



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JOÃO ALBERTO DE OLIVEIRA SOARES JÚNIOR**

**MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DURANTE O  
CRESCIMENTO DE *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* EM BATELADA**

**FORTALEZA**

**2018**

JOÃO ALBERTO DE OLIVEIRA SOARES JÚNIOR

**MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES DURANTE O  
CRESCIMENTO DE *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* EM BATELADA**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

FORTALEZA – CEARÁ

2018

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

---

S654m Soares Júnior, João Alberto de Oliveira.  
Monitoramento da produção de biossurfactantes durante o crescimento de *Bacillus paralicheniformis* em batelada / João Alberto de Oliveira Soares Júnior. – 2018.  
48 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,  
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo.

1. Bacillus. 2. Biossurfactante. 3. MEOR. I. Título.

CDD 570

---

JOÃO ALBERTO DE OLIVEIRA SOARES JÚNIOR

MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DURANTE O  
CRESCIMENTO DE *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* EM BATELADA

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas do Departamento de  
Biologia da Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para a obtenção do  
título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Vania Maria Maciel Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra Denise Cavalcante Hissa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Maria Cristiane Rabelo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

FORTALEZA – CEARÁ

2018

À minha mãe, meu pai e minha irmã.

À todos o amigos que contribuíram  
com minha caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, especialmente a minha mãe, Aldenora, a pessoa mais generosa que eu conheço e que me ensinou desde cedo o valor da cultura e educação. As ela lamenta não poder ter me dado mais coisas e eu sempre gosto de lembrar que ao me dar educação ela já me deu tudo.

A profa. Dra. Vania Maria Maciel Melo, por acreditar em mim, me orientar e ser sempre uma fonte de inspiração, não apenas no caminho da microbiologia, mas na vida. Ainda me encanta com tudo que eu posso aprender.

A minha coorientadora do coração, Bárbara Cibelle, que foi tão importante para minha formação que talvez ela nem mesmo saiba. Eu também não teria chegado até aqui se não fosse por ela.

A Dra. Mirella Pereira, também pela coorientação, pelas correções e dicas em todos os trabalhos, e por me socorrer nos momentos de maior desespero.

A professora Dra. Denise Cavalcante Hissa, por me ajudar com seu conhecimento e carinhosamente aceitar avaliar meu trabalho e participar da banca examinadora.

A Dra. Maria Cristiane Rabelo que gentilmente aceitou avaliar meu trabalho e participar da banca examinadora.

A toda equipe do LEMBIOTECH pelo apoio profissional e emocional, em especial ao amigo Samuel Araújo, que foi a primeira pessoa a me orientar no laboratório e caminha comigo desde então, ao amigo Jonathan Santos, um dos jovens mais inteligentes com que eu tive o prazer de trabalhar e que me ajudou bastante nesse caminho, e as amigas Gabrielly Oliveira e Claudiane Carvalho, duas pessoas por que eu tenho profunda admiração e que sem saber me ajudaram a não enlouquecer nos piores momentos.

A CAPES e CNPq, e todos os órgãos e instituições que fomentam que ajudam a construir a ciência no Brasil e que direta ou indiretamente também me ajudaram a chegar até aqui.

A Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade de cursar Ciências Biológicas e por todas as experiências maravilhosas que me proporcionou e que eu espero ainda experimentar.

## RESUMO

O petróleo é um dos mais importantes recursos energéticos já explorados pelo homem. Não obstante as complicações socioeconômicas e ecológicas associadas a sua extração, sua exploração não apresenta sinal de desaceleração e muitos estudos são direcionados às técnicas de extração para melhorar e garantir a sua produção. Dentre elas, a recuperação melhorada de óleo utilizando microrganismos (MEOR) tem chamado atenção principalmente pela sua eficiência, economia e segurança ecológica quando comparado a outras técnicas de melhoria de extração. Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são conhecidas por produzirem moléculas biossurfactantes pertencentes à classe dos lipopeptídeos. Com baixo peso molecular, os lipopeptídeos estão entre os surfactantes mais eficientes em redução de tensão superficial e interfacial, fenômenos essenciais em MEOR. O presente trabalho analisou a produção de biossurfactantes em batelada por uma cepa de *Bacillus* isoladas de sedimentos de manguezal, com o intuito de isolar e identificar aquela(s) com maior potencial para aplicação em MEOR. As bactérias foram cultivadas em meio mineral tendo glicose como fonte de carbono e a produção de biossurfactantes foi monitorada por meio de atividade dispersante de óleo, atividade emulsificante e da medida de tensão superficial. Os resultados mostraram que sobrenadantes das culturas foram capazes de dispersar óleo derramado na água do mar, indicando a presença de tensoativos. Apenas ICA58 não mostrou atividade emulsificante, atividade não desejada em MEOR, por isso essa estirpe foi selecionada para mais testes e identificação. A identificação molecular baseada nos genes rRNA 16S, *gyrB* e *rpoB* mostrou que ICA58 é filogeneticamente relacionada à espécie *Bacillus paralicheniformis*. O tensoativo produzido por ICA58 reduziu a tensão superficial da água para 27,7 mN/m. A bactéria produziu surfactante em concentração de NaCl de 50 mg/L. O surfactante produzido é resistente a autoclavação (121°C, 15 min) e a alta salinidade (200 g/L de NaCl). Após autoclavação, o surfactante de ICA58 mostrou atividade emulsificante, sugerindo que essa atividade estava inibida por algum desemulsificante. Em conjunto, esses resultados sugerem que ICA58 produz mais de uma classe e/ou isoforma de lipopeptídeo e que as moléculas de interesse podem ser obtidas em momentos diferentes de cultivo e que todas as atividades detectadas tem potencial para aplicações na indústria do petróleo, principalmente em MEOR.

## ABSTRACT

Oil is one of the most important energy resources ever explored by man. Despite the socioeconomic and ecological complications associated to its extraction, its exploitation does not show signs of deceleration and many studies are directed to the extraction techniques to improve and guarantee its production. Among them, the improved recovery of oil using microorganisms (MEOR) has been mainly focused on its efficiency, economy and ecological safety when compared to other extraction improvement techniques. Bacteria belonging to the genus *Bacillus* are known to produce biosurfactant molecules belonging to the class of lipopeptides. With low molecular weight, lipopeptides are among the most efficient surfactants in reducing surface tension and interfacial, essential phenomena in MEOR. The present work analyzed the production of biosurfactants in batch by a strain of *Bacillus* isolated from mangrove sediments, in order to isolate and identify those with the greatest potential for application in MEOR. The bacteria were grown in mineral medium having glucose as carbon source and the production of biosurfactants was monitored by means of oil dispersing activity, emulsifying activity and the measurement of surface tension. The results showed that culture supernatants were able to disperse spilled oil into sea water, indicating the presence of surfactants. Only ICA58 showed no emulsifying activity, undesired activity in MEOR, so this strain was selected for further testing and identification. Molecular identification based on the 16S, *gyrB* and *rpoB* rRNA genes showed that ICA58 is phylogenetically related to the *Bacillus paralicheniformis* species. The surfactant produced by ICA58 reduced the surface tension of water to 27.7 mN/m. The bacterium produced surfactant in NaCl concentration of 50 mg/L. The surfactant produced is resistant to autoclaving (121 ° C, 15 min) and high salinity (200 g/L NaCl). After autoclaving, ICA58 surfactant showed emulsifying activity, suggesting that this activity was inhibited by some de-emulsifying agent. Taken together, these results suggest that ICA58 produces more than one lipopeptide class and / or isoform and that the molecules of interest can be obtained at different times of cultivation and that all activities detected have potential for applications in the petroleum industry, MEOR.



## LISTA DE IMAGENS

Figura 1 - A) Representação esquemática de uma molécula de surfactante, formada por uma cabeça polar e uma calda apolar; B) Estrutura molecular da principal isoforma do tensoativo surfactina .....	14
Figura 2 - Esquema mostrando a distribuição de forças em uma molécula de água A) dentro do líquido e B) as moléculas de surfactantes se estabilizam na superfície entre as moléculas de água reduzindo as interações .....	15
Figura 3 - Esquema mostrando a formação de micelas em meio aquoso. O surfactante dissolvido se estabiliza preferencialmente na interface óleo-água (a). Aumentando-se a concentração de surfactante até o ponto de saturação da interface óleo-água as moléculas começam a se estabilizar nas superfícies líquido-ar e líquido-sólido (b). Aumentando-se novamente a concentração de surfactante até a saturação de todas as superfícies disponíveis (c) as moléculas no meio se estabilizam na forma de micelas (d) .....	17
Figura 4 - Aspecto das colônias em meio ATGE após 24 horas de crescimento .....	30
Figura 5 - Triplicatas de cada uma das culturas após 48 horas de crescimento .....	31
Figura 6 - Dispersão de óleo produzida pela aplicação de 100 uL de sobrenadante livre de células: (a) após 5 minutos; (b) após 24 horas .....	33
Figura 7 - Resultado do E24, mostrando a atividade emulsificante dos sobrenadantes das quatro cepas selecionadas. ICA58 e ICA 62 não formaram emulsão .....	34
Figura 8 - Árvore filogenética concatenada mostrando o agrupamento de ICA 58 com o grupo de <i>B. paralicheniformis</i> .....	35
Figura 9 - O gráfico mostra a sobreposição das curvas de crescimento da bactéria ICA 58 e de redução de tensão superficial no sobrenadante no decorrer do tempo .....	36
Figura 10 - Variação da atividade emulsificante do sobrenadante da cultura de ICA 58 em três faixas durante a curva de crescimento .....	37
Figura 11 - Perfil da tensão superficial exercida pelo sobrenadante de ICA 58 em diferentes tempos, quando cultivada sob concentrações crescentes de sal. O controle mostra a tensão superficial do meio estéril nas diferentes salinidades .....	39
Figura 12: Variação da tensão superficial pela adição de NaCl ao sobrenadante livre de células .....	40

- Figura 13 - Medida de tensão superficial em sobrenadante autoclavado e não autoclavado. O resultado mostra que a autoclavação não teve nenhum efeito sobre a redução de tensão .....40
- Figura 14 - Capacidade emulsificante do sobrenadante de ICA 58 com querosene. (a) teste feito com o sobrenadante natural; (b) teste feito com o sobrenadante autoclavado. O controle negativo feito com querosene e meio estéril .....41
- Figura 15 - Análise da atividade desemulsificante. (a) resultado da aplicação de biossurfactante não autoclavado após 24 horas; (b) resultado da aplicação de sobrenadante autoclavado após 24 horas .....42
- Figura 16 - Perfil da tensão superficial exercida por concentrações crescentes do biossurfactante de ICA 58 .....43

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classes de biossurfactantes e principais microrganismos envolvidos .....	19
Tabela 2 - Comparação entre os valores de CMC para alguns dos principais surfactantes comerciais (de acordo com o fabricante) .....	20
Tabela 3 - Identificação molecular da bactéria ICA 58 para os genes 16S RNA, <i>gyrB</i> e <i>rpoB</i> com base nos dados do GenBank .....	35

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	12
2	Aspectos Teóricos .....	14
2.1	Tensoativos .....	14
2.2	Bactérias produtoras de biossurfactantes .....	18
2.3	A Industria do petróleo .....	20
2.3.1	<i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i> – MEOR .....	21
3	Objetivos .....	23
4	Materiais e Métodos .....	24
4.1	Microorganismos .....	24
4.1.1	Seleção dos microrganismos .....	24
4.1.2	Produção de biossurfactante .....	24
4.1.3	Teste de dispersão de óleo .....	25
4.1.4	Teste para atividade emulsificante (E24) .....	25
4.1.5	Identificação molecular da cepa ICA58 .....	25
4.2	Monitoramento da produção de biossurfactante .....	27
4.2.1	Curva de crescimento .....	27
4.2.2	Tensão Superficial durante o crescimento .....	27
4.2.3	Capacidade emulsificante durante o crescimento .....	28
4.3	Teste de resistência a salinidade .....	28
4.4	Teste de termoestabilidade do biossurfactante .....	28
4.5	Teste de capacidade desemulsificante .....	29
4.6	Determinação da Concentração Micelar Crítica .....	29

	4.6.1	Extração do biossurfactante por precipitação ácida .....	29
	4.6.2	Determinação da CMC .....	29
5		Resultados e Discussão .....	30
	5.1	Seleção dos Microrganismos .....	30
	5.2	Identificação Molecular .....	34
	5.3	Monitoramento da produção de biossurfactante .....	36
	5.4	Teste de halotolerancia .....	38
	5.5	Teste de termoestabilidade .....	40
	5.6	Determinação da CMC .....	42
6		Conclusão .....	44
7		Referencias .....	45

## 1 Introdução

Os surfactantes são compostos anfifílicos que apresentam elevado interesse industrial e comercial devido suas propriedades tensoativas. Apenas em 2008, a produção mundial anual de surfactantes foi de 13 milhões de toneladas e as projeções já mostravam um aumento de 4,5% ao ano até 2018 gerando receitas de mais de 41 bilhões (Ashby et al., 2013). Entretanto, esses químicos são geralmente muito tóxicos e não biodegradáveis, o que representa um custo adicional devido ao risco potencial de contaminação. Assim, os surfactantes biológicos, ou biossurfactantes, vem ganhando destaque devido a sua diversidade de propriedades. Além de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, sua resistência a altas temperaturas e capacidade de agir mesmo em ambientes de baixo pH ou altos níveis de salinidade (Reis et al., 2013) permitem uma vasta gama de aplicações.

De um modo geral os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua composição química como glicolipídios, lipossacarídeos, fosfolipídeos, lipopeptídeos e outros, sendo os biossurfactantes lipopeptídeos os mais eficientes (Barros, 2007). Os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os mais bem estudados, sendo agrupados normalmente em três grandes famílias de acordo com sua estrutura: Surfactinas, Iturinas e Fengicinas (Zhao et al., 2017). Esses compostos são produzidos geralmente na forma de uma mistura de moléculas e isoformas que diferem na substituição de alguns aminoácidos e no comprimento de cadeias laterais, que podem apresentar uma série de atividades biológicas, físicas e químicas distintas (Moran, 2010; Farias, 2017).

Um dos principais e mais promissores mercados para o uso de biossurfactantes é a indústria do petróleo, onde, suas aplicações incluem desde a incorporação em óleos lubrificantes até biorremediação até dispersão em derramamentos de óleo. Dentro da cadeia produtiva suas aplicações incluem a remoção e mobilização de resíduos em tanques de estocagem e principalmente a recuperação avançada de petróleo (Nitschke e Pastore, 2002).

A recuperação de petróleo costuma ser classificada por fases determinadas pelas técnicas utilizadas para extrair o óleo do interior do reservatório. Na chamada fase primária, tanto o petróleo quanto o gás natural são recuperados utilizando a pressão natural do poço recém-perfurado. A partir da fase secundária o processo de recuperação

se torna ativo e consiste basicamente na injeção de produtos dentro do poço com o objetivo de aumentar a pressão interna e forçar a expulsão de mais petróleo. A recuperação primária costuma ser entre 5% e 10%, enquanto a fase de recuperação secundária tem uma taxa entre 10% e 40% (Sem, 2008), o que significa que no cenário mais otimista ainda resta metade do petróleo aprisionado no interior do poço. Essa limitação há muito tempo tem estimulado pesquisas em várias frentes no sentido de desenvolver técnicas de recuperação avançadas, denominadas como EOR (do inglês, *Enhanced Oil Recovery*), para aperfeiçoar a extração de petróleo em campos maduros em uma fase terciária de recuperação. Entre essas técnicas a chamada recuperação microbiológica avançada de petróleo (ou MEOR, do inglês *Microbial Enhanced Oil Recover*) é um método terciário onde microrganismos ou seus metabólitos, como os biossurfactantes, são utilizados para mobilizar essa fração de óleo que dificilmente seria recuperada utilizando técnicas convencionais (Suthar et al., 2008).

Outro problema enfrentado pela indústria durante o processo de recuperação é a formação de emulsões indesejadas. Essas emulsões são normalmente dispersões de água em óleo, formadas espontaneamente durante o processo de produção, juntamente com a água produzida, e podem ser encontradas em praticamente todas as fases da cadeia produtiva (Oseghale et al, 2012). Dependendo da natureza do poço essas dispersões podem ser altamente estáveis e precisam ser desfeitas para evitar, entre outros problemas, diminuição na produção, processos de corrosão em equipamentos e aumento nos custos de refino.

Por isso, a pesquisa por biossurfactantes capazes de reduzir a tensão nas interfaces com óleo, para melhorar a recuperação de petróleo em poços maduros, mas que ao mesmo tempo sejam capazes de prevenir ou mesmo remediar a formação de emulsões é altamente desejável.

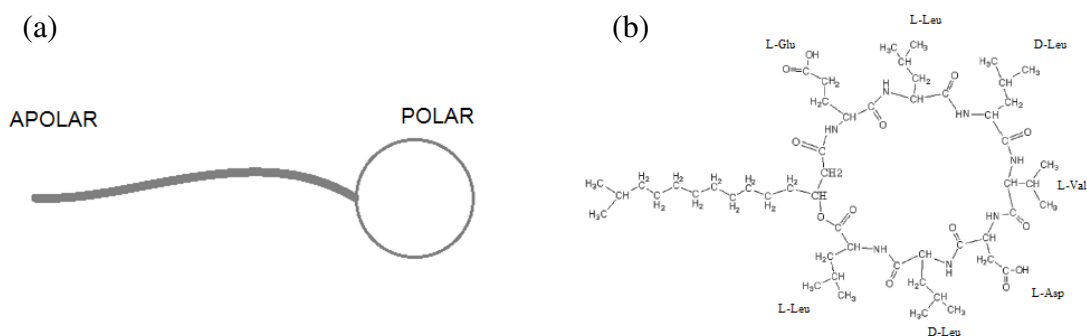
## 2 Aspectos Teóricos

### 2.1 Tensoativos

Compostos ativos de superfícies (SACs), surfactantes, ou ainda tensoativos, são compostos que apresentam como principal característica a presença de uma porção polar e outra apolar na mesma molécula. A parte apolar de um tensoativo normalmente é composta de uma cadeia carbônica, enquanto a parte polar é formada por átomos que apresentam concentração de cargas, formando um polo positivo ou negativo. Tradicionalmente são representados por uma barra ou uma calda (porção apolar), ligada a um círculo (porção polar) (Figura 1A).

Quando uma molécula de tensoativo é colocada em água, a parte polar, hidrofílica, é responsável pela solubilização, enquanto a parte apolar, hidrofóbica, dificulta a solubilização. Caso a parte hidrofílica seja suficientemente polar para solubilizar a parte apolar, a solução se estabiliza. De maneira semelhante, quando uma molécula de tensoativo é colocada em meio orgânico, como óleo, a sua parte hidrofóbica (ou lipofílica) passa a ser responsável pela solubilidade, enquanto a parte hidrofílica dificulta a solubilização. Mesmo assim, por apresentar características hidrofílicas e lipofílicas na mesma molécula nunca apresenta total estabilidade na sua dissociação, seja em meio polar seja em meio apolar. É essa instabilidade que proporciona aos tensoativos as características que os tornam tão interessantes (DALTIM, 2012).

Figura 1: a) Representação esquemática de uma molécula de surfactante, formada por uma cabeça polar e uma cauda apolar; b) Estrutura molecular da principal isoforma do tensoativo surfactina.



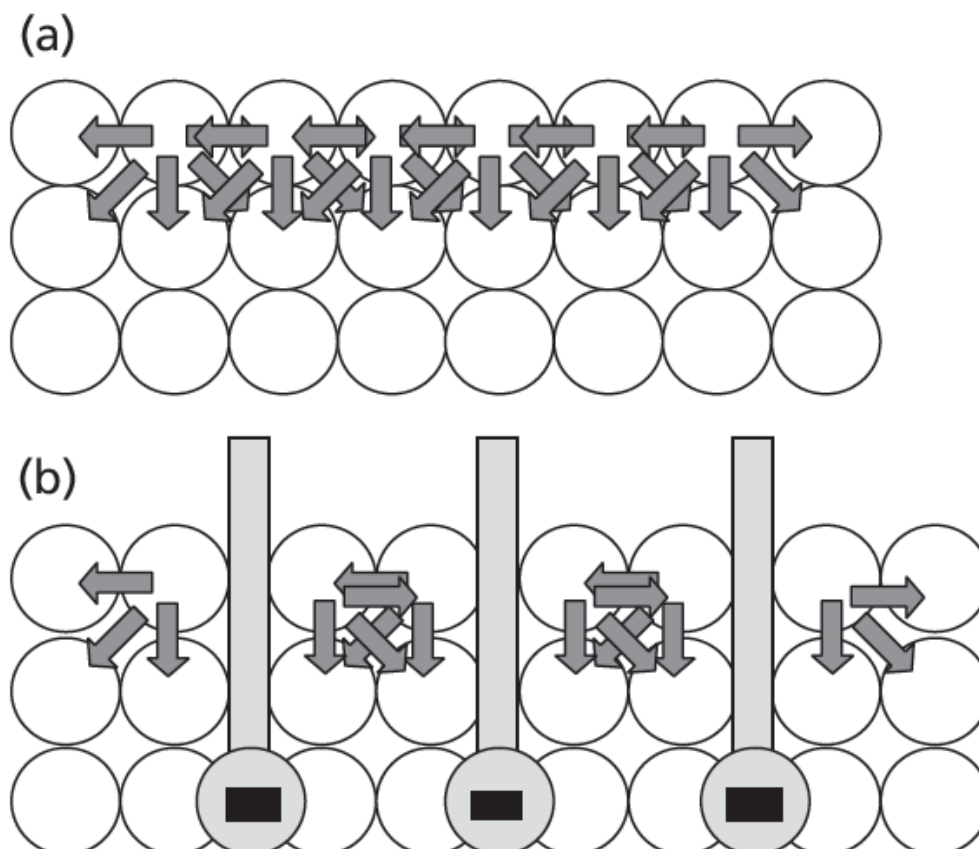
Fonte: DALTIM, 2012



A maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é de origem petroquímica, sintetizados em processos que requerem vários passos de purificação, elevando o custo de produção. Além disso, costumam possuir elevada toxicidade e sua natureza sintética dificulta sua degradação na natureza, aumentando os impactos ao meio ambiente. Apesar disso, as necessidades industriais e comerciais tem aumentado a demanda por surfactantes no mundo.

Para sua utilização comercial, os tensoativos devem possuir algumas características intrínsecas que comprovem sua eficiência e eficácia. Entre as principais podemos listar capacidade redutora de tensão, capacidade emulsificante e concentração micelar crítica (CMC) (Barros, 2007).

Figura 2: Esquema mostrando a distribuição de forças em uma molécula de água A) dentro do líquido e B) as moléculas de surfactantes se estabilizam na superfície entre as moléculas de água reduzindo as interações.



Fonte: (DALTIM, 2012)

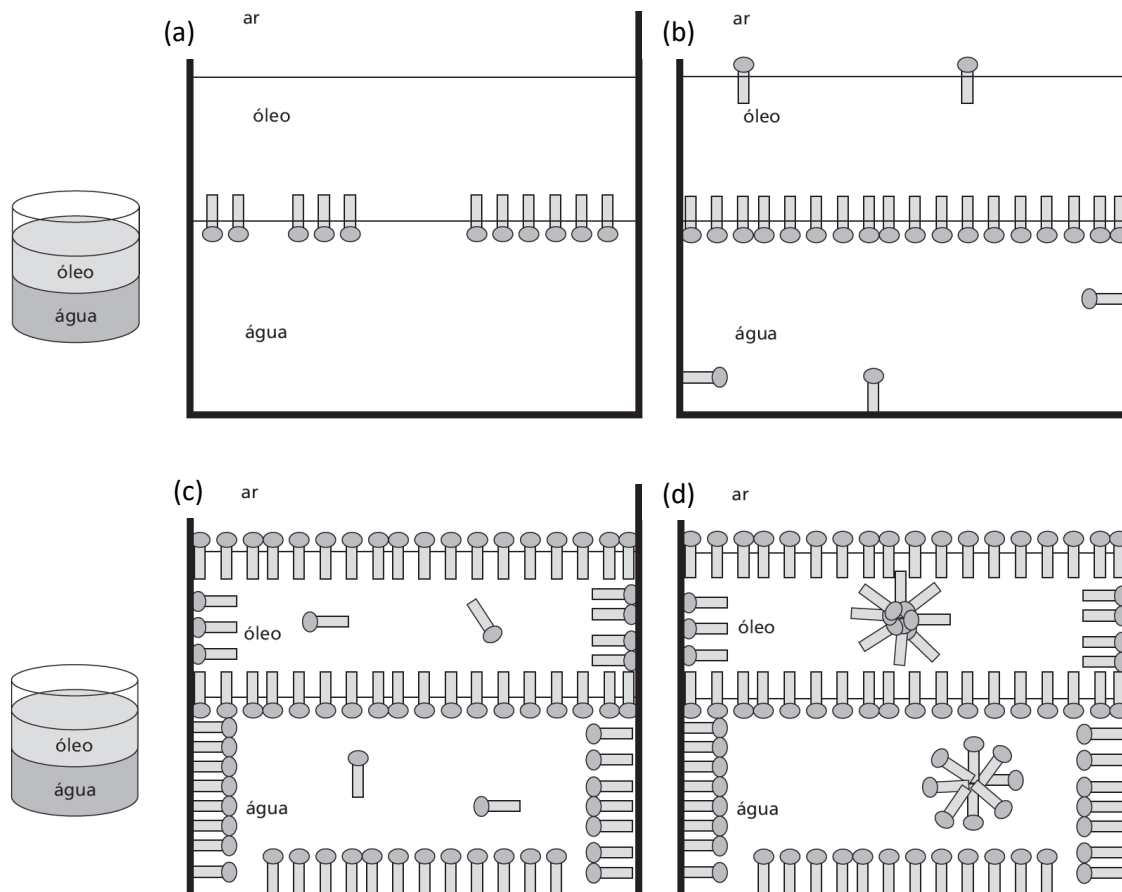
A tensão superficial é uma propriedade da água causada pela forte atração que cada molécula sofre pelas moléculas vizinhas. Quando observamos essas forças de atração no interior do líquido, cada molécula de água é atraída por um número de moléculas distribuídas ao seu redor, de modo que a resultante das forças é nula. Porém, na superfície não há moléculas acima, de modo que a resultante é uma força que puxa as moléculas de água para o centro, aumentando sua coesão nessa área (Figura 2a).

Essa coesão é responsável pela tensão superficial. Quando um tensoativo é solubilizado na água suas moléculas tendem a migrar e se organizar na superfície, causando uma separação parcial entre as moléculas de água (Figura 2b). Nesse estado as moléculas de água na superfície ficam separadas por outras pelas quais não tem tanta afinidade. Essa separação reduz a força de coesão e conseqüentemente a tensão superficial.

A quantidade de moléculas que podem ocupar a interface água-ar da solução é o principal fator que limita a redução de tensão superficial. Essa quantidade de moléculas é determinada pela estrutura do tensoativo e pelas suas cargas, e varia para cada tipo de surfactante. Quando o limite é atingido não haverá mais alteração no valor da tensão superficial mesmo que se aumente a concentração de surfactante na solução, pois não há mais espaço para moléculas de surfactante se estabilizarem. A partir desse ponto o espaço interfacial está saturado e as moléculas de surfactante passam a ocupar o meio da solução. Devido sua característica anfifílica as moléculas tendem a se organizar em estruturas mais estáveis chamadas micelas (Figura 3d). Surfactantes organizados em micelas são menos estáveis do que surfactantes nas interfaces, mas são mais estáveis do que surfactantes monoméricos livres (DALVIN, 2012).

Assim, a concentração de surfactante na qual o valor mínimo de tensão superficial é atingido é chamada concentração micelar crítica (CMC), pois também é a concentração na qual micelas se formam espontaneamente. Essa concentração é um parâmetro único para cada tensoativo. Em concentrações abaixo da CMC surfactantes estão em sua forma monomérica (Figura 3a, 3b, 3c), enquanto para valores acima eles se organizam em micelas (Figura 3d). Acima dessa concentração a tensão interfacial permanece essencialmente constante, pois apenas a forma monomérica contribui para a redução de tensão (Upton, 2017; Rosen, 2004).

Figura 3: Esquema mostrando a formação de micelas em meio aquoso. O surfactante dissolvido se estabiliza preferencialmente na interface óleo-água (a). Aumentando-se a concentração de surfactante até o ponto de saturação da interface óleo-água as moléculas começam a se estabilizar nas superfícies líquido-ar e líquido-sólido (b). Aumentando-se novamente a concentração de surfactante até a saturação de todas as superfícies disponíveis (c) as moléculas no meio se estabilizam na forma de micelas (d).



Fonte: (DALTIM, 2012)

A existência de micelas no meio pode ainda contribuir para a formação de emulsões, misturando dois líquidos normalmente imiscíveis. Quando tentamos forçar a mistura de óleo em água, por exemplo, através de agitação, algumas gotículas de óleo podem se dispersar na fase aquosa por algum tempo. Mas devido às suas características hidrofóbicas as gotículas de óleo tendem a se coalescer em porções cada vez maiores e serem expulsas da fase aquosa retornando ao estado de duas fases distintas. Mas quando a mesma agitação ocorre na presença de um tensoativo as gotículas de óleo dispersas em água formam novas superfícies água-óleo e a tendência do tensoativo que estava organizado em micelas é migrar para essas novas interfaces, buscando um estado de maior estabilidade. Esse efeito ocorre rapidamente caso haja uma boa quantidade de

micelas. Isso significa que só haverá formação de emulsão caso o surfactante esteja acima da CMC (DALTIM, 2012).

## **2.2 Bactérias produtoras de Biosurfactantes**

Com o avanço da biotecnologia a utilização de compostos de origem biológica em substituição aos químicos tradicionais tem aumentado em todo o mundo. Biosurfactantes são tensoativos de origem biológica, que podem ser produzidos por diversos seres vivos, mas principalmente microrganismos, e que apresentam uma série de vantagens quando comparados com surfactantes sintéticos. Enquanto surfactantes químicos são classificados normalmente pelo seu padrão de dissociação em água os biosurfactantes podem ser classificados de acordo com seu modo de ação, peso molecular, propriedades físico-químicas, e principalmente de acordo com sua origem biológica e composição química (DALTIM, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002). A tabela 1 relaciona os microrganismos envolvidos na produção das principais classes, o que incluem lipopeptídeos, glicolipídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, surfactantes poliméricos e particulados.

Para os microrganismos os biosurfactantes fornecem uma série de vantagens na competição por recursos (NITSCHKE; PASTORE, 2002):

- Podem atuar na emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e outros compostos insolúveis, facilitando o crescimento nesses substratos;
- Em associação com a parede podem facilitar o transporte de hidrocarbonetos para dentro da célula;
- Atuam na aderência/liberação da célula em superfícies, facilitando a colonização de novos nichos;
- Vários biosurfactantes, principalmente da classe dos glicolípídios e lipopeptídeos apresentam atividade antibiótica.

Devido a sua natureza biológica os biosurfactantes apresentam uma série de vantagens ecológicas quando comparados aos surfactantes de origem petroquímica. Seu baixo impacto ao meio ambiente se deve principalmente pela sua baixa toxicidade para outros seres vivos além de sua elevada biodegradabilidade, evitando seu acúmulo no meio ambiente, o que aumenta seu nível de interesse em um mundo cada vez mais preocupado com questões ambientais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

TABELA 1: Classes de biossurfactantes e principais microrganismos envolvidos

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
<b>Glicolípidios</b>	
Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i>
Trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
<b>Lipopeptídeos e Lipoproteínas</b>	
Peptídeo-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosa	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
<b>Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios</b>	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídios	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
<b>Surfactantes poliméricos</b>	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
<b>Surfactantes particulados</b>	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	<i>Varias bactérias</i>

Fonte: (Nitsche & Pastore, 2012).

Do ponto de vista econômico, também apresentam alta eficiência e eficácia. Os biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos, são capazes de alcançar resultados melhores em concentrações menores. Outras vantagens são sua efetividade

mesmo em altas temperaturas, alta salinidade e extremos de pH. Apesar de apresentarem as mesmas características principais dos surfactantes, os biossurfactantes tem um processo de produção relativamente simples e potencialmente mais barato. Os principais problemas de custos estão relacionados à dificuldade de recuperação do produto, baixa produtividade e uso de substratos caros (NITSCHKE&PASTORE, 2002, REIS, 2013).

As pesquisas se concentram em buscar formas de reduzir os custos na produção de biossurfactantes, tanto melhorando a produção por microrganismos já conhecidos como procurando novas fontes. Bactérias do gênero *Bacillus sp.* são conhecidas por serem produtoras de biossurfactantes do tipo lipopeptídeo, que são os melhores biossurfactantes conhecidos. A surfactina, por exemplo, um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*, é um dos principais biossurfactantes utilizados comercialmente e um dos mais potentes já relatado, sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água para 27mN/m e apresentar uma das mais baixas CMCs, principalmente quando comparado a surfactantes sintéticos (Tabela 2) (Barros, 2007).

TABELA 2: Comparação entre os valores de CMC para alguns dos principais surfactantes comerciais (de acordo com o fabricante)

Surfactante	CMC (mg/L)
CHAPS <sup>[1]</sup>	4920
SDS <sup>[1]</sup>	1728
NP-40® <sup>[1]</sup>	179
Triton X-100® <sup>[2]</sup>	130
Brij® - 35 <sup>[1]</sup>	110
Tween 20® <sup>[2]</sup>	60
Surfactina (>98% HPLC) <sup>[2]</sup>	7,8 – 20,7

Fonte: Dados coletados no site dos fabricantes: [1] <https://www.thermofisher.com>; [2] <https://www.sigmaaldrich.com>.

### 2.3 A Indústria do Petróleo

O petróleo tem sido explorado pela humanidade desde a antiguidade. Os registros históricos já mostravam sua utilização por povos do Oriente Médio, por volta de 4000 AEC, para os mais diversos fins. Mas foi apenas com a segunda Revolução Industrial, no início do século XX, que sua demanda o transformou numa das principais *commodities* da economia mundial. A indústria de petróleo e gás se tornou a principal

fornecedora de energia do mundo, principalmente com o surgimento dos motores de combustão interna e especialmente em automotores. Hoje, embora o petróleo constitua uma importante matéria prima da indústria petroquímica sua importância primordial ainda é como fonte de energia, da qual depende a economia mundial (Enciclopédia Britânica OnLine, 2018).

Devido a sua importância econômica, e a despeito de suas complicações ambientais, o petróleo continua sendo um dos principais motores da indústria mundial, assim como a principal *commodity* de muitos países. Apesar das oscilações derivadas de fatores de mercado e do desenvolvimento de novas tecnologias energéticas, o petróleo é um recurso que não mostra sinais de desaceleração em sua produção. Por ser um recurso não renovável, várias previsões tem sido feitas no decorrer dos anos sobre o fim da exploração do petróleo. Por isso as pesquisas nesta área estão entre as que mais movimentam dinheiro ao redor do mundo.

A indústria do petróleo representa um dos principais mercados para os biossurfactantes (SILVA et al., 2014). As suas características tensoativas permitem sua aplicação em praticamente todas as áreas da cadeia produtiva. Os campos incluem produção de óleos lubrificantes, a biorremediação e dispersão em derramamentos de óleo, mobilização de resíduos em tanques de estocagem e recuperação avançada de petróleo em poços maduros (NITSCHKE&PASTORE, 2002; BARROS, 2007; SILVA et al, 2014).

### **2.3.1 *Microbial Enhanced Oil Recovery - MEOR***

Devido a importância da produção, as empresas petrolíferas direcionam seus esforços para aperfeiçoar o fator de recuperação (RF) dos seus campos já perfurados, para mantê-los em níveis economicamente viáveis. A maioria das bacias sedimentares com potencial para produção de petróleo já são conhecidas, e a busca e perfuração em novos campos tendem a ser reduzidas, devido a complicações geopolíticas e ambientais (MUGGERIDE, 2014).

Após a perfuração de um poço a energia potencial acumulada pela pressão é responsável pelo fluxo inicial e pela extração de óleo em uma fase chamada recuperação primária. À medida que a pressão diminui dá-se início a recuperação secundária, onde há necessidade de injeção de água ou gases para manter essa pressão e fazer com que o

óleo continue fluindo. Em média, 35% do volume original do poço podem ser recuperados por essas técnicas. Contudo, com a redução da pressão o fluxo de óleo diminui até se tornar economicamente inviável, principalmente na medida em que grandes volumes de água, proveniente da recuperação secundária, são coproduzidos com o óleo. Em alguns poços mais antigos a água produzida chega a superar o volume de óleo recuperado (Miller, 2013).

Para remediar essa queda de produtividade e aumentar a vida útil dos poços, várias técnicas são empregadas em uma terceira fase, chamada recuperação terciária, que visa aumentar a mobilidade do óleo preso no poço por meio de processos físicos e químicos. Entre essas técnicas, a chamada MEOR (do inglês *Microbial Enhanced Oil Recovery*) utiliza microrganismos e seus metabólitos para remover a fração residual de óleo em poços maduros. Vários produtos microbianos podem ser utilizados nessa fase, como surfactantes, polímeros, solventes, ácidos, gases ou mesmo a própria biomassa bacteriana, todos agindo em diferentes processos (Sem, 2008, Suthar, 2008).

A utilização de surfactantes representa um dos mais promissores avanços na recuperação de óleo residual e vários estudos apontam que os biosurfactantes representam um dos principais agentes em MEOR (SEM, 2008). Sua utilização pode se dar tanto pela produção *in situ*, quanto pela produção em biorreatores e posterior aplicação. No primeiro caso o processo envolve a estimulação de bactérias nativas pela injeção de nutrientes específicos para direcionar o desenvolvimento de microrganismos desejados ou a injeção de consórcios pré-selecionados. No segundo caso, metabólitos, como biosurfactantes, são produzidos em biorreatores e injetados posteriormente no poço. Em ambas as aplicações o objetivo é modificar as interações óleo/rocha de modo a aumentar a mobilidade das frações de óleo remanescentes (SEM, 2008).



### **3 Objetivos**

Esse estudo teve por objetivo avaliar a produção de biossurfactantes por uma estirpe de *Bacillus paralicheniformis* cultivada em batelada para determinar seu potencial para aplicação em MEOR.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- Avaliar a atividade de dispersão de óleo;
- Medir a atividade emulsificante;
- Verificar a redução da tensão superficial;
- Avaliar a influência da salinidade e temperatura na atividade tensoativa;
- Determinar a concentração micelar crítica (CMC).

## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 Microorganismos**

#### **4.1.1 Seleção dos microrganismos**

Quatro cepas de bacilos foram selecionadas da coleção do LEMBIOTECH por terem se mostrado boas produtoras de biossurfactantes em trabalhos anteriores (Lima, 2013): TIM04 e TIM11, isoladas de sedimentos do manguezal em Timonha – CE, e ICA58 e ICA62, isoladas de sedimentos de manguezal em Icapuí – CE. As bactérias estavam estocadas a -20 °C e foram reativadas com crescimento em caldo TGE (5,0 g de triptona, 1,0 g de glicose, 2,5 g de extrato de levedura por litro de meio) a 37°C e agitação de 150 rpm por 24h. As bactérias que se mostraram viáveis foram isoladas pela técnica de semeadura por esgotamento em placas contendo ATGE (15,0 g de Ágar, 5,0 g de triptona, 1,0 g de glicose, 2,5 g de extrato de levedura por litro de meio). As colônias isoladas foram caracterizadas e utilizadas para preparo de lâminas e posterior coloração de Gram. Após o isolamento, as bactérias utilizadas nesse trabalho foram cultivadas e estocadas em tubos contendo meio ATGE inclinado para manuseio.

#### **4.1.2 Produção de biossurfactante**

Para a produção de biossurfactante, as bactérias foram cultivadas isoladamente em meio mineral caldo surfactina (CS) (MORÁN et al., 2000, com modificações). O meio CS foi composto por: 10,0 g de glicose; 5,0 g de extrato de levedura; 1,0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6,0 g de NaHPO<sub>4</sub>; 2,7 g de NaCl e 0,6 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O por litro de água destilada pH 7,0. O meio foi esterilizado por autoclavação de 110°C por 15 min. A solução de micronutrientes composta por: 10,95 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5,0 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,54 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,39 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,25 g de Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e 0,17 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O por litro de água, foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm.

As colônias isoladas foram cultivadas em meio CS por 12 h e a cultura obtida teve sua absorbância ajustada para 0,150±0,005 a 600 nm de forma a constituir o inóculo de 10% (v/v). Esse inóculo ajustado foi então transferido para um volume maior de caldo surfactina (160 mL) em frasco Erlenmeyer contendo 0,1% (v/v) de solução de micronutrientes (0,16 mL) onde as culturas permaneceram sob agitação contínua de 150 rpm, a 30 °C por 48 h. O crescimento foi feito em triplicata para cada bactéria. Após as

48h de crescimento, a cultura foi centrifugada a  $10.000 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$ , por 15 min para a obtenção do sobrenadante livre de células (SLC). Apenas o sobrenadante foi utilizado para as atividades a seguir.

#### **4.1.3 Teste de dispersão de óleo**

A presença de biossurfactante foi determinada pelo teste da dispersão do óleo, realizado segundo Morikawa, Hirata e Imanaka (2000), com adaptações. Os testes foram realizados nas quatro cepas selecionadas. O ensaio foi realizado em placas de Petri de diâmetro 100 x 20 mm, onde foram adicionados 50 mL de água do mar artificial (15,153 g de NaCl, 2,18 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,6 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,652 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0,414 g de KCl, 0,116 g de  $\text{NaHCO}_3$  por litro de água destilada) acrescidos de uma camada superficial de 0,25 g de petróleo. Em seguida foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante livre de células e o diâmetro dos halos foi medido. O controle negativo do ensaio foi realizado com meio estéril e o petróleo utilizado foi obtido da fazenda Belém, situada nos municípios de Aracatí e Icapuí. A presença e eficiência do biossurfactante no sobrenadante foram dimensionadas pelo tamanho do halo formado.

#### **4.1.4 Teste de atividade emulsificante (E24)**

A determinação da capacidade de formar emulsão foi feita utilizando a metodologia proposta por Iqbal, Khalid e Malik (1995). O teste foi feito utilizando tubos de ensaio rosqueados contendo 2 mL de querosene (JACARÉ ESSO, BR) e igual volume de sobrenadante livre de células. Os tubos foram então agitados com vórtex por 2 min e deixados em repouso por 24 h a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ). A medida chamada percentual de emulsificação (E24) foi calculada a partir da divisão aritmética entre a altura da camada emulsificada pela altura total da coluna e multiplicada por 100.

$$E24 = \frac{\text{Camada emulsificada}}{\text{Altura total}} \times 100$$

#### **4.1.5 Identificação molecular da cepa ICA58**

O DNA genômico foi extraído de uma cultura pura de ICA58 utilizando o protocolo Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), (Warner, 1996). Ao final da extração o DNA obtido foi eluído em 30  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA (10 mM:1 mM, pH 8.0) com

20 µg/µL de RNase. O rendimento obtido foi estimado pela medida de absorvância no comprimento de onda de 260 nm em um espectrofotômetro do tipo Nanodrop (ND 1000 Nanodrop, USA). O gene que codifica para o rDNA 16S foi amplificado por reação de cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores bacterianos universais 27F (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG -3') e 1525R (5'- AAGGAGGTGWTCCARCC -3') (Marchesi et al., 1998). A reação de PCR foi preparada para um volume de 25 µL contendo 100 ng de DNA genômico como *template*, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase (GoTaq, Promega, USA). A reação de PCR foi conduzida em um termociclador programado para uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min.

Os genes constitutivos que codificam para subunidade β da DNA girase (*gyrB*) e para RNA polimerase subunidade β (*rpoB*) foram amplificados utilizando os iniciadores UP1-F (5'- GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTT YGA-3 ') e UP2-R (5'- AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNGCR TCNGTCAT-3') para *gyrB*; e rpoB-F (5'-AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC-3') e rpoB-R (5'-AAGAACCGTAACCGGCAACTT-3') para *rpoB* (Ahaotu et al., 2013). A PCR foi preparada para um volume final de 50 µL contendo 50 ng de DNA genômico, Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador e 1,0 unidade de Taq DNA Polimerase (GoTaq, Promega, USA). A reação para o gene *gyrB* foi conduzida em um termociclador programado para uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 66 °C por 1 min, 72 °C por 2 min e um alongamento final a 72 °C por 7 min. Para o gene *rpoB* o programa utilizado foi desnaturação inicial a 94 °C por 2 min seguido 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 51 °C por 45 s, 68 °C por 50 s e um alongamento final a 68 °C por 90 min. Todos os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com o marcador de DNA SYBR<sup>TM</sup> safe (Invitrogen, USA) e purificado usando o Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A concentração dos produtos purificados foi determinada medindo-se a absorvância a 260 nm em espectrofotometro Nanodrop<sup>®</sup> ND-1000. O sequenciamento do DNA foi feito pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coreia). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando os iniciadores 27F, 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'), 518F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3) e 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA

TCC-3') para o rRNA 16S; UP1-F, UP2-R para o *gyrB*; e *rpoB*-F, *rpoB*-R para o gene *rpoB* usando o kit ABI PRISM BigDye™ terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, USA) seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante. Os produtos foram purificados por precipitação em etanol com solubilização em água destilada e aplicados no sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems, USA). As sequências parciais foram utilizadas para gerar uma sequência consenso no programa CodonCode Aligner 5.1.1. Esta última, por sua vez, foi analisada e comparada com outras depositadas no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search* – BLAST (Altschul et al., 1997). O alinhamento múltiplo foi feito utilizando o programa ClustalW (Thompson et al., 1994).

Para construção da árvore filogenética, as múltiplas sequências foram alinhadas usando o algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994), para cada gene separadamente e posteriormente trimadas e concatenadas. A análise filogenética foi realizada utilizando o programa Geneious® 9.1.5. (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). A árvore filogenética foi construída utilizando inferências pelo método de Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) com valores de bootstrap baseados em 1000 replicatas e pelo método Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) de estimativa de pareamento evolutivo.

## **4.2 Monitoramento da produção de biossurfactante**

### **4.2.1 Curva de crescimento**

A bactéria foi cultivada em caldo surfactina para um volume final de 600 mL durante 50 h de crescimento. Nesse período foram retiradas alíquotas a cada 2 h para realização de medidas de absorvância e pH. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS 6™ (Madison, WI, USA) sob um comprimento de onda de 600 nm. O pH foi medido em um potenciômetro Digimed DM-22 (São Paulo, SP, Brasil). Os dados foram plotados em um gráfico cartesiano para visualização do seu comportamento no decorrer do tempo.

### **4.2.2 Tensão superficial durante o crescimento**

As medidas de tensão superficial foram realizadas em 10 pontos distribuídos ao longo da curva de crescimento. Para cada um deles uma alíquota de 20 mL foi retirada e centrifugada a 10.000 x g, a 4°C, por 15 min para a obtenção do sobrenadante livre de

células (SLC). Um volume de 15 mL de SLC foi reservado para medição de tensão superficial. A determinação da tensão foi realizada utilizando o método do anel de Du Noüy em um tensiômetro Krüss, modelo K6 (Krüss k6 GmgH, Hamburgo, Alemanha) equipado com anel de platina de 1,9 cm. O equipamento foi previamente calibrado com água deionizada, para um valor de tensão superficial de 72 mN/m. O controle negativo foi feito com caldo surfactina estéril. Todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente de 25°C.

#### **4.2.3 Capacidade emulsificante durante o crescimento**

A avaliação da capacidade emulsificante no decorrer do crescimento foi realizada em três períodos de tempo: de 5 a 13 h; de 24 a 32 h e após 50 h de crescimento. Para cada amostra a determinação da capacidade de formar emulsão foi feita utilizando a metodologia proposta por Iqbal, Khalid e Malik (1995) já descrita anteriormente.

#### **4.3 Teste de resistência a salinidade**

A bactéria foi cultivada em meio CS por 12 h e a cultura obtida teve sua absorbância ajustada para  $0,150 \pm 0,005$  a 600 nm de forma a constituir o inóculo de 10% (v/v). Esse inóculo padronizado foi dividido em cinco frascos Erlenmeyers contendo caldo surfactina, acrescidos de NaCl em concentrações de 2,7 g/L, 25 g/L, 40 g/L, 50 g/L e 100 g/L. Após 48 h de crescimento a cultura foi centrifugada e o sobrenadante livre de células teve sua tensão superficial medida em tensiômetro.

Em um segundo teste o sobrenadante livre de células foi adicionado de NaCl nas concentrações de 50 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 250 g/L e 300 g/L e a tensão superficial foi medida.

#### **4.4 Teste de termoestabilidade do biossurfactante**

A bactéria foi cultivada em meio CS por 12 h e a cultura obtida teve sua absorbância ajustada para  $0,150 \pm 0,005$  a 600 nm de forma a constituir o inóculo de 10% (v/v). O inóculo padronizado foi transferido para um volume maior de meio CS e após um cultivo de 48 h o sobrenadante livre de células foi submetido a uma temperatura de 121°C por 15 minutos, em autoclave, para avaliar sua resistência à temperatura. Após o aquecimento foram realizadas novas medidas de redução de tensão e E24. Os resultados

foram comparados com o sobrenadante não autoclavado. O meio CS estéril foi utilizado como controle.

#### **4.4 Teste de capacidade desemulsificante**

Para avaliação da capacidade desemulsificante foi preparado bioemulsões (2 mL de sobrenadante + 2mL de querosene) e emulsões (2 mL solução 0,01% de tween20 + 2 ml querosene). As emulsões formadas foram deixadas em repouso por 24 horas para constatar sua estabilidade. Nas emulsões estáveis foram aplicadas 0,1 mL, 0,3 mL e 0,5 mL de sobrenadante livre de células da ICA 58 autoclavado e não autoclavado em triplicata. Após a aplicação as emulsões foram deixadas em repouso por 24 horas para observar sua capacidade de desfazer as emulsões.

#### **4.6 Determinação da Concentração Micelar Crítica**

##### **4.6.1 Extração do biosurfactante por precipitação ácida**

O sobrenadante livre de células e em temperatura ambiente foi acidificado até pH 2,0 por adição de HCl concentrado e deixado em repouso por 24h a 4 °C. Após esse período, o precipitado foi separado por centrifugação a 15.000 x g, por 20 min a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuscitado em água acidificada pH 2,0 e novamente centrifugado sob as mesmas condições. Após duas repetições o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuscitado em água deionizada e o pH final foi ajustado para 7,0 com ajuda de NaOH diluído. A solução final contendo o lipopeptídeo foi congelada e liofilizada para obtenção do biosurfactante em pó.

##### **4.6.2 Determinação da CMC**

Para determinação da concentração micelar crítica (CMC), foi tomada uma massa de 12,5 mg de biosurfactante em pó que foi diluído em água deionizada, transferida para um balão volumétrico e ajustada para um volume de 25 mL, finalizando uma solução de concentração de 500 mg/L. A tensão superficial dessa solução mãe foi medida e ela foi sucessivamente diluída para as concentrações de 300, 250, 200 150 100, 80, 60, 50, 40, 36, 32, 28, 24, 20, 16, 12, 8, 4 mg/L. A plotagem dos valores de tensão superficial para cada concentração permitiu a visualização da faixa em que ocorre a CMC.

## 5 Resultados e Discussão

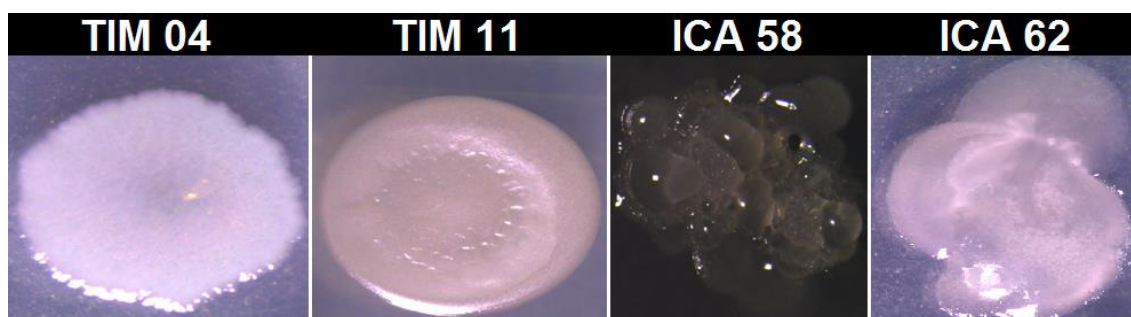
### 5.1 Seleção dos microrganismos

O critério de seleção utilizado nesse trabalho considerou os microrganismos cujos biossurfactantes produzidos apresentassem especificamente duas características principais: boa redução de tensão superficial e atividade emulsificante nula. Embora em algumas situações específicas a formação de emulsões também seja utilizada como um elemento para melhorar transporte de óleo em tubulações, desfazer essas emulsões representa um custo adicional para a produção (SEM, 2008; Li et al., 2012).

Neste sentido, foram selecionadas inicialmente quatro cepas de *Bacillus*, retiradas da coleção do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia – UFC (LEMBIOTECH – UFC): TIM04, TIM11, ICA58 e ICA62. Essas bactérias foram obtidas a partir de sedimentos dos manguezais de Timonha – CE e Icapuí – CE. Testes anteriores já haviam indicado que essas cepas poderiam atender as características desejadas (Lima 2013). Os resultados agora precisavam ser confirmados.

As bactérias escolhidas estavam armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , precisando serem reativadas. Para isso as cepas foram cultivadas em caldo TGE e após 24 horas de crescimento a  $37^{\circ}\text{C}$  sob 150 rpm de agitação mostraram crescimento satisfatório, constatado visualmente pela turbidez do caldo. Após a reativação, as bactérias foram purificadas através do esgotamento em placa contendo meio ATGE e incubadas por 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . As quatro bactérias apresentaram colônias de dimensões semelhantes, variando ente 0,3 cm e 0,5 cm, mas morfologicamente bem distintas (Figura 4). As colônias de ICA 58 visualmente chamaram a atenção devido a sua aparência mucoide muito evidente.

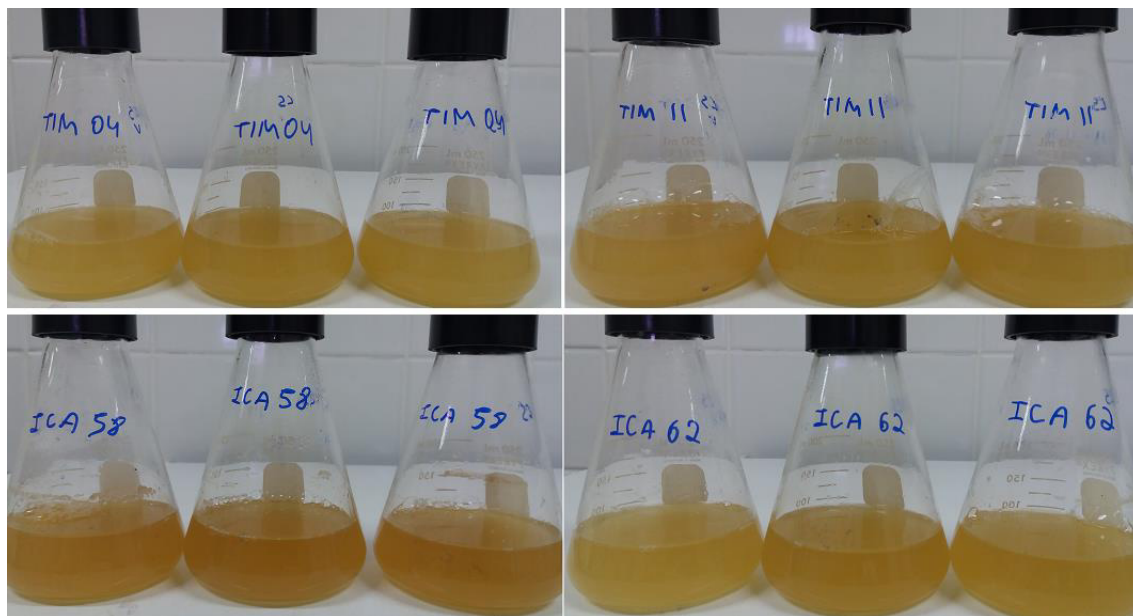
Figura 4: Aspecto das colônias em meio ATGE após 24 horas de crescimento



Fonte: elaborado pelo autor.



Figura 5: Triplicatas de cada uma das culturas após 48 horas de crescimento



Fonte: elaborado pelo autor.

A coloração de Gram feita a partir das colônias isoladas em ATGE confirmou que todas são bastonetes Gram positivos com dimensões de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  a 0,4  $\mu\text{m}$ . Não foi visualizada nenhuma formação de arranjos característicos nem esporos sob essas condições.

Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzirem biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos que podem tanto permanecer ligados à parede celular como serem liberados para o meio (SAIMMAI et al., 2012). Após o crescimento de 48 horas, as culturas foram submetidas à centrifugação de 10.000 x g por 15 min, para separação entre sobrenadante e células, e posterior avaliação das propriedades tensoativas no sobrenadante (Figura 5).

O primeiro teste realizado com os sobrenadantes foi o de dispersão de óleo. A contaminação de ambientes marinhos por hidrocarbonetos provenientes de acidentes na indústria petrolífera é um grave problema em todo o mundo e a capacidade dispersante é uma das mais importantes aplicações de biossurfactantes, visto que contaminações por petroquímicos provenientes de vazamentos podem permanecer no ambiente marinho por anos após o acidente. O teste é uma forma confiável de visualizar a presença biossurfactante. Como a dispersão depende da micelização de partículas de óleo, quanto

mais rápido e quanto maior é o halo formado maior a concentração de biosurfactante no meio (Youssef et al, 2004).

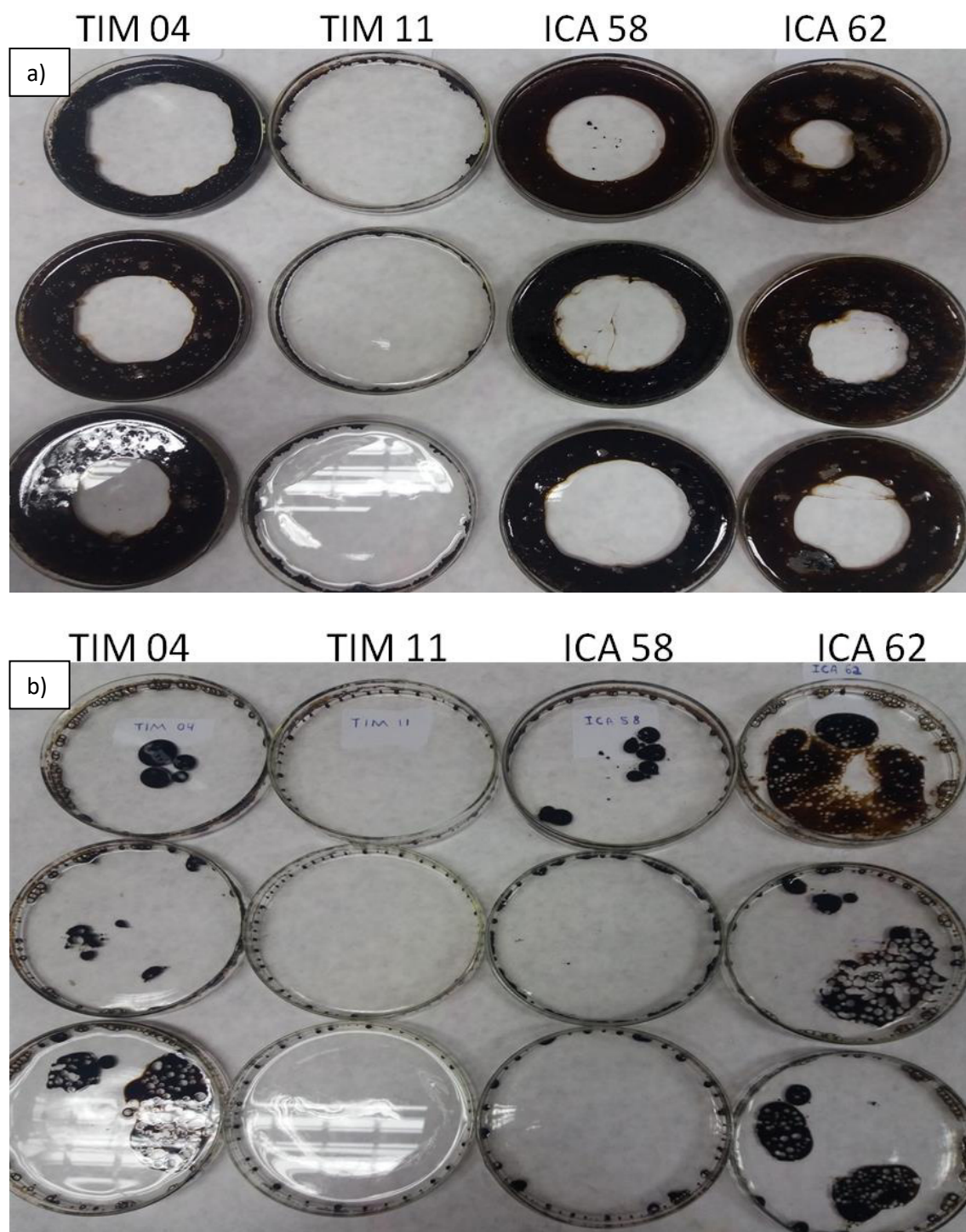
Os experimentos foram realizados com água do mar artificial, que contem uma concentração de 15,153 g de NaCl por litro. Segundo Chadransekar (2006), a salinidade tem influência positiva sobre a atividade dispersante, de modo que em um ambiente marinho, onde a salinidade normalmente é superior a 25g de NaCl por litro a atividade dispersante pode ser mais eficiente. O processo de dispersão depende da micelização das porções de óleo em água. Isso permite que a mancha de óleo seja quebrada em gotículas menores que em seguida são levadas pelas correntes, se depositando no fundo. Gotas de óleos menores se tornam mais disponíveis para microrganismos que naturalmente removem o óleo do ambiente.

A Figura 6 mostra os resultados do ensaio da dispersão de óleo registrados após 5 min e após 24 horas da aplicação de 100 µL de sobrenadante no centro da placa. Os resultados do teste mostraram que todas as quatro cepas liberavam o biosurfactante para o meio. Embora todos tenham apresentado alguma atividade, a cepa TIM11 se destacou por formar um halo total em menos de 5 minutos. A cepa ICA 62 foi a que apresentou resultado menos satisfatório, com menor atividade dispersante, além de um pequeno grau de reversão. A reversão significa que a massa de óleo se desestabilizou para o centro da placa, o que pode indicar certa instabilidade das micelas formadas.

O teste de capacidade emulsificante foi feito para selecionar as cepas cujos biosurfactantes não formavam emulsões. Os resultados apresentados na Figura 7 revelaram que apenas os sobrenadantes das cepas ICA 58 e ICA 62 não formaram emulsões. Na literatura é comum que não se faça uma distinção clara entre os termos biosurfactante e bioemulsificante, e embora bioemulsificantes sejam considerados biosurfactantes, nem todos os biosurfactantes formam emulsões estáveis (Viramontes-Ramos et al, 2010). Normalmente lipopeptídeos de baixo peso molecular são conhecidos por serem bons redutores de tensão sem necessariamente agirem como emulsificantes enquanto moléculas anfipáticas de alto peso molecular, como lipopolissacarídeos e lipoproteínas são conhecidos como bons emulsificantes (Silva, 2014). Isso mostra que as duas atividades não são necessariamente atreladas. Apesar disso também foi considerado que a falta de emulsão de ICA 58 e ICA 62 possa estar

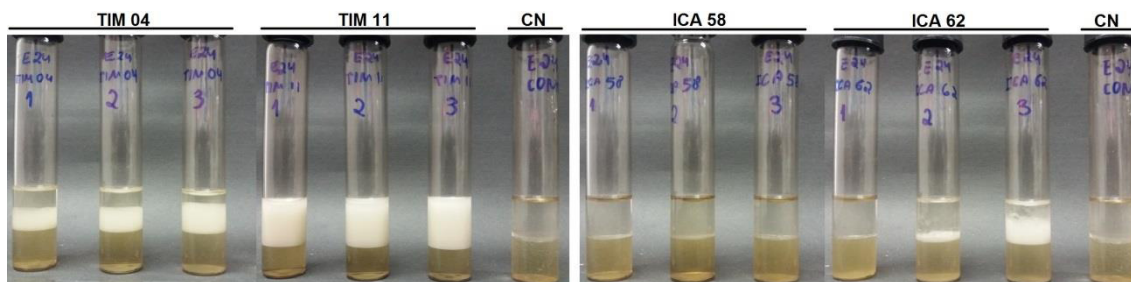
relacionada a produção de algum tipo de molécula que inibisse a produção de emulsões. Nesse caso poderia haver mais uma molécula de interesse.

Figura 6: Dispersão de óleo produzida pela aplicação de 100 uL de sobrenadante livre de células: (a) após 5 minutos; (b) após 24 horas.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 7: Resultado da atividade emulsificante dos sobrenadantes das cepas TIM 04, TIM 11, ICA 58 e ICA 62. O controle negativo foi feito com querosene e meio estéril.



Fonte: elaborada pelo autor.

É importante salientar que as interações que permitem a formação de emulsão também podem variar com o tipo de hidrocarboneto testado. No nosso caso todos os testes de E24 foram realizados com querosene que, segundo o fabricante, é formado por uma mistura de hidrocarbonetos 100% de cadeia alifática. Uma mistura diferente de hidrocarbonetos pode resultar em um resultado diferente.

Em conjunto, os resultados do teste de dispersão de óleo e o E24 motivaram a escolha da bactéria ICA 58 para continuidade dos testes, por apresentar uma boa dispersão de óleo, o que denota uma boa quantidade de biossurfactante, e apresentar zero índice de emulsão, o que a torna uma ótima candidata para reduzir custos com desestabilização de emulsões. Segundo Youssef e colaboradores (2004), o tamanho do halo formado no teste de dispersão é uma medida confiável não apenas da presença, mas também da quantidade de biossurfactante na mistura.

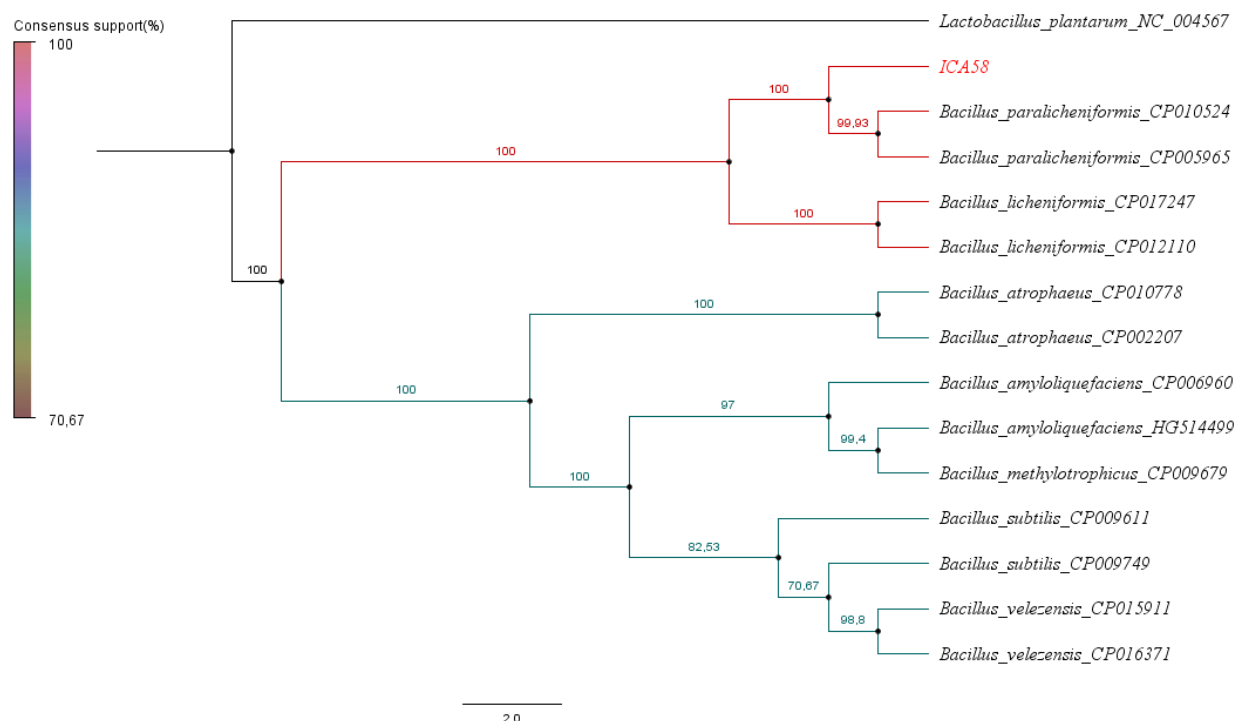
## 5.2 Identificação Molecular

A identificação molecular foi feita baseada na amplificação da sequência para o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico, e identificou a bactéria como pertencente ao gênero *Bacillus*. Posteriormente, foi adicionada à análise mais dois genes, *gyrB* e *rpoB* para uma melhor aproximação. O alinhamento das sequências foi feita utilizando a ferramenta BLAST, comparando com sequências disponíveis no GenBank e revelou que a bactéria ICA 58 apresentava alta similaridade com *B. paralicheniformis* (100%) e *B. licheniformis* (99%). Contudo, após a construção de um alinhamento múltiplo dos genes utilizando o ClustalW, a construção de uma árvore filogenética concatenada, utilizando o modelo de distância Tamura-Nei, indicou que ICA 58 é filogeneticamente mais próxima de *B. paralicheniformis* (Figura 8).

TABELA 3: Identificação molecular da bactéria ICA 58 para os genes 16S RNA, *gyrB* e *rpoB* com base nos dados do GenBank

Cepa	Espécies mais relacionadas no GenBank (Consenso ID)	16S rRNA		<i>gyrB</i>		<i>rpoB</i>	
		ID (%)	Tamanho (pb)	ID (%)	Tamanho (pb)	ID (%)	Tamanho (pb)
ICA 58	<i>B. paralicheniformis</i>	100	1494	99	1054	100	550
	<i>B. licheniformis</i>	99		98		99	

Figura 8: Árvore filogenética concatenada mostrando o agrupamento de ICA 58 com o grupo de *B. paralicheniformis*



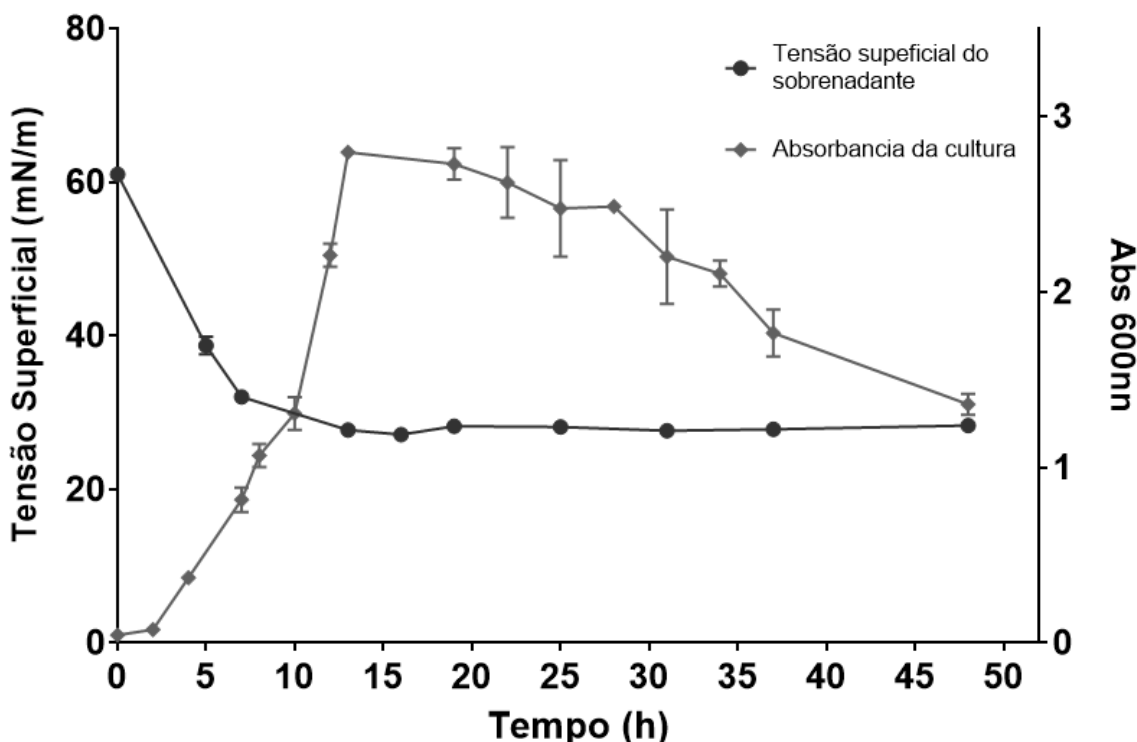
Fonte: Elaborado pelo autor. *L. plantarum* foi utilizado como grupo externo.

Existem pouquíssimos trabalhos envolvendo *Bacillus paralicheniformis*, sendo a primeira descrição realizada por Dunlap e colaboradores em 2015. Nesse trabalho ele utilizou de uma combinação de testes bioquímicos e moleculares para uma diferenciação entre as espécies *B. licheniforme* e *B. paralicheniforme* devido a sua proximidade. Devido aos poucos trabalhos publicados envolvendo a espécie outros experimentos devem ser realizados para total compreensão de suas potencialidades.

### 5.3 Monitoramento da produção de biossurfactante

A utilização de um pré-inóculo, além de servir como padronização para efeitos comparativos, também diminuiu a duração da fase lag, já que a bactéria teve a oportunidade de se adaptar a composição do meio mineral antes de ser inoculada. A curva de crescimento foi construída a partir da média aritmética dos valores de absorbância de duas replicatas de ICA 58 cultivadas. A medida de absorbância é uma grandeza que acompanha a concentração total de células, sem fazer distinção entre organismos viáveis e não viáveis, mas é um modo prático de determinar o comportamento da curva de crescimento, especialmente da fase exponencial. A correlação entre a densidade óptica e a densidade celular varia a partir de um valor crítico, o que pode ser corrigido a partir da diluição das amostras e posterior multiplicação pelo fator de diluição (WIDDEL, 2010). O método permitiu a construção de uma curva eficiente para observar o crescimento da bactéria.

Figura 9: Curvas de crescimento da bactéria ICA 58 e de redução de tensão superficial no sobrenadante no decorrer do tempo.



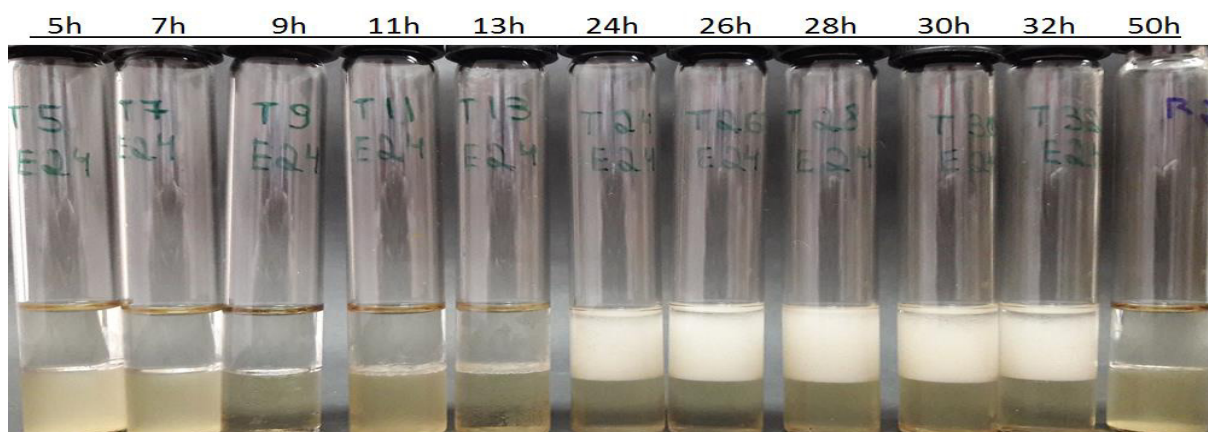
Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 9 mostra a sobreposição das curvas de crescimento e de redução de tensão superficial do sobrenadante no decorrer do tempo. Os resultados revelam que o sobrenadante já apresenta uma considerável redução de tensão a partir de 5 horas de

crescimento, passando de 62 mN/m para 38,7 mN/m. A tensão foi reduzida a seu menor valor, 27,7mN/m, após 12 horas de cultivo permanecendo constante até o fim do experimento.

Ao comparar os gráficos de crescimento e tensão superficial de ICA 58 nota-se que a produção de biossurfactante (monitorada pela redução da tensão) já está presente desde o começo da fase exponencial e atinge o sua redução máxima de tensão antes de atingir a fase estacionária. Isso pode indicar tanto que a produção de biossurfactante é boa, se iniciando logo cedo na fase exponencial ou que o surfactante tem uma baixa CMC, que é atingida logo cedo na fase exponencial. A maioria dos biossurfactantes lipopeptídicos tem sua produção intensificada após a fase exponencial e durante a fase estacionária. Durante a fase exponencial a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e o metabolismo bacteriano está todo voltado para o crescimento. Mas no decorrer da curva submetida a necessidades diferentes ela pode produzir metabólitos diferentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002, Reis 2013). Vale ressaltar que o meio mineral utilizado foi otimizado para estimular a produção de surfactina o que certamente influenciou positivamente a produção de surfactante. (LIMA, 2013; MORAN, 2000).

Figura 10: Variação da atividade emulsificante do sobrenadante da cultura de ICA 58 em três faixas durante a curva de crescimento.



Fonte: Dados da pesquisa.

A Figura 10 mostra os resultados do ensaio de emulsificação (E24). Os testes de E24 foram realizados nas faixas de 5 a 13 horas, durante a fase exponencial, de 24 a 32 horas, na fase estacionária e início do declínio, e na amostra final, após 50 horas de crescimento. Os resultados mostram que durante o período de 5 a 13 horas não existe atividade emulsificante. Nos tempos de 24, 26, 28, 30 e 32 horas de crescimento o

sobrenadante apresentou atividade emulsificante entre 60 e 63%. Já ao final do experimento (50 horas) não foi visualizada atividade emulsificante de ICA 58.

Esses resultados mostram que a redução de tensão e a capacidade emulsificante surgem em momentos diferentes, provavelmente provocadas por tensoativos distintos. Isso sugere que a bactéria possa produzir mais de um biossurfactante em momentos diferentes da curva de crescimento. Além disso, a perda da atividade emulsificante após 50 horas sugere que uma molécula com atividade desemulsificante também pode estar presente.

De acordo com a literatura, já foi reportado que lipopeptídeos em *Bacillus* são sintetizados por vias de múltiplos passos mediadas por várias enzimas não ribossômicas que catalisam a formação de vários metabólitos. Além disso, já foi relatado que a produção de surfactina é regulada por genes dependentes da densidade celular e ocorre principalmente no final da fase exponencial e durante a fase estacionária. A estrutura dos lipopeptídeos pode variar desde a composição e comprimento da cadeia hidrofóbica até o número e disposição dos aminoácidos presentes na porção hidrofílica. Essa diversidade estrutural pode influenciar significativamente tanto suas propriedades físico-químicas quanto biológicas (NDLOVU et al, 2017).

### **5.3 Teste de halotolerância**

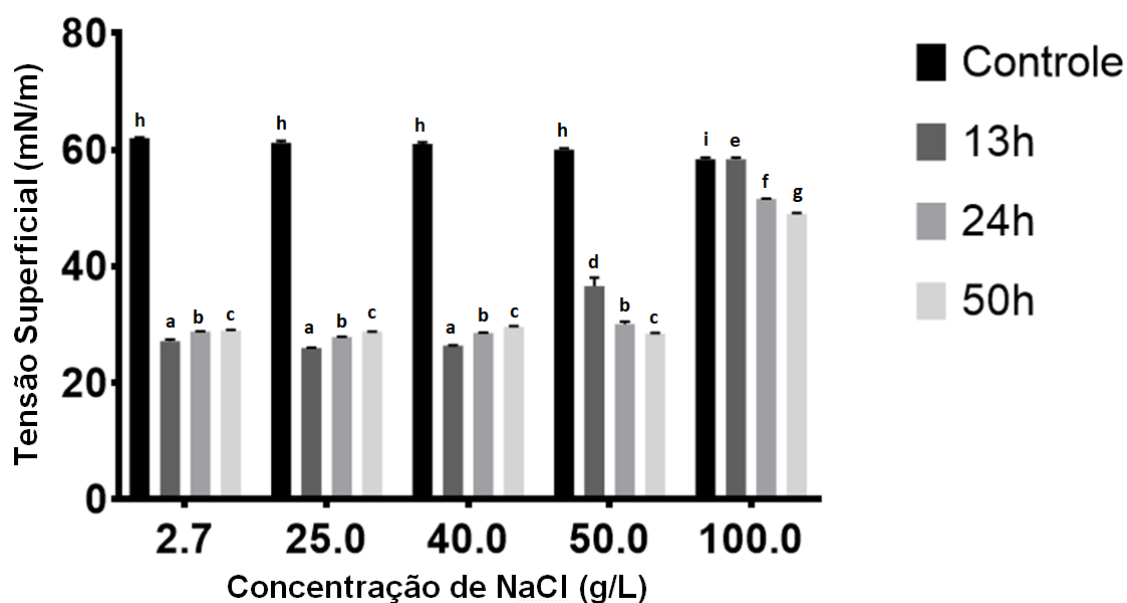
Os testes de crescimento em meio salino foram realizados cultivando ICA 58 em caldos contendo concentrações variáveis de NaCl até uma concentração de 100 g/L de NaCl. A bactéria foi capaz de crescer mesmo a uma concentração de 100 g/L de NaCl, constatado visualmente pela turbidez da cultura. Mas a medida de tensão superficial no sobrenadante mostrou que a produção de biossurfactante no meio foi comprometida em salinidades mais elevadas (Figura 11).

A principal dificuldade encontrada por microrganismos que precisam suportar meios de elevada salinidade é a manutenção da pressão osmótica. De acordo com Hardin e colaboradores (2016), microrganismos, tanto halófilos quanto halotolerantes, adotam estratégias variadas para sobreviver a essas condições. Uma dessas estratégias consiste em manter a concentração de solutos orgânicos compatíveis no citoplasma, para manter o equilíbrio osmótico. Esses solutos compatíveis são normalmente compostos orgânicos de baixo peso molecular como aminoácidos, açúcares ou mesmo moléculas complexas como glicolipídios, fosfolipídios e lipopeptídeos. Uma vez que a



concentração desses compostos é necessária no citoplasma, eles não são jogados para o meio.

Figura 11: Perfil da tensão superficial exercida pelo sobrenadante de ICA 58 em diferentes tempos, quando cultivada em diferentes concentrações crescentes de sal. O controle mostra a tensão superficial do meio estéril nas diferentes salinidades. A comparação entre os valores de tensão medidos para cada tempo não mostrou diferença estatística entre as concentrações de 2,7 g/L, 25 g/L, 40 g/L (Anova).

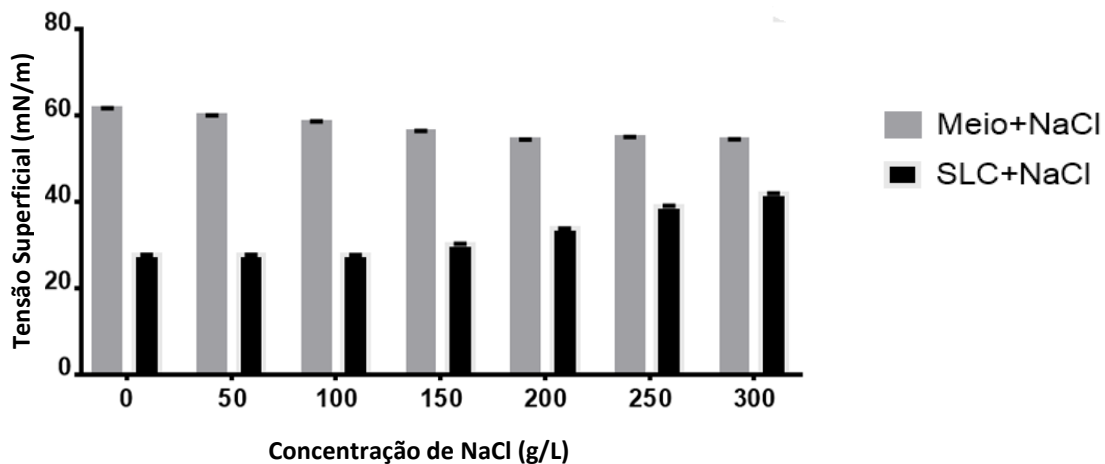


Fonte: dados da pesquisa.

A medida de tensão mostrou que ela foi capaz de produzir biossurfactante sem prejuízo apenas até uma concentração de 50 g/L de NaCl. Isso inviabiliza uma aplicação *in situ* para MEOR, uma vez que a salinidade em poços pode ultrapassar 200 mg/L.

Para verificar o potencial para aplicação em técnicas *ex situ*, onde o sobrenadante é produzido fora do poço e posteriormente aplicado, o sobrenadante livre de células foi adicionado de sal até uma concentração de 300 mg/L e a tensão foi medida. Os resultados mostraram que o surfactante se mantém eficaz até uma salinidade de 200 mg/L de NaCl, sendo capaz de reduzir a tensão superficial para 33,7 mN/m nessa concentração.

Figura 12: Variação da tensão superficial pela adição de NaCl ao sobrenadante livre de células.

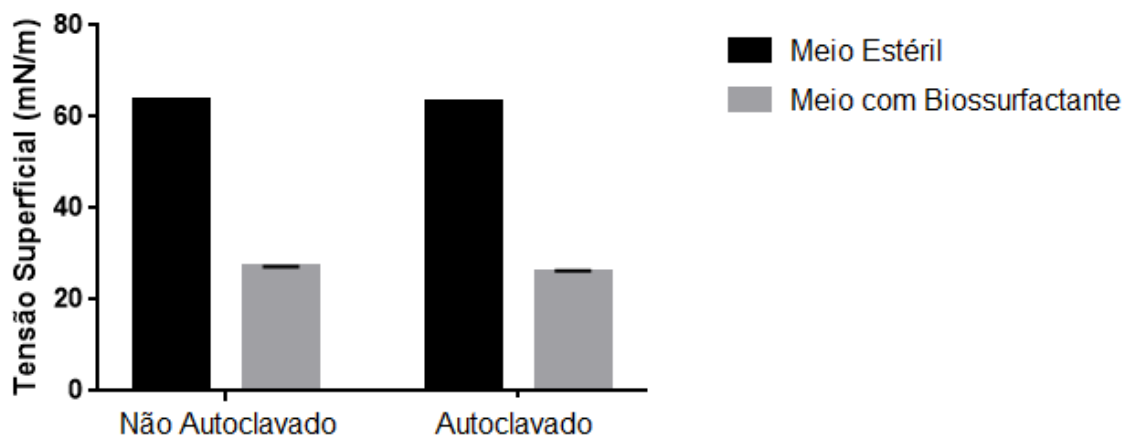


Fonte: dados da pesquisa

### 5.5 Teste de termoestabilidade

Os resultados mostraram que o tratamento térmico por autoclavagem do sobrenadante de ICA 58 não teve nenhuma influência sobre a atividade redutora de tensão superficial (Figura 12). Isso indica que a porção do biossurfactante responsável por essa atividade é termoestável.

Figura 13: Medida de tensão superficial em sobrenadante autoclavado e não autoclavado.

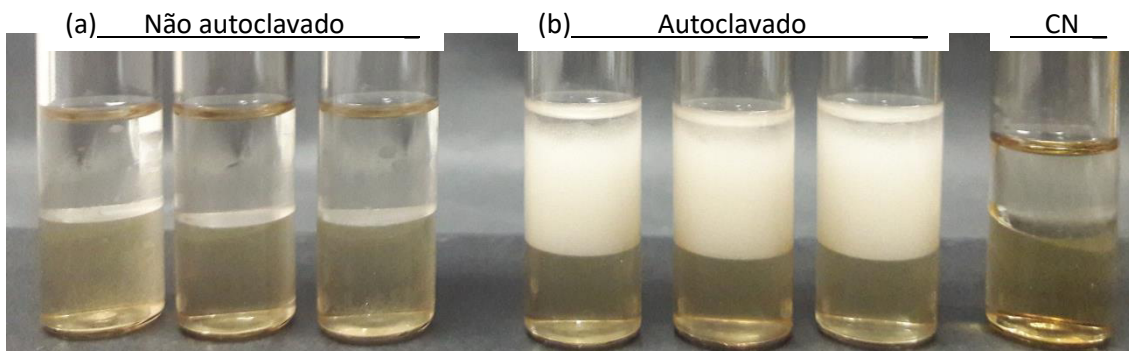


Fonte: dados da pesquisa

Em contrapartida chamou a atenção que a atividade emulsificante, que era ausente, passou a ser em torno de 63% após a autoclavagem (Figura 13). O surgimento dessa atividade após aquecimento reforça a ideia de que a falta de emulsificação

detectada inicialmente no sobrenadante de ICA 58 é resultado da inibição ou remediação produzida por uma molécula desemulsificante.

Figura 14: Capacidade emulsificante do sobrenadante de ICA 58 com querosene. (a) teste feito com o sobrenadante natural; (b) teste feito com o sobrenadante autoclavado. O controle negativo feito com querosene e meio estéril.

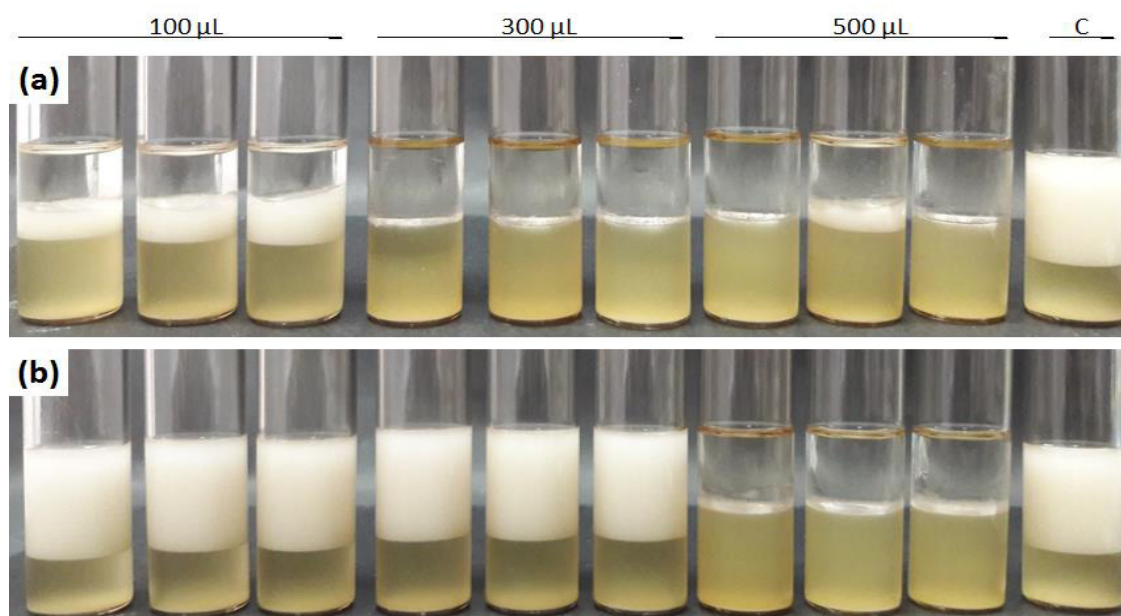


Fonte: dados da pesquisa.

Para comprovar, mais um teste foi realizado, dessa vez aplicando um volume de sobrenadante autoclavado e não autoclavado em uma emulsão estável preparada anteriormente formada entre querosene e uma mistura de biossurfactantes produzidos por outra cepa de bacillus. O objetivo era verificar se ICA 58 era capaz de desfazer especificamente uma bioemulsão, por isso foi utilizada a cepa de *Bacillus sp.* pertencente a coleção do LEMBIOTECH, conhecida por produzir um bioemulsificante de alta estabilidade. O teste também foi feito em uma emulsão formada de querosene e Tween20 para verificar se ele também poderia reverter uma emulsão formada por um surfactante sintético.

Em cada emulsão foi aplicado em triplicata um volume de 100, 300 e 500  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de ICA 58 para observar se ele seria capaz de desfazer a emulsão formada. Os resultados foram registrados após 24 horas mostraram que o sobrenadante não foi efetivo na reversão da emulsão formada por Tween20, mas se mostrou bastante eficaz em reverter a bioemulsão. A Figura 18a mostra que 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante não autoclavado de ICA 58 foi capaz de reduzir a emulsão de 66% para 30%. A emulsão foi completamente desfeita quando aplicados 300 e 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de ICA 58. Na Figura 18b vemos que após autoclavação, a atividade desemulsificante de ICA58 foi reduzida, sendo necessário 500  $\mu\text{L}$  para desfazer a emulsão.

Figura 15: Análise da atividade desemulsificante. (a) resultado da aplicação de biossurfactante não autoclavado após 24 horas; (b) resultado da aplicação de sobrenadante autoclavado após 24 horas.



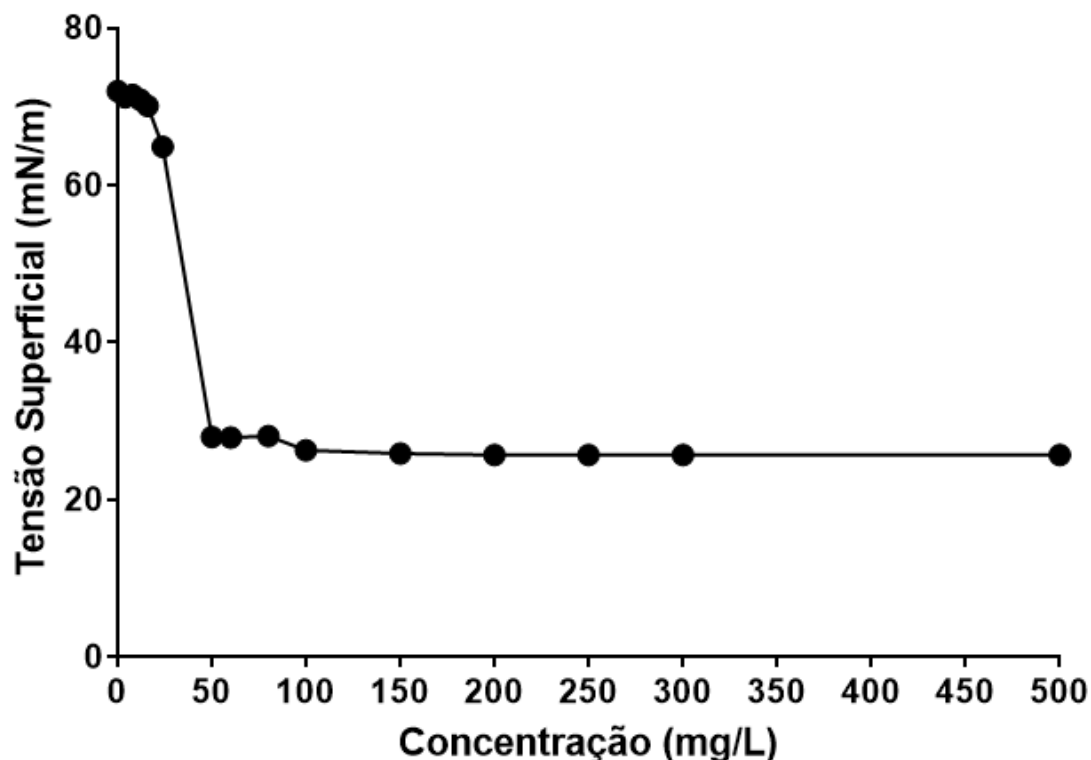
Fonte: dados da pesquisa.

Li e colaboradores (2012) investigaram a atividade de um biodesemulsificante produzido por *Bacillus mojavences* que mantinha sua capacidade desemulsificante até uma temperatura de 75 °C, mas que tinha sua capacidade reduzida, mas não anulada, em temperaturas superiores, de 75 °C a 120 °C. Isso indicaria que o biodesemulsificante era formado por um componente termoestável e outro termolábil. ICA 58 pode produzir um desemulsificante semelhante, que tem sua capacidade reduzida em temperaturas maiores. O potencial de uma molécula capaz de desfazer bioemulsões é enorme na indústria do petróleo, visto que emulsões indesejadas podem acarretar uma série de problemas dentro da cadeia produtiva.

## 5.6 Determinação da CMC

O cálculo da CMC foi feito a partir da tensiometria do biossurfactante precipitado, liofilizado e solubilizado em água ultrapura. As medidas mostraram que este é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m, apresentando-se como um surfactante bastante eficaz. De acordo com Muligan (2005) um tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial da água para 35 mN/m já é considerado um bom surfactante.

Figura 16: Perfil da tensão superficial exercida por concentrações crescentes do biossurfactante de ICA 58



Fonte: dados da pesquisa.

As diluições sucessivas permitiram estimar a CMC do biossurfactante de ICA 58, que ficou em torno em 50 mg/L (Figura 16). Esse valor de CMC está compatível com os valores esperados para biossurfactantes e é superior ao índice de muitos surfactantes sintéticos conforme foi apresentado na Tabela 2. Outro fator que deve ser considerado é que a curva foi construída utilizando um surfactante semi-purificado. O método de precipitação ácida em pH 2,0 na maioria das circunstâncias permite a produção de um surfactante de alta qualidade. Mas em um pH tão baixo pode ocorrer a co-precipitação de outras moléculas (Baker, 2010). Isso significa que por uma simples questão de massa a CMC poderia ser até menor. Mesmo assim, para intuito de aplicações na indústria do petróleo, onde não é necessário um material com alto grau de pureza, a precipitação ácida em pH 2,0 é suficiente.

## 6 Conclusão

Este estudo revelou as propriedades tensoativas excepcionais de uma estirpe de *Bacillus paralicheniformis* isolada de sedimentos de manguezal, que tem potencial de aplicação na recuperação de óleo de reservatórios e na dispersão de derrames de óleo no mar. Essa bactéria produz um tensoativo de baixa CMC (50 mg/L) sendo capaz de reduzir a tensão superficial da água para 27 mN/m após 12 horas de crescimento e consegue se desenvolver e produzir biossurfactante a uma salinidade de 50 mg/L. O surfactante produzido é eficaz mesmo sob alta salinidade (200 g/L de NaCl) e após autoclavação (121°C por 15 min) e apresenta também atividade desemulsificante que pode ser explorada pela indústria.

## 7 Referências

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J., (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25, 3389–3402
- ASHBY, R.D., MCALOON, A.J., SOLAIMAN, D.K.Y. et al. (2013); A Process Model for Approximating the Production Costs of the Fermentative Synthesis of Sophorolipids. **Journal of Surfactants and Detergents** 16: 683-691. <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1466-0>
- BAKER S.C., CHEN CY. (2010) Enrichment and Purification of Lipopeptide Biosurfactants. In: Sen R. (eds) **Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology**, vol 672. Springer, New York, NY
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL. Potencial de Diversificação da Indústria Química Brasileira – Relatório 4: Tensoativos. **BAIN & COMPANY**. 2014, [https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada\\_publica\\_FEPprospec0311\\_Quimicos\\_Relat4\\_tensoativos.pdf](https://www.bndes.gov.br/arquivos/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_tensoativos.pdf)
- BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P. et al (2007); Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. Volume 30, No. 2 409-414, 2007.
- CHANDRASEKAR, S., SORIAL G., A., WEAVER J., W. (2006); Dispersant effectiveness on oil spills – impact of salinity. **ICES Journal of Marine Science**. Volume 63, Issue 8, 1 January 2006, Pages 1418–1430
- DALTIN, D. (2012); **Tensoativos: Química, Propriedades e Aplicações**. Capítulo 1, 1ª Reimpressão, Editora Edgard Blücher Ltda, SP. 2012.
- DUNLAP C. A., KWON S., ROONEY A P., KIM S. (2015); *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (2015), 65, 3487–3492

- HARDING, T., BROWN, M. W., SIMPSON, A. G. B., & ROGER, A. J. (2016); Osmoadaptative strategy and its molecular signature in obligately halophilic heterotrophic protists. **Genome Biology and Evolution**, 8(7), 2241–2258.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. (1995); Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyper production of biosurfactant by gamma ray - induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.176-179, 1995.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., et al. (2012); Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**. 28(12), 1647–1649. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- LI, X., LI, A., LIU, C., YANG, J., MF, A., HOU, N., XU, Y., REN, N. (2012); Characterization of the extracellular biodemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition. **Process Biochemistry** vol 47 626–634. 2012
- LIMA, L. B. (2013); Frequência de Bactéria produtoras de Biosurfactantes Lipopeptídeos em Sedimentos de Manguezais do Ceará. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais). Universidade Federal do Ceará. 2013.
- MILLER, R. G., SORREL S. R. (2013); The Future of Oil Supply. **Philosophical Transactions of Royal Society A**. 372:20130179
- MORÁN, A. C.; OLIVEIRA, N.; COMMENDATORE, M.; ESTEVES, J. L.; SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation*, v.11 (1), p.65-71, 2000.
- MORAN, S., ROBERTSON, K., PARADISI, F., RAI, D. K., MURPHY, C. D. (2010); Production of lipopeptides in *Bacillus* sp. CS93 isolated from Pozzol. **FEMS Microbiology Letters**. Vol 304, (2010) 69-73.
- MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. (2000); A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.



- MUGGERIDGE A, COCKIN A, WEBB K, ET AL. (2014); Recovery rates, enhanced oil recovery and technological limits. **Philosophical Transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**. 2014;
- MULLIGAN, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198.
- NDLOVU, T., RAUTENBACH, M., KHAN, W. (2017); Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. **AMB Express**. 2017; 7: 109. Published online 2017 May 31. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0367-4>
- NITSCHKE, M., PASTORE G. M. (2002); Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, Volume 25 No. 5, 772-776, 2002.
- OSEGHALE CI, AKPABIO EJ, UDOTTONG G. (2012); Breaking of oil-water emulsion for the improvement of oil recovery operations in the Niger Delta oilfields. **International Journal of Engineering and Technology**. (2012) Vol 2, No 11
- PEREIRA J.F.B., GUDINA E.J., COSTA R. et al. (2013); **Optimization and characterization of biosurfactant production by Bacillus subtilis isolates towards microbial enhanced oil recovery applications**. Fuel 111: 259-268.
- REIS, R. S.; PACHECO, G. J.; PEREIRA, A. G.; FREIRE, D. M. G. (2013); Biosurfactants: Production and Applications, Biodegradation - **Life of Science**, Dr. Rolando Chamy (Ed.), InTech, 2013, vol 01, p. 31-61, 2013.
- SAIMMAI, A.; SOBHLON, V. MANEERAT, S. (2012); Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. **Annals of Microbiology**, v.62, p. 391-402, 2012b.
- SAITOU, N., NEI, M. (1987); The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and Evolution** 1987 Jul;4(4):406-25
- SEM, R. (2008); Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR, **Progress in Energy and Combustion Science**. 2008 Vol 34, No 6

- SILVA, R.C.F.S., ALMEIDA, D. G., RUFINO R. D., LUNA, et al. (2014); Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. **International Journal of Molecular Sciences**, 2014, *15*, 12523-12542; doi:10.3390/ijms150712523
- SUTHAR, H., KRUSHI, H., DESAI, A., NERURKAR, A. (2008); Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. 2008. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 75, No 2. 225-230.
- TAMURA K., NEI M. (1993); Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** 10:512-526.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., (1994); CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22, 4673–80.
- TSOSKOUNOGLOU, M., AYERIDES, G., TRITPOULOU, E. (2008); The end of cheap oil: current status and prospects. **Energy Policy**. vol. 36 (2008) pg 3797–3806
- VIRAMONTES-RAMOS, Sabina et al. (2010); Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiol.**, São Paulo , v. 41, n. 3, p. 668-675, Oct. 2010 .
- YOUSSEF, N.H.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N.; KNAPP, R.M.;MCINERNEY, M.J. (2004); Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004
- ZHAO, H., SHAO, D. JIANG, C., SHI, J., LI, Q., HUANG, Q., et al. (2017); Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 101, 5951-5960. doi: 10.1007/200253-017-8396-0