. **Impactos da molhabilidade da rocha na produção e recuperação de petróleo**. 2010. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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**, [s.l.], v. 102, n. 3, p. 1179–1190, 2018.

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

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 783, jul. 1985.

GAO, P. *et al.* An exogenous surfactant-producing *Bacillus subtilis* facilitates indigenous Microbial Enhanced Oil Recovery. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 7, 18 fev. 2016.

GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 14, n. jan, p. 23–32, 2018.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; SHAHRAKI, A. K. Enhanced oil recovery from low permeability dolomite cores using biosurfactant produced by a *Bacillus mojavensis* (PTCC 1696) isolated from Masjed-I Soleyman field. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [s.l.], v. 81, p. 24–30, jan. 2012.

GLOBAL MARKET INSIGHTS, Inc. **Biosurfactants market size by product (sophorolipids, rhamnolipids, Alkyl Polyglucosides [APG], Methyl Ethyl Sulfonates [MES], sucrose esters, sorbitan esters, lipopeptides), by application (household detergents, personal care, industrial cleaners, food processing, oilfield chemicals, agricultural chemicals, textiles), industry analysis report, regional outlook (U.S., Germany, UK, France, Italy, China, India, Japan, Thailand, Brazil), application potential, price trend, competitive market share & forecast, 2018 – 2024**. 2018a. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactants-market-report>. Acesso em: 4 out. 2018.

GLOBAL MARKET INSIGHTS, Inc. **Biosurfactants market worth over \$2.7 bn by 2024**. 2018b. Disponível em: <https://www.gminsights.com/pressrelease/biosurfactants-market-size>. Acesso em: 4 out. 2018.

GODDARD, W.A., *et al.* **Screening methods for selection of surfactant formulations for IOR from fractured carbonate reservoirs**. California, DOE Topical Report, DE-FC26-04NT15521.

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**,

[s.l.], v. 10, n. 2, p. e0116871, 17 fev. 2015.

GRAND VIEW RESEARCH. **Biosurfactants market analysis by product (rhamnolipids, sophorolipids, MES, APG, sorbitan esters, sucrose esters) and segment forecast to 2020.** 2018. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biosurfactants-industry>. Acesso em: 4 out. 2018.

GUDIÑA, E. J. *et al.* International Biodeterioration & Biodegradation isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 68, p. 56–64, 2012.

HALIM, A. Y. *et al.* CPC TESTING: Towards the understanding of microbial metabolism in relation to microbial enhanced oil recovery. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, [s.l.], v. 149, p. 151–160, jan. 2017.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity. **RSC Adv.**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 2974–2982, 2015.

HITZMAN, D. O. Petroleum microbiology and the history of its role in enhanced oil recovery. **Proc. Int. Conf. Microb.**, [s.l.], Enhancement Oil Recovery Meeting Date 1982, (CONF-8205140), 162–218, 1983.

HSIEH, F.-C. *et al.* Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 3, set. 2004.

INÈS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, [s.l.], v. 71, p. 100–12, set. 2015.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Medium-term oil market report. Overview.** 2016. Disponível em: <https://www.iea.org/Textbase/npsum/MTOMR2016sum.pdf>. Acesso em: 4 out. 2018.

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**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 176–179, set. 1995.

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

JACQUES, P. Surfactin and Other Lipopeptides from *Bacillus* spp. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (Ed.). **Biosurfactants: From Genes to Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, p. 57–91.

JANIYANI, K. L. *et al.* De-emulsification of oil-in-water emulsions by *Bacillus subtilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 452–456, jul. 1994.

- KASTER, K. M. *et al.* Mechanisms involved in Microbially Enhanced Oil Recovery. **Transport in Porous Media**, [s.l.], v. 91, n. 1, p. 59–79, 21 jan. 2012.
- 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**, [s.l.], v. 122, n. 1, p. 139–152, jan. 2017.
- KE, C. Y. *et al.* A pilot study on large-scale Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in Baolige oilfield. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s.l.], v. 127, n. January, p. 247–253, 2018.
- KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [s.l.], v. 28, n. 12, p. 1647–9, 15 jun. 2012.
- KHEIRALLA, Z. H. *et al.* Characterization of biosurfactants produced by *Halobacillus dabanensis* and *Pontibacillus chungwhensi* isolated from oil-contaminated mangrove ecosystem in Egypt. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 263–269, maio 2013.
- KHIRE, J. M.; KHAN, M. I. Microbially Enhanced Oil Recovery (MEOR). Part 1. Importance and mechanism of MEOR. **Enzyme and Microbial Technology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 170–172, fev. 1994.
- KIM, P. IL *et al.* Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 20, n. 1, p. 138–45, 2010.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 111–20, dez. 1980.
- KNOBLICH, A. *et al.* Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 5, n. 1–2, p. 43–48, set. 1995.
- 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**, [s.l.], v. 186, n. 4, p. 1084–1096, 2004.
- LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, [s.l.], n. 1947, p. 1353–1366, 2007.
- 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**, [s.l.], v. 221, p. 12–18, mar. 2016.
- LEE, S. C. *et al.* Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. **Archives of Microbiology**, [s.l.], v. 188, n. 4, p. 307–312, 2007.

- LI, C.-J.; ANASTAS, P. T. Green chemistry: present and future. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 4, p. 1413, 2012.
- LI, L. *et al.* Screening and partial characterization of *Bacillus* with potential applications in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. **Crop Protection**, [s.l.], v. 35, p. 29–35, maio 2012a.
- LI, X. *et al.* Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 4, p. 626–634, abr. 2012b.
- LIMA, L.B. **Frequência de bactérias produtoras de biossurfactantes lipopeptídeos em sedimentos de manguezais do Ceará**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.
- LIU, J.-F. *et al.* Chemical structure, property and potential applications of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* in petroleum recovery and spill mitigation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 4814–4837, 3 mar. 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**, [s.l.], v. 87, n. 10, p. 1105–1110, jun. 2012.
- LOTTA, G., MARTINS, R. Estudo da continuidade dos projetos educacionais do município de Icapuí. **Cadernos Gestão Pública e Cidadania**, [s.l.], v. 26, 2003.
- MA, Y. *et al.* Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC–ESI–MS/MS. **AMB Express**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 79, 17 dez. 2016.
- MA, Z. *et al.* Isolation and characterization of a new iturinic lipopeptide, mojavensin A produced by a marine-derived bacterium *Bacillus mojavensis* B0621A. **The Journal of antibiotics**, [s.l.], v. 65, n. 6, p. 317–22, jun. 2012.
- MARCHESI, J. R. *et al.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, [s.l.], v. 64, n. 2, p. 795–9, fev. 1998.
- MARIN, C. P. *et al.* Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 66, p. 239–245, abr. 2015.
- MARTINS, S. S. DA S. *et al.* Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. **Holos**, [s.l.], v. 6, p. 54, 11 dez. 2015.
- MAUDGALYA, S.; KNAPP, R. M.; MCINERNEY, M. J. Microbial Enhanced-Oil-Recovery technologies: a review of the past, present, and future. **Production and Operations Symposium**, [s.l.], 2007.
- MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2015, p. 1–9, 2015.

- MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, [s.l.], v. 45, n. 5, p. 31–4, maio 1982.
- MORÁN, A. C. *et al.* Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, [s.l.], 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**, [s.l.], v. 1488, n. 3, p. 211–218, nov. 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**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 759–769, jul. 2018.
- MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 133, n. 2, p. 183–198, jan. 2005.
- MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 14, n. 5, p. 372–378, 2009.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. **Engineering Geology**, [s.l.], v. 60, n. 1–4, p. 371–380, 2001.
- 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**, [s.l.], n. August 2006, p. 1–8, 2009.
- NEGIN, C.; ALI, S.; XIE, Q. Most common surfactants employed in chemical enhanced oil recovery. **Petroleum**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 197–211, 2016.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- ONGENA, M. *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 1084–90, abr. 2007.
- ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 115–125, mar. 2008.
- PATEL, J. *et al.* Recent developments in microbial enhanced oil recovery. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 52, p. 1539–1558, 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**, [s.l.], v. 23, n. 10, p. 1716–1728, 2012.

PATHAK, K. V.; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in Microbially Enhanced Oil Recovery (MEOR). **3 Biotech**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 41–48, 12 fev. 2014.

PECCI, Y. *et al.* LC/ESI-MS/MS characterization of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. **Journal of Mass Spectrometry**, [s.l.], v. 45, n. 7, p. 772–778, 8 jun. 2010.

PEREIRA, J. F. B. *et al.* Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards Microbial Enhanced Oil Recovery applications. **Fuel**, [s.l.], v. 111, p. 259–268, 2013.

PEYPOUX, F. *et al.* Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. **The Journal of antibiotics**, [s.l.], v. 37, n. 12, p. 1600–4, dez. 1984.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied microbiology and biotechnology**, [s.l.], v. 51, n. 5, p. 553–63, maio 1999.

PORNSUNTHORNTAWEE, O. *et al.* Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 42, n. 2, p. 172–179, nov. 2008.

PORTWOOD, J. T. A Commercial Microbial Enhanced Oil Recovery Technology: evaluation of 322 projects. **SPE Production Operations Symposium**, [s.l.], p. 693–708, 1995.

PRICE, N. P. J. *et al.* Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. **FEMS Microbiology Letters**, [s.l.], v. 271, n. 1, p. 83–89, 2007.

PUEYO, M. T. *et al.* Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. **Microbial Ecology**, [s.l.], v. 57, n. 2, p. 367–378, 2009.

RAAIJMAKERS, J. M. *et al.* Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 34, n. 6, p. 1037–1062, nov. 2010.

RASHEDI, H.; YAZDIAN, F.; NAGHIZADEH, S. Microbial Enhanced Oil Recovery. In: LAURA ROMERO-ZERÓN (Ed.). **Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites**. [s.l.] InTech, 2012, p. 318.

REKSIDLER, R. *et al.* A Microbial Enhanced Oil Recovery field pilot in a brazilian onshore oilfield. **17Th Spe Improved Oil Recovery Symposium [Ior] (Tulsa, Ok, 4/24-28/2010) Proceedings**, [s.l.], n. 201037, p. 1–7, 2010.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California.

**International Journal of Systematic Bacteriology**, [s.l.], v. 46, n. 2, p. 470–475, 1 abr. 1996.

ROMERO, D. *et al.* The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 430–440, abr. 2007.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental microbiology**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 229–36, abr. 2001.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 249–252, jun. 2002.

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**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 499–506, 1 dez. 2002.

SAFDEL, M. *et al.* Microbial Enhanced Oil Recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 74, n. February, p. 159–172, 2017.

SAHARAN, B.S., SAHU, R.K., SHARMA, D., A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 2011: GEBJ-29, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, [s.l.], v. 4, n. 4, p. 406–25, jul. 1987.

SAMANTA, A. *et al.* Comparative studies on enhanced oil recovery by alkali–surfactant and polymer flooding. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 67–74, 6 jul. 2012.

SANDERSEN, S. B. **Enhanced Oil Recovery with Surfactant Flooding**. [s.l.], Technical University of Denmark, 2012.

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

SHENG, J. J. Status of surfactant EOR technology. **Petroleum**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 97–105, jun. 2015.

SIEBER, S. A.; MARAHIEL, M. A. Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 185, n. 24, p. 7036–7043, 15 dez. 2003.

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

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising

strategies. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 126, n. 1, p. 2–13, jan. 2019.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. & MAIER, R. M. Biosurfactants: a general overview. In: Soberón-Chávez, G. (Ed.), **Biosurfactants: from genes to applications**. Springer-Verlag; Berlin Heidelberg, p. 1–11, 2011.

SOFLA, S. J. D.; SHARIFI, M.; SARAPARDEH, A. H. Toward mechanistic understanding of natural surfactant flooding in enhanced oil recovery processes: The role of salinity, surfactant concentration and rock type. **Journal of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 222, p. 632–639, out. 2016.

STANKOVIC, S. *et al.* Screening for the presence of biosynthetic genes for antimicrobial lipopeptides in natural isolates of *Bacillus* sp. **Archives of Biological Sciences**, [s.l.], v. 64, n. 4, p. 1425–1432, 2012.

STEIN, T. Whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for rapid identification of bacteriocin/lantibiotic-producing bacteria. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, [s.l.], v. 22, n. 8, p. 1146–52, abr. 2008.

STEINBÜCHEL, A. **Biosurfactants: from genes to applications**. Munster: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2011. v. 20

SUTHAR, H. *et al.* Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 75, n. 2, p. 225–230, out. 2008.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 108–109, p. 303–318, maio 2004.

TADROS, T. F. **Emulsion Science and Technology In Colloids and Interface Science Series**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, [s.l.], v. 30, n. 12, p. 2725–9, dez. 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 22, n. 22, p. 4673–80, nov. 1994.

VAN DEN BERG, R. A. *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 142, 2006.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 24, n. 6, p. 604–620, nov. 2006.

VANITTANAKOM, N. *et al.* Fengycin--a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **The Journal of antibiotics**, [s.l.], v. 39, n. 7, p. 888–901, jul.

1986.

VATER, J. *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of. **Society**, [s.l.], v. 68, n. 12, p. 6210–6219, 2002.

WAGNER, M. In: **Microbial enhanced of oil recovery from carbonate reservoirs with complex formation characteristics**. Proceedings of the 1990 Int. Conf. on Microbial Enhancement of Oil Recovery. Development in Petroleum Science Series, 31. Amsterdam: Elsevier, 1991.

WANG, L. T. *et al.* Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 57, n. 8, p. 1846–1850, 2007.

WARNER, S. A. J. **Genomic DNA isolation and lambda library construction**. Wiley&Sons ed. New York: Wiley, 1996.

WATROUS, J. *et al.* Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 26, p. E1743–E1752, 26 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**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 115–122, jan. 2008.

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

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current Metabolomics**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 92–107, 1 nov. 2012.

XIA, J. *et al.* MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 37, n. Web Server, p. W652–W660, 1 jul. 2009.

XIA, J. *et al.* MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 40, n. W1, p. W127–W133, 1 jul. 2012.

XIA, J. *et al.* MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], 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**, [s.l.], v. 407, n. 9, p. 2529–2542, 10 mar. 2015.

YERNAZAROVA, A. *et al.* Microbial Enhanced Oil Recovery. In: LAURA ROMERO-ZERON (Ed.). **Chemical Enhanced Oil Recovery (cEOR) - a Practical Overview**. [s.l.], InTech, 2016. p. 200.

YOUSSEF, N. *et al.* In Situ Biosurfactant Production by *Bacillus* Strains Injected into a Limestone Petroleum Reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 73, n. 4, p. 1239–1247, 15 fev. 2007.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; MCINERNEY, M. J. Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. **Applied and Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 71, n. 12, p. 7690–7695, 1 dez. 2005.

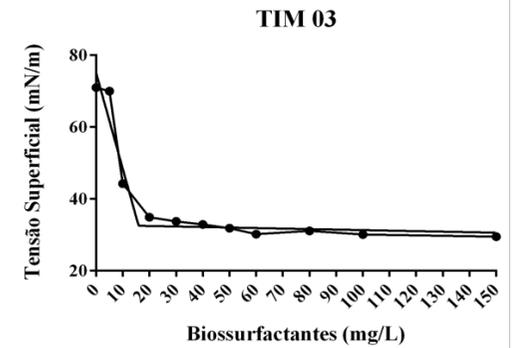
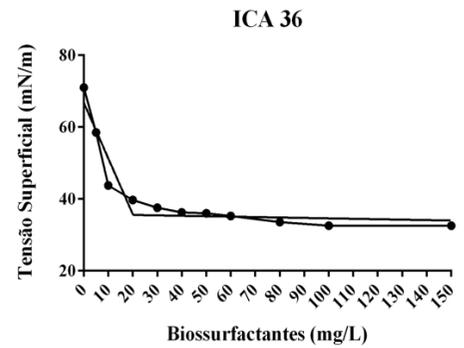
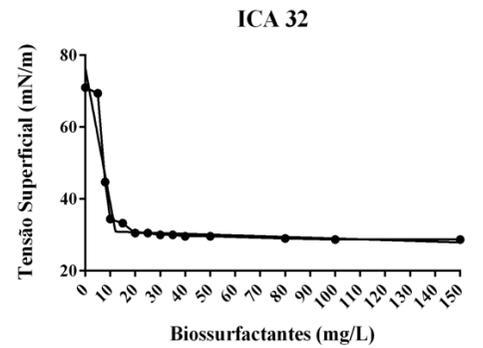
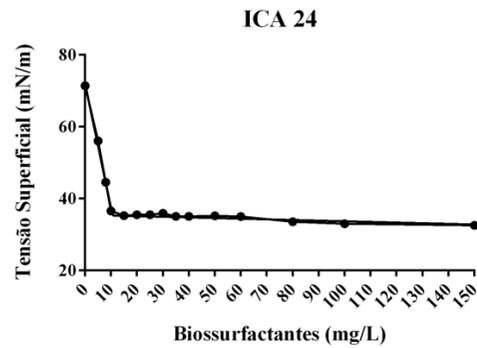
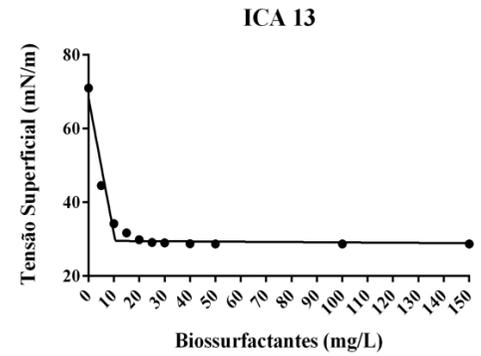
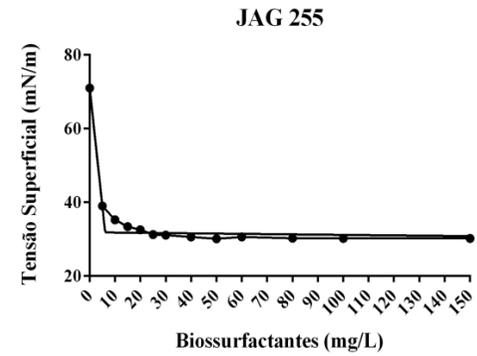
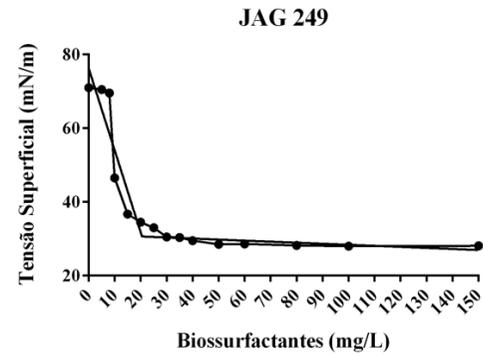
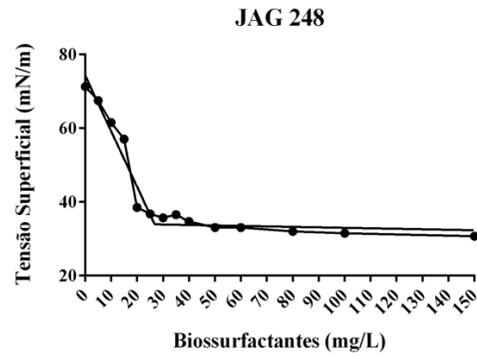
YUAN, J. *et al.* Recovery of several cell pellet-associated antibiotics produced by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 169–176, ago. 2014.

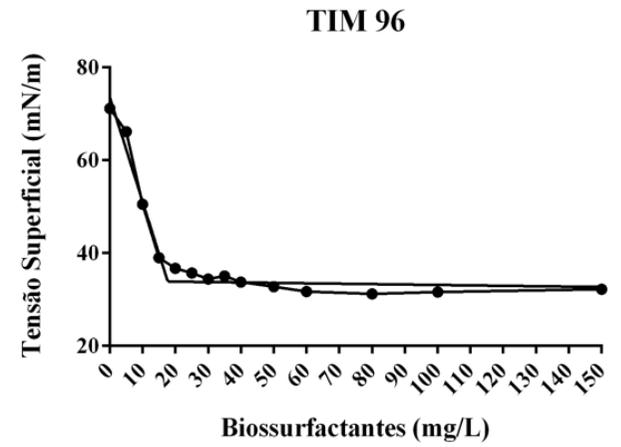
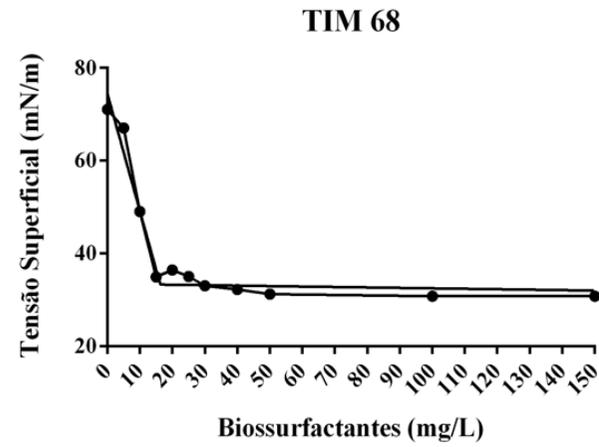
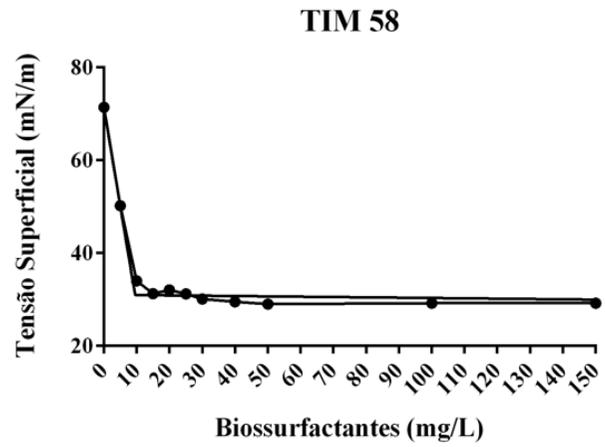
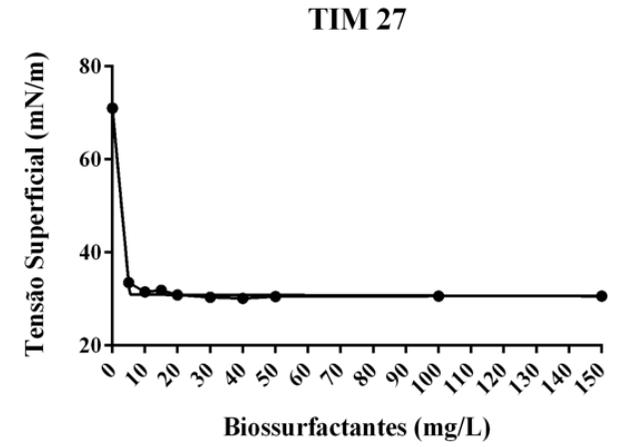
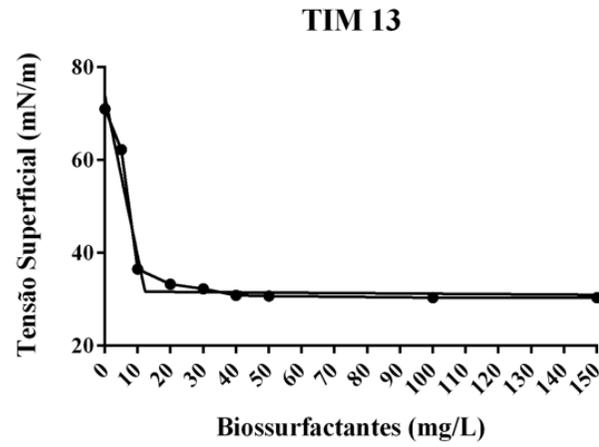
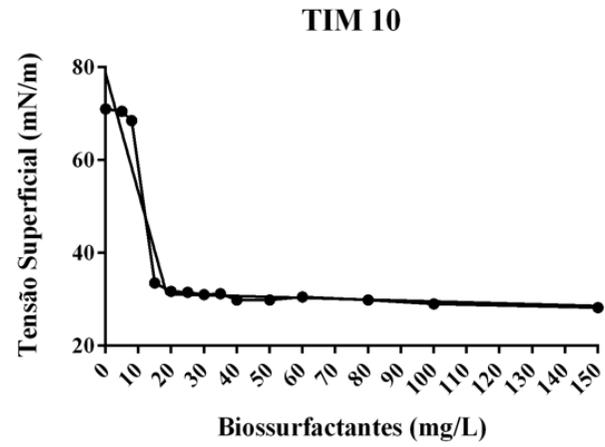
ZHANG, S.-M. *et al.* Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. **African Journal of Microbiology Research**, [s.l.], v. 6, n. 8, p. 1747–1755, 29 fev. 2012.

ZHAO, Z. *et al.* Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 292–297, jan. 2010.

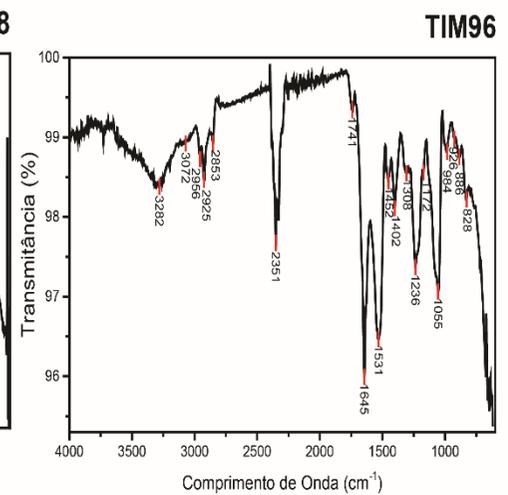
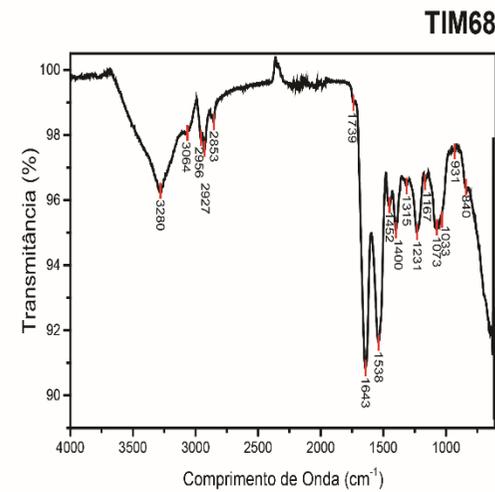
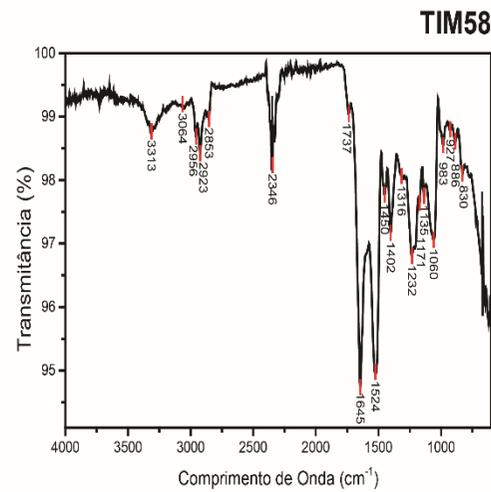
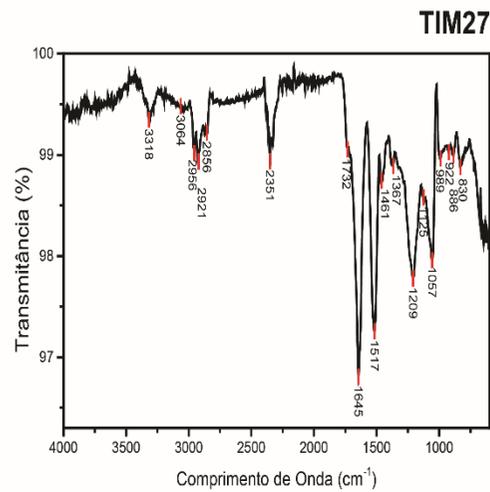
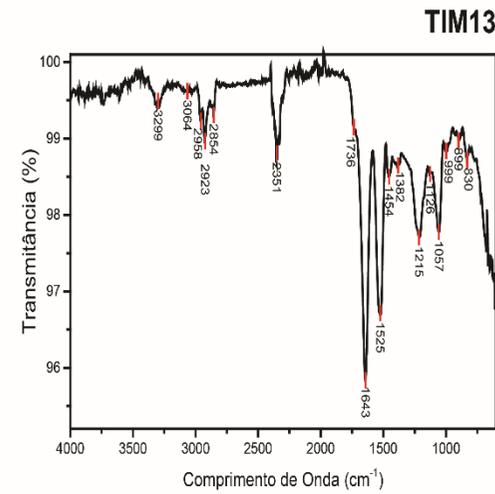
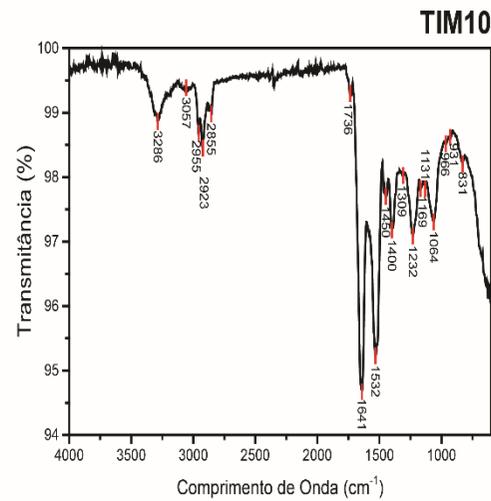
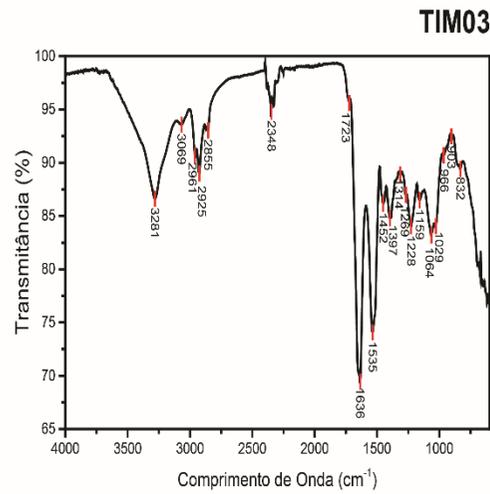
ZHU, Z. *et al.* Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 29, n. 11, p. 2105–2114, 2013.

**ANEXO A - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA (CMC) EM FUNÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m) DOS BIOSSURFACTANTES PRODUZIDOS PELO CULTIVO DAS 14 ESTIRPES EM MEIO MINERAL.**









ii. Espectros de transmittância dos biossurfactantes produzidos pelas estirpes bacterianas do manguezal do Timonha.

**ANEXO C - 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.**

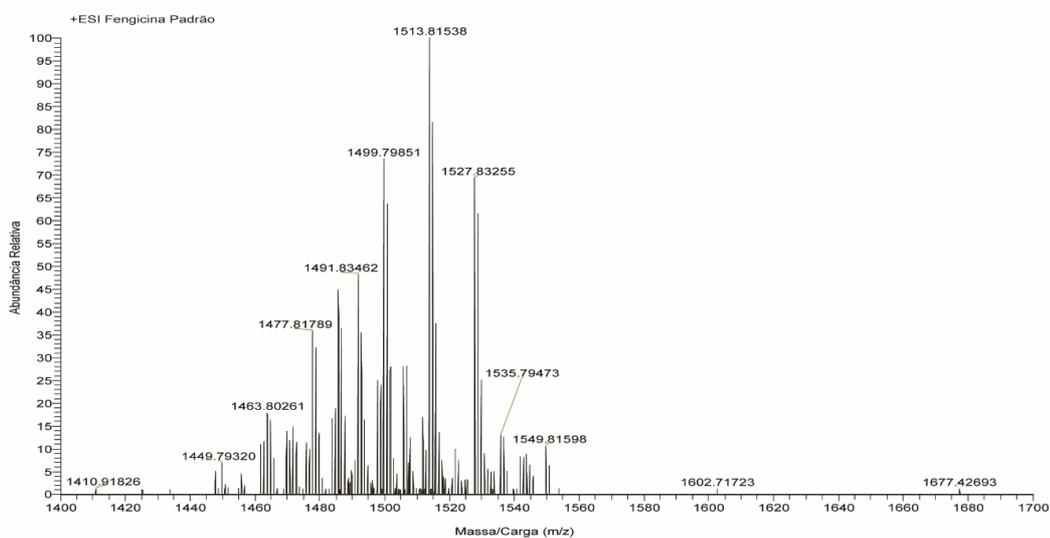
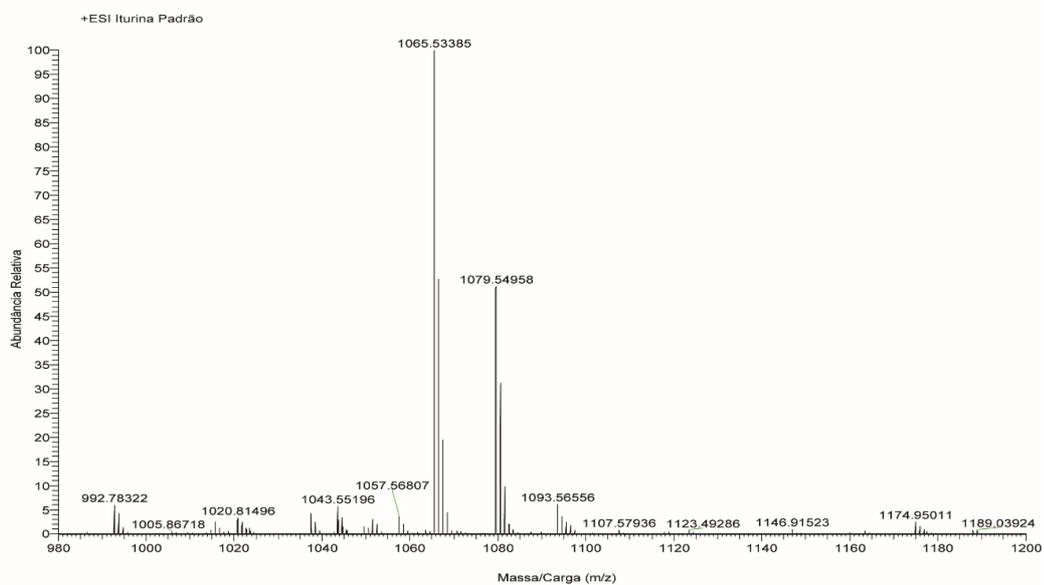
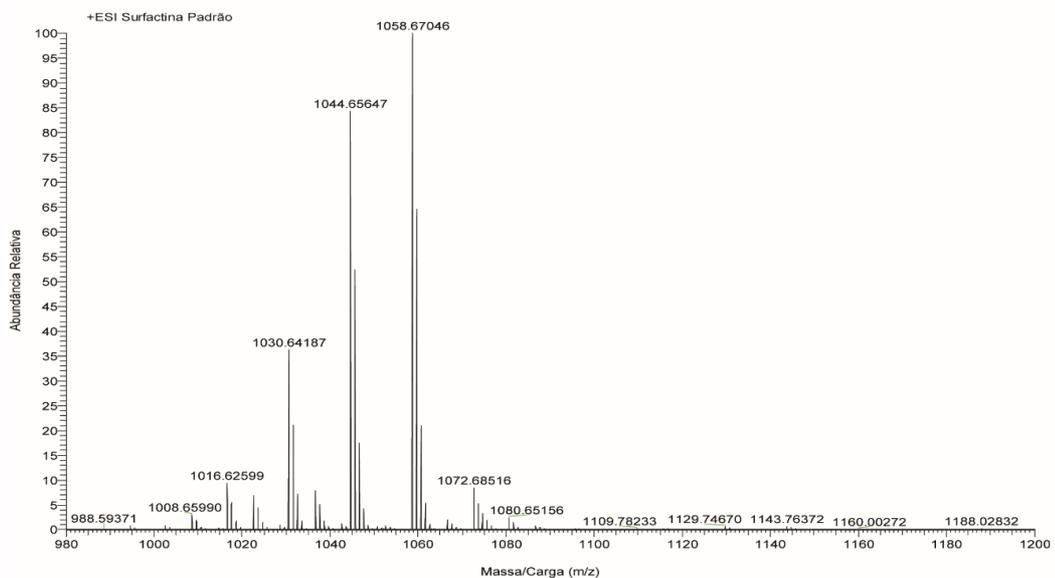
<i>m/z</i>	Tipo de Lipopeptídeo	Estirpes Produtoras	Referências
1008,66	C13 surfactina A [M+H] <sup>+</sup> /Leu7 C14 surfactina B [M+H] <sup>+</sup> /Val7	ICA 13, TIM 27, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	BIE; LU; LU, 2009; GONG <i>et al.</i> , 2015; LEE <i>et al.</i> , 2016; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008; YANG <i>et al.</i> , 2015
1016,63	C12 surfactina A [M+Na] <sup>+</sup> /Leu7 C13 surfactina B [M+Na] <sup>+</sup> /Val7	JAG 255, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	CHEN <i>et al.</i> , 2008; KIM <i>et al.</i> , 2010; STEIN, 2008
1021,53	C14 bacilomicina L [M+H] <sup>+</sup>	TIM 96	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008
1022,68	C14 surfactina A [M+H] <sup>+</sup> /Leu7 C15 surfactina B [M+H] <sup>+</sup> /Val7 C13 bamilocina A [M+H] <sup>+</sup>	JAG 255, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 10, ICA 36, TIM 13	BIE; LU; LU, 2009; GONG <i>et al.</i> , 2015; LEE <i>et al.</i> , 2016, 2007; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008
1030,65	C13 surfactina A [M+Na] <sup>+</sup> /Leu7 C14 surfactina B [M+Na] <sup>+</sup> /Val7	TIM 27, JAG 249, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13, TIM 96, TIM 58, JAG 255	CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; KIM <i>et al.</i> , 2010; KOU MOUTSI <i>et al.</i> , 2004; PECCI <i>et al.</i> , 2010; PEREIRA <i>et al.</i> , 2013; STEIN, 2008; VATER <i>et al.</i> , 2002; YANG <i>et al.</i> , 2015
1035,55	C15 bacilomicina L [M+H] <sup>+</sup>	TIM 96	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008
1036,70	C15 surfactina A [M+H] <sup>+</sup> /Leu7 C16 surfactina B [M+H] <sup>+</sup> /Val7	JAG 255, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 10, ICA 36, TIM 13	BIE; LU; LU, 2009; CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; LEE <i>et al.</i> , 2016; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008; YANG <i>et al.</i> , 2015
1043,56	C14 iturina A [M+H] <sup>+</sup> /Asn1 C14 bacilomicina L [M+Na] <sup>+</sup>	TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24	BIE; LU; LU, 2009; CALDEIRA <i>et al.</i> , 2011; CHEN <i>et al.</i> , 2008, 2016; CHO <i>et al.</i> , 2003; GONG <i>et al.</i> , 2015; ISOGAI <i>et al.</i> , 1982; PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984; STEIN, 2008; YANG <i>et al.</i> , 2015; YUAN <i>et al.</i> , 2014; ZHANG <i>et al.</i> , 2012
1044,66	C14 surfactina A [M+Na] <sup>+</sup> /Leu7 C15 surfactina B [M+Na] <sup>+</sup> /Val7	JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, TIM 68, ICA 36	CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; KIM <i>et al.</i> , 2010; KOU MOUTSI <i>et al.</i> , 2004; PECCI <i>et al.</i> , 2010; PEREIRA <i>et al.</i> , 2013; STEIN, 2008; VATER <i>et al.</i> , 2002
1045,56	C15 bacilomicina D (M+H) <sup>+</sup>	ICA 32, JAG 255, ICA 13	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984
1046,62	C13 surfactina A [M+K] <sup>+</sup> /Leu7 C14 surfactina B [M+K] <sup>+</sup> /Val7	TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10	STEIN, 2008

1049,56	C16 bacilomicina L [M+H] <sup>+</sup>	ICA 24, TIM 96, TIM 13	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008
1050,71	C16 surfactina A [M+H] <sup>+</sup> /Leu7 C17 surfactina B [M+H] <sup>+</sup> /Val7	JAG 255, TIM 27, TIM 58, TIM 10, ICA 36, TIM 13	WATROUS <i>et al.</i> , 2012
1053,54	C14 bacilomicina D [M+Na] <sup>+</sup>	ICA 32, JAG 255	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984
1057,58	C15 iturina A [M+H] <sup>+</sup> /Asn1 C15 bacilomicina L [M+Na] <sup>+</sup>	TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24	BIE; LU; LU, 2009; CALDEIRA <i>et al.</i> , 2011; CHEN <i>et al.</i> , 2008, 2016; CHO <i>et al.</i> , 2003; GONG <i>et al.</i> , 2015; ISOGAI <i>et al.</i> , 1982; PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984; PUEYO <i>et al.</i> , 2009; STEIN, 2008; YANG <i>et al.</i> , 2015; YUAN <i>et al.</i> , 2014; ZHANG <i>et al.</i> , 2012
1058,68	C15 surfactina A [M+Na] <sup>+</sup> /Leu7 C16 surfactina B [M+Na] <sup>+</sup> /Val7	ICA 32, JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 68, ICA 36	CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; KOUMOUTSI <i>et al.</i> , 2004; PECCI <i>et al.</i> , 2010; PEREIRA <i>et al.</i> , 2013; STEIN, 2008; YANG <i>et al.</i> , 2015
1059,58	C16 bacilomicina D [M+H] <sup>+</sup> C14 bacilomicina L [M+K] <sup>+</sup>	ICA 32, JAG 255, TIM 03, JAG 248	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984
1060,63	C14 surfactina A [M+K] <sup>+</sup> /Leu7 C15 surfactina B [M+K] <sup>+</sup> /Val7	TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10	STEIN, 2008
1065,54	C14 iturina A [M+Na] <sup>+</sup> /Asn1	JAG 248, ICA 13, ICA 24	CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; PUEYO <i>et al.</i> , 2009; VATER <i>et al.</i> , 2002; YANG <i>et al.</i> , 2015; ZHANG <i>et al.</i> , 2012
1066,64	C14 iturina A [M+Na] <sup>+</sup> /Asn1 C13 iturina [M+K] <sup>+</sup> /Asn1	JAG 248, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 68, TIM 13	KIM <i>et al.</i> , 2010; YUAN <i>et al.</i> , 2014
1067,55	C15 bacilomicina D [M+Na] <sup>+</sup>	ICA 32, JAG 255, ICA 13, ICA 24	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984
1071,59	C16 iturina A [M+H] <sup>+</sup> /Asn1 C16 bacilomicina L [M+Na] <sup>+</sup>	ICA 32, JAG 255, TIM 03, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, ICA 36, TIM 13	CALDEIRA <i>et al.</i> , 2011; CHO <i>et al.</i> , 2003; ISOGAI <i>et al.</i> , 1982; STEIN, 2008; YUAN <i>et al.</i> , 2014
1072,54	C17 bacilomicina D [M+H] <sup>+</sup>	TIM 13, TIM 96	-
1072,69	C16 surfactina A [M+Na] <sup>+</sup> /Leu7 C17 surfactina B [M+Na] <sup>+</sup> /Val7	ICA 32, JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, ICA 36	CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; YANG <i>et al.</i> , 2015
1074,68	C15 surfactina A [M+K] <sup>+</sup> /Leu7 C16 surfactina B [M+K] <sup>+</sup> /Val7	ICA 32, JAG 255, JAG 248, TIM 96, JAG 249, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	BEN AYED <i>et al.</i> , 2014

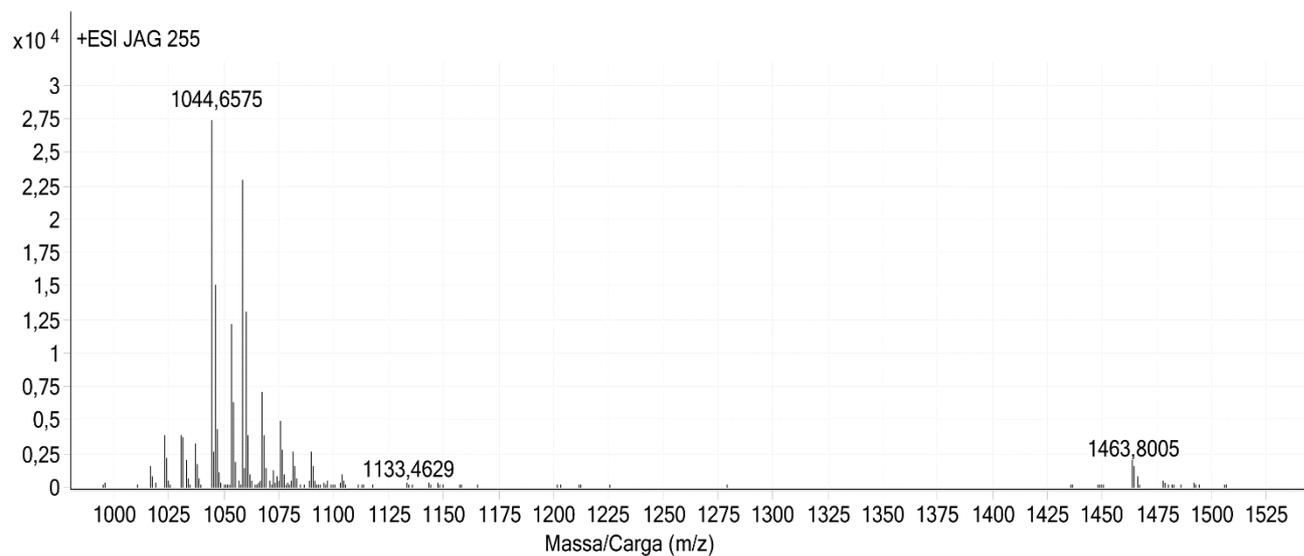
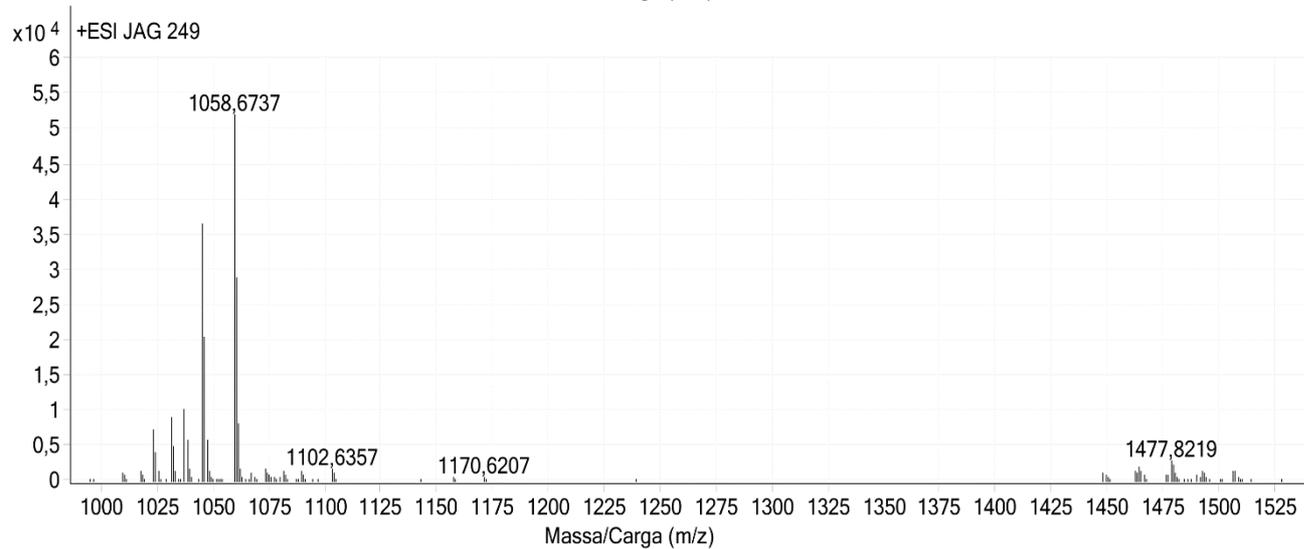
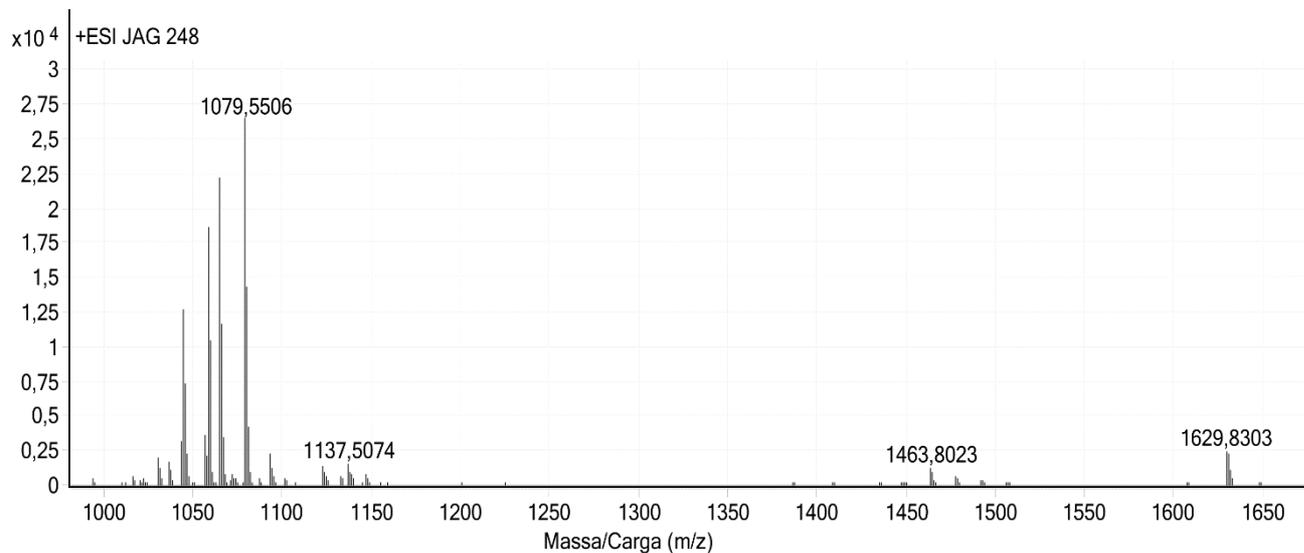
1079,56	C15 iturina A [M+Na] <sup>+</sup> /Asn1	ICA 32, JAG 255, TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24	CHEN <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; PRICE <i>et al.</i> , 2007; PUEYO <i>et al.</i> , 2009; VATER <i>et al.</i> , 2002; YANG <i>et al.</i> , 2015; ZHANG <i>et al.</i> , 2012
1080,66	C15 iturina A [M+Na] <sup>+</sup> /Asn1 C14 iturina A [M+K] <sup>+</sup> /Asn1 C16 bacilomicina D [M+Na] <sup>+</sup>	JAG 248, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	GONG <i>et al.</i> , 2015; KIM <i>et al.</i> , 2010; YUAN <i>et al.</i> , 2014
1086,71	C17 surfactina A [M+Na] <sup>+</sup> /Leu7	ICA 32, JAG 255, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 10, ICA 36, TIM 13	VATER <i>et al.</i> , 2002; WATROUS <i>et al.</i> , 2012
1087,53	C16 bacilomicina L [M+K] <sup>+</sup>	ICA 32, JAG 255, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, ICA 36, TIM 13	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984; STEIN, 2008
1088,6	C16 surfactina A [M+K] <sup>+</sup> /Leu7	ICA 13, ICA 24, TIM 10, ICA 36, TIM 13	STEIN, 2008
1093,57	C16 iturina A [M+Na] <sup>+</sup> /Asn1	TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24, TIM 68	GONG <i>et al.</i> , 2015; KIM <i>et al.</i> , 2010; PUEYO <i>et al.</i> , 2009; VATER <i>et al.</i> , 2002; YUAN <i>et al.</i> , 2014
1095,58	C15 iturina A [M+K] <sup>+</sup> /Asn1	ICA 32, JAG 255, TIM 03, JAG 248, ICA 13, ICA 24, TIM 68, TIM 13	-
1097,57	C16 bacilomicina D [M+K] <sup>+</sup>	JAG 255, TIM 03, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, TIM 13, ICA 36	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984
1101,54	C17 bacilomicina L [M+K] <sup>+</sup>	JAG 255, ICA 13, ICA 24, TIM 27, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	PEYPOUX <i>et al.</i> , 1984
1102,68	C17 surfactina A [M+K] <sup>+</sup> /Leu7	ICA 13, ICA 24, TIM 10, ICA 36, TIM 13	-
1107,59	C17 iturina A [M+Na] <sup>+</sup> /Asn1	TIM 03, TIM 68	PRICE <i>et al.</i> , 2007
1123,50	C17 iturina A [M+K] <sup>+</sup> /Asn1	JAG 248, ICA 13, ICA 24, TIM 10, ICA 36, TIM 13	KAUR <i>et al.</i> , 2017; WATROUS <i>et al.</i> , 2012
1447,82	C15 fengicina A [M+H] <sup>+</sup> /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 <i>et al.</i> , 2012
1463,81	C16 fengicina A [M+H] <sup>+</sup> /Ala6 C14 fengicina B [M+H] <sup>+</sup> /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 <i>et al.</i> , 2008; GONG <i>et al.</i> , 2015; KOUMOUTSI <i>et al.</i> , 2004; LI <i>et al.</i> , 2012a; PATHAK <i>et al.</i> , 2012; PECCI <i>et al.</i> , 2010; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008; VATER <i>et al.</i> , 2002; YANG <i>et al.</i> , 2015

1477,83	C17 fengicina A [M+H] <sup>+</sup> /Ala6 C15 fengicina B [M+H] <sup>+</sup> /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 <i>et al.</i> , 2008, 2010; GONG <i>et al.</i> , 2015; KOUMOUTSI <i>et al.</i> , 2004; LI <i>et al.</i> , 2012a; PATHAK <i>et al.</i> , 2012; PECCI <i>et al.</i> , 2010; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008; VATER <i>et al.</i> , 2002; YANG <i>et al.</i> , 2015
1485,80	C16 fengicina A [M+Na] <sup>+</sup> /Ala6 C14 fengicina B [M+ Na] <sup>+</sup> /Val6	JAG 255, TIM 96, JAG 249, TIM 10, TIM 68, ICA 36, TIM 13	GONG <i>et al.</i> , 2015; PATHAK <i>et al.</i> , 2012
1491,85	C18 fengicina A [M+H] <sup>+</sup> /Ala6 C16 fengicina B [M+H] <sup>+</sup> /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 <i>et al.</i> , 2008; KOUMOUTSI <i>et al.</i> , 2004; LI <i>et al.</i> , 2012a; PATHAK <i>et al.</i> , 2012; PECCI <i>et al.</i> , 2010; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008; VATER <i>et al.</i> , 2002
1495,86	C17 fengicina A [M+H] <sup>+</sup> /Ala6 C15 fengicina B [M+H] <sup>+</sup> /Val6 Cadeia Linear	ICA 36, TIM 13	MA <i>et al.</i> , 2016; PATHAK <i>et al.</i> , 2012
1499,82	C17 fengicina A [M+Na] <sup>+</sup> /Ala6 C15 fengicina B [M+Na] <sup>+</sup> /Val6	JAG 249, TIM 10, ICA 36, TIM 13	GONG <i>et al.</i> , 2015
1505,86	C19 fengicina A [M+H] <sup>+</sup> /Ala6 C17 fengicina B [M+H] <sup>+</sup> /Val6	JAG 255, JAG 248, TIM 96, TIM 27, JAG 249, TIM 58, TIM 13	BIE; LU; LU, 2009; KOUMOUTSI <i>et al.</i> , 2004; LI <i>et al.</i> , 2012a; PATHAK <i>et al.</i> , 2012; PECCI <i>et al.</i> , 2010; ROONGSAWANG <i>et al.</i> , 2002; STEIN, 2008; VATER <i>et al.</i> , 2002; YANG <i>et al.</i> , 2015
1510,86	C17 fengicina B [M+H] <sup>+</sup> /Ala6 Cadeia Linear	ICA 36	LIU <i>et al.</i> , 2012; PATHAK <i>et al.</i> , 2012

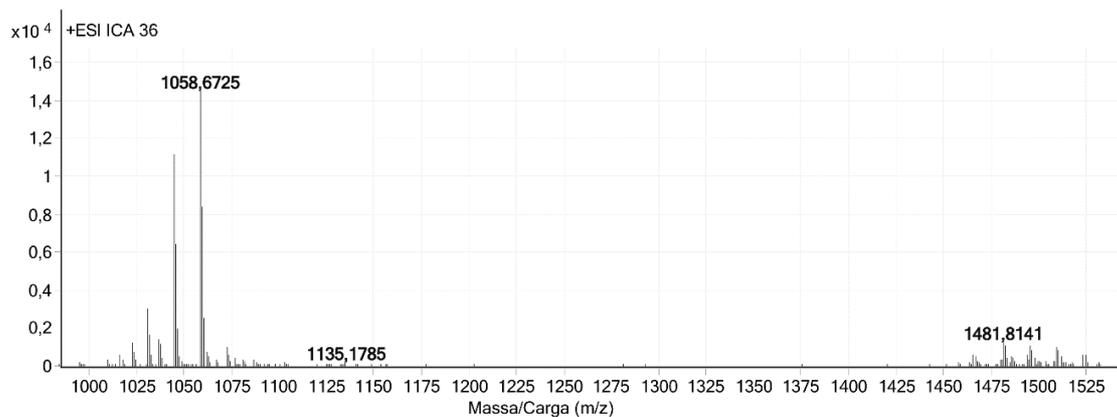
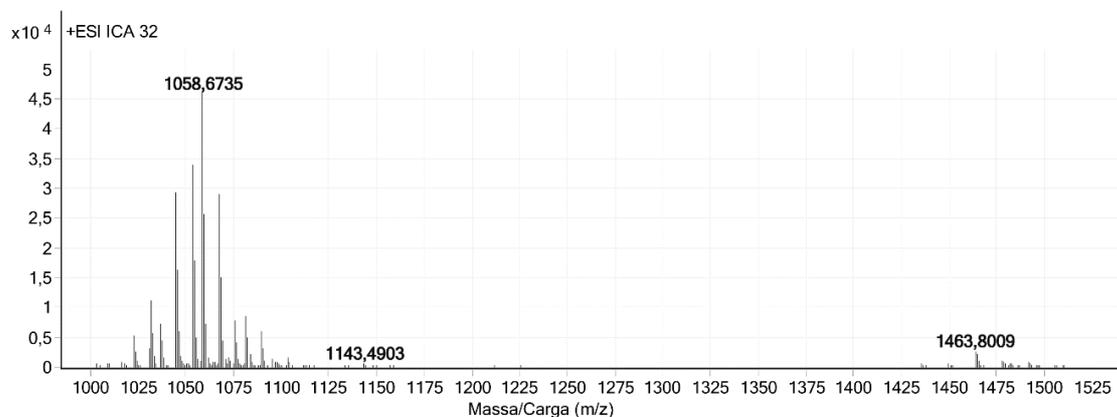
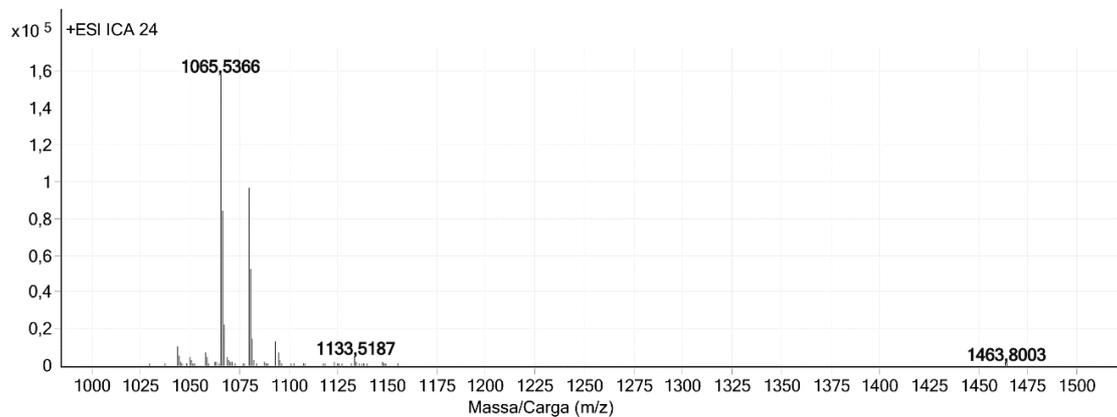
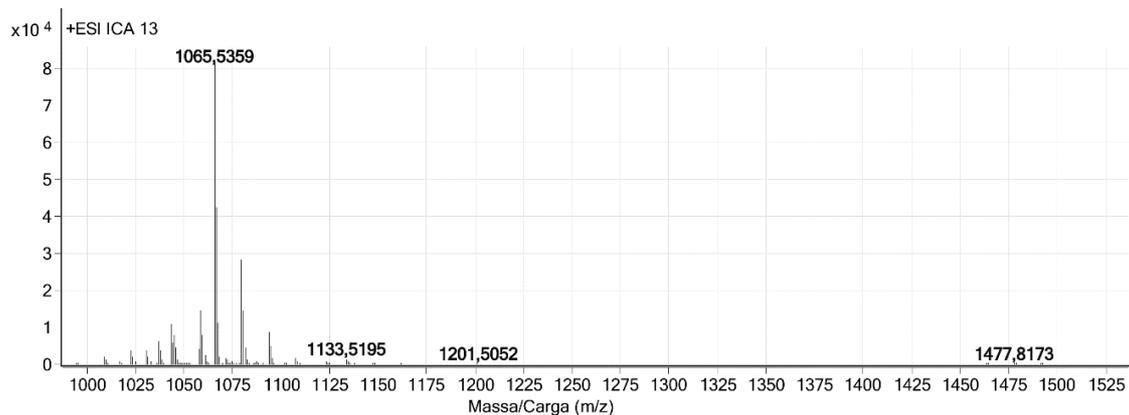
## ANEXO D - ESPECTROS DE MASSAS POR ESI-Q-TOF MS



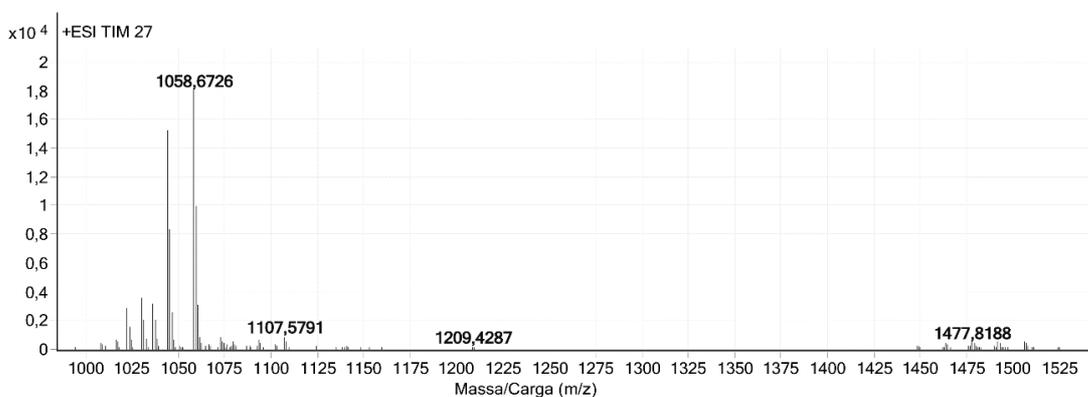
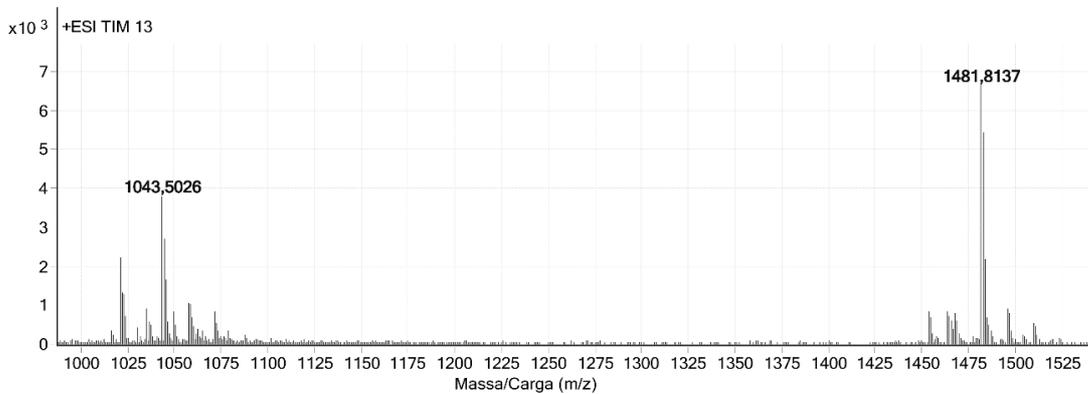
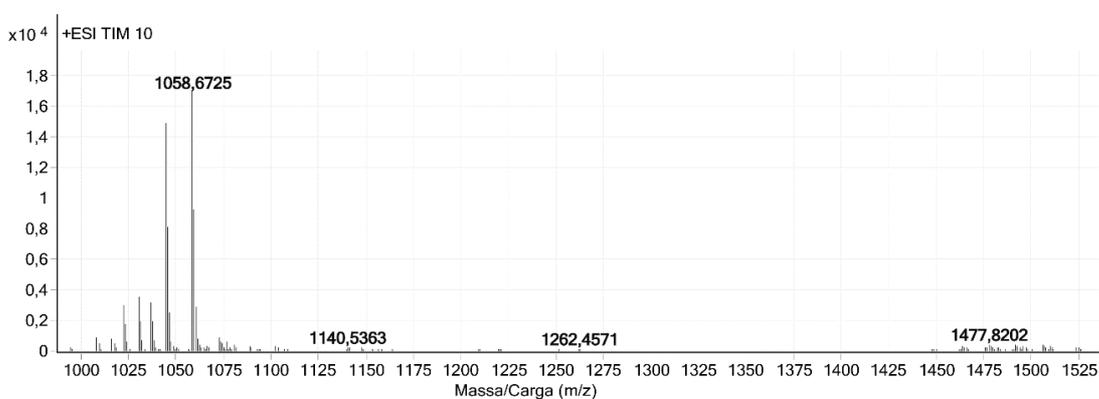
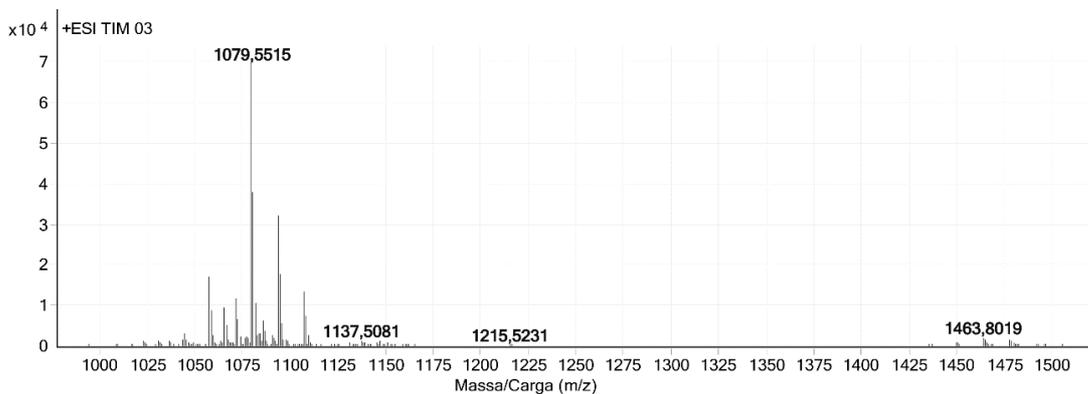
- i. Espectros de massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da surfactina, iturina A e fengicina comerciais produzidas por *Bacillus subtilis*.



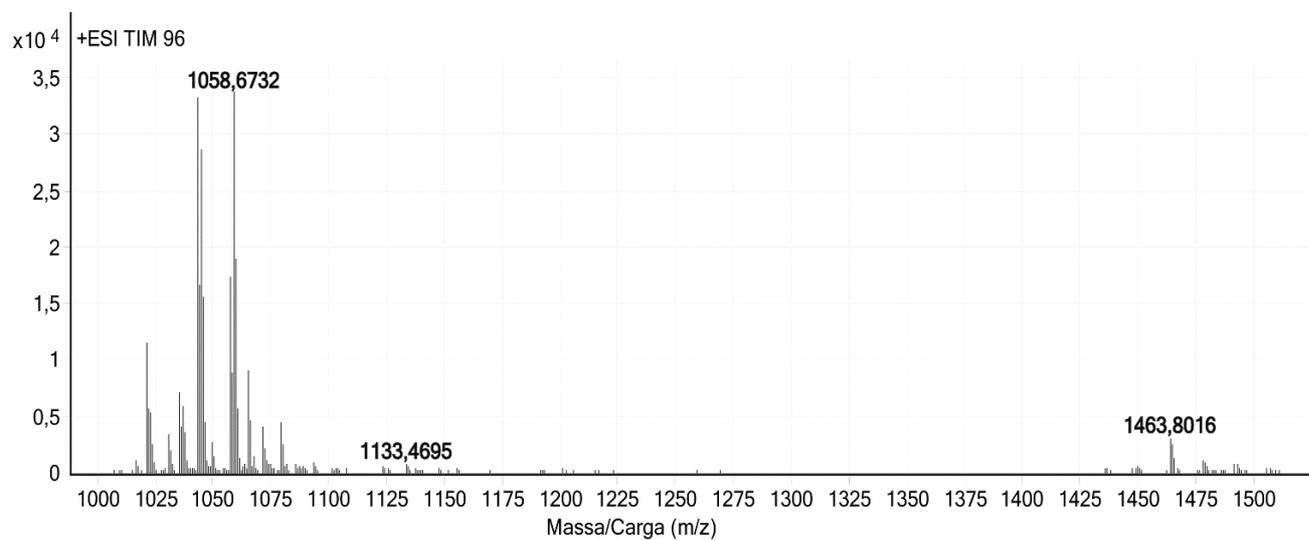
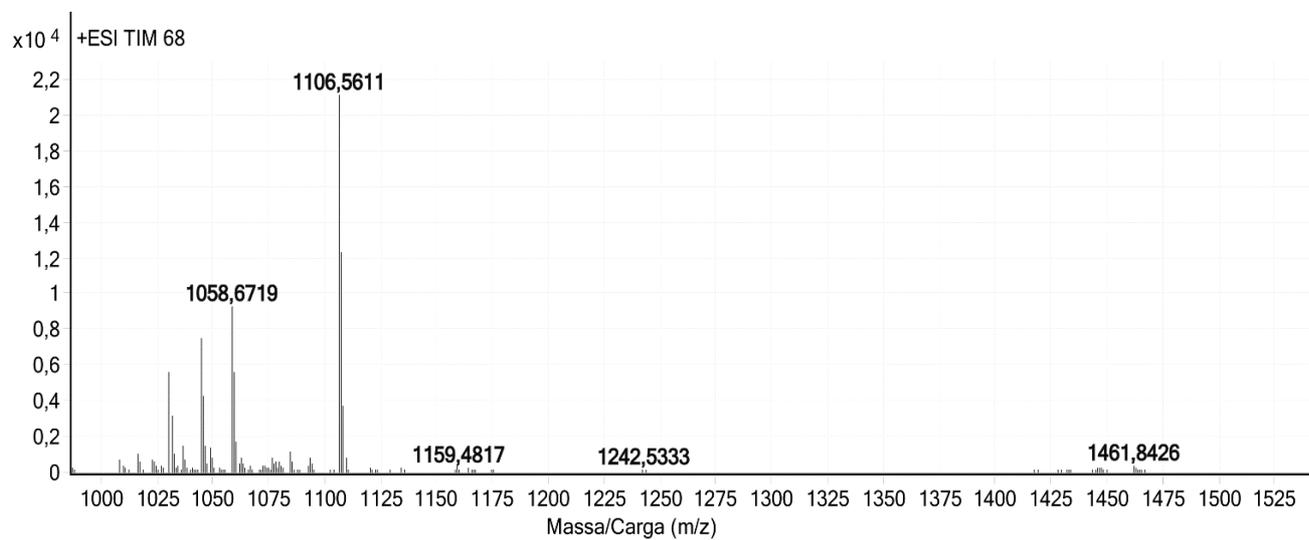
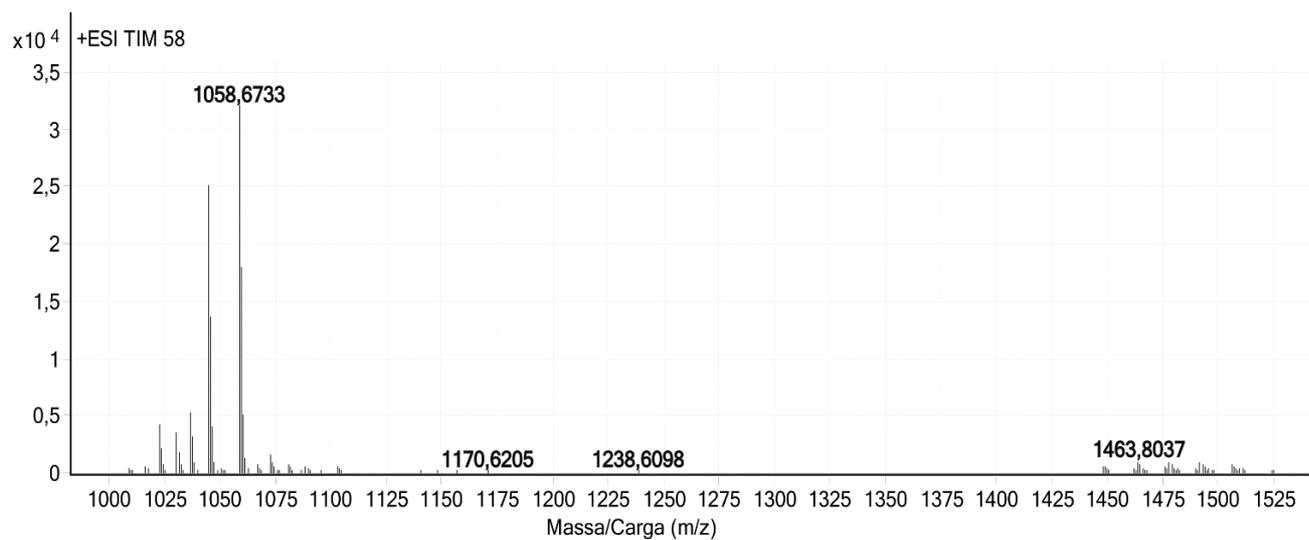
- ii. Espectros de massas por ESI-Q-TOF MS, em modo positivo, evidenciando os picos característicos da mistura complexa de lipopeptídeos produzidos pelas estirpes do manguezal do Jaguaribe (JAG 248, JAG 249 e JAG 255).



- iii. 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 (ICA 13, ICA 24, ICA 32 e ICA 36).



- iv. 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 (TIM 03, TIM 10, TIM 13 e TIM 27).



- v. 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 (TIM 58, TIM 68 e TIM 96).