



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ALAN PORTAL D'ALMEIDA**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO DE  
BIOEMULSIFICANTE DE *Acinetobacter venetianus* ISOLADA DE AMOSTRAS DE  
PETRÓLEO**

**FORTALEZA**

**2023**

ALAN PORTAL D'ALMEIDA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO DE  
BIOEMULSIFICANTE DE *Acinetobacter venetianus* ISOLADA DE AMOSTRAS DE  
PETRÓLEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque.

FORTALEZA

2023

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)

---

- D1p D'Almeida, Alan Portal.  
Produção, caracterização e aplicação em biorremediação de bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus* isolada de amostras de petróleo / Alan Portal D'Almeida. – 2023.  
178 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.  
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque.
1. Agente de superfície-ativa. 2. Biorremediação. 3. Degradação de hidrocarbonetos. 4. Dispersante polimérico. 5. Ecotoxicidade. I. Título.

CDD 660

---

ALAN PORTAL D'ALMEIDA

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO DE  
BIOEMULSIFICANTE DE *Acinetobacter venetianus* ISOLADA DE AMOSTRAS DE  
PETRÓLEO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 18/07/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (DEQ-UFC)

---

Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque (Coorientador)  
Universidade Federal do Ceará (DEAL-UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Débora de Oliveira  
Universidade Federal de Santa Catarina (EQA-UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto  
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (CCBS-UFERSA)

*A todos que me acompanharam nessa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amados pais **Kátia Regina Portal Mello** e **Flávio Luiz Rodrigues de Almeida**, por todo o amor, carinho e apoio no caminho que resolvi trilhar.

À minha avó **Graciete da Conceição Portal Pereira** e minha tia-madrinha **Diana Cláudia Portal Pereira**, que também sempre me incentivaram e sempre acreditaram no meu potencial. Ao meu irmão **Alex Portal D'Almeida**, por toda a amizade e companheirismo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Maria Valderez Ponte Rocha**, pela paciência e orientação que, desde a graduação, me recebeu de forma atenciosa e acolhedora no GPBio (Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos). Uma grande pesquisadora por quem nutro uma grande admiração e respeito por sua ética e persistência.

Ao Prof. Dr. **Tiago Lima de Albuquerque**, por toda a paciência, amizade, cafés, lanches e conselhos, com quem aprendi e ainda aprendo muito desde minha chegada ao GPBio.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e aos professores e colegas do grupo de pesquisa GPBio, por todo o apoio, amizade e companheirismo durante meu mestrado. Especialmente **Carla Reis** e **Hillydson Levy**, pelo carinho e conversas de corredor.

Às minhas colegas de mestrado **Maria Luiza**, **Vitória Natasha** e **Sadwa Fernandes**, pelos dias de estudo, apresentações em grupo, almoços e conversas.

Ao meu amado namorado **Fabiano Martins**, por todo o seu amor, paciência, companheirismo, incentivo e amizade, nos dias bons e nos dias ruins.

Aos professores **Ítalo Waldimiro Lima de França**, **Denise Cavalcante Hissa**, **Débora de Oliveira** e **Raphaela Vasconcelos Gomes Barreto** que foram extremamente gentis ao aceitarem o convite para participarem como membros da banca de avaliação a que esse trabalho foi submetido.

Ao Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), ao Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA) e ao Instituto de Ciências do Mar (Labomar) pelo apoio científico.

Aos órgãos de fomento pelos recursos com os quais foi possível o desenvolvimento deste projeto, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Processo 88881.46952/2019-01), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processos 316373/2021-4 e 440868/2020-3) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo financiamento da bolsa durante o mestrado.

“Enquanto eu tiver perguntas e não houver  
resposta continuarei a escrever.” – Clarice  
Lispector. A hora da estrela, 1977.

## RESUMO

A aplicação de dispersantes biológicos tem se destacado na remediação de derramamentos de petróleo, pela sua menor ecotoxicidade e maior biodegradabilidade em relação aos surfactantes sintéticos, tradicionalmente aplicados. Entretanto, tais biomoléculas têm sido pouco utilizadas industrialmente devido aos baixos rendimentos, à ineficiência de alguns métodos de separação e à escassez de estudos com aplicação em biorremediação. Neste contexto, essa pesquisa busca produzir, pré-purificar, caracterizar e aplicar um bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus*, bactéria isolada de óleo oriundo de um desastre ambiental que atingiu praias do Nordeste brasileiro em 2019. Para otimização do meio de produção, foram variadas as condições de temperatura (25-40 °C), pH (4-10) e concentração de NaCl (0-35 g L<sup>-1</sup>) no meio de cultura. Também foram avaliados três métodos de precipitação: ácida (em pH 2,0, usando HCl 12 mol L<sup>-1</sup>), por etanol absoluto (razão 2:1) e por sulfato de amônio (50% m/v). Em seguida a biomolécula foi pré-purificada por método *ethanol-salting out, hot phenol* (90% v/v) e extração com éter. A biomolécula pré-purificada foi caracterizada quanto a sua estrutura molecular por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) e ressonância magnética nuclear (<sup>1</sup>H RMN). Em seguida, a estabilidade do bioemulsificante bruto foi estudada quanto à presença de NaCl (0 a 50 g L<sup>-1</sup>), ao pH (2 a 10) e a altas temperaturas (60 a 120 °C, por até 120 minutos). Também, estudou-se as características ecotoxicológicas da biomolécula, mensurando-se o índice de germinação em *Ocimum basilicum* e *Brassica oleracea* e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) em *Artemia salina*. O potencial biorremediador do emulsificante foi avaliado a partir da descontaminação de óleo *in vitro*, na superfície, e na limpeza de areia e rochas. As condições ótimas de produção de bioemulsificante bruto foram a 30 °C, em meio a pH 7 e suplementado com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl, apresentando concentração 3,3 g L<sup>-1</sup> de bioproduto. A precipitação por etanol, a mais promissora, aumentou o índice de emulsificação de 53% (meio livre de células) para 58%, reduzindo a tensão superficial em 44,4% (40 mN m<sup>-1</sup>). A pré-purificação pelo método *ethanol-salting out* mostrou-se eficiente para a separação do produto, atingindo concentração micelar crítica de 50 mg L<sup>-1</sup>, e análises moleculares indicaram a produção de um bioemulsificante semelhante ao emulsan, com massa das unidades monoméricas de 1099 Da. O biosurfactante bruto apresentou alta estabilidade à salinidade (até 50 g L<sup>-1</sup>), variações de pH (4-8) e de temperatura (até 120 °C por 120 min), também apresentando baixa ecotoxicidade para espécies vegetais (IG% > 80%, a concentração de 3000 mg L<sup>-1</sup>) e microcrustáceos (CL<sub>50</sub> de 5750 mg L<sup>-1</sup>). O bioproduto foi capaz de dispersar até 12% da massa de óleo em meio marinho *in vitro*, principalmente hidrocarbonetos de cadeia de C<sub>22</sub>-C<sub>33</sub>, dispersando óleo à uma área de 50 cm<sup>2</sup> sobre a superfície da água do mar em uma área total de 315 cm<sup>2</sup>, removendo cerca de 25% da massa de óleo contaminante em areia e reduzindo consideravelmente as manchas de óleo adsorvidas em rochas. Também se avaliou o potencial da cepa para a produção de bioemulsificantes utilizando óleo diesel, hexadecano, querosene e petróleo como fontes de carbono, obtendo-se maior atividade emulsificante com querosene (EI<sub>24</sub>%: 58%). Também foi estudada a suplementação do meio com fontes de carbono hidrofílicas para aumentar a produção de bioemulsificante, na qual a glicose adicionada ao meio contendo querosene aumentou a concentração de bioemulsificante para 7,5 g L<sup>-1</sup>. Assim, foi produzido um bioproduto de alto potencial biorremediador, apresentando características promissoras para aplicação em diversos setores industriais.

**PALAVRAS-CHAVE:** agente de superfície-ativa; biorremediação; degradação de hidrocarbonetos; dispersante polimérico; ecotoxicidade.

## ABSTRACT

The application of biological dispersants has been notorious in remediations of oil spills, due to their lower ecotoxicity and greater biodegradability compared to synthetic surfactants, traditionally applied. However, such biomolecules have not been much used industrially due to low yields, the inefficiency of some separation methods and the scarcity of studies of application in bioremediation. In this context, this research seeks to produce, pre-purify, characterize and apply a bioemulsifier of *Acinetobacter venetianus*, a bacteria isolated from oil of an environmental disaster that hit beaches in the Brazilian Northeast in 2019. To optimize production conditions, the temperature (25-40 °C), pH (4-10) and NaCl concentration (0-35 g L<sup>-1</sup>) in the culture medium were varied. Three precipitation methods were also applied: by acid (at pH 2.0, using 12 mol L<sup>-1</sup> HCl), by absolute ethanol (2:1 ratio) and by ammonium sulfate (50% m/v). Then the biomolecule was pre-purified by ethanol-salting out method, hot phenol (90% v/v) and extraction with ether. The pre-purified biomolecule was characterized according to its molecular structure by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) and nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR). Then, the stability of the crude bioemulsifier was evaluated regarding the presence of NaCl (0 to 50 g L<sup>-1</sup>), pH (2 to 10) and high temperatures (60 to 120 °C, for up to 120 minutes). Also, the ecotoxicological characteristics of the biomolecule were studied, measuring the germination index in *Ocimum basilicum* and *Brassica oleracea* and the lethal concentration (LC<sub>50</sub>) in *Artemia salina*. The bioremediation potential of the emulsifier was evaluated from the decontamination of oil *in vitro*, on the surface of sea water, and cleaning of sand and rocks. The optimal conditions for the production of crude bioemulsifier were at 30 °C, in pH 7 medium and supplemented with 3 g L<sup>-1</sup> of NaCl, presenting a concentration of 3.3 g L<sup>-1</sup> of bioproduct. The ethanol precipitation, the most promising one, increased the emulsification index from 53% (cell-free medium) to 58%, reducing surface tension by 44.4% (40 mN m<sup>-1</sup>). The pre-purification by the ethanol-salting out method proved to be efficient for the separation of the bioproduct, presenting a critical micellar concentration of 50 mg L<sup>-1</sup>, and molecular analyzes indicated the production of a bioemulsifier similar to emulsan, with mass of monomeric units of 1099 Da. The crude biosurfactant showed high stability to salinity (up to 50 g L<sup>-1</sup>), pH (4-8) and temperature variations (up to 120 °C for 120 min), also presenting low ecotoxicity for plant species (GI% > 80%, at 3000 mg L<sup>-1</sup>) and microcrustaceans (LC<sub>50</sub> of 5750 mg L<sup>-1</sup>). The bioproduct was able to disperse up to 12% of the oil mass in the marine environment *in vitro*, mainly C<sub>22</sub>-C<sub>33</sub> hydrocarbons chains, dispersing oil to an area of 50 cm<sup>2</sup> on the surface of sea water in a total area of 315 cm<sup>2</sup>, removing about 25% of the contaminating oil mass in sand and considerably reducing oil stains adsorbed on rocks. The potential of the strain for the production of bioemulsifiers using diesel oil, hexadecane, kerosene and petroleum as carbon sources was also evaluated, obtaining greater emulsifying activity with kerosene (EI<sub>24</sub>%: 58%). Supplementation of the medium with hydrophilic carbon sources to increase bioemulsifier production was also studied, in which glucose added to the medium containing kerosene increased the bioemulsifier concentration to 7.5 g L<sup>-1</sup>. Thus, a bioproduct with high bioremediation potential was produced, presenting promising characteristics for application in several industrial sectors.

**KEYWORDS:** active surface agent; bioremediation, ecotoxicity, hydrocarbon degradation, polymeric dispersant.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.1-** Embarcação coletando óleo do derramamento de óleo causado pela explosão da plataforma Deepwater Horizon (2010)..... 34
- Figura 1.2-** Foto do derramamento de óleo ocorrido no Brasil em 2019, destacando o impacto aos pescadores tradicionais..... 37
- Figura 1.3-** Barreiras de contenção utilizadas para conter derramamentos de óleo em ambiente marinho..... 39
- Figura 1.4-** Queima *in situ* utilizada para remediação de derramamento de óleo em condições climáticas adequadas..... 40
- Figura 1.5-** Avião aplicando dispersantes sobre mancha de petróleo..... 41
- Figura 1.6-** Representação de um agente surfactante, apontando a polaridade de suas regiões hidrofílicas e hidrofóbicas), e o comportamento de moléculas de surfactantes em baixas concentrações (A), próximas ao CMC (B) e superiores ao CMC (C)..... 43
- Figura 1.7-** Estruturas de surfactantes aniônicos..... 44
- Figura 1.8-** Estruturas de surfactantes catiônicos..... 45
- Figura 1.9-** Estruturas de surfactantes não-iônicos..... 46
- Figura 1.10-** Estruturas de surfactantes anfóteros..... 47
- Figura 1.11-** Fluxograma representando o processo de biorremediação de derramamento de petróleo *in situ* acelerado pela administração de bioemulsificantes..... 50
- Figura 1.12-** Estrutura da surfactina, um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*..... 53
- Figura 1.13-** Molécula de emulsan, biopolímero de *Acinetobacter*, ressaltando as diversas regiões e funções da molécula..... 67
- Figura 1.14-** Rota metabólica da produção de emulsan e degradação de hidrocarbonetos no interior de microrganismos do gênero *Acinetobacter*..... 69

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 2.1-</b>	Sementes de <i>Ocimum basilicum</i> distribuídas em papel filme para avaliação de fitotoxicidade do bioemulsificante produzido .....	80
<b>Figura 2.2-</b>	Microcrustáceos ( <i>Artemia salina</i> ) eclodidos em água do mar simulada para avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante.....	81
<b>Figura 2.3-</b>	Fluxograma dos experimentos realizados visando a produção de bioemulsificante.....	87
<b>Figura 2.4-</b>	Influência da temperatura na produção de bioemulsificantes por <i>A. venetianus</i> AMO1502. (▲) Concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Índice de emulsificação (IE24 %) e (●) Redução da tensão superficial (RTS%).....	89
<b>Figura 2.5-</b>	Influência do pH do meio de cultivo na produção de bioemulsificantes por <i>A. venetianus</i> AMO1502. (▲) Concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Índice de emulsificação (IE24 %) e (●) Redução da tensão superficial (RTS%).....	90
<b>Figura 2.6-</b>	Influência da concentração de NaCl do meio de cultivo na produção de bioemulsificantes por <i>A. venetianus</i> AMO1502. (▲) Concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Índice de emulsificação (IE24 %) e (●) Redução da tensão superficial (RTS%).....	91
<b>Figura 2.7-</b>	Perfil da produção de bioemulsificante no meio mineral em condições otimizadas: meio de cultivo a pH 7,0 e suplementado com $3 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl e processo conduzido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ : concentração de células (▲), concentração de glicose (■) e índice de emulsificação (■).....	92
<b>Figura 2.8-</b>	Meio livre de células (MLC) contendo bioemulsificante, o que é evidenciado pela produção de espuma (A) e emulsão do caldo de produção (MLC) utilizando querosene como fonte hidrofóbica a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (B).....	93
<b>Figura 2.9-</b>	Perfil do pH durante a produção de bioemulsificante de <i>Acinetobacter venetianus</i> : (■) pH, (▲) concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (●) concentração de ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ ).....	94
<b>Figura 2.10-</b>	Emulsões formadas pelo bioemulsificante extracelular de <i>A. venetianus</i> AMO1502 presente meio livre de células (MLC), produzido utilizando glicose como fonte de carbono a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,0, 150 rpm com adição de NaCl	

	(3 g L <sup>-1</sup> ), em diferentes fontes hidrofóbicas: (A) Água; (B) Hexano; (C) Heptano; (D) Querosene; (E) Óleo de Soja; (F) Óleo mineral; (G) Óleo AGE e (H) Petróleo.....	96
<b>Figura 2.11-</b>	Diluição micelar crítica (DMC) do meio livre de células contendo bioemulsificante extracelular produzido nas condições otimizadas (30 °C, pH 7,0 e na presença de NaCl (3 g L <sup>-1</sup> )).....	98
<b>Figura 2.12-</b>	Bioemulsificante bruto recuperado com etanol (BB-E) de <i>Acinetobacter venetianus</i> , produzido a 30 °C, pH 7,0 e 3,0 g L <sup>-1</sup> de NaCl: (A) após liofilização e (B) em aplicação como agente emulsificante (IE <sub>24</sub> %: 58%± 2%) à 1 g L <sup>-1</sup> utilizando querosene como fonte hidrofóbica.....	102
<b>Figura 2.13-</b>	Perfil de produção de bioemulsificante bruto precipitado com etanol (BB-E) (▼) e da redução da tensão superficial (RTS%) (●) durante o processo de produção por <i>A. venetianus</i> AMO1502 usando MM (3 g L <sup>-1</sup> de NaCl) a pH 7,0 e conduzido a 30 °C e 150 rpm.....	103
<b>Figura 2.14-</b>	Ilustração do sistema heterogêneo composto por fase hidrofóbica (querosene) e fase aquosa: (A) água, (B) MLC e (C) BB (1 g L <sup>-1</sup> ), para determinação da tensão interfacial (TI).....	104
<b>Figura 2.15-</b>	Concentração micelar crítica obtida com o bioemulsificante purificado com etanol em diferentes estágios de processo: (■) Bioemulsificante bruto, (●) 2 <sup>a</sup> lavagem com etanol, (▲) 3 <sup>a</sup> lavagem com etanol, (▼) 4 <sup>a</sup> lavagem com etanol, (◆) 1 <sup>a</sup> cristalização com Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , (◀) 2 <sup>a</sup> cristalização com Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	105
<b>Figura 2.16-</b>	Espectro de FT-IR de bioemulsificante pré-purificado (BPP) por <i>etanol salting-out</i> produzido por <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 ressaltando as bandas representativas da produção de emulsan.....	107
<b>Figura 2.17-</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H de bioemulsificante de <i>A. venetianus</i> pré-purificado por método <i>etanol-salting out</i> .....	109
<b>Figura 2.18-</b>	Espectro MALDI-TOF/TOF do bioemulsificante de <i>A. venetianus</i> pré-purificado por método <i>etanol-salting out</i> , apresando molécula com características semelhantes a outras emulsan.....	110

<b>Figura 2.19-</b> Estrutura proposta para o polímero produzido por <i>A. venetianus</i> AMO1502 neste trabalho com base em análises <sup>1</sup> H RMN, FT-IR e MALDI-TOF/TOF....	112
<b>Figura 2.20-</b> Emulsão formada com óleo de parafina em (A) meio contendo BPP (100 mg L <sup>-1</sup> ) e (B) solução padrão de HLB 10.....	113
<b>Figura 2.21-</b> Estabilidade da emulsão formada por bioemulsificante de <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 no decorrer de 120 dias a 25 °C: (A) emulsões e (B) imagens mostrando as gotas observadas em microscópio ótico.....	114
<b>Figura 2.22-</b> Estabilidade do bioemulsificante bruto avaliado pelo índice de emulsificação em, (A) meios com diferentes concentrações salinas (0, 2,5, 5, 10, 20 e 50 g L <sup>-1</sup> ), (B) quando exposto a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 7, 8 e 10) e (C) quando exposto a diferentes temperaturas: (■) 60 °C, (●) 80 °C, (▲) 100 °C e (▼) 120 °C por 120 minutos.....	115
<b>Figura 2.23-</b> Fitotoxicidade do bioemulsificante bruto de <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 em: (▲) <i>Ocimum basilicum</i> e (●) <i>Brassica oleracea</i> , representado pelo índice de germinação (%) de sementes expostas a diferentes concentrações de BB.....	119
<b>Figura 2.24-</b> Fitotoxicidade do bioemulsificante bruto precipitado com etanol (BB-E) na concentração de 3000 mg L <sup>-1</sup> em (A) <i>Ocimum basilicum</i> e (B) <i>Brassica oleracea</i> .....	120
<b>Figura 2.25-</b> Relação entre a concentração de bioemulsificante bruto de <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 e o número de <i>Artemia salinas</i> mortas devido a exposição ao biocomposto.....	121
<b>Figura 2.26-</b> Imagens de <i>Artemia salina</i> em microscópio ótico (ampliação x100) demonstrando corpos intactos e lúmen intestinal de tamanho normal em diferentes concentrações de bioemulsificante: (A) 0 mg L <sup>-1</sup> , (B) 10 mg L <sup>-1</sup> , (C) 50 mg L <sup>-1</sup> , (D) 100 mg L <sup>-1</sup> , (E) 500 mg L <sup>-1</sup> , (F) 1000 mg L <sup>-1</sup> , (G) 2000 mg L <sup>-1</sup> , (H) 3000 mg L <sup>-1</sup> .....	122
<b>Figura 2.27-</b> Ação do bioemulsificante na redução de massa de petróleo (%) adicionada ao meio no decorrer do tempo e comparação com controles: Bioemulsificante precipitado com etanol (BB-E) na concentração de 10% (m/v) (◆), BB-	

	Concentração de 1% (m/v) (▼), Meio livre de células (MLC) (◆), SDS (▲), Meio Mineral (■) e Água do mar (●).....	123
<b>Figura 2.28-</b>	Dispersão de petróleo <i>in vitro</i> após 21 dias de biorremediação utilizando: (■) água do mar, (■) meio livre de células (MLC), (■) bioemulsificante bruto (1% m/v) e (■) bioemulsificante bruto 10% (m/v) .....	125
<b>Figura 2.29-</b>	Potencial dispersante (A) da água do mar simulada; (B) SDS, (C) meio livre de células (MLC) e (D) do bioemulsificante precipitado com etanol (BB) a concentração de 1 g L <sup>-1</sup> .....	127
<b>Figura 2.30-</b>	Areia (A) antes, (B) após contaminação com óleo de motor e (C) após tratamento com o bioemulsificante.....	127
<b>Figura 2.31-</b>	Ação do bioemulsificante na remoção de óleo de motor da areia sob agitação e sem agitação comparado com controles (SDS 1 g L <sup>-1</sup> e água do mar simulada) por sete (07) dias.....	128
<b>Figura 2.32-</b>	Ação do bioemulsificante produzido por <i>Acinetobacter venetianus</i> em rochas contaminadas por óleo contaminante, coletadas da praia de Iguape, Aquiraz, que foi afetada pelo acidente ambiental de 2019 no Nordeste brasileiro. (A) Rocha no tempo zero e (B) rocha após 7 dias de tratamento com o bioemulsificante produzido. As setas adicionadas representam pontos com expressiva diminuição das manchas.....	129

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 3.1-</b>	Fluxograma dos experimentos realizados visando avaliar a influência da utilização de diferentes fontes de carbono.....	139
<b>Figura 3.2-</b>	Análise do crescimento celular (A) e produção de emulsificante determinada por Índice de emulsificação (IE <sub>24</sub> %) (B) e Redução da tensão superficial (RTS%) (C) por <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 usando diferentes fonte de carbono e o processo conduzido a 30 °C e 150 rpm.....	141
<b>Figura 3.3-</b>	Produção de bioemulsificante por <i>Acinetobacter venetianus</i> utilizando querosene como fonte de carbono a 30 °C e 150 rpm (MM-Q). (▼) Concentração de bioemulsificante (g L <sup>-1</sup> ); (■) Índice de emulsificação do	

- meio livre de células (MLC) (%) e (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ )..... 145
- Figura 3.4-** Produção de bioemulsificante por *Acinetobacter venetianus* a 30 °C e 150 rpm utilizando petróleo como fonte de carbono (MM-P). (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (●) Redução da tensão superficial (%) e (■) Índice de emulsificação do meio livre de células (MLC) (%)..... 147
- Figura 3.5-** Índice de hidrofobicidade em diferentes meios: (■) MM, (●) MM-P e (▲) MM-Q a 30 °C e 150 rpm..... 150
- Figura 3.6-** Perfil do crescimento celular e produção de bioemulsificante em meios contendo: (A) glicose 2% (m/v) (MM-G2), (B) etanol 2% (v/v) (MM-E2) e (C) glicose 1% (m/v) e etanol 1% (v/v) (MM-GE) como fonte de carbono e o processo conduzido a 30 °C e 150 rpm. (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), (◆) Concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (■) índice de emulsificação (%)..... 151
- Figura 3.7-** Produção de bioemulsificante utilizando querosene (1% v/v) como fonte de carbono por *Acinetobacter venetianus* acelerado pela presença de: (A) glicose 1% (m/v) (MM-QG) e (B) etanol 1% (v/v) (MM-QE) no processo conduzido a 30 °C e 150 rpm. (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), (◆) Concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (■) índice de emulsificação (%)..... 154
- Figura 3.8 -** Atividade emulsificante do MLC obtido com querosene como fonte de carbono suplementado com (A) glicose e (B) etanol..... 155
- Figura 3.9-** Produção de bioemulsificante utilizando petróleo (1% m/v) como fonte de carbono por *Acinetobacter venetianus* acelerada pela presença de: (A) glicose 1% (m/v) (MM-PG) e (B) etanol 1% (v/v) (MM-PE) com o processo conduzido a 30 °C e 150 rpm, por 35 dias. (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), (◆) Concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (■) índice de emulsificação (%)..... 156

## ANEXOS

- Figura A1-** Diagrama conceitual da dissertação 178

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.1-</b> Derramamentos de petróleo globalmente mais relevantes das últimas décadas (>200.000 toneladas) e os respectivos métodos de remediação aplicados.....	32
<b>Tabela 1.2-</b> Acidentes ambientais de grandes proporções relacionados a derramamentos de petróleo ocorridos no Brasil.....	35
<b>Tabela 1.3-</b> Concentração letal para 50% dos organismos (CL <sub>50</sub> ) contra <i>Artemia</i> de alguns surfactantes químicos.....	48
<b>Tabela 1.4-</b> Emulsificantes biológicos: classificação dos principais grupos, microrganismos produtores e principais aplicações.....	52
<b>Tabela 1.5-</b> Utilização de surfactantes com diferentes valores de equilíbrio hidrofílico/lipofílico (HLB).....	55
<b>Tabela 1.6-</b> Exemplos de microrganismos produtores de emulsificantes biológicos.....	58
<b>Tabela 1.7-</b> Microrganismos do gênero <i>Acinetobacter</i> sintetizadores de bioemulsificantes, suas condições de produção e métodos de separação.....	62

### CAPÍTULO 2

<b>Tabela 2.1-</b> Diferentes proporções de <i>Span</i> 80 e <i>Tween</i> 80 utilizadas para criar soluções com HLB variando de 8-15.....	85
<b>Tabela 2.2-</b> Índice de emulsificação (IE <sub>24</sub> %) do bioemulsificante extracelular de <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 presente no meio livre de células (MLC) usando diferentes fontes hidrofóbicas.....	97
<b>Tabela 2.3-</b> Concentração de proteínas no meio livre de células, BB-A e BB-E produzidos nas condições otimizadas (30 °C, pH 7,0 e 3 g L <sup>-1</sup> de NaCl).	99

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 3.1-</b> Parâmetros de resposta da produção de bioemulsificante de <i>Acinetobacter venetianus</i> utilizando glicose, etanol e/ou querosene como fonte de carbono, a 30 °C e 150 rpm por 120 h.....	158
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	Bioemulsificante Bruto
BB-A	Bioemulsificante Bruto Precipitado com Ácido
BB-E	Bioemulsificante Bruto Precipitado com Etanol
BPP	Bioemulsificante Pré-purificado
BB-SA	Bioemulsificante Bruto Precipitado com Sulfato de Amônio
CMC	Concentração Micelar Crítica
DMC	Diluição Micelar Crítica
HLB	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
MM	Meio Mineral
MM-Q	Meio Mineral com Querosene
MM-QE	Meio Mineral com Querosene e Etanol
MM-QG	Meio Mineral com Querosene e Glicose
MM-P	Meio Mineral com Petróleo
MM-PE	Meio Mineral com Petróleo e Etanol
MM-PG	Meio Mineral com Petróleo e Glicose
TI	Tensão Interfacial

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Objetivo geral .....	26
2.2 Objetivos específicos .....	26
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	28
<b>1 DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO</b> .....	31
1.1. Derramamentos de petróleo e seus impactos ambientais .....	31
1.2 Derramamentos de petróleo no Brasil.....	34
1.3 Acidente ambiental de 2019 no Nordeste Brasileiro .....	36
<b>2 REMEDIAÇÃO DE DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO</b> .....	38
2.1 Barreiras de contenção .....	39
2.2 Queima in situ.....	40
2.3 Dispersantes .....	41
2.4 Biorremediação .....	48
<b>3 BIOSURFACTANTES E BIOEMULSIFICANTES</b> .....	51
3.1 Definição e aplicações.....	51
3.2 Toxicidade dos dispersantes biológicos .....	56
3.3 Produção de biocompostos de superfície-ativa .....	57
3.4 Gênero <i>Acinetobacter</i> e o emulsan .....	61
<b>CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE DE <i>Acinetobacter venetianus</i> USANDO GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO</b> .....	72
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	73
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	74
2.1 Material.....	74
2.1.1 <i>Reagentes</i> .....	74
2.1.2 <i>Microrganismo</i> .....	74
2.2 Propagação do inóculo .....	75
2.3 Produção de bioemulsificante.....	75
2.4 Avaliação da recuperação do bioemulsificante.....	76
2.5 Pré-purificação do bioemulsificante .....	77
2.6 Parâmetros de resposta para a produção de bioemulsificante.....	78
2.7 Estabilidade do bioemulsificante .....	79
2.8 Avaliação da ecotoxicidade do bioemulsificante.....	79
2.9 Potencial biorremediador .....	81

2.10 Métodos analíticos .....	83
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>88</b>
3.1 Otimização das condições de produção de bioemulsificante .....	88
3.2 Atividade emulsificante do MLC .....	94
3.3 Recuperação do bioemulsificante .....	99
3.4 Pré-purificação do bioemulsificante .....	104
3.5 Análise molecular .....	106
3.5.1 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) .....	106
3.5.2 Ressonância magnética nuclear ( <sup>1</sup> H RMN) .....	108
3.5.3 Espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF) .....	109
3.5.4 Avaliação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) .....	112
3.6 Estabilidade do bioemulsificante e das emulsões formadas .....	113
3.7 Avaliação da ecotoxicidade do bioemulsificante .....	118
3.7.1 Avaliação da fitotoxicidade .....	118
3.7.2 Avaliação da citotoxicidade .....	120
3.8 Aplicação do bioemulsificante como agente biorremediador na dispersão de óleos .....	123
3.8.1 Aplicação do bioemulsificante na dispersão de óleos <i>in vitro</i> .....	123
3.8.2 Aplicação do bioemulsificante na dispersão de óleos em superfícies aquosas .....	126
3.8.3 Aplicação do bioemulsificante na limpeza solo arenoso e rochas .....	127
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>130</b>
<b>CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR <i>Acinetobacter venetianus</i> AMO1502 UTILIZANDO HIDROCARBONETOS COMO FONTE DE CARBONO .....</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>133</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>135</b>
2.1 Material .....	135
2.1.1 Reagentes .....	135
2.1.2 Microrganismo .....	135
2.2 Produção de bioemulsificante .....	135
2.3 Recuperação do bioemulsificante bruto .....	136
2.4 Influência da glicose e etanol na degradação de hidrocarbonetos .....	136
2.5 Métodos Analíticos .....	137
2.5.1 Atividade emulsificante .....	137
2.5.2 Redução da tensão superficial (RTS%) .....	137
2.5.3 Determinação da biomassa .....	137
2.5.4 Determinação da concentração de glicose e etanol .....	138
2.5.5 Determinação da hidrofobicidade celular .....	138
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>140</b>

<b>3.1 Produção de bioemulsificante por <i>A. venetianus</i> AMO1502 utilizando fontes de carbono hidrofóbicas .....</b>	<b>140</b>
<b>3.2 Estudo cinético da degradação de querosene e petróleo.....</b>	<b>144</b>
<b>3.3 Efeitos da adição de glicose e etanol na degradação de querosene e petróleo .....</b>	<b>150</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>159</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>160</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>161</b>
<b>ANEXO A - DIAGRAMA CONCEITUAL DA DISSERTAÇÃO. ....</b>	<b>178</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar dos esforços internacionais para a diminuição do uso de petro-derivados, a sociedade contemporânea ainda é muito dependente dessas substâncias devido à alta importância da indústria do petróleo para a produção de energia, plásticos, lubrificantes, surfactantes e outros produtos. Assim, o alto fluxo de navios petroleiros em rotas comerciais cada vez mais congestionadas, leva a derramamentos acidentais frequentes (GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020; HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012), causando contaminações que impactam nos setores de alimentos, turismo e no cotidiano da população local, sobretudo grupos de maior vulnerabilidade social e econômica (SOARES *et al.*, 2022). Os impactos causados pelos acidentes envolvendo derramamentos de petróleo costumam ser duradouros, podendo ser observados anos após ocorrido pelos efeitos no meio-ambiente, turismo e economia (ARNOLD *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2022; ZENGEL *et al.*, 2022).

Quando a prevenção não é suficiente e acidentes ocorrem, são aplicados alguns métodos de remediação como, por exemplo, o uso de barreiras e *skimmers* (FREITAS *et al.*, 2016), a queima *in situ* (VAN GELDEREN *et al.*, 2015) e a aplicação de dispersantes (ARNOLD *et al.*, 2022). Esses métodos podem ter sua eficácia comprometida dependendo das características físico-químicas do óleo, idade do derramamento, volume de óleo derramado e condições climáticas. A utilização de alguns dos métodos supracitados também pode causar impactos ambientais durante a aplicação, como é o caso da queima *in situ* e a utilização de dispersante químicos, ambos pesadamente regulados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), restringindo sua utilização (BRASIL, 2015, 2017), devido ao seu potencial danoso (ARNOLD *et al.*, 2022; COUTO *et al.*, 2020; REBELLO *et al.*, 2014).

Assim, biossurfactantes e bioemulsificantes vêm sendo estudados como alternativas para a utilização de alguns métodos mais agressivos para o ecossistema local. Essas biomoléculas são dispersantes produzidos por rota microbiana e tendem a possuir menor ecotoxicidade e maior biodegradabilidade que as opções sintéticas (FELIX *et al.*, 2019; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; ROCHA *et al.*, 2014). Diversos gêneros de microrganismos foram reportados como sendo produtores desses agentes de superfície-ativa, como *Acinetobacter* (MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021), *Bacillus* (DE FRANÇA *et al.*, 2022), *Pseudomonas* (ROCHA *et al.*, 2014), *Serratia* (DOS SANTOS *et al.*, 2021) e *Candida* (LUNA *et al.*, 2011).

Os bioemulsificantes, em contraste com os biossurfactantes, costumam ter maior massa molecular, menor potencial tensoativo e geralmente formam emulsões mais estáveis (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002), sendo promissores na dispersão de óleo de acidentes ambientais, sendo aplicados em biorremediação *in situ* e *ex situ* (BARROS *et al.*, 2014; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; WU *et al.*, 2022). Assim, os emulsificantes biológicos vêm se destacando na comunidade científica pelo seu alto poder dispersante, baixa toxicidade e potencial para remediação de derramamentos de petróleo.

Inovações recentes têm buscado otimizar produção desses bioprodutos (BEZZA; CHIRWA, 2015; D'ALMEIDA, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; LIRA *et al.*, 2020; TAO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2016). Entre elas, a utilização de microrganismos isolados de derramamentos, selecionando cepas expostas a contaminantes, normalmente mais adaptáveis a metabolização de fontes de carbono hidrofóbicas e a produção de emulsificantes biológicos potentes na dispersão desses contaminantes (CHAMANROKH *et al.*, 2008; STANCU, 2022; ZOU *et al.*, 2014).

Um gênero de microrganismos produtor de bioemulsificantes que se destaca é o *Acinetobacter*, normalmente isolado de amostras de hidrocarbonetos contaminantes (CHAMANROKH *et al.*, 2008; STANCU, 2022). Essas bactérias são produtoras de potentes agentes de superfície-ativa com alto poder emulsificante, entre eles o “emulsan”, um lipoheteropolissacarídeo, utilizado não apenas em derramamentos de petróleo, mas também na remoção de metais pesados e nas indústrias farmacêutica e de alimentos (KIM *et al.*, 1997; MERCALDI *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; THRAEIB *et al.*, 2022).

O Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio, Universidade Federal do Ceará) possui vasto portfólio na produção e aplicação de biossurfactantes e bioemulsificantes de *Bacillus subtilis* (ROCHA, 2007; GIRO *et al.* 2009; FELIX, 2012; DE FRANÇA, 2014; DE FRANÇA *et al.* 2015, 2022; FELIX *et al.*, 2019), *Pseudomonas aeruginosa* (ROCHA, 2007; ROCHA *et al.* 2007, 2014) *Acinetobacter calcoaceticus* (ROCHA *et al.* 2006) e *Acinetobacter venetianus* (D'ALMEIDA, 2022; D'ALMEIDA *et al.* 2023).

Este grupo tem buscado o desenvolvimento de novas tecnologias para avanços na produção de agentes de superfície-ativa para, principalmente, o aprimoramento de técnicas para remediação de acidentes ambientais, como, por exemplo, o derramamento de petróleo ocorrido no Nordeste do Brasil em 2019, que causou impactos duradouros neste país. Assim, em parceria

com o Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH, Universidade Federal do Ceará), diversas cepas foram isoladas e identificadas a partir de petróleo oriundo da praia de Icaraí de Amontada, Amontada, Ceará – Brasil (03°01'25.0" S, 39°38'17.3" W) em 2019. Dentre esses microrganismos, destacou-se a cepa codificada como AMO1502, identificada como *Acinetobacter venetianus*, microrganismo conhecido pela produção de potentes agentes emulsificantes e potencial para a degradação de hidrocarbonetos (DAMSKOZLOWSKA *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2021; MERCALDI *et al.*, 2008; PANILAITIS *et al.*, 2007; SU; CHEN; LIN, 2009). Em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo, a cepa apresentou maior crescimento em meio contendo NaCl em sua composição, pela adaptação da cepa ao seu local de coleta (manguezais de água salobra do litoral cearense), produzindo um agente emulsificante com características semelhantes ao emulsan (D'ALMEIDA, 2022). Assim, este trabalho buscou dar andamento às pesquisas envolvendo esse microrganismo isolado para melhorar a produção, caracterizar e aplicar os agentes de superfície ativa em derramamentos de petróleo em ensaios “*in vitro*”.

Diante do contexto exposto, este trabalho teve como objetivo produzir um emulsificante biológico a partir da cepa *Acinetobacter venetianus* AMO1502, caracterizá-lo e aplicá-lo como agente biorremediador em acidentes ambientais envolvendo derramamentos de petróleo, de modo a incentivar a aplicação de agentes de superfície-ativa de origem biológica.

Para uma melhor apresentação dos resultados obtidos, a dissertação foi dividida na forma de capítulos, explicitados no Anexo A, que se apresentam da seguinte forma:

**Capítulo 1:** Constitui-se de uma revisão bibliográfica que reúne informações a respeito de diversos tópicos, como derramamentos de petróleo no mundo e no Brasil, métodos de remediação, a utilização de dispersantes, a definição de biosurfactantes e bioemulsificantes, suas particularidades, e métodos de produção, aplicação e caracterização.

**Capítulo 2:** Este capítulo apresenta resultados experimentais referentes a produção de um emulsificante pela cepa *Acinetobacter venetianus* AMO1502 (código de acesso MT478042.1 – NCBI) isolada de amostras de óleo contaminante coletadas da praia de Icaraí de Amontada (Amontada, Ceará – Brasil), utilizando glicose como fonte de carbono. Além, dos resultados obtidos dos processos de separação, caracterização e aplicação como agente biorremediador em ensaios *in vitro*.

**Capítulo 3:** Este capítulo foi dedicado à produção de agentes de superfície-ativa a partir da cepa *A. venetianus* AMO1502 utilizando diferentes hidrocarbonetos como fonte de carbono,

avaliando-se a hidrofobicidade celular e a adição de fontes de carbono menos complexas para aceleração do crescimento e produção do agente de interesse.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo principal produzir, caracterizar e aplicar como agente biorremediador, um bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 isolada de um derramamento de petróleo ocorrido na costa de Amontada, Ceará.

### 2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de produção de um emulsificante biológico por uma estirpe de *Acinetobacter venetianus* isolada de amostras de óleo coletadas no município de Amontada-CE.
- Avaliar melhores métodos de recuperação do biocomposto produzido: precipitação ácida, por etanol e por sulfato de amônio.
- Caracterizar a estabilidade do emulsificante biológico em relação ao pH, temperatura e concentração de NaCl.
- Averiguar o potencial do bioproduto produzido como dispersante de contaminações de óleo em meio marinho e na superfície, e contaminante em areia e em rochas de praias.
- Avaliar a ecotoxicidade (fitotoxicidade e citotoxicidade) do bioemulsificante com intuito de entender os possíveis efeitos adversos de sua aplicação em processos biorremediatórios.
- Caracterizar o bioproduto produzido quanto a sua estrutura molecular e características surfactante e emulsificante.
- Avaliar a produção de bioemulsificantes por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 em meio contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono.

---

# CAPÍTULO 1

---

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar dos esforços mundiais para a redução da dependência de petro-derivados, a indústria do petróleo continua sendo uma das mais importantes para a economia contemporânea, sendo avaliada em U\$7.330,80 bi em 2023, com expectativa de crescimento para U\$8.670,91 bilhões até 2027 (*The Business Research Company*, 2023), e representando cerca de 15% do PIB brasileiro (Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP, 2023). A sociedade ainda é muito dependente dessas substâncias para geração de energia (35,3% da energia consumida no mundo todo tem origem na queima de óleos), produção de polímeros, solventes e outros produtos (NASER; DEIAB; DARRAS, 2021). Assim, devido a sua alta demanda, existe um grande fluxo de navios petroleiros pelos mares e oceanos, levando a acidentes frequentes, em especial em grandes rotas comerciais, (GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020; HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012) causando problemas ecológicos pela contaminação, impactando negativamente a economia, vida cotidiana e saúde das pessoas afetadas, com maior gravidade para grupos residentes em áreas litorâneas e que dependem do extrativismo para subsistência (CÂMARA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2022). Os impactos causados por derramamentos de petróleo podem ser observados por muitos anos após o ocorrido devido a lentidão dos processos naturais de degradação. Como um exemplo, cita-se a explosão da plataforma *Deepwater Horizon*, que ocorreu no Golfo do México (Luisiana, Estados Unidos) em 2010, e o derramamento de óleo de 2019 que ocorreu na costa brasileira, cujos impactos continuam afetando o meio ambiente e a economia, oficialmente, até o ano de 2022 (ARNOLD *et al.*, 2022; SOARES *et al.*, 2022; ZENGEL *et al.*, 2022).

Entre as formas mais comuns de se minimizar os impactos causados por derramamentos de petróleo estão o uso de barreiras e *skimmers* (FREITAS *et al.*, 2016), a queima *in situ* (VAN GELDEREN *et al.*, 2015) e a aplicação de dispersantes (ARNOLD *et al.*, 2022). Esses dois últimos métodos são pesadamente regulados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que restringe ou proíbe a queima de óleo a menos de 5,55 km da costa, ilhas, recifes e/ou na presença de mamíferos, répteis e aves no local, e a utilização de dispersante químicos a menos de 2 km da costa (BRASIL, 2015, 2017), devido ao alto impacto ambiental causado por essas técnicas (ARNOLD *et al.*, 2022; COUTO *et al.*, 2020; REBELLO *et al.*, 2014).

Assim, emulsificantes biológicos, vêm sendo estudados como substitutos para os surfactantes químicos. Essas moléculas também são dispersantes, com atividade emulsificante e tensoativa, porém são produzidos por rota microbiana, apresentando menor ecotoxicidade e maior biodegradabilidade (DE FRANÇA *et al.* 2015; FELIX *et al.*, 2019; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; ROCHA *et al.*, 2014). Esses agentes biorremediadores podem ser produzidos por diversos gêneros de bactérias e fungos como, *Acinetobacter* (MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021), *Bacillus* (DE FRANÇA *et al.*, 2022), *Serratia* (DOS SANTOS *et al.*, 2021) e *Candida* (LUNA *et al.*, 2011). Esses emulsificantes biológicos são classificados como biossurfactantes ou bioemulsificantes, termos que se referem a moléculas produzidas por via biológica, com atividade emulsificante e surfactante, mas o termo “bioemulsificante” costuma ser usado em referência a moléculas com menor atividade tensoativa, reduzindo menos a tensão superficial, e maior peso molecular que os “biossurfactantes” (UZOIGWE *et al.*, 2015).

Biossurfactantes e bioemulsificantes são moléculas compostas por regiões polares (hidrofílicas) e apolares (hidrofóbicas), permitindo a interação entre substâncias imiscíveis, como óleo e água, sendo utilizados nas indústrias de cosméticos, de alimentos e farmacêutica, como agentes emulsificantes (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2018; KHOPADE *et al.*, 2012; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019). Esses produtos agem de forma semelhante aos dispersantes químicos, diminuindo a tensão interfacial entre moléculas hidrofóbicas e água, permitindo que agentes naturais, como o vento e ondas, dispersem as manchas em gotas menores que serão mais facilmente degradadas por processos naturais através da evaporação, oxidação pela luz, sedimentação e, principalmente, biorremediação (ARNOLD *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2016). Por tanto, o potencial dessas biomoléculas no tratamento de áreas afetadas por acidentes ambientais também vem sendo estudado pelo seu alto poder emulsificante, aliado a causa de menores efeitos colaterais nos ecossistemas onde serão administrados, como no ambientes em que ocorreu-se derramamento de petróleo (BEZZA; CHIRWA, 2015; BHARALI *et al.*, 2018; CAHYANI; ISMAYANA; YANI, 2022; CHAPRÃO *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2021; LUNA *et al.*, 2017; MORAIS; ABUD, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

Os biossurfactantes e bioemulsificantes são promissores na dispersão do óleo, potencializando outras formas de remediação, como a biorremediação por microrganismos degradadores de óleo, processo natural, mas que ocorre muito lentamente (BARROS *et al.*,

2014; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; WU *et al.*, 2022). Assim, a utilização de emulsificantes biológicos vem se destacando na comunidade científica como alternativa para reduzir manchas de petróleo sem causar grandes impactos ao ambiente.

Entretanto, apesar de todas as vantagens apresentadas, os emulsificantes biológicos costumam ser menos utilizados industrialmente que as opções comerciais, devido aos maiores custos de produção, baixos rendimentos e métodos ainda ineficientes de recuperação do bioproduto, que representam a maior parte dos custos associados com a sua produção (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; ROCHA *et al.*, 2006). Esses obstáculos vêm sendo superados pela utilização novas estirpes microbianas, de novos substratos, a otimização dos parâmetros de produção e novos métodos de separação e purificação que buscam reduzir os custos associados com a produção em larga escala desses agentes (DE FRANÇA *et al.* 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; KEZRANE *et al.*, 2020; KOUTINAS *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2016).

A busca por novas formas de se produzir emulsificantes biológicos tem levado muitos cientistas a buscar novas cepas e novas estratégias para a produção dessas biomoléculas (BEZZA; CHIRWA, 2015; D'ALMEIDA, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; LIRA *et al.*, 2020; TAO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2016). Uma estratégia que vem ganhando destaque é o isolamento de microrganismos a partir de amostras de contaminantes orgânicos hidrofóbicos, já que bactérias degradadoras de hidrocarbonetos normalmente não são abundantes nos meios não-poluídos (HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012). Assim, essa estratégia seleciona microrganismos expostos a esses contaminantes orgânicos, adaptáveis à metabolização de fonte de carbono hidrofóbicas (CHAMANROKH *et al.*, 2008; STANCU, 2022; ZOU *et al.*, 2014).

Um gênero de microrganismo que se destaca é o *Acinetobacter*, que são isolados de amostras de hidrocarbonetos contaminantes (CHAMANROKH *et al.*, 2008; STANCU, 2022). Essas bactérias são conhecidas como produtoras de emulsificantes biológicos de alto poder remediador. Um desses emulsificantes é conhecido como “emulsan”, um lipoheteropolissacarídeo, de alto peso molecular e atividade emulsificante, utilizado principalmente em derramamentos de petróleo, e remoção de metais pesados (KIM *et al.*, 1997; MERCALDI *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019).

Neste capítulo de revisão bibliográfica, buscou-se reunir dados sobre derramamentos de petróleo, impactos e métodos de remediação, definir o que são dispersantes e sua utilização como agentes remediadores, enfatizando os dispersantes biológicos (biossurfactantes e bioemulsificantes), quanto a sua produção e aplicação, em especial o emulsan produzido a partir de bactérias do gênero *Acinetobacter*, que é o foco dessa dissertação.

## 1 DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO

### 1.1. Derramamentos de petróleo e seus impactos ambientais

Apesar dos esforços globais para a diminuição da queima de combustíveis fósseis, o petróleo ainda é a maior fonte de energia utilizada mundialmente (NASER; DEIAB; DARRAS, 2021), gerando um grande comércio de compra e venda desse produto para a produção de combustíveis, reagentes e polímeros. Entretanto, apesar do interesse multinacional pelo produto, as grandes reservas petrolíferas são restritas a poucos lugares, geralmente longe dos grandes mercados, o que resulta em um grande fluxo mundial de navios transportadores. A organização dos países exportadores de petróleo (OPEC) é composta por países, como Arábia Saudita, Angola, Emirados Árabes Unidos, Iraque, Kuwait, Nigéria e Venezuela, que juntos possuem a maior parte das reservas mundiais de óleo do mundo (GUPTA, 2008) e que, somados ao Canadá, Cazaquistão e Rússia, compõem os dez maiores produtores de petróleo do mundo, o que implica em um fluxo petrolífero concentrado nesses países que produzem a maior parte do óleo exportado (30.153.000 barris por dia) (DENÍZ, 2019).

A baixa distribuição das reservas de petróleo pelo mundo e alta demanda mundial gera a concentração de rotas comerciais entre os países produtores de petróleo e os grandes compradores mundiais (Estados Unidos, China, União Europeia, Índia e Japão) (DENÍZ, 2019), que por sua vez está diretamente ligada a quantidade e intensidade dos derramamentos de petróleo (GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020). Assim, as regiões do Atlântico Norte (principalmente o Canal Inglês, Baía de Biscaia, Mar do Norte, Mar Mediterrâneo, Mar do Caribe e Golfo do México), Sul da África, Estreito de Malaca e Mar do Japão concentram a maior parte dos acidentes com derramamentos de petróleo (DUKE, 2016; GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020) e também os de maior intensidade, como apresentado na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1** - Derramamentos de petróleo globalmente mais relevantes das últimas décadas (>200.000 toneladas) e os respectivos métodos de remediação aplicados.

Derramamento	Ano	País	Quantidade de Óleo (t)	Métodos de Remediação Utilizados	Referências
<i>Deepwater Horizon</i>	2010	Estados Unidos	600.000	Dispersantes Químicos	BRAKSTAD; LEWIS; BEEGLE-KRAUSE, 2018; ZENGEL <i>et al.</i> , 2022
<i>Golfo Arábico</i>	1990	Kuwait	500.000-1.000.000	Dispersantes Químicos	PROCTOR; FLATHER; ELLIOTT, 1994
<i>Ixtoc-1</i>	1979	México	480.000	Dispersantes Químicos	BURGHERR, 2007; LINDBLOM; EMERY; LARA, 1981
<i>Atlantic Empress</i>	1979	Trinidade e Tobago	287.000	Dispersantes Químicos	CHEN <i>et al.</i> , 2019; HORN; NEAL, 2005
<i>ABT Summer</i>	1991	Angola	260.000	Dispersantes Químicos	GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020; TAMIS <i>et al.</i> , 2012
<i>Castillo de Bellver</i>	1983	África do Sul	252.000	Dispersantes Químicos	GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020; MOLDAN <i>et al.</i> , 1985
<i>Amoco Cadiz</i>	1978	França	223.000	Dispersantes Químicos e Barreiras	GUNDLACH <i>et al.</i> , 1983; O'SULLIVAN, 1978

Fonte: Autor

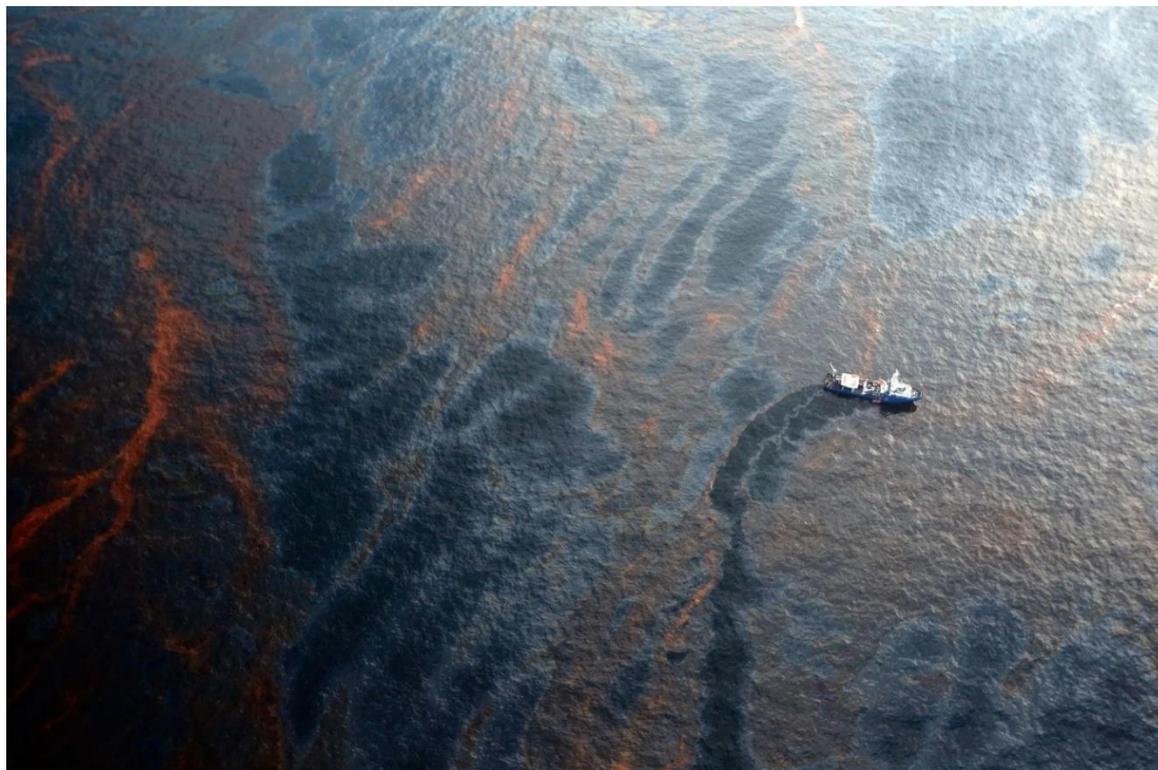
Análises feitas por outros autores (DUKE, 2016; GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020) reforçam a vulnerabilidade das regiões apresentadas devido ao alto fluxo de navios, ressaltando a relação entre número de acidentes com derramamento de petróleo e a quantidade de óleo transportado na área. Em geral, essas áreas tratam-se de regiões de grande vulnerabilidade ambiental, relacionando também as maiores rotas comerciais e a presença de mangues, áreas de vital importância para reprodução de espécies e que são especialmente vulneráveis a derramamentos de óleo (DUKE, 2016).

O alto volume de petróleo derramado em áreas afetadas, como as apresentadas na Tabela 1.1, causou impactos ambientais que seriam sentidos anos após os acidentes, impactando principalmente nesses ambientes de pântanos, mangues e estuários (ARNOLD *et al.*, 2022; CONAN, 1982; DUKE, 2016; ZENGEL *et al.*, 2022). A presença de óleo em ambientes estuarinos é de grande preocupação, devido à sua resistência a degradação, em grande parte devido sua hidrofobicidade, que impede a dispersão, diluição e metabolização do material por microrganismos, podendo persistir por décadas aderido em superfícies (KINGSTON, 2002; REDDY *et al.*, 2002), liberando substâncias tóxicas para organismos enquanto cobre a superfície da água e do solo, importantes para a respiração de animais (DUKE, 2016).

Apesar da remoção do óleo ser possível pela aplicação de métodos de remediação, como a queima *in situ* e a utilização de dispersantes químicos, estes métodos podem causar tantos malefícios ao ambiente quanto o derramamento de óleo em si. A queima do petróleo costuma liberar sólidos contaminantes que se dispersam na água e no ar, enquanto os dispersantes químicos costumam ter alta toxicidade e baixa biodegradabilidade, persistindo e afetando esses lugares já fragilizados pelo derramamento de óleo (DUKE, 2016; KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA; MEDRZYCKA; KARPENKO, 2013; REBELLO *et al.*, 2014). Estima-se que a vegetação dos mangues pode levar mais de 30 anos para se recuperar dos efeitos desses poluentes (DUKE, 2016). Isso se comprova com estudos recentes, que apontam que a vegetação pantanosa do sul dos Estados Unidos ainda não se recuperou dos eventos acidente *Deepwater Horizon*, Golfo do México (Luisiana, Estados Unidos), mesmo após mais de 20 anos do ocorrido (ZENGEL *et al.*, 2022).

Essa cura lenta do meio ambiente ocorre devido a fatores como a viscosidade do óleo, a sensibilidade da vegetação local, a exposição repetida desses organismos a esses poluentes e a utilização de métodos agressivos de limpeza, como a utilização de surfactantes químicos, que pode causar danos diretos a vegetação ou ao solo (ZENGEL *et al.*, 2022). Estima-se que 6,81 milhões de litros de COREXIT™ EC9527A e COREXIT™ EC9500A, emulsificantes químicos, tenham sido utilizados na remediação de áreas atingidas pelo derramamento de petróleo *Deepwater Horizon* (Figura 1.1), uma quantidade de dispersante sem precedentes, que causou problemas não só para o meio-ambiente, mas também para aqueles que possam ter inalado os aerossóis de dispersante despejado no local (ARNOLD *et al.*, 2022).

**Figura 1.1-** Embarcação coletando óleo do derramamento de óleo causado pela explosão da plataforma *Deepwater Horizon* (2010).



Fonte: GRAYTHEN, C. Getty Images. Disponível em: <https://www.nytimes.com/2020/04/19/climate/deepwater-horizon-anniversary.html>. Acesso em 02/12/2022.

## 1.2 Derramamentos de petróleo no Brasil

Devido a localização geográfica do Brasil e sua distância de grandes rotas petrolíferas, ocorreram poucos derramamentos de petróleo com volume elevado quando comparado a outros países (DUKE, 2016; GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020). Entretanto, quando comparado com os demais países da América do Sul, o Brasil tem uma concentração maior de acidentes que outros países da região (GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020), em especial a região centro-sul do país, que registra a maior parte dos derramamentos das últimas décadas. No entanto, mais recentemente, a região Nordeste também vem reportando um volume considerável de óleo encontrado em suas margens, em especial após o derramamento de 2019 causado pelo navio *Boubolina* que derramou mais de 5300 toneladas de óleo na costa da região (BURGHERR, 2007; SOARES *et al.*, 2022).

Nota-se que a maioria dos acidentes expressivos no litoral brasileiro aconteceu na região Sudeste, próximos aos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, apresentados na Tabela 1.2, que são maiores produtores de petróleo do país (SOUSA; GOMES, 2022). Essa produção se deve

pela proximidade desses estados com as maiores bacias de petróleo do país, como a Bacia de Santos e de Campos, que representa a maior área do pré-sal brasileiro (SOUSA; GOMES, 2022).

**Tabela 1.2** - Acidentes ambientais de grandes proporções relacionados a derramamentos de petróleo ocorridos no Brasil.

Local do Derramamento	Ano	Estado	Quantidade de Óleo	Origem do Vazamento	Referências
Baía de Guanabara	1975	Rio de Janeiro	6.000 t	Embarcações	(HERCULANO, 2012)
Bertioga	1983	São Paulo	3.000.000 L	Oleoduto	(INFANTE <i>et al.</i> , 2008)
Baía de Guanabara	2000	Rio de Janeiro	1.300.000 L	Oleoduto	(CIOTTI <i>et al.</i> , 2009)
Bacia de Campos	2001	São Paulo	86.000 L	Embarcações	(CARMONA; GHERARDI, DOUGLAS FRANCISCO MARCOLINO; TESSLER, 2003)
Derramamento de 2019	2019	Estados do Nordeste, Rio de Janeiro e Espírito Santo.	5.380 t	Embarcações	(SOARES <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Autor

O aumento da produção de óleo no Nordeste e o desenvolvimento acelerado da região podem estar direcionando a região a um maior risco de acidentes ambientais, o que se refletiu no grande acidente ambiental que afetou praias dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, além de alguns estados do Sudeste, em 2019.

Desde então acidentes menores também vem ocorrendo, ainda que não tão expressivos como o de 2019, como em 2022 quando foram encontradas novas manchas de óleo no litoral do nordeste oriundas de limpezas realizadas em tanques petroleiros (CARNEIRO & TORTELLA, 2022). Essas contaminações menores costumam ser comuns, causadas de forma rotineira por acidentes habituais como a limpeza de navios, vazamentos em oleodutos ou poluições de origem industrial (CHEN *et al.*, 2019; GALIERIKOVÁ; MATERNA, 2020).

### 1.3 Acidente ambiental de 2019 no Nordeste Brasileiro

A costa brasileira exerce grande importância ecológica, compreendendo praias, estuários, recifes e mangues, além da existência de recifes de corais onde habitam espécies ameaçadas de extinção, e também é onde se encontra a maior parte da população brasileira (ESCOBAR, 2019). Em agosto de 2019, a nação brasileira foi surpreendida com diversos relatos sobre manchas de óleo que apareciam nas praias do seu litoral, rapidamente se espalhando pela maioria dos estados litorâneos (dos 17 estados litorâneos, 11 foram afetados), sendo o maior acidente envolvendo derramamento de óleos que aconteceu no Brasil ou em águas tropicais até a presente data (SOARES *et al.*, 2020, 2022).

O Nordeste é uma região de alta vulnerabilidade econômica à derramamentos de petróleo devido sua posição geográfica, em especial os estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Rio Grande do Norte, que foram severamente afetados pelo derramamento de óleo de 2019 (CÂMARA *et al.*, 2021). Essa vulnerabilidade está ligada a proximidade e dependência econômica de atividades ligadas ao mar, além de sua alta população (IBGE, 2018). O Nordeste compreende três das dez maiores regiões metropolitanas do Brasil (Fortaleza, Salvador e Recife), as quais apresentam altos índices de vulnerabilidade socioeconômica a derramamentos de petróleo, um índice que avalia a sensibilidade a acidentes ambientais em relação à dependência dessas áreas para atividades econômicas, em comparação com o resto do país. Por exemplo, o Índice de Vulnerabilidade (IV), aponta que os estados da Bahia (IV: 106.951), Pernambuco (IV: 68.751), Ceará (IV: 58.770) e Rio Grande do Norte (IV: 47.511), são os mais vulneráveis a impactos causados por derramamentos de petróleo, representando 28,0%, 18,0%, 15,4% e 12,44% da vulnerabilidade econômica total da Região Nordeste, respectivamente (CÂMARA *et al.*, 2021).

Apesar do óleo ter se espalhado também para a região Sudeste (RJ e ES), estima-se que 99,88% de todo o óleo derramado permaneceu na região Nordeste, região caracterizada pela alta concentração demográfica na faixa litorânea (oito dos nove estados do Nordeste têm suas capitais no litoral) e alta dependência de atividades marinhas, como extrativismo e turismo, para a geração de renda (SOARES *et al.*, 2022).

Pesquisas indicavam a redução do turismo e outras atividades econômicas nas regiões afetadas, por consequência, a redução de empregos e a piora na qualidade de vida da população, em especial para parcela das pessoas com menor renda, principalmente os pescadores

tradicionais, pela contaminação do pescado, que diminuiu a disponibilidade, vendas e o valor desses alimentos, como representado pela Figura 1.2 (MAGRIS; GIARRIZZO, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2022). Apesar de todos o setor de pescados ter sido afetado, devido o maior impacto do óleo em regiões de mangue, as comunidades dependentes da coleta de ostras, conchas e mexilhões foram os mais afetados, comunidades já consideradas de alto risco social e em situação de insegurança alimentar (MAGRIS; GIARRIZZO, 2020; SOARES *et al.*, 2022).

**Figura 1.2** - Foto do derramamento de óleo ocorrido no Brasil em 2019, destacando o impacto aos pescadores tradicionais.



Fonte: SPINASSÉ, R. Folhapress. Disponível em: <https://veja.abril.com.br/brasil/vida-em-corais-sofre-queda-de-47-apos-vazamento-de-oleo-diz-pesquisa/>. Acesso em: 04/12/2022.

Além dos impactos socioeconômicos, esse acidente também causou grandes impactos ambientais. O derramamento atingiu pelo menos 57 áreas de praia ou de mar protegidas, sendo Bahia (15 áreas de praia ou de mar protegidas), Ceará (oito áreas) e Pernambuco (sete áreas) os estados com maior número de áreas de preservação ambiental afetadas, que estão entre os estados mais vulneráveis a esses acidentes (CÂMARA *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2020).

O Ceará foi um dos estados mais afetados pelo derramamento de petróleo, onde foram coletadas 39,76 t de óleo, representando cerca de 1% do óleo recolhido no país, entretanto foi

o segundo estado com maior número de unidades de conservação afetadas, onde oito áreas protegidas foram contaminadas (SOARES *et al.*, 2020). O estado também é muito dependente do turismo, que representava cerca 12,7% do PIB estadual (Sentur-CE, 2020), cujo crescimento caiu cerca de 9% do segundo para o terceiro trimestre de 2019, resultante do derramamento de petróleo que ocorreu na região, o que resultou na diminuição da geração de empregos e atividade econômica no estado, que só apresentou recuperação no ano de 2021, após o fim do *Lockdown* aplicado durante a pandemia de COVID-19 (IPECE, 2023). No entanto, é possível notar uma concomitância temporal entre os efeitos resultantes do incidente de vazamento de petróleo ocorrido em 2019 e a pandemia de COVID-19 em 2020 sobre a indústria do turismo, assim apresentando desafios significativos no processo de interpretação e análise dos conjuntos de dados.

Dentre os muitos ecossistemas atingidos, estuários e mangues foram os mais afetados, como foi observado também em derramamentos anteriores que ocorreram em outros países (DUKE, 2016; SOARES *et al.*, 2022; ZENGEL *et al.*, 2022). Essas regiões são de suma importância para a reprodução de peixes e crustáceos consumidos na região, como a sardinha-bandeira, biquara, saporuna e pirá (APOLIANO; SOARES FILHO; ASANO, 2020). Apesar de estudos sobre os impactos a longo prazo em populações locais, é sabido que esses ecossistemas podem demorar décadas para se recuperarem da exposição ao óleo com base em eventos anteriores (ZENGEL *et al.*, 2022). Entretanto, impactos agudos foram identificados em populações de equinodermos, poliquetos e esponjas com evidências de ingestão de óleo, impactando na rede alimentar e o equilíbrio ambiental das regiões afetadas (SOARES *et al.*, 2022).

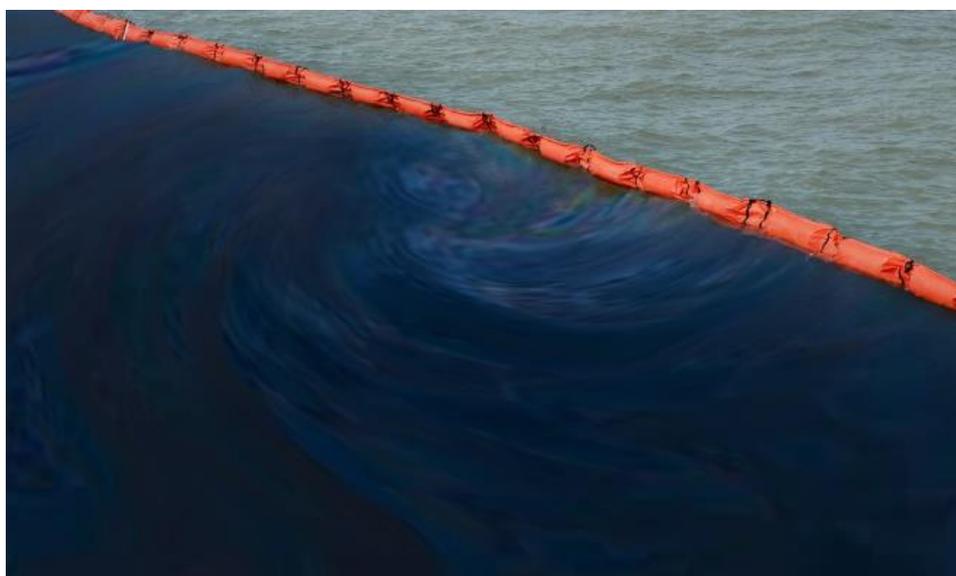
## 2 REMEDIAÇÃO DE DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO

Apesar dos esforços para evitar os derramamentos de petróleo, estes acidentes costumam ocorrer frequentemente, assim algumas estratégias foram desenvolvidas para mitigar os seus impactos, que devem ser aplicadas de acordo com a situação apresentada, como as condições climáticas, espessura do óleo e distância para a costa (DE OLIVEIRA, 2016; HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012). A seguir serão descritos os métodos mais comuns de remediação aplicados para conter derramamentos de petróleo.

## 2.1 Barreiras de contenção

As barreiras de contenção ou barreiras absorventes, exemplificadas na Figura 1.3, são utilizadas para conter o óleo na superfície da água, para que não se espalhe, mantendo-o aprisionado de forma a facilitar seu recolhimento ou queima (VENTIKOS *et al.*, 2004). Para tal, essas barreiras precisam ser resistentes a condições de temperatura e a força de correntezas, bem como serem flexíveis e capazes de se ajustar ao movimento da água, de modo a permanecer sobre a lâmina de água, impedindo o espalhamento do óleo (DE OLIVEIRA, 2016).

**Figura 1.3** - Barreiras de contenção utilizadas para conter derramamentos de óleo em ambiente marinho.



Fonte: BASF. Disponível em: [https://www.basf.com/global/press-photos/en/photos/2019/05/P228\\_oil%20spill%20barrier.jpg.assetdownload.jpg](https://www.basf.com/global/press-photos/en/photos/2019/05/P228_oil%20spill%20barrier.jpg.assetdownload.jpg) Acesso em: 28/08/2022.

A utilização de barreiras de contenção é comumente utilizada nos momentos seguintes ao vazamento ou para proteger ambientes mais sensíveis ao derramamento (DE OLIVEIRA, 2016; O'SULLIVAN, 1978), porém, caso o método não seja aplicado com celeridade, o óleo se espalhará pela superfície mais rapidamente do que as embarcações que carregam as barreiras, devido à ação do vento e ondas, assim as condições climáticas e o tempo até a notificação das autoridades tem grande impacto na eficiência desse método (TAMIS *et al.*, 2012).

Essa técnica também necessita do auxílio de outros equipamentos, como *skimmers*, que são recolhedores de óleo, para que ocorra de fato a remoção dos poluentes da superfície

marinha. Assim, a aplicabilidade dessa técnica depende da resposta rápida ao derramamento, condições climáticas favoráveis e das características físico-químicas do óleo derramado (LYRA, 2013).

Desse modo, devido a necessidade de respostas rápidas das autoridades competentes e a dificuldade da sua aplicação em clima adverso faz com que a utilização de barreiras de contenção apresente baixa eficiência em relação a outras técnicas, apesar de apresentar baixos riscos ambientais colaterais advindos de sua utilização (LYRA, 2013).

## 2.2 Queima *in situ*

A queima *in situ*, demonstrada na Figura 1.4, é uma técnica que consiste na combustão do óleo ainda na superfície do mar, retido por barreiras de contenção resistentes a chamas. Apesar de eficiente, removendo-se rapidamente o óleo de áreas afetadas, em especial no caso de óleos mais viscosos, e de ser utilizada em muitos países da Europa e nos Estados Unidos, ela apresenta uma série de riscos ambientais (VAN GELDEREN *et al.*, 2015).

**Figura 1.4** - Queima *in situ* utilizada para remediação de derramamento de óleo em condições climáticas adequadas.



Fonte: NPR. Disponível em: [https://media.npr.org/assets/img/2017/03/21/controlledburnuscg\\_cc\\_custom0cf3bfe960f6833f025196cd50cda49b84a6cd3f.jpg](https://media.npr.org/assets/img/2017/03/21/controlledburnuscg_cc_custom0cf3bfe960f6833f025196cd50cda49b84a6cd3f.jpg) Acesso em: 28/08/2022.

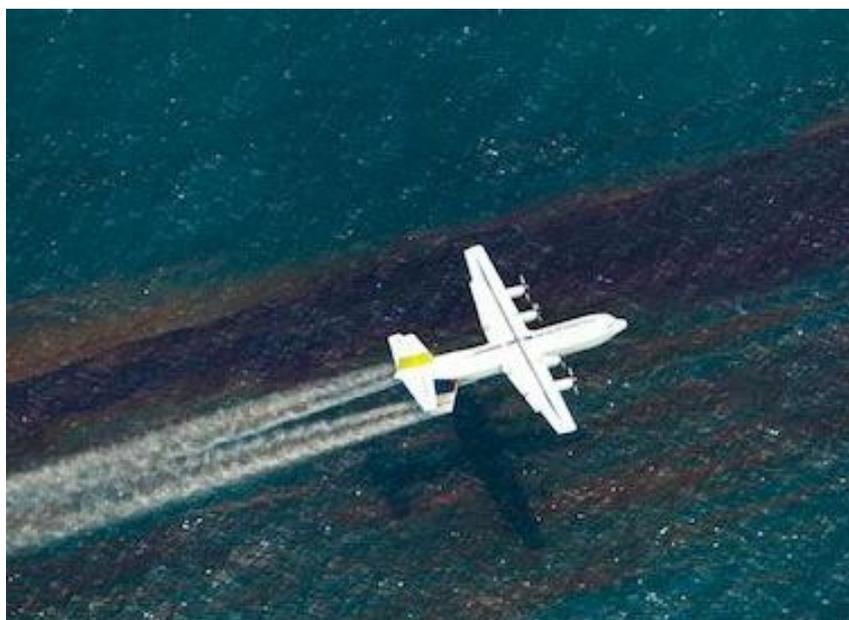
A queima de óleo costuma gerar resíduos pesados que afundam e alteram a composição química da água, e resíduos leves que alteram a qualidade do ar, além de afetar a temperatura

do local. Para aplicação dessa técnica é necessário que a camada de óleo tenha espessura suficiente para a queima e que o óleo não esteja emulsionado (VAN GELDEREN *et al.*, 2015). Além disso, as condições ambientais também devem ser avaliadas, já que ventos e ondas muito fortes podem atrapalhar a queima e espalhar a fumaça, assim faz-se necessário um maior cuidado durante a ignição (DE OLIVEIRA, 2016; VAN GELDEREN *et al.*, 2015). Devido a estes efeitos colaterais, essa estratégia só foi regulamentada no Brasil recentemente, pela resolução nº 482, de 2017, ainda sendo necessário notificar-se as autoridades e respeitar-se a distância mínima de 5,56 km de costas e ilhas e, e a profundidade mínima de 20 metros antes da aplicação (BRASIL, 2017).

### 2.3 Dispersantes

A utilização de dispersantes químicos, como o COREXIT™ (ARNOLD *et al.*, 2022), é muito comum em derramamentos de petróleo pelo mundo, como apresentado na Figura 1.5 e Tabela 1.1, apresentando vantagens consideráveis em relação aos outros métodos, como a possibilidade da utilização durante climas adversos ou quando o óleo já está bastante disperso, assim como a dispensabilidade de armazenamento para o óleo (DE OLIVEIRA, 2016).

**Figura 1.5** - Avião aplicando dispersantes sobre mancha de petróleo.



Fonte: ENCICLOPÉDIA PUGET SOUND. Disponível em: [https://www.eopugetsound.org/sites/default/files/topical\\_article/images/c-130\\_dispersants\\_deepwaterhorizon\\_noaa.jpg](https://www.eopugetsound.org/sites/default/files/topical_article/images/c-130_dispersants_deepwaterhorizon_noaa.jpg).

Acesso em: 28/08/2022.

A utilização dos surfactantes químicos promove a emulsão do óleo na água, diminuindo o tamanho das gotas, que poderão então ser degradadas por efeito da evaporação, da fotooxidação ou biorremediação, fenômenos naturais que demorariam anos para ocorrer sem a ajuda desses agentes químicos, como em acidentes anteriores, nos quais observou-se a persistência do óleo por pelo menos 30 anos após o derramamento (ARNOLD *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2016; KINGSTON, 2002; REDDY *et al.*, 2002). Assim, a aplicação de dispersantes costuma ser um dos métodos mais aplicados em grandes acidentes ambientais, isto é, quando há vazamento de uma quantidade de óleo grande demais para ser recolhido ou queimado, havendo sido aplicada em diversos acidentes no passado, inclusive nos maiores acidentes com derramamento de petróleo já registrados: a explosão da plataforma *Deepwater Horizon* (ARNOLD *et al.*, 2022), o acidente ambiental do Golfo Árabe (PROCTOR; FLATHER; ELLIOTT, 1994) e a explosão do poço *Ixtoc 1* (LINDBLOM; EMERY; LARA, 1981).

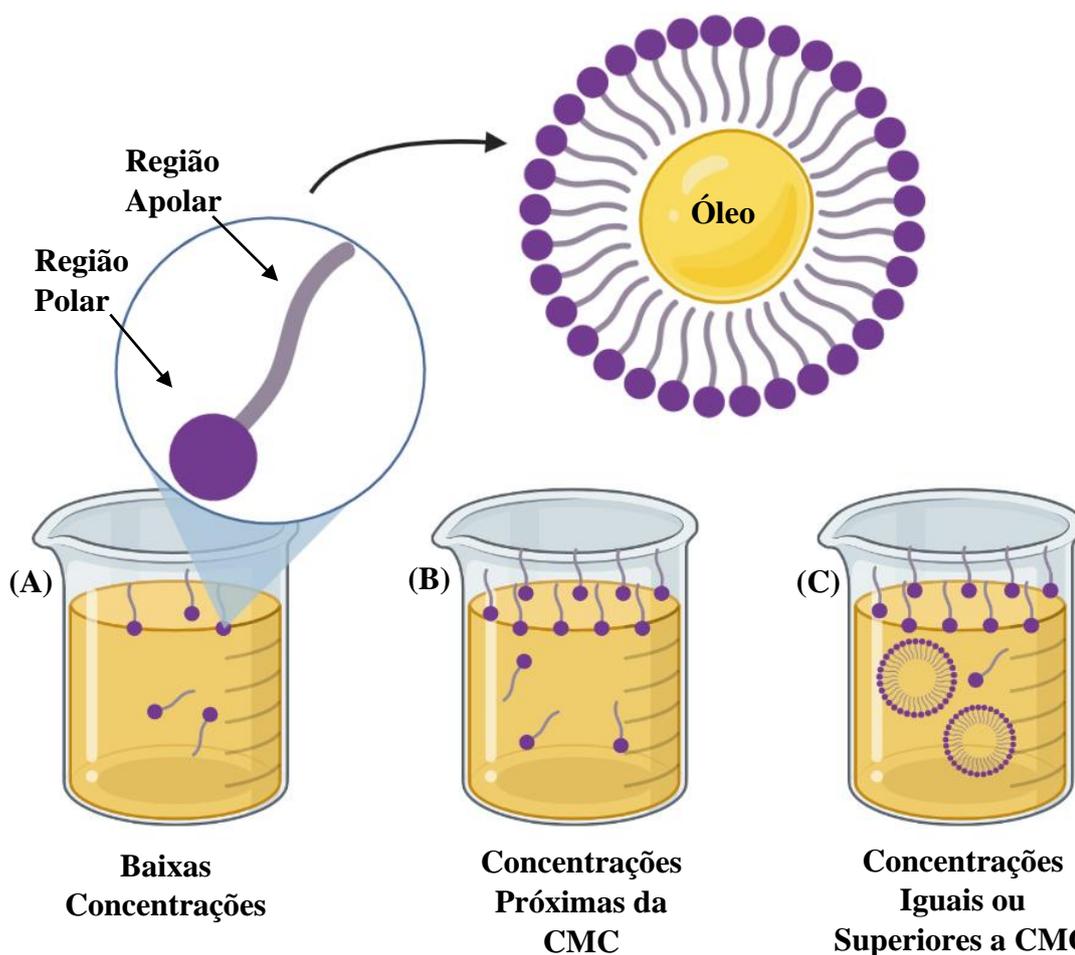
A utilização de dispersantes químicos também traz uma série de desvantagens devido a sua alta toxicidade, por exemplo, o COREXIT™, surfactante vastamente utilizado em remediação de derramamentos de petróleo, apresenta concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>) de 20,7 mg L<sup>-1</sup> (COREXIT, 2019), sendo caracterizado como uma substância altamente tóxica (UNIÃO EUROPÉIA, 2006). A presença de surfactantes químicos no ar também pode causar problemas respiratórios e desconfortos em populações expostas diretamente durante a remediação (ARNOLD *et al.*, 2022). Assim, utilização de surfactantes químicos também está diretamente ligado a demora na recuperação de áreas afetadas por derramamento de petróleo, apesar de seus efeitos crônicos ainda serem pouco conhecidos (ZENDEL *et al.*, 2022).

Surfactantes são substâncias anfífilas, isto é, que em sua estrutura possuem uma parte polar (hidrofílica, chamada de cabeça) e uma parte apolar (hidrofóbica, chamada de cauda), assim sendo capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial de líquidos imiscíveis (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002). O termo surfactante vem de *agente de superfície-ativa*, o que indica que eles são capazes de interagir com a superfície da água e com as pontes de hidrogênio, causando uma redução da entalpia por unidade de área do líquido, fazendo com que emulsões ocorram mais facilmente (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

Quando a concentração de um surfactante no meio é suficientemente alta a tensão superficial deixa de cair e o composto se agrupa em aglomerados moleculares denominados “micelas”. A concentração em que a primeira micela é formada é denominada concentração

micelar crítica (CMC), exemplificada na Figura 1.6, e é intrínseca de cada surfactante, normalmente variando entre 1-200 mg L<sup>-1</sup> (MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021). Essa característica promove a interação entre água e substâncias hidrofóbicas e podem ser utilizadas para auxiliar em limpezas pelas emulsões formadas que solubilizam o óleo, aumentando a biodisponibilidade do óleo para os microrganismos e facilitam a adsorção por outros métodos (BARROS *et al.*, 2014; D'ALMEIDA, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

**Figura 1.6** - Representação de um agente surfactante, apontando a polaridade de suas regiões (hidrofílicas e hidrofóbicas), e o comportamento de moléculas de surfactantes em baixas concentrações (A), próximas ao CMC (B) e superiores ao CMC (C).

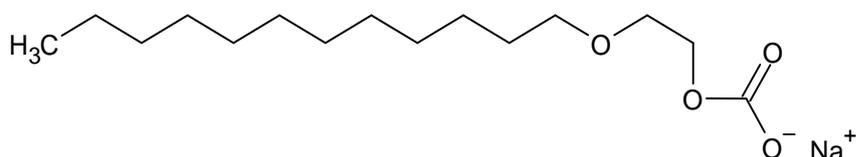


Fonte: Elaborado pelo próprio autor utilizando a versão online gratuita de BioRender (<https://www.biorender.com/>)

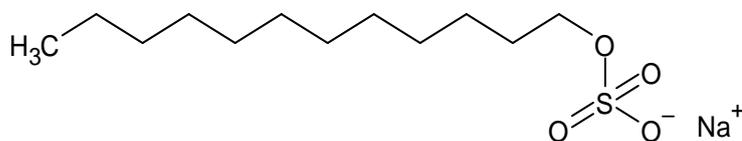
Surfactantes químicos são produzidos por rota sintética geralmente a partir de derivados do petróleo e compostos sulfurados e este composto costumam ser classificadas quanto à carga da sua região polar, sem classificadas como aniônicos, catiônicos, não-iônicos e anfóteros.

A maioria dos surfactantes aniônicos, exemplificados na Figura 1.7, são monovalentes e apresentam  $\text{Na}^+$  como contraíon (Dodecil sulfato de sódio, lauril sulfato de sódio etc.), entretanto existem surfactantes divalentes e/ou cujo contraíon é  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  ou aminas protonadas, que são produzidos com propósitos mais específicos. Surfactantes aniônicos são a classe de surfactantes mais utilizada industrialmente devido ao seu menor custo de produção e alto potencial emulsificante em meio alcalino (KHIRE, 2010).

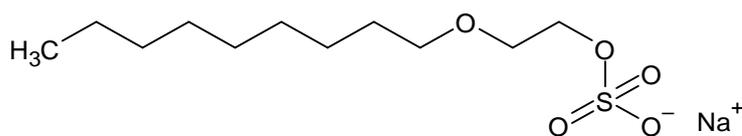
**Figura 1.7** - Estruturas de surfactantes aniônicos.



Sal de ácido lauril carboxílico

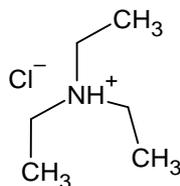


Dodecil sulfato de sódio

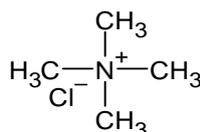


Lauril sulfato de sódio

Surfactantes catiônicos, exemplificados na Figura 1.8, costumam ser formados por aminas de cadeias longas ou sais de quaternários de amina, sendo as vezes sensíveis a pHs mais elevados (exceto compostos quaternários de amônio), e aderem a superfícies sólidas, agindo como inibidores de corrosão, germicidas e lubrificantes (KHIRE, 2010).

**Figura 1.8** - Estruturas de surfactantes catiônicos.

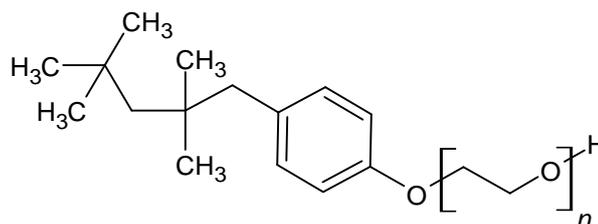
Cloreto de trietilamina



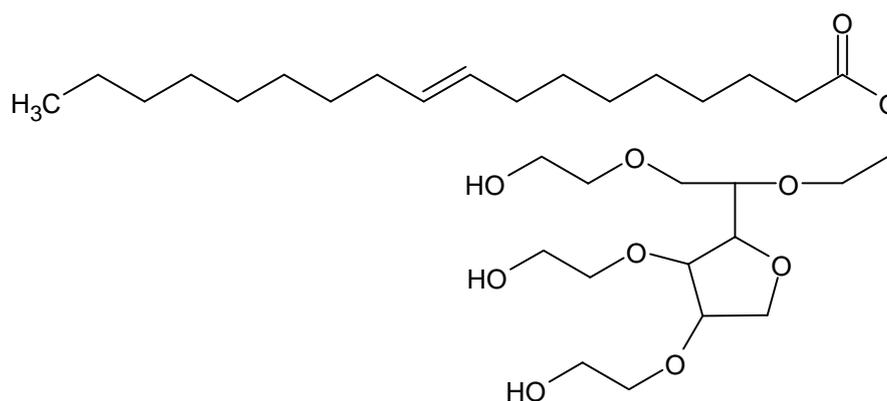
Cloreto de tetrametilamônio

Fonte: Autor.

Surfactantes não-iônicos, apresentados na Figura 1.9, apresentam grupos poliéter ou polihidroxil como região polar (cabeça), eles são compatíveis para utilização associada com todos os outros tipos de surfactantes e tendem a formar pouca espuma, o que torna eles úteis como agentes redutores de tensão superficial sem a formação de camadas de espuma sobre a superfície, o que é útil na indústria de alimentos e na remoção de solo de fibras hidrofóbicas (KHIRE, 2010).

**Figura 1.9** - Estruturas de surfactantes não-iônicos.

Triton X-100

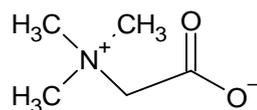


Tween 80

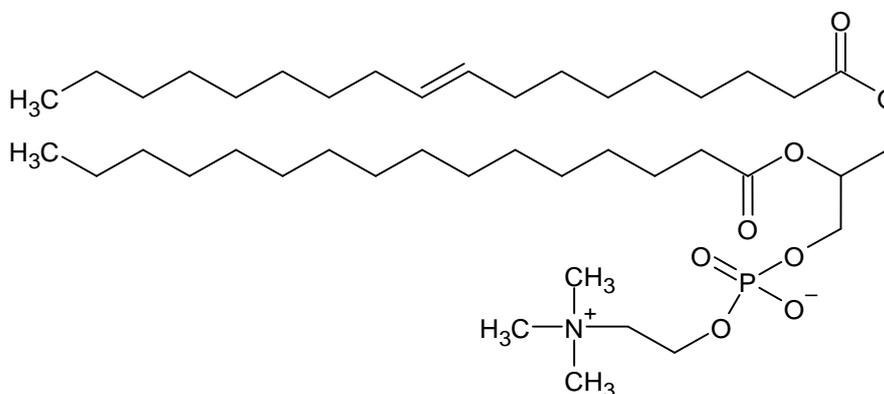
Fonte: Autor.

Surfactantes anfóteros (ou Zwitterionicos), apresentados na Figura 1.10, contém duas cargas, uma positiva e uma negativa. Normalmente a carga positiva é composta por amônio e a negativa é em geral um boxilato, podendo variar mais facilmente que a carga positiva. Esses surfactantes são utilizados na indústria têxtil para prover maciez à materiais, sendo compatíveis com outros surfactantes. Essa classe de surfactantes apresenta comportamento diferente dependendo do pH do meio, apresentando comportamento catiônico em pH ácido e aniônico em pH alcalino, sendo utilizados na química fina, como na formulação de pesticidas, para combinar com produtos específicos (KHIRE, 2010).

**Figura 1.10** - Estruturas de surfactantes anfóteros.



Trimetilglicina



Lecitina

Fonte: Autor.

Os emulsificantes químicos são largamente utilizados em derramamentos de petróleo, em especial em formulações compostas por misturas de mais de uma substância, como o COREXIT™ 9500, composto por surfactantes aniônicos e não-iônicos (JOHN *et al.*, 2016). Esses emulsificantes químicos utilizados em derramamentos são conhecidos por causar efeitos adversos em ecossistemas já fragilizados pelo derramamento do petróleo, diminuindo a qualidade da água e intoxicando os organismos vivos, mesmo em baixas concentrações, como demonstrado pelo seu CL<sub>50</sub> apresentado na Tabela 1.3, (KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA; MEDRZYCKA; KARPENKO, 2013). Desse modo, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da resolução nº 472, de 2015, restringe a utilização de emulsificantes químicos a menos de 2 km da costa e em áreas de preservação ambiental, sendo também necessária aprovação do conselho antes da aplicação da técnica (BRASIL, 2015).

**Tabela 1.3** - Concentração letal para 50% (CL<sub>50</sub>) de alguns surfactantes químicos, para microcrustáceos do gênero *Artemia*.

Surfactante sintético	CL <sub>50</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Referência
COREXIT™	20,7	COREXIT, 2019
Dodecil sulfato de sódio	8,5	EKONOMOU <i>et al.</i> , 2019
Lauril sulfato de sódio	8,8	EKONOMOU <i>et al.</i> , 2018
Triton X-100	3,3	EDWARDS; LEPO; LEWIS, 2003

Fonte: Autor

Um método que vem ganhando destaque é a biorremediação assistida por agentes de superfície ativa de origem biológica, devido ao seu alto poder emulsificante, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade. Esses bioprodutos são muito estudados pelo seu potencial para emulsionar óleos de diferentes viscosidades, facilitando a degradação por efeitos naturais, tais como a biorremediação, sendo por vezes mais eficientes que os surfactantes sintéticos (BEZZA; CHIRWA, 2015; BHARALI *et al.*, 2018; CAHYANI; ISMAYANA; YANI, 2022; CHAPRÃO *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2021; FELIX *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2016; KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA; MEDRZYCKA; KARPENKO, 2013; LUNA *et al.*, 2017; MORAIS; ABUD, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

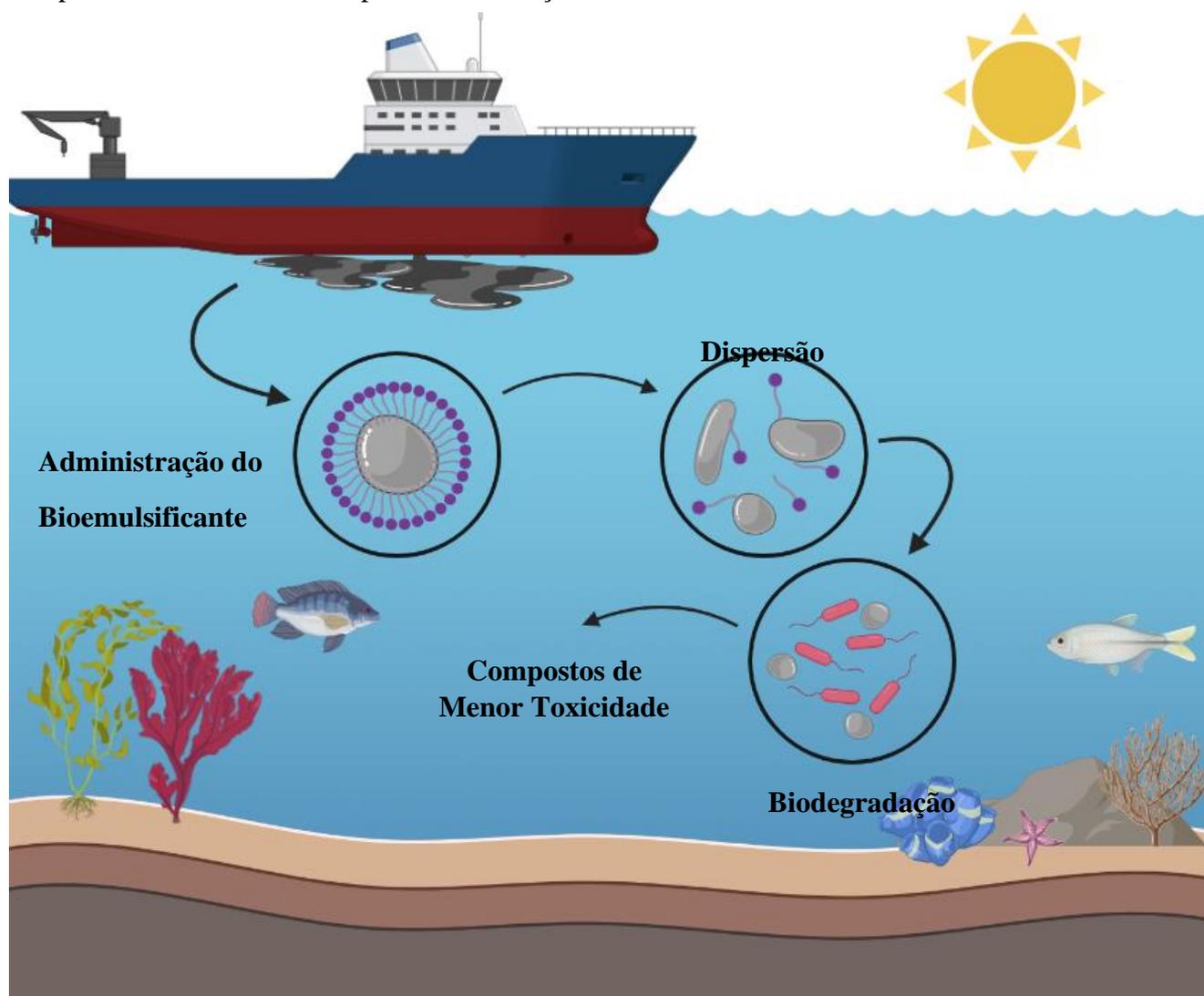
## 2.4 Biorremediação

Como expresso anteriormente, a utilização de emulsificantes biológicos é diversa, podendo ser aplicados nos mais diversos setores da indústria. Uma utilização que vem chamando a atenção de cientistas é a biorremediação onde um emulsificante, ou uma cepa microbiana, é aplicada em uma área poluída por compostos hidrofóbicos para aumentar a biodisponibilidade desses poluentes para microrganismos degradadores (*in situ*), ou quando o contaminante é remediado em reatores fora do local do derramamento (*ex situ*) (D'ALMEIDA, 2022; HENTATI *et al.*, 2021; JOSHI; DESAI, 2013; THRONE-HOLST *et al.*, 2006). Em ambos os casos, utilização de microrganismos originários do local do acidente é eficiente para processos de biorremediação, já que não há necessidade de adaptá-los ao novo *habitat*, ou o biosurfactante utilizado já faz parte da rota metabólica da biota local (BACH; GUTNICK, 2006; BHARALI *et al.*, 2018).

Nos últimos anos muitos estudos vêm demonstrado o potencial de emulsificantes biológicos na dispersão de óleos pesados e contaminantes orgânicos (ATAKPA *et al.*, 2022; D'ALMEIDA, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2020; MILAGRE *et al.*, 2018;

MORAIS; ABUD, 2012). Essa utilização costuma acelerar o processo de biorremediação, que é o processo natural de degradação de óleos e outros poluentes hidrofóbicos por ação microbiana, que metaboliza essas substâncias, convertendo-as em compostos de menor toxicidade (THRONE-HOLST *et al.*, 2006), requerendo menor energia. Entretanto, apesar da maior parte dos hidrocarbonetos serem biodegradáveis, a taxa de degradação do poluente pode ser limitada pela baixa biodisponibilidade desses óleos no meio aquoso devido a hidrofobicidade dessas substâncias (BHARALI *et al.*, 2018; RADZUAN; BANAT; WINTERBURN, 2017). Assim, a utilização desses agentes de superfície-ativa, exemplificadas na Figura 1.11, pode atuar na dispersão e emulsão de óleos poluentes e no aumento da sua biodisponibilidade, potencializando a biorremediação por microrganismos (ZHANG *et al.*, 2017).

**Figura 1.11** - Fluxograma representando o processo de biorremediação de derramamento de petróleo *in situ* acelerado pela administração de bioemulsificantes.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor utilizando a versão online gratuita de BioRender (<https://www.biorender.com/>)

### 3 BIOSURFACTANTES E BIOEMULSIFICANTES

#### 3.1 Definição e aplicações

Biossurfactantes e bioemulsificantes são termos que muitas vezes são utilizados para se referir a moléculas com características diferentes, mas que tem a função semelhante de promover e estabilizar emulsões. O primeiro se refere a moléculas de baixo peso molecular e com alto poder surfactante, isto é, são poderosos agentes de redução da tensão superficial, enquanto os bioemulsificantes por vezes são chamados de “biopolímeros” ou “polissacarídeos” devido ao maior peso molecular, e sendo capazes de promover emulsões mais estáveis que os biossurfactantes mesmo em baixas concentrações, mas sendo ineficientes na redução da tensão superficial (baixa atividade surfactante) (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; THRAEIB *et al.*, 2022; UZOIGWE *et al.*, 2015).

Essa diferença molecular entre biossurfactantes e bioemulsificantes vêm gerando questionamentos na comunidade científica, em especial quanto a classificação dos bioemulsificantes, se são um grupo de biossurfactantes, ou possuem particularidades moleculares suficientes para que sejam caracterizados como um grupo distinto (UZOIGWE *et al.*, 2015).

Biossurfactantes são classificados de forma diferente aos surfactantes químicos, sendo diferenciados pela natureza bioquímica da molécula, assim sendo classificados em dois grupos principais, pelo seu peso molecular, apresentados na Tabela 1.4. Dentre os biossurfactantes mais comumente isolados, destacam-se os glicolipídeos que contém açúcares rhamnose e trehalose pela fácil produção e separação, e dentre os bioemulsificantes destacam-se os lipoheteropolissacarídeos, como o emulsan, por ser um potente agente emulsificante extracelular (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; MERCALDI *et al.*, 2008).

**Tabela 1.4** - Emulsificantes biológicos: classificação dos principais grupos, microrganismos produtores e principais aplicações.

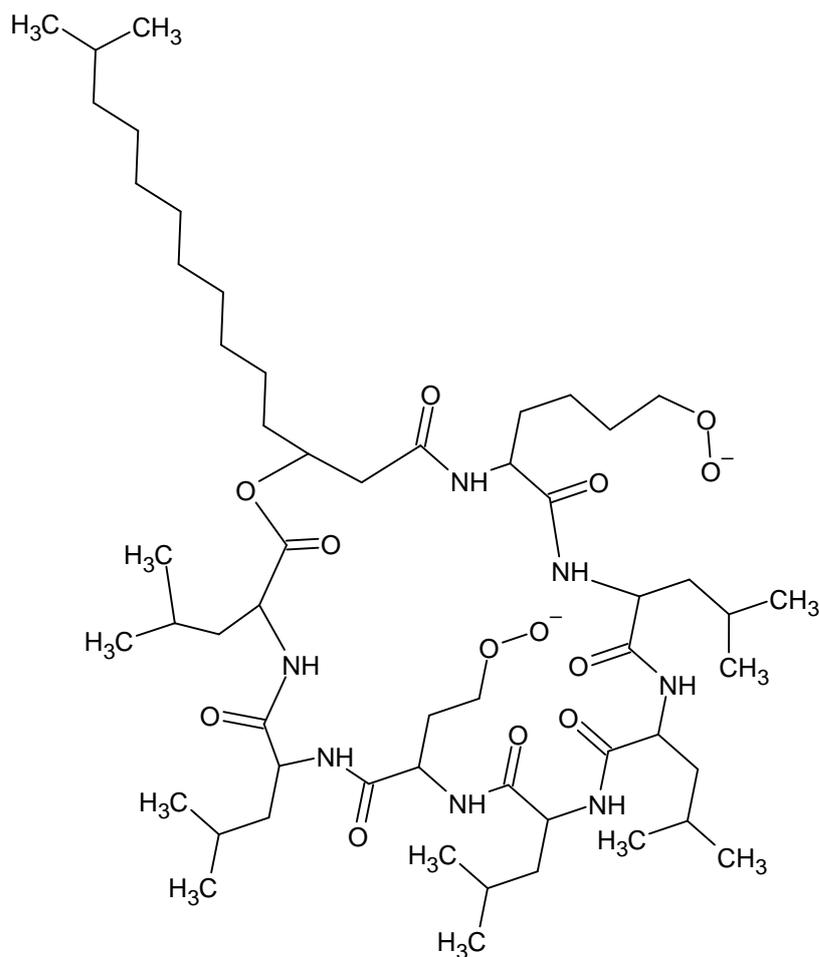
Peso molecular	Tipo de surfactante	Exemplos de microrganismo produtores	Utilização	Referências
Baixo (Biossurfactantes)	Lipopetídeos	<i>Acinetobacter</i> sp. D3-2, <i>Acinetobacter junii</i> B6 <i>Bacillus subtilis</i> CN2	Biodegradação e biorremediação.	BEZZA; CHIRWA, 2015; MUTAI <i>et al.</i> , 2014; OHADI <i>et al.</i> 2018
	Glicolipídeos	<i>Candida antarctica</i> , <i>Shewanella algae</i> B12, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> HAK01	Bactericida, degradação de óleos e MEOR.	GHARAEI <i>et al.</i> , 2022; KHADEMO LHOSSINI <i>et al.</i> , 2019; KIM <i>et al.</i> , 2002
Alto (Bioemulsans ou Bioemulsificantes)	Lipo-heteropolissacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1, <i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	Biorremediação, entrega de medicamentos e emulsificante.	ALIZADEH-SANI <i>et al.</i> , 2018; MERCALDI <i>et al.</i> , 2008
	Ácidos Lipoecóico	<i>Streptococcus lactis</i> ATCC 9936, <i>Lactobacillus casei</i> NIRD R094	Fortalecimento de interações na superfície celular	WICKEN; EVANS; KNOX, 1986
	Lipoglicanos	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Emulsão de óleos comestíveis	HYDER, 2015
	Proteoglicanos	<i>Acinetobacter junii</i> SC14	Emulsão de óleos comestíveis	PATIL; CHOPADE, 2001
	Lipoproteínas	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> ZRS	Biorremediação	ZHAO <i>et al.</i> , 2016

Adaptado de KHIRE (2010), BANAT *et al.* (2010) e THRAEIB *et al.* (2022).

Os biossurfactantes, de baixo peso molecular, costumam ser classificados em lipopeptídeos ou glicolipídeos, tendo alta atividade surfactante, diminuindo a tensão superficial de meios aquosos consideravelmente, porém suas emulsões tendem a ser menos estáveis que as dos bioemulsificantes. Dentre os microrganismos produtores de biossurfactantes de baixo peso

molecular, destaca-se o *Bacillus subtilis*, um microrganismo capaz de produzir a surfactina, cuja estrutura está representada na Figura 1.12, um lipopeptídeo cíclico com alto potencial surfactante e atividade antimicrobiana (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; DE FRANÇA *et al.*, 2022; FELIX *et al.*, 2019; OHNO; ANO; SHODA, 1995).

**Figura 1.12** - Estrutura da surfactina, um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*.



Fonte: Adaptado de National Library of Medicine, Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Surfactin>, Acesso em 04/01/2023.

Biossurfactantes, como a surfactina de *B. subtilis* (1 kDa) apresentam massa molecular consideravelmente menor que bioemulsificantes, como o emulsan (1000-1010 kDa) (KHIRE, 2010; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018). Entretanto, apesar do peso molecular consideravelmente menor, os biossurfactantes apresentam algumas características moleculares semelhantes aos bioemulsificantes mais comuns, como a presença de aminoácidos, a porção hidrofílica composta por regiões aniônicas e ácidos graxos na região hidrofóbica, que no caso da surfactina é composta predominantemente por ácido 3-hidroxi-13-metiltetradecanoico

(RAJENDRAN; MARAHIEL, 1999). Contudo, biossurfactantes de baixo peso molecular não formam emulsões estáveis em comparação com os bioemulsificantes, devido as características poliméricas destes últimos, que adicionam maior estabilidade na formação de micelas (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019).

Em derramamentos de petróleo, biossurfactantes aumentam a efetividade da dispersão e a biodisponibilidade do poluente para degradação microbiológica ao diminuir a tensão interfacial entre água e óleo, facilitando a dispersão de óleo em gotículas, porém sendo menos eficientes em prevenir a aglomeração dessas gotículas, o que diminui a estabilidade das emulsões (UZOIGWE *et al.* 2015).

De forma similar aos biossurfactantes, os bioemulsificantes podem ser utilizados na dispersão e degradação de poluentes hidrofóbicos, mesmo em concentrações baixas. Entretanto, diferente dos biossurfactantes, em derramamentos de petróleo essas moléculas assumem a função específica de envolver completamente gotículas de óleo, prevenindo que se aglomerem novamente, assim caracterizando essas emulsões como mais estáveis que as formadas com biossurfactantes (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; UZOIGWE *et al.*, 2015). Desse modo, os compostos de superfície-ativa de origem biológica podem ser divididos em dois grupos com funções diferentes: (i) Surfactantes, que são moléculas capazes de diminuir a tensão superficial e interfacial de líquidos e (ii) Emulsificantes, que estão ligados a estabilização de emulsões. Entretanto, alguns emulsificantes apresentam atividade surfactante.

Os bioemulsificantes, bioemulsans ou emulsificantes de alto peso molecular, são considerados moléculas multifuncionais, já que possuem aplicações em diversos setores da indústria, por exemplo, na indústria farmacêutica como veículo de entrega de medicamentos (MERCALDI *et al.*, 2008), tratamento de doenças de pele (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2018), e na indústria de alimentos como estabilizantes de emulsões entre cadeias hidrofóbicas (como gorduras e óleos vegetais) e água, e substituto para gema de ovo, por exemplo (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2018; THRAEIB *et al.*, 2022).

Uma forma de classificação os bioemulsificantes é através do equilíbrio hidrofílico/lipofílico, ou índice HLB (Tabela 1.5), que define os surfactantes quanto ao uso de acordo com a inclinação dele em relação à água ou óleo (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

**Tabela 1.5** - Utilização de surfactantes com diferentes valores de equilíbrio hidrofílico/lipofílico (HLB).

Índice HLB	Utilização
<3	Agentes anti-espuma
3-8	Emulsificantes água/óleo
7-10	Agentes umidificantes
8-16	Emulsificantes óleo/água
13-16	Detergentes
16-19	Agentes solubilizantes

Fonte: Adaptado de BANAT *et al.* (2021)

Entretanto uma aplicação que tem chamado a atenção da comunidade científica é potencial dessas biomoléculas na remoção de contaminantes em áreas afetadas após derramamentos de petróleo (BEZZA; NKHALAMBAYAUSI CHIRWA, 2015; BHARALI *et al.*, 2018; CAHYANI; ISMAYANA; YANI, 2022; CHAPRÃO *et al.*, 2015; D'ALMEIDA, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; LUNA *et al.*, 2017; MORAIS; ABUD, 2012; SILVA *et al.*, 2018). O potencial dessas biomoléculas na remediação de contaminações se mostrou promissor em relação aos surfactantes químicos, devido ao seu alto poder emulsificante e sua baixa toxicidade, assim reduzindo a necessidade de surfactantes químicos, que são agressivos ao meio ambiente (CHAPRÃO *et al.*, 2015; FELIX *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018; ZENGEL *et al.*, 2022).

Em derramamentos de petróleo, os bioemulsificantes agem envolvendo gotículas de óleo, formando emulsões e prevenindo a aglomeração desses hidrocarbonetos, processo conhecido como solubilização micelar, que também aumenta a biodisponibilidade dos óleos para a microbiota, sendo um mecanismo de ação diferente dos biosurfactantes (UZOIGWE *et al.*, 2015). Esses bioprodutos podem conferir aderência celular aos microrganismos produtores, o que é essencial para a degradação de fontes de carbono hidrofóbicas, como hidrocarbonetos, presentes em alguns substratos, assim essas células costumam ser eficientes em processos de biorremediação (SATPUTE *et al.*, 2010).

Apesar desse potencial a maior parte dos surfactantes utilizados na remediação de áreas contaminadas são de origem sintética (ARNOLD *et al.*, 2022). Isso se dá devido ao maior custo de produção por rotas biológicas e a ineficiência de alguns métodos de purificação, entretanto

novos avanços vêm sido feitos na área, como a utilização de microrganismos isolados de ambientes com alta presença de hidrocarbonetos, fontes de carbono alternativas e de baixo custo, e o estudo de novas formas de purificação (BANAT *et al.*, 2021; CHAMANROKH *et al.*, 2008; CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; KEZRANE *et al.*, 2020; KOUTINAS *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2006).

### 3.2 Toxicidade dos dispersantes biológicos

A toxicidade de um surfactante é importante para sua aplicação, já que a utilização de tratamentos agressivos pode ter consequências duradouras na fauna e flora desses locais já fragilizados (DUKE, 2016; ZENGEL *et al.*, 2022). Enquanto surfactantes químicos, como Triton X-100, não são biodegradáveis, os emulsificantes biológicos costumam ser, isto é, persistem menos tempo no ambiente, assim causando menos impactos na região de aplicação. Biosurfactantes e bioemulsificantes se mostram facilmente assimilados por microrganismos degradadores, apresentando biodegradabilidade de duas a três vezes maior que dispersantes sintéticos como dodecil sulfato de sódio (SDS) (KIM *et al.*, 2002). Assim, devido aos baixos impactos causados por essas substâncias, vários bioemulsificantes foram licenciados pela *Organization for Animal Health* e *World Health Organization* para utilizações diversas, inclusive nutricionais (THRAEIB *et al.*, 2022).

Devido a sua estrutura polimérica, bioemulsificantes em geral formam micelas com menores cargas eletrostáticas, também causam menos efeitos em organismos locais sem diminuir seu poder emulsificante, podendo ser utilizados em conjunto com outras técnicas, como a adsorção de partículas de óleo (BARROS *et al.*, 2014; HUA *et al.*, 2003). Assim, os bioemulsificantes são uma alternativa direta aos emulsificantes sintéticos para biorremediação, pois aumentam a interação entre água e fontes hidrofóbicas, diminuindo o tamanho das gotículas, podendo ser utilizados em distâncias menores da costa sem causar efeitos colaterais.

Experimentos apontam que biosurfactantes somente começam a afetar fibroblastos de ratos em concentrações 500 vezes maiores que dos alquilbenzeno sulfonados, surfactantes químicos altamente tóxicos, e também possuem toxicidade aguda menor que o Triton X-100 (KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA; MEDRZYCKA; KARPENKO, 2013). Outros autores avaliaram a toxicidade de emulsificantes biológicos obtidos de *Pseudomonas* sp. para aplicação como cosméticos, pela avaliação da cicatrização em ratos, e os autores reportaram que o composto avaliado não apresentaram mortalidade ou efeitos adversos (HENTATI *et al.*, 2021).

Adicionalmente, outras pesquisas avaliaram a toxicidade de biossurfactantes diretamente em organismos marinhos, identificando que biossurfactantes de *Bacillus*, *Streptomyces* e *Pseudomonas* apresentam toxicidade moderada para larvas de *Artemia franciscana* em concentrações acima de 300 mg L<sup>-1</sup>, e o emulsificante biológico de *Halomonas* apresentou alta toxicidade em 500 mg L<sup>-1</sup>, sem apresentar efeitos hemolíticos em células humanas (PATIÑO *et al.*, 2021). Um estudo de biossurfactantes de *B. subtilis* expôs larvas de *Artemia salina* e sementes de *Lactuca sativa* a este composto para determinação de cito e fitotoxicidade pelo método CL<sub>50</sub>, e os resultados apontaram concentração letal (CL<sub>50</sub>) de 612,27 mg L<sup>-1</sup> e somente em concentrações altas (500 mg L<sup>-1</sup>) houve impacto no desenvolvimento de *Lactuca sativa*, apontando um índice de germinação menor que 80% e nenhuma alteração em raízes ou toxicidade sobre microcrustáceos foi observada (FELIX *et al.*, 2019).

Assim, para que um emulsificante biológico seja utilizado como agente biorremediador, é necessário que sua ecotoxicidade seja baixa, para que seja utilizado com segurança em manguezais e estuários, e que possua alta estabilidade, mantendo as emulsões tempo o suficiente para que o óleo seja metabolizado ou coletado por adsorventes.

### 3.3 Produção de biocompostos de superfície-ativa

Os produtores de emulsificantes biológicos podem ser divididos em três categorias, a depender do tipo de substrato utilizado na produção (AMARAL *et al.*, 2006; LIN, 1996; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; THRAEIB *et al.*, 2022): (i) os que produzem biomoléculas de forma induzida apenas na presença de alcanos, como o gênero *Corynebacterium*, (ii) as que produzem emulsificantes na presença de substratos exclusivamente hidrossolúveis, como o gênero *Bacillus*, e (iii) aqueles que produzem bioprodutos tanto em substratos hidrossolúveis quanto induzidos pela presença de alcanos, como as bactérias do gênero *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. No caso das leveduras, a produção normalmente ocorre na presença de substratos lipossolúveis (CHAPRÃO *et al.*, 2015; THRAEIB *et al.*, 2022), apresentados na Tabela 1.6.

**Tabela 1.6** - Exemplos de microrganismos produtores de emulsificantes biológicos.

<b>Tipo de Microrganismo</b>	<b>Gênero</b>	<b>Substrato</b>	<b>Referências</b>
Bactérias	<i>Acinetobacter</i>	Etanol, óleo vegetal, petróleo e suco de caju	CHAMANROKH <i>et al.</i> , 2008; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; ROCHA <i>et al.</i> , 2006
	<i>Bacillus</i>	Glicerol, óleo pesado, óleo vegetal, soro de leite, suco de caju	DE FRANÇA <i>et al.</i> , 2015; FELIX <i>et al.</i> , 2019; ZHANG; FENG; XUE, 2022
	<i>Pseudomonas</i>	Óleo vegetal, suco de caju	KHADEMOLHOS SEINI <i>et al.</i> , 2019; ROCHA <i>et al.</i> , 2014; SILVA <i>et al.</i> , 2018
	<i>Rhodococcus</i>	Glicerol, <i>n</i> -alcanos e petróleo	CIAPINA <i>et al.</i> , 2006; HU <i>et al.</i> , 2020; KIM <i>et al.</i> , 1990
	<i>Vibrio</i>	Petróleo	HU; WANG; WANG, 2015; MANEERAT; PHETRONG, 2007
Leveduras	<i>Candida</i>	Hidrocarbonetos e resíduos agroindustriais	CHAPRÃO <i>et al.</i> , 2015; HUA <i>et al.</i> , 2003; LIRA <i>et al.</i> , 2020
	<i>Kluyveromyces</i>	Lactose	LUKONDEH; ASHBOLT; ROGERS, 2003
	<i>Saccharomyces</i>	Glicose	CAMERON; COOPER; NEUFELD, 1988
Fungos Filamentosos	<i>Aspergillus</i>	Extrato de malte e óleo de soja	SPERB <i>et al.</i> , 2018
	<i>Trichoderma</i>	Glicose	PIEGZA <i>et al.</i> , 2021

Fonte: Autor

Cepas isoladas de derramamentos de petróleo, estrategicamente, são comumente aplicadas para a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes. Alguns microrganismos

capazes de produzir emulsificantes potentes e com alto poder de metabolização de compostos orgânicos são citados na literatura como *Alcanivorax* (MANEERAT; PHETRONG, 2007), *Pseudomonas* (LIU *et al.*, 2017), *Bacillus* (ZHANG *et al.*, 2018) e *Acinetobacter* (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021).

Para identificar a produção de biossurfactante e/ou bioemulsificantes em um meio pode-se aplicar uma gama de técnicas, como o avaliar o aumento da atividade emulsificante do meio de produção (no caso de produção extracelular) e a diminuição da tensão superficial do meio (IQBAL; KHALID; MALIK, 1995; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019). Outros métodos mais específicos podem ser aplicados em placas de Petri para detecção de ramnolipídeos, como a utilização de ágar sangue (JOHNSON; BOESE-MARRAZZO, 1980), ágar brometo de cetil triamonio (CTAB) (SIEGMUND; WAGNER, 1991), ensaios de orcinol (BHARALI *et al.*, 2018) e testes de área de zona limpa (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

O tipo de emulsificante biológico produzido dependerá tanto das características filogenéticas da espécie em questão, como características do meio de cultura, como do substrato utilizado como fonte de carbono, fonte de nitrogênio ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , aminoácidos ou ureia), e da abundância ou ausência de fatores de crescimento (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; FATAJEVA *et al.*, 2014).

Existem diferentes formas de se produzir emulsificantes biológicos, variando de cepa para cepa. Por exemplo, no caso de fungos filamentosos foi observada a produção de biossurfactantes tanto em fermentação em estado sólido (PIEGZA *et al.*, 2021), quanto em fermentação submersa (FS) (SPERB *et al.*, 2018).

A temperatura, fator importante para a manutenção da atividade das enzimas presentes em microrganismos, também pode variar. Autores reportaram a produção de biossurfactantes em temperaturas inferiores a 30 °C para *Rhodococcus erythropolis* (LUONG *et al.*, 2018), *Candida sphaerica* (SANTOS *et al.*, 2020), *Candida lipolytica* (LIRA *et al.*, 2020) e *Serratia marcescens* (DOS SANTOS *et al.*, 2021), e temperaturas iguais ou superiores a 30 °C foram observadas para *Acinetobacter venetianus* (D'ALMEIDA, 2022), *Acinetobacter calcoaceticus* (ROCHA *et al.*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (ROCHA *et al.*, 2014), *Pseudomonas fluorescens* (PEEKAT & ABU, 2017), *Mycobacteria* (IVANOVA *et al.* 2016) e *Bacillus subtilis* (DE FRANÇA *et al.*, 2022). O que é um indicativo na alta variedade de meios de culturas disponíveis para a produção de emulsificantes biológicos.

O pH do meio também é de grande importância para a manutenção da cepa. Normalmente a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes ocorre em pH neutro (D'ALMEIDA, 2022; DE FRANÇA *et al.*, 2022; ROCHA *et al.*, 2014), entretanto alguns microrganismos são capazes de produzir bioemulsificantes em meios acidificados, como *Pseudomonas fluorescens* (PEEKAT & ABU, 2017) e *Mycobacteria* (IVANOVA *et al.* 2016).

A salinidade do meio também é um parâmetro a ser considerado na produção de bioemulsificantes, estando diretamente ligada ao local de isolamento e espécie da cepa. Microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (ROCHA *et al.*, 2007) e *Rhodococcus erythropolis* (LUONG *et al.* 2018) podem produzir biossurfactantes na ausência de NaCl, porém muitos outros microrganismos podem necessitar desse sal na composição do meio em concentração entre 1-10 g L<sup>-1</sup>, como *Bacillus subtilis* (DE FRANÇA *et al.*, 2022; FELIX *et al.*, 2019), *Acinetobacter calcoaceticus* (MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021), *Acinetobacter venetianus* (D'ALMEIDA, 2022) e *Serratia marcescens* (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Apesar da grande variedade de condições de meio de produção, os baixos rendimentos obtidos na produção de biossurfactantes e bioemulsificantes por métodos tradicionais diminuí a utilização industriais desses compostos, a utilização de substratos alternativos de baixo custo vem otimizando e incentivando a produção em escala industrial. Um dos tipos de substrato mais comuns para a produção de biossurfactante é a utilização de resíduos agroindustriais, como matéria-prima agrícola (PANILAITIS *et al.*, 2007), suco de caju (ROCHA *et al.*, 2006), óleo vegetal (CHAMANROKH *et al.*, 2008), glicerol (DE FRANÇA, 2014) e efluentes agroindustriais (GAUTAM; TYAGI, 2006). A utilização de hidrocarbonetos e fontes de carbono mais complexas, como petróleo, também é utilizada, em especial na produção de emulsificantes complexos como o emulsan de *Acinetobacter* (CHAMANROKH *et al.*, 2008; HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008; THRONE-HOLST *et al.*, 2006).

Dentre os muitos microrganismos produtores de emulsificantes biológicos, o gênero *Acinetobacter* vem se destacando pela sintetização de emulsificantes de alto peso molecular, potentes agentes emulsificante e baixa toxicidade, em especial o emulsan, um lipoheteropolissacarídeo polimérico com grande potencial para derramamento de petróleo mesmo em baixas concentrações (MERCALDI *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019).

### 3.4 Gênero *Acinetobacter* e o emulsan

O gênero *Acinetobacter* compreende uma gama de microrganismos gram-negativos, estritamente aeróbios, com formato de cocobacilo, imóveis, de oxidase-negativa, que ocorrem em ambientes marinhos, solo e até pele humana (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019), capazes de metabolizar diversas fontes de carbonos, como petróleo cru (CHAMANROKH *et al.*, 2008), suco de caju (ROCHA *et al.*, 2006), hidrocarbonetos (PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008), etanol (CHAMANROKH *et al.*, 2008; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018), resíduos agroindustriais (PANILAITIS *et al.*, 2007) e óleos comestíveis (CHAMANROKH *et al.*, 2008; HYDER, 2015).

Esses microrganismos podem produzir uma série de emulsificantes biológicos, como emulsan (*A. calcoaceticus* RAG-1 e *A. venetianus* RAG-1) (CHAMANROKH *et al.*, 2008; D'ALMEIDA, 2022; SU; CHEN; LIN, 2009), biodispersan (*A. calcoaceticus* A2) (ROSENBERG *et al.*, 1988) e alasan (*A. radioresistens* KA53) (NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995), considerados emulsificantes potentes e com utilizações nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e em remediação de derramamento de petróleo (ALIZADEH-SANI *et al.*, 2018; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019). Dentre esses bioemulsificantes, destacam-se aqueles de alto peso molecular (>1000 kDa), os expolissacarídeos, como emulsan e seus análogos. Esses compostos costumam apresentar alto potencial emulsificante, sendo compostos polianiônicos, constituídos por proteínas, ácidos graxos e carboidratos.

Assim, a produção desses compostos já foi muito estudada cientificamente, entretanto poucos estudos exploraram análises de purificação e caracterização desses compostos, sendo um dos grandes gargalos para a produção desses biocompostos em escala industrial. Na Tabela 1.7 são apresentadas cepas de *Acinetobacter* produtoras de bioemulsificantes, principalmente o emulsan, bem como as técnicas de separação, purificação e caracterização aplicados pelos autores.

**Tabela 1.7** - Microrganismos do gênero *Acinetobacter* produtores de bioemulsificantes, condições de cultivo e métodos de separação do bioproduto (continua).

Microrganismo	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Temperatura	Agitação	Método de Separação	Método de Purificação	Métodos Analíticos	Referências
<i>Acinetobacter bouvetii</i> UAM25	Glicerol e Hexadecano	NaNO <sub>3</sub>	30 °C	200 rpm	Precipitação Alcólica	Ultrafiltração	FT-IR <sup>1</sup> H RMN	ORTEGA-DE LA ROSA <i>et al.</i> 2018
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Caldo de Lisogenia	-	37 °C	150 rpm	Sulfato de Amônio	-	FT-IR <sup>1</sup> H RMN	AMANI, 2017
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PTCC 1318	Óleo de Girassol	NaNO <sub>3</sub>	37 °C	120 rpm	Sulfato de Amônio	-	Atividade Emulsificante	AMANI & KARIMINEZHAD 2016
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> ZRS	Hexadecano	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 °C	120 rpm	Condensação à vácuo	Coluna de Filtração a Gelo	FT-IR MALDI-TOF/TOF <sup>1</sup> H RMN <sup>13</sup> C RMN	ZHAO <i>et al.</i> 2016

**Tabela 1.7** - Microrganismos do gênero *Acinetobacter* produtores de bioemulsificantes, condições de cultivo e métodos de separação do bioproduto (continuação).

<i>Acinetobacter baumannii</i> AC5	Óleo de oliva, girassol, milho, gergelim, Gasolina e Óleo diesel	Extrato de Levedura	30 °C	120 rpm	Extração com Solventes	-	Quantificação de Carboidratos e Proteínas	HYDER, 2015
<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	Sulfato de Amônio	Fenol Quente	<sup>1</sup> H RMN <sup>13</sup> C RMN	BARNHART <i>et al.</i> 2012
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Etanol, Óleo de Soja e Petróleo	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	200 rpm	Sulfato de Amônio	Extração com Éter	<sup>1</sup> H RMN <sup>13</sup> C RMN	CHAMANROKH <i>et al.</i> 2010
<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	175 rpm	Precipitação Alcóolica	Lavagem com Etanol	Método Fenol-Ácido Sulfúrico e Cromatografia Gasosa	SU <i>et al.</i> 2009
<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	Sulfato de Amônio	Fenol Quente	Cromatografia Gasosa e SDS-Page	MERCALDI <i>et al.</i> 2008

**Tabela 1.7** - Microrganismos do gênero *Acinetobacter* produtores de bioemulsificantes, condições de cultivo e métodos de separação do bioproduto (continuação).

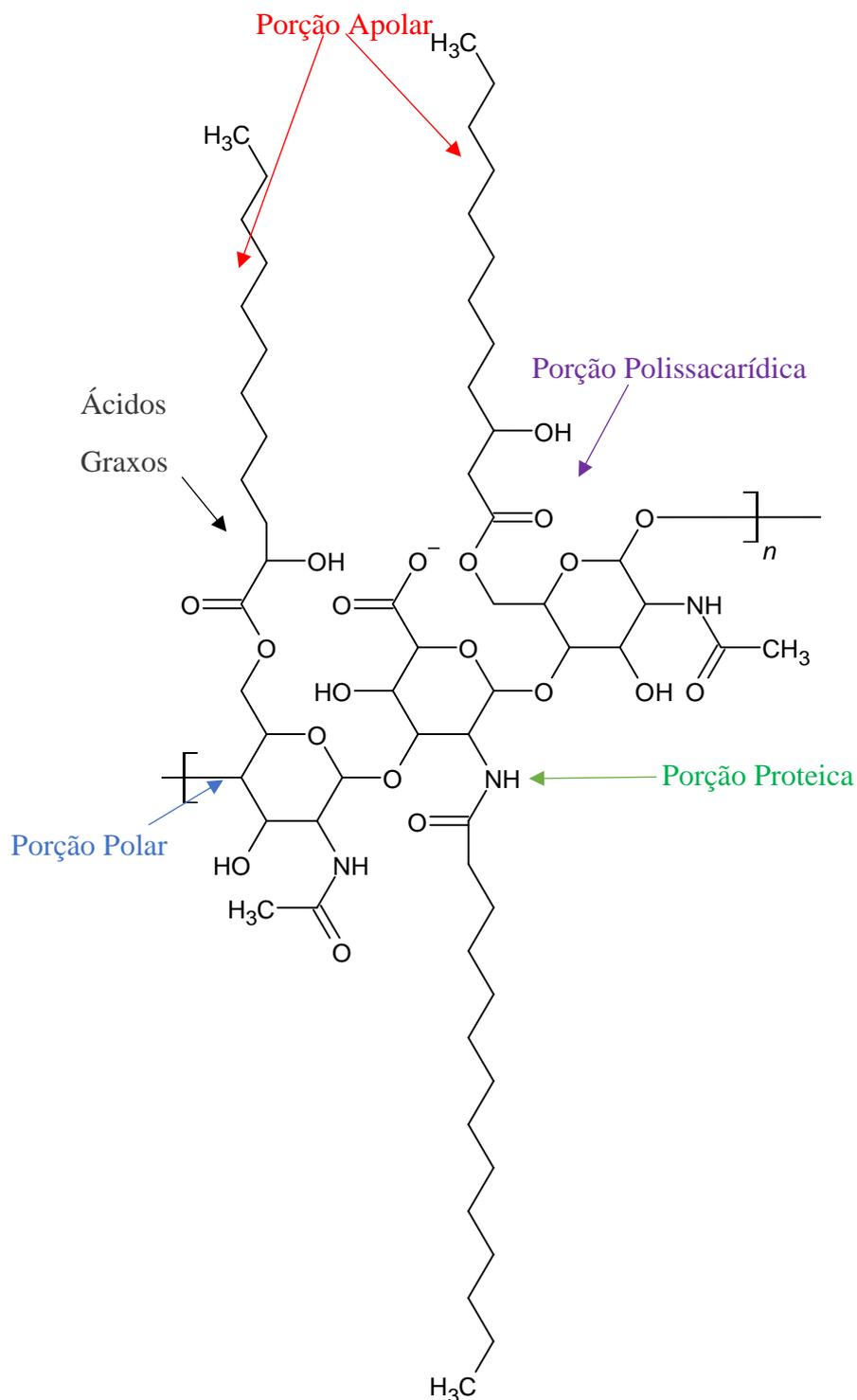
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> subsp. <i>anitratus</i> SM7	Heptadecano	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	30 °C	200 rpm	Precipitação Alcólica	-	-	(PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008)
<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG-1	Carboidratos de Soja e Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	-	-	Atividade Emulsificante	PANILAITIS <i>et al.</i> 2007
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	Sulfato de Amônio	Extração com Éter	<sup>19</sup> F RMN	JOHRI <i>et al.</i> 2003
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Ácido Palmítico e Estearico	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	Sulfato de Amônio	Extração com Éter	Cromatografia Gasosa e Cromatografia de Permeação em Gel	JOHRI <i>et al.</i> 2002
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Ácidos Graxos com Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	Sulfato de Amônio	Fenol Quente	Espectrometria de Massa e Cromatografia de Permeação em Gel	PANILAITIS <i>et al.</i> 2002

**Tabela 1.7** - Microrganismos do gênero *Acinetobacter* produtores de bioemulsificantes, condições de cultivo e métodos de separação do bioproduto (conclusão).

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Ácidos Graxos	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	250 rpm	Sulfato de Amônio	Extração com Éter	Cromatografia Gasosa	GORKOVENKO <i>et al.</i> 1997
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Etanol	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 °C	180 rpm	-	-	Método Fenol-Ácido Sulfúrico	CHOI; CHOI; LEE, 1996

O emulsan, apresentado na Figura 1.13, um lipo-heteropolissacarídeo polianiónico, é capaz de emulsionar substâncias hidrofóbicas de cadeia grande mesmo em concentrações pequenas, formando emulsões estáveis, destacando-se entre os emulsificantes biológicos, pode ser produzido à partir de fontes de carbono alternativas como hidrocarbonetos (PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008), óleos (CHAMANROKH *et al.*, 2008), subprodutos e resíduos agro industriais, como o suco de caju (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; PANILAITIS *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2006). Essa substância é formada por aproximadamente 80% (m/m) lipopolissacarídeo e 20% exopolissacarídeo de alto peso molecular, sendo a massa da unidade monomérica 1kDa, e seu peso molecular total aproximadamente 1000 kDa, diminuindo para 41-250 kDa em sua forma livre de proteínas, chamada de “apoemulsan” (BARNHART *et al.*, 2012; DAMS-KOZLOWSKA *et al.*, 2008; KHIRE, 2010; MERCALDI *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; PIROG; LUTSAI; MUCHNYK, 2021; THRAEIB *et al.*, 2022). As características do meio de produção como a fonte de carbono influenciam no potencial emulsificante, na estabilidade do produto e nas características físico-químicas do composto, que pode apresentar alta estabilidade em uma grande variedade de pH (3-12) e HLB maior que 10, indicado para formulação de emulsões óleo/água (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; OHADI *et al.*, 2018; PANILAITIS *et al.*, 2007).

**Figura 1.13** - Molécula de emulsan, biopolímero de *Acinetobacter*, ressaltando as diversas regiões e funções da molécula.



Fonte: Adaptado de AMANI (2017) e DESAI & BANAT, 1997

Apesar de complexo e de apresentar características poliméricas, o emulsan é composto por duas porções, assim como outros emulsificantes, uma hidrofóbica, formada por ácidos

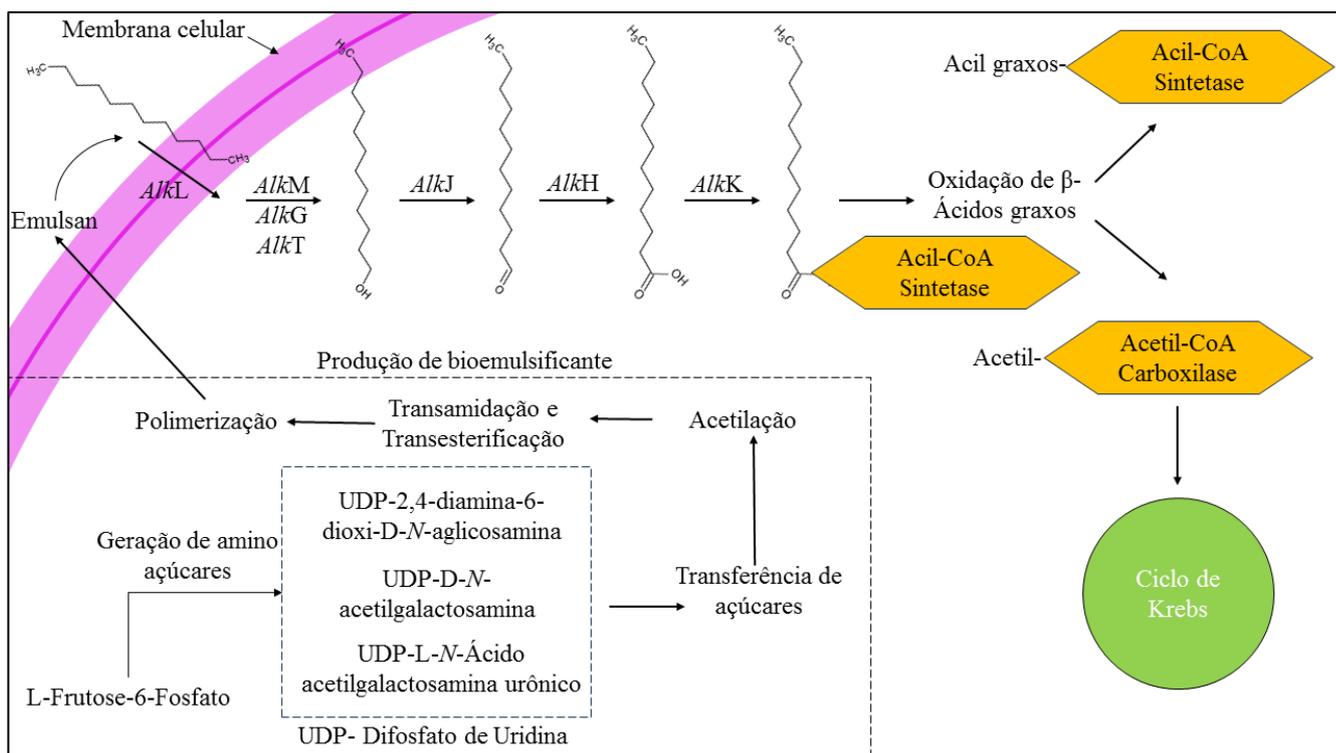
graxos, que podem variar em tamanho de cadeia e saturação (BARNHART *et al.*, 2012; DESAI; BANAT, 1997; NAKAR; GUTNICK, 2001), e uma hidrofílica, composta por três monossacarídeos: N-acetil-D-galactoseamina, ácido D-galacturônico e diamina-6-dioxi-D-glicose, que representam a porção mais característica dos emulsificantes do emulsan (BARNHART *et al.*, 2012; CHAMANROKH *et al.*, 2010; MERCALDI *et al.*, 2008). Esse composto emulsificante foi identificado pela primeira nos anos 70, sendo extraído de *Arthrobacter* sp. (atualmente renomeada como *Acinetobacter venetianus* RAG-1), cepa capaz de degradar hidrocarbonetos pela ação de enzimas alceno hidroxilases (MERCALDI *et al.*, 2008; THRONE-HOLST *et al.*, 2006). Em décadas mais recentes a produção de emulsan foi realizada principalmente por cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; PANILAITIS *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2006), entretanto pesquisas revelaram que a cepa apresenta as mesmas características fenotípicas da *Acinetobacter venetianus* RAG-1 (VANEECHOUTTE *et al.*, 1999).

A rota metabólica da *A. venetianus* foi estudada por autores anteriores, sendo um microrganismo com grande potencial para degradação de hidrocarbonetos por enzimas *AlkB1* e *AlkB2* (BACH; GUTNICK, 2006; LIU *et al.*, 2021; NAKAR; GUTNICK, 2001; THRONE-HOLST *et al.*, 2006) e, apesar de variar de acordo com cada espécie do gênero, esse microrganismo parece ter predileção por moléculas maiores e mais complexas, como óleo diesel (C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>), os quais a célula adere com a formação de uma camada de polissacarídeos que confere a ela elevado poder surfactante, por vezes sendo classificada como biossurfactante particulado (BALDI; PEPI; CAPONE, 2003; MERCALDI *et al.*, 2008; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Também se identifica a presença de esterases antecedendo a formação de emulsificantes, mediando a liberação de emulsan pela célula, assim sendo possível inferir que se trata de um bioproduto extracelular, no qual o emulsan é um veículo para o transporte da fonte de carbono, em especial n-alcenos, que são captados e levados ao interior da célula por vesículas extracelulares (FONDI *et al.*, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002). A produção desse biopolímero costuma começar a ocorrer no fim da fase exponencial (log), continuando de forma acelerada na fase estacionária do crescimento celular (ROSENBERG *et al.*, 1988).

Assim, a produção de emulsan no interior da célula, ilustrada na Figura 1.14, ocorre a partir da acetilação de açúcares hidrossolúveis, como a frutose, para a geração de amino açúcares, que após etapas de acetilação, transamidificação, transesterificação e polimerização, irão formar os monossacarídeos que compõem a cadeia principal de isômeros de emulsan, sendo

em seguida liberado para o meio extracelular (NAKAR; GUTNICK, 2001). Uma vez no meio extracelular, o emulsan irá atuar na emulsão de hidrocarbonetos, que serão conduzidos a interior da célula por enzimas de transporte de alcanos (*AlkL*) através vesículas de transporte (FONDI *et al.*, 2012; KOTHARI *et al.*, 2016). A degradação de hidrocarbonetos no interior de células de *Acinetobacter venetianus* foi descrita por Kothari *et al.* (2016), na qual enzimas alcano hidroxilase (*AlkM*), rubredoxina (*AlkG*) e rubredoxina redutase (*AlkT*) irão agir na adição de hidroxilas à cadeia carbônica, convertendo-a em álcoois de cadeia longa, que em seguida serão convertidos novamente em aldeídos e ácidos carboxílicos por ação de enzimas álcool desidrogenase (*AlkJ*) e aldeído desidrogenase (*AlkH*). Por fim, acil-coenzima A sintetase (*AlkK*) iniciarão a oxidação de ácidos graxos por acetil-coenzima carboxilase pelo ciclo de Krebs.

**Figura 1.14** - Rota metabólica da produção de emulsan e degradação de hidrocarbonetos no interior de microrganismos do gênero *Acinetobacter*



Fonte: Adaptado de Nakar & Gutnick, 2001 e Kothari *et al.* 2016.

Como agente emulsificante, o emulsan é mais eficaz para emulsionar cadeias grandes e misturas de hidrocarbonetos, não sendo tão eficiente em estabilizar emulsões de cadeias pequenas, como pentano e hexano (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019), tendo um grande potencial na remediação de derramamento de petróleo pelo alto poder como agente dispersante

de óleos pesados, auxiliando na biorremediação desses hidrocarbonetos, que em geral são de cadeia longa (BEZZA; NKHALAMBAYAUSI CHIRWA, 2015; BHARALI *et al.*, 2018; CAHYANI; ISMAYANA; YANI, 2022; CHAPRÃO *et al.*, 2015; D'ALMEIDA, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; LUNA *et al.*, 2017; MORAIS; ABUD, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

Dentre as aplicações do emulsan, destacam-se a remediação de poluentes orgânicos, na indústria do petróleo como aditivo na recuperação microbiana avançada de óleo (MEOR, em inglês) e limpeza de tanques, na indústria cosméticas como cremes, loções, sabões e shampoos, na indústria de alimentos, de agricultura e na farmacêutica como veículo de administração de vacinas (MERCALDI *et al.*, 2008; PATIL; CHOPADE, 2001; ROCHA *et al.*, 2006; THRAEIB *et al.*, 2022).

Um importante passo para a utilização efetiva de emulsificantes produzidos a partir de agentes biológicos é a sua recuperação do meio e posterior purificação, etapa denominada de *dowstream*. Os métodos de purificação mais utilizados para a precipitação de emulsan costumam ser a precipitação de proteínas por sulfato de amônio (CHAMANROKH *et al.*, 2008), que consistem na precipitação de moléculas de alto peso molecular pela saturação do meio, e tem a vantagem de não degradar o bioproduto, sendo muito utilizada na química fina para precipitação de moléculas proteicas. A precipitação por etanol também é aplicada para a separação desse composto devido suas características polissacarídicas e seu alto peso molecular (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; NOHATA; AZUMA; KURANE, 1996; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008), consistindo na alteração das forças iônicas de um meio, diminuindo a solubilidade de um composto pela adição de álcoois ou cetonas. Após processos de separação e purificação, o emulsan costuma apresentar baixa solubilidade em meio aquoso, porém seu potencial emulsificante é elevado mesmo em baixas concentrações (MERCALDI *et al.*, 2008).

---

## **CAPÍTULO 2**

---

## CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE DE *Acinetobacter venetianus* USANDO GLICOSE COMO FONTE DE CARBONO

## RESUMO

Bioemulsificantes são moléculas produzidas por rota biológica, com alto potencial emulsificante e baixa toxicidade, sendo aplicáveis em diversas industriais, como farmacêutica, de alimentos e de petróleo. Assim, neste capítulo da presente dissertação otimizou-se a produção de bioemulsificantes por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 usando glicose como fonte carbono, avaliando a temperatura (25-40 °C), pH (4-10) e concentração de NaCl (0-35 g L<sup>-1</sup>) do meio de cultura e estudou-se os melhores métodos de separação (ácido, etanol ou sulfato de amônio) e pré-purificação (*etanol-salting out*, fenol quente e extração com éter) para a caracterização da biomolécula. Após, realizaram-se ensaios para avaliar a estabilidade do bioproduto frente à salinidade (0-50 g L<sup>-1</sup>), pH (2-10) e variações de temperatura (60-120 °C), e para determinar sua fitotoxicidade em sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e couve (*Brassica oleracea*) e citotoxicidade (*Artemia salina*). Posteriormente, o potencial do bioemulsificante como agente biorremediador foi verificado na dispersão de óleo em ambiente marinho, solo arenoso e rochas contaminadas. A cepa apresentou maior crescimento celular e produção de bioemulsificante a 30 °C, pH neutro e concentração de NaCl de 3 g L<sup>-1</sup>. A precipitação por etanol absoluto 2:1 (etanol: meio livre de células) foi a mais adequada para a recuperação do bioproduto. A pré-purificação por *etanol-salting out* se mostrou eficiente para a separação do biocomposto, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de aproximadamente 100 mg L<sup>-1</sup> após o processo. Análises de FT-IR, MALDI-TOF/TOF e <sup>1</sup>H RMN indicaram a produção de uma biomolécula com características similares ao emulsan, um bioemulsificante produzido por outras cepas de *Acinetobacter venetianus*, com massa da unidade monomérica de 1099 Da. O agente de superfície-ativa produzido apresentou alta estabilidade, quanto ao seu poder emulsificante, em concentrações altas de NaCl (até 50 g L<sup>-1</sup>), em diferentes pH (4-8) e em temperaturas altas (120 °C por até 120 minutos). Em nenhum dos experimentos realizados o índice de germinação das sementes avaliadas foi menor que 80% e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi calculada como 5795 mg L<sup>-1</sup>, o que é indicativo da baixa toxicidade do bioproduto. O bioemulsificante produzido em sua forma bruta foi eficiente na dispersão de óleo na superfície, apresentando área de dispersão de óleo de 50 cm<sup>2</sup>, e dispersando até 12% da massa de petróleo em ambiente marinho, em especial hidrocarbonetos com cadeia entre C<sub>22</sub>-C<sub>33</sub>. O bioemulsificante também foi capaz de reduzir a massa de óleo de motor contaminante em areia em aproximadamente 25%, e de reduzir as manchas de rochas contaminadas. Assim, o bioemulsificante produzido apresentou alta eficiência em processos de dispersão e baixa toxicidade, um indicativo do seu alto potencial para aplicação em processos de remediação ambiental.

**Palavras-Chave:** *Acinetobacter*, agente de superfície-ativa, biorremediação, ecotoxicidade, emulsan.

## 1 INTRODUÇÃO

Bioemulsificantes são substâncias anfipáticas, compostas por uma região polar e outra apolar, o que promove a interação entre substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, como água e óleos, assim formando emulsões (KHIRE, 2010). Esse potencial para a formação de emulsões é de grande interesse industrial para a aplicação em alimentos, fármacos e limpeza de contaminantes orgânicos, como é o caso de desastres ambientais (THRAEIB *et al.*, 2022). Assim, novas pesquisas têm buscado otimizar a produção desses agentes de superfície-ativa de origem biológica, que além de tão eficientes quanto as opções sintéticas, apresentam menor toxicidade e maior biodegradabilidade (DE FRANÇA *et al.*, 2022; FELIX *et al.*, 2019; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021).

A utilização de bioemulsificantes em remediação de contaminantes orgânicos, como petróleo, já é bem reportada na literatura, sendo um indicativo da eficiência desses emulsificantes biológicos como agentes biorremediadores (ATAKPA *et al.*, 2022; D'ALMEIDA, 2022; DOS SANTOS *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2020; MILAGRE *et al.*, 2018; MORAIS; ABUD, 2012).

Esses emulsificantes biológicos costumam ser produzidos a partir de cepas de microrganismos degradadores de petróleo, em especial aqueles isolados de ambientes contaminados por hidrocarbonetos (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021). Os microrganismos do gênero *Acinetobacter* se destacam pela abundância em ambientes contaminados e pela produção de um eficiente bioemulsificante, com maior estabilidade que de outros emulsificantes biológicos de baixo peso molecular, conhecido com emulsan (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; KHIRE, 2010; MERCALDI *et al.*, 2008; THRAEIB *et al.*, 2022). Esse agente de superfície-ativa é um lipoheteropolissacarídeo, de alto peso molecular (1000-1010 KDa) e alto poder emulsificante, com aplicações não apenas em remediação de derramamentos de petróleo, mas também nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosmético devido a sua estabilidade e baixa toxicidade (MERCALDI *et al.*, 2008; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; ROCHA *et al.*, 2006; THRAEIB *et al.*, 2022; VÁZQUEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2017). Entretanto, a utilização desses agentes de superfície-ativa de origem biológica é escassa, carecendo de estudos que busquem novas formas de recuperação e de aplicação desses bioprodutos.

Assim, este capítulo apresenta um estudo sobre produção de bioemulsificantes a partir de uma cepa de *Acinetobacter venetianus*, utilizando-se meio de cultivo contendo apenas glicose como fonte de carbono. Após a produção o bioproduto foi separado, caracterizado e aplicado como agente biorremediador.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagentes

Fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e glicose foram obtidos da Neon Comercial® (Suzano, SP); ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), bórax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de sódio (NaCl), etanol, fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sódio (NaOH), nitrato de cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA® (Indaiatuba, SP); areia (sílica), cromassie Brilliant Blue G-250 e extrato de levedura foram obtidos da SigmaAldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO); e o querosene foi adquirido no mercado local de Fortaleza - CE. Todos os reagentes possuíam grau para análise. O petróleo utilizado nos ensaios de dispersão, classificado com leve ( $^\circ\text{API}$  maior que 31), foi gentilmente cedido pelo Grupo de Pesquisa em Termofluidodinâmica Aplicada (GPTA) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará. O petróleo oriundo de derramamento utilizado nos experimentos foi recolhido da praia do Iguape, no município de Aquiraz ( $03^\circ 56' 46''$  S,  $38^\circ 16' 36''$  W).

#### 2.1.2 Microrganismo

A cepa de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 foi isolada de amostras de petróleo de um derramamento ocorrido na costa brasileira em 2019, na cidade de Amontada ( $03^\circ 01' 25.0''$  S,  $39^\circ 38' 17.3''$  W), e foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech), Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Esse microrganismo foi registrado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo número de acesso MT478042.1. A cepa foi armazenada a  $4^\circ\text{C}$  em meio ATGE ( $15\text{ g L}^{-1}$

de ágar, 5 g L<sup>-1</sup> de triptona, 1 g L<sup>-1</sup> de glicose e 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) com adição de 3% (m/v) de NaCl, pH 7,0 e, quando necessário, ativada em meio de mesma composição.

## 2.2 Propagação do inóculo

Para propagação do inóculo, utilizou-se o meio mineral (MM) composto por: glicose (10,0 g L<sup>-1</sup>), Na<sub>4</sub>HO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (6,0 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (5,0 g L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3,0 g L<sup>-1</sup>), NaCl (3,0 g L<sup>-1</sup>) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>) e MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,6 g L<sup>-1</sup>) (adaptado de D'almeida, 2022). O meio de cultivo foi esterilizado a 110 °C por 10 minutos e em seguida suplementado com solução de micronutrientes a 0,1% (v/v): ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10,95 g L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (5,0 g L<sup>-1</sup>), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (1,54 g L<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,39 g L<sup>-1</sup>), Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,25 g L<sup>-1</sup>) e Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O (0,17 g L<sup>-1</sup>), sendo esta solução esterilizada por filtração com membranas de diâmetro 0,45 µm (Millipore®, USA). Por fim, o pH do meio foi ajustado para 7,0 utilizando solução de NaOH (3,0 mol L<sup>-1</sup>) e solução de HCl (3,0 mol L<sup>-1</sup>).

Então, três colônias isoladas da cepa *A. venetianus* AMO1502 em meio Ágar ATGE foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral (MM) suplementado com a solução de micronutrientes e incubada a 30 °C e 150 rpm por 24 horas. Para padronizar a concentração de células inicial do sistema, ajustou-se a densidade óptica do inóculo para 0,15 ± 0,02, a 600 nm, através de diluições em meio de cultivo estéril.

## 2.3 Produção de bioemulsificante

Após o crescimento do inóculo, a produção ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral (MM) e 2% (v/v) de inóculo ajustado, a 150 rpm por até 48 horas para produção de bioemulsificante. Ao final do período o caldo foi centrifugado a 5000 g por 20 minutos (Hettich®, 420R) para obter o meio livre de células (MLC). Para otimização da produção do bioemulsificante, inicialmente foi estudada a influência da temperatura (25, 30, 35 e 40 °C), fixando-se o pH (7,0) e a concentração de NaCl (3,0 g L<sup>-1</sup>) do meio constantes, como descrito por D'Almeida (2022). Em seguida, após determinação da temperatura ótima, variou-se o pH do meio (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) utilizando solução de NaOH (3,0 mol L<sup>-1</sup>) ou HCl (3,0 mol L<sup>-1</sup>), mantendo o meio de cultivo com uma concentração de NaCl de 3,0 g L<sup>-1</sup> e, finalmente, variou-se a concentração de NaCl (0, 1, 3, 5, 10 e 35 g L<sup>-1</sup>) do meio mantendo os outros parâmetros constantes. A influência das condições estudadas foi acompanhada pelo crescimento celular, índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>%) e redução da tensão superficial (RTS%) no decorrer do tempo de processo.

A produção de bioemulsificante foi acompanhada pelo meio livre de células (MLC), quanto ao seu índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>) em diferentes fontes hidrofóbicas (hexano, heptano, querosene, óleo de soja, heptadecano, óleo mineral, óleo AGE e petróleo), descrito na seção 2.6.1 e atividade surfactante, avaliada pela redução da tensão superficial, seção 2.6.2, e diluição micelar crítica (DMC), seção 2.6.3.

Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicata.

#### 2.4 Avaliação da recuperação do bioemulsificante

Três métodos de recuperação do bioemulsificante foram estudados. No primeiro, foi conduzida a precipitação ácida (adaptado de PEREIRA *et al.*, 2013), que consistiu em ajustar o meio livre de células (MLC) a pH 2,0 (com HCL 12 mol L<sup>-1</sup>) e em seguida foi mantido a 4 °C por 24 h. O precipitado obtido foi lavado 3 vezes com água acidificada (pH 2,0) para remoção de impurezas e recolhido por centrifugação a 5000g por 20 min.

No segundo método avaliou-se a precipitação alcoólica, pela adição de etanol absoluto à proporção de 2:1 (Etanol:MLC) no MLC (adaptado de NOHATA; AZUMA; KURANE, 1996) e, em seguida, mantendo-se o sistema a 4 °C por 24 h. Após, o meio foi centrifugado para separação do precipitado, que foi ressuspensionado em água destilada e liofilizado.

Por fim, a precipitação por sulfato de amônio foi realizada de acordo com metodologia adaptada de Rosenberg *et al.* (1979), pela adição de sulfato de amônio ao MLC (50% m/v) e, em seguida, mantendo-se o sistema a 4 °C por 24 h. O precipitado obtido pela supersaturação com sulfato de amônio foi dialisado por 24 h, trocando-se a água constantemente para remoção de sais e em seguida sendo liofilizado para remoção de umidade.

Após realização das etapas, os BB (BB-A, para o precipitado obtido por precipitação ácida, BB-E, obtido com etanol e BB-AS, obtido com sulfato de amônio) foram ressuspensionados (1 g L<sup>-1</sup>) para avaliação do IE<sub>24%</sub> e concentração de proteínas, conforme metodologias apresentadas nos tópicos 2.6.1 e 2.10.5, respectivamente.

Com o intuito de diminuir os custos do processo de aplicação foi utilizado o **bioemulsificante bruto (BB)** em ensaios de estabilidade, ecotoxicidade e de biorremediação, apresentados nos tópicos 2.7, 2.8 e 2.9, respectivamente.

## 2.5 Pré-purificação do bioemulsificante

Com o intuito de aumentar a pureza do bioemulsificante para realização de métodos de caracterização molecular, aplicou-se algumas técnicas utilizadas na literatura para a pré-purificação de biopolímeros de *Acinetobacter*.

A pré-purificação por *ethanol-salting out* foi realizada, adaptada de Rosenberg *et al.* (1983) e Shoham *et al.* (1983). Para tal, o BB-E foi ressuspendido e precipitado novamente com etanol 4 vezes (como descrito na seção 2.4). Em seguida o BB-E foi ressuspendido em solução de 80% etanol (v/v) e cristalizado pela adição de solução saturada de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  em 90% etanol, na mesma proporção, mantendo-se o sistema a 4 °C por 24 h. O processo de cristalização foi realizado duas vezes. O bioproduto foi centrifugado a 5000g por 20 minutos, submetido a diálise por 24 h, com trocas constantes de água e em seguida liofilizado.

A pré-purificação com fenol quente foi realizada a partir da metodologia adaptada de Kaplan *et al.* (1985), que reportaram a utilização do método para a remoção de impurezas proteicas de bioemulsificantes de *Acinetobacter*. Assim, o BB foi solubilizado em água deionizada ( $2 \text{ g L}^{-1}$ ) e aquecido até 70 °C, e em seguida adicionou-se um volume igual de solução de fenol 90% (v/v) pré-aquecido sob agitação por 15 minutos. Depois de esfriar, a mistura foi centrifugada e as fases aquosa e fenólica, em conjunto com a camada interfacial e os agrupados viscosos da fase aquosa, foram separados, dialisados e liofilizados.

A extração em éter foi realizada por trabalhos anteriores da literatura para remoção de impurezas alifáticas (GORKOVENKO *et al.*, 1997). Para tal, 2,0 g de BB foram extraídos com éter etílico em aparato *Soxhlet* por dois dias à temperatura de 25 °C com fluxo de água gelada (4° C) para reciclo de solvente. Em seguida o solvente foi removido e o extrato foi seco.

Por fim, o bioemulsificante pré-purificado (BPP) obtido com todos os métodos de pré-purificação foi pesado para avaliação do rendimento e ressuspendido em água destilada ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) para avaliação da concentração de proteínas, descrito no tópico 2.10.5. A atividade emulsificante ( $\text{IE}_{24\%}$ ) do meio contendo o BBP foi definida como parâmetro para seleção do melhor método de pré-purificação.

## 2.6 Parâmetros de resposta para a produção de bioemulsificante

### 2.6.1 Atividade emulsificante

Para determinação da atividade emulsificante, adaptou-se a metodologia descrita por Iqbal *et al.* (1995), na qual avalia-se a altura da emulsão de uma fonte hidrofóbica líquida, pura ou em mistura. Adicionou-se 2 mL de querosene, como fonte hidrofóbica, em 2 mL de MLC ou solução de BB, em seguida agitou-se vigorosamente o sistema em *vórtex* por 2 minutos e a emulsão foi mantida por 24 horas a 25 °C. O índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>%) foi determinado pela proporção entre a altura da fase emulsionada (A<sub>FE</sub>) e altura total do sistema (A<sub>T</sub>), conforme apresentado na Equação 1.

$$IE_{24}(\%) = \frac{A_{FE}}{A_T} \times 100 \quad (1)$$

### 2.6.2 Redução da tensão superficial (RTS%) e Tensão Interfacial (TI)

A tensão superficial do meio foi medida pelo método Du nouy (1925) em tensiômetro Kruss e a redução da tensão superficial (RTS%) em relação a condição inicial foi calculada conforme a Equação 2, pela relação entre a tensão superficial inicial do sistema (TS<sub>i</sub>) e tensão superficial final do sistema (TS<sub>f</sub>). Para cada análise utilizou-se 20 mL de MLC ou solução de BB (em diferentes concentrações) e as tensões superficiais foram medidas a 25 °C e analisadas em triplicata.

$$RTS(\%) = \frac{TS_i - TS_f}{T_i} \times 100 \quad (2)$$

A tensão interfacial (TI) entre a fase aquosa e hidrofóbica foi medida no tensiômetro Kruss, para avaliar as interações intermoleculares entre as fases em ausência e presença do bioemulsificante. Nessas análises foram adicionados 10 mL de querosene a 10 mL de meio livre de células (MLC) ou solução contendo bioemulsificante (BB: 1 g L<sup>-1</sup>) e usou-se como controle o meio de cultura e água. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.6.3 Diluição micelar crítica (DMC) e concentração micelar crítica (CMC)

A diluição micelar crítica (DMC) do meio livre de células (MLC) e concentração micelar crítica (CMC) do bioemulsificante bruto (BB) foram determinadas por metodologia adaptada de Sheppard & Mulligan (1987). Assim, a DMC foi calculada pelo ponto de inflexão da curva de diminuição da tensão superficial em relação a diluição do meio livre de células (MLC). Desse modo, foram realizadas sucessivas diluições a partir do meio livre de células

(MLC) em água destilada. A concentração micelar crítica (CMC) do bioemulsificante bruto (BB) foi determinada pelo ponto de inflexão da curva do gráfico da variação de tensão superficial pela concentração de BB.

## 2.7 Estabilidade do bioemulsificante

A persistência das emulsões formadas com querosene e o MLC, obtido nas condições otimizadas, foi avaliada mantendo-se o sistema a 25 °C e verificando-se a alteração na altura da emulsão a cada 30 dias por um período total de 120 dias. Possíveis alterações no perfil do diâmetro das gotas foram avaliadas em microscópio ótico.

A estabilidade do BB foi avaliada quanto ao índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>) em relação ao pH, temperatura e concentração de NaCl de acordo com metodologia reportada por Rocha *et al.* (2014), com modificações. Para analisar o perfil de estabilidade em diferentes pH, solubilizou-se BB em concentração padrão (1 g L<sup>-1</sup>) em água com pH ajustado (2, 4, 6, 7, 8 e 10) com solução de NaOH e HCl a 1 mol L<sup>-1</sup>. A estabilidade térmica foi avaliada ao manter a solução de BB (1 g L<sup>-1</sup>) em diferentes temperaturas (60 °C, 80 °C, 100 °C e 121 °C) por até 120 minutos. Por fim, soluções contendo BB a 1 g L<sup>-1</sup> e com diferentes concentrações de NaCl (0, 2,5, 5, 10, 20 e 50 g L<sup>-1</sup>) foram preparadas para avaliar a estabilidade do bioemulsificante produzido a condições salinas.

## 2.8 Avaliação da ecotoxicidade do bioemulsificante

A ecotoxicidade, que incluiu a avaliação da fitotoxicidade e da citotoxicidade do bioemulsificante, foi determinada por metodologia adaptada de Tiquia *et al.* (1996), descrita a seguir.

Para avaliar a fitotoxicidade foi observado o efeito do bioemulsificante no alongamento das raízes e o número de sementes germinadas de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e couve (*Brassica oleracea*). Para tal, foram colocados papel de filtro (10 cm de diâmetro) em placas de Petri e umedecidos com 1 mL de solução de BB com diferentes concentrações (0, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000 e 3000 mg L<sup>-1</sup>), todos os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida foram distribuídas 10 sementes sobre o papel, como ilustrado na Figura 2.1. As placas foram colocadas em câmara de germinação, na ausência de luz a 25 °C por 120 h. No terceiro dia de incubação, o sistema foi regado com 1 mL da solução de BB (na respectiva concentração utilizada no início do experimento). Após o período de incubação, as sementes germinadas

foram contadas e mediu-se o comprimento das raízes entre o hipocótilo e a extremidade da raiz com auxílio de paquímetro. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

**Figura 2.1** - Sementes de *Ocimum basilicum* distribuídas em papel filme para avaliação da fitotoxicidade do bioemulsificante produzido.



Fonte: Autor

O índice de germinação (IG%) foi calculado pela relação entre o número de sementes germinadas no meio contendo bioemulsificante ( $N_b$ ), o número de sementes germinado no controle ( $N_c$ ), o tamanho das raízes germinadas meio contendo bioemulsificante ( $T_b$ ) e o tamanho das raízes germinadas no controle ( $T_c$ ), conforme as Equação 4.

$$IG\% = \frac{SG\% \times CR\%}{100} \quad (4)$$

A citotoxicidade em *Artemia salina*, um microcrustáceo, ilustrado na Figura 2.2, foi realizado para avaliar os efeitos do bioemulsificante sobre fauna, segundo metodologia adaptada de Meyer *et al.* (1982). Assim, para eclodir os cistos, preparou-se 200 mL de solução de água do mar simulada e adicionou-se 0,2 g de cistos sob luz e aeração a 25 °C por 24 h.

**Figura 2.2** - Microcrustáceos (*Artemia salina*) eclodidos em água do mar simulada para avaliação da citotoxicidade do bioemulsificante.



Fonte: Autor

Em seguida, 10 náuplios foram transferidos para frascos de vidro contendo 5 mL de solução de BB a diferentes concentrações (10, 50, 100, 1000, 2000 e 3000 mg L<sup>-1</sup>) e utilizou-se água do mar simulada como controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As contagens de microcrustáceos vivos e mortos foram realizadas após 48 h, sendo considerados mortos aqueles organismos que não se movimentassem por 10 segundos (REIS, 2021). Após o ensaio, buscou-se por alterações anatômicas como dilatação no estômago ou rompimento de membros nos corpos dos microcrustáceos por microscopia ótica (Olympus CX21), ampliando-se em até 100x.

Por fim, ajustou-se uma equação linear simples aos dados de porcentagem de náuplios de *Artemia salina* mortos em relação a concentração da solução de BB, assim sendo possível a determinação da concentração letal 50 (CL<sub>50</sub>) e concentração letal 95 (CL<sub>95</sub>).

## 2.9 Potencial biorremediador

### 2.9.1 Dispersão de petróleo *in vitro* simulando ambiente marinho

O potencial emulsificante do meio livre de células (MLC) e do bioemulsificante (BB) foram avaliados utilizando amostras de óleo coletadas do acidente ambiental de 2019 na costa brasileira, em Aquiraz – Ceará (03°56'46" S, 38°16'36" W). Inicialmente, 0,3 g de óleo foi mantido em contato com 30 mL de MLC ou solução de BB (1% ou 10% (m/v)) em frascos

Erlenmeyer de 50 mL por um período de 0 a 21 dias. A redução da massa de óleo causada pela ação do bioemulsificante em água do mar simulada em laboratório (composição 23,5 g L<sup>-1</sup> NaCl, 5,0 g L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub> e 4,0 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) foi analisada gravimetricamente e o perfil dos hidrocarbonetos solubilizados foi avaliado por cromatografia gasosa (segundo metodologia descrita no tópico 2.10.4). Água do mar simulada (sem BB) e dodecil sulfato de sódio (SDS, 1% (m/v)) solubilizado em água do mar simulada, foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

### 2.9.2 Dispersão de petróleo em superfície aquosa

Para determinar o poder dispersante do bioemulsificante adicionou-se 30 mL de água destilada em uma placa de Petri (10 cm de diâmetro), em seguida adicionou-se 1,0 mL de petróleo bruto sobre a superfície da água. Em seguida 0,5 mL de MLC e solução de BB (1 g L<sup>-1</sup>) foi lentamente gotejada no centro do filme de óleo. A ação do bioemulsificante foi detectada pelo espalhamento do óleo e formação de halo. A área de dispersão de óleo (ADO) foi calculada conforme a Equação 5, onde r é o raio do halo.

$$ADO = \pi \times r^2 \quad (5)$$

### 2.9.3 Limpeza de areia contaminada

O potencial dispersante do BB para a limpeza de solo contaminado foi avaliado verificando-se sua ação em areia impregnada com óleo, simulando uma condição real de derramamento no ambiente conforme metodologia adaptada (MORAIS; ABUD, 2012). Esses ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 g de areia (50-70 mesh) (Sigma-Aldrich) contaminada com óleo de motor (5 mL). Em seguida, então adicionou-se 30 mL de solução de BB (1 g L<sup>-1</sup>) como agente remediador. Água do mar simulada e SDS foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. Para similar as condições ambientais, como o movimento das ondas, as amostras foram incubadas em agitação de 100 rpm a 25 °C por 7 dias. Após este período, a areia foi separada por filtração a vácuo e lavada com 100 mL de água destilada. Então a areia foi seca a 60 °C e a massa de óleo removida foi calculada gravimetricamente, sendo comparada com a massa seca pesada antes do experimento. Testes sem agitação foram conduzidos com todas as amostras para comparação de resultados, e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.9.4 Dispersão de óleo aderido em rochas**

Rochas contaminadas com óleo coletadas em regiões costeiras (nas seguintes coordenadas: 03°56'46'' S, 38°16'36'' W) foram utilizadas para avaliar a eficácia do bioemulsificante como agente remediador. As rochas foram mantidas em contato com MLC a 30 °C por 7 dias e sob agitação de 150 rpm para simular a ação das ondas. Após esse período, a redução do tamanho das manchas presentes nas rochas foi determinada por avaliação visual.

## **2.10 Métodos analíticos**

### **2.10.1 Determinação da biomassa**

O crescimento celular foi acompanhado por densidade óptica (DO), à comprimento de onda de 600 nm, em espectrofotômetro *Biochrom Libra S11*, e a concentração celular foi determinada por curva de calibração previamente obtida.

### **2.10.2 Determinação da concentração de glicose**

A concentração de glicose foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA), em conjunto com detector de índice de refração (Model 2412) e coluna Supelco 610-H com a análise conduzida a 65 °C. O eluente utilizado foi uma solução aquosa de 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ao fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> e o volume de injeção das amostras foram 20 µL.

### **2.10.3 Identificação de grupos funcionais típicos**

A análise dos grupos funcionais da biomolécula foi realizada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada acoplado (ATR-FTIR). A análise foi realizada em espectrômetro Cary 630 (Agilent Technologies), na região de 650-4000 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 1 cm<sup>-1</sup> e 32 varreduras.

### **2.10.4 Perfil dos hidrocarbonetos dispersos por ação do bioemulsificante**

Para avaliação da distribuição de *n*-alcanos no ensaio de dispersão, inicialmente os alcanos residuais foram extraídos com hexano 2:1 (hexano:meio) sob agitação em agitador orbital a 200 rpm por 30 minutos. Em seguida, a fase orgânica foi coletada em funil de separação e a umidade foi removida pela adição de sulfato de sódio a 20% (m/v) e filtrado. O solvente foi removido em balão de fundo redondo conectado a evaporador rotativo. O extrato foi coletado em vials e analisado por cromatografia gasosa na Central Analítica de Instrumentação da

Universidade de São Paulo (Instituto de Química, Universidade de São Paulo). O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu (Kyoto, Japão) com espectrometria de massa (CG-MS) com detector de ionização de chama (*Flame ionization detection*, FID). A coluna capilar cromatográfica DB-5MS (30m x 0,25 mm I.D.) foi utilizada para CG-FID e CG-MS. O gás de arraste foi hélio ultrapuro. A temperatura de injeção e de análise foi de 280 °C por 20 minutos a uma taxa de aquecimento de 3 °C/minuto. A identificação dos picos foi realizada por comparação com os picos obtidos do padrão C8-C40 (Sigma Aldrich Chemical Co.) e confirmada por espectroscopia de massa.

### **2.10.5 Determinação da concentração de proteínas**

Para determinar a concentração de proteínas no MLC e em soluções de BB e BPP (1 g L<sup>-1</sup>) usou-se o método Bradford (1976), determinando a concentração por uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA, adquirida da Sigma-Aldrich Chemical Co.).

### **2.10.6 Identificação de prótons da molécula de bioemulsificante**

A avaliação estrutura molecular do bioemulsificante pré-purificado foi realizada na Central Analítica de Instrumentação da Universidade de São Paulo (Instituto de Química, Universidade de São Paulo). O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do bioemulsificante pré-purificado foram obtidos em Espectrômetro Varian Inova 500 de 11,5 Tesla, operando a frequência de 300 MHz, a uma temperatura de 25 °C. Água deuterada (D<sub>2</sub>O) foi o solvente utilizado na dissolução das amostras e o sinal residual do hidrogênio foi usado na calibração dos espectros. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram dados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

### **2.10.6 Avaliação da massa molecular da unidade do bioemulsificante**

A avaliação da massa molecular do bioemulsificante pré-purificado foi realizada na Central Analítica de Instrumentação da Universidade de São Paulo (Instituto de Química, Universidade de São Paulo). Para análise, a amostra seca foi aplicada a matriz contendo 1% (m/v) de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamico em 30% (v/v) acetonitrila e 0,1% (v/v) trifluoroacético e seca em vácuo. O espectro foi coletado em Ultraflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Alemanha). Os dados reportados são resultantes de sinais de aproximadamente 800 lasers.

### 2.10.7 Equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) do bioemulsificante

A avaliação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico foi avaliada para identificação da formação de emulsões água/óleo ou óleo/água conforme metodologia adaptada de Dehghan-Noude; Housaindokht; Bazzaz (2005). Para tal, utilizou-se dois surfactantes sintéticos de HLB conhecido, um com baixo valor de HLB, solúvel em óleo (*Span* 80, HLB 4,3), e um com alto valor de HLB, solúvel em água (*Tween* 80, HLB 15,0). Em seguida, os surfactantes foram homogeneizados por 2 minutos sob agitação vigorosa em diferentes proporções, determinadas pela Equação 6, para a produção de soluções com HLB variados (8-15), pela proporção entre o HLB dos surfactantes e a massa (% , m/m) entre eles, para obtenção da Tabela 2.1.

$$HLB_{solução} = \frac{(HLB_{Span\ 80} \times M_1) + (HLB_{Tween\ 80} \times M_2)}{100} \quad (6)$$

**Tabela 2.1:** Diferentes proporções de *Span* 80 e *Tween* 80 utilizadas para criar soluções com HLB variando de 8-15.

Razão <i>Span</i> 80: <i>Tween</i> 80 (% , m/m)	HLB
65,4:34,6	8
56,9:43,1	9
47,7:53,3	10
37,4:62,6	11
28,0:72,0	12
18,7:81,3	13
9,3:90,7	14
0,0:100,0	15

Em seguida, foi realizado a análise do índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>%), conforme descrito na seção 2.6.1, utilizando óleo de parafina como fonte hidrofóbica, com cada uma das soluções supracitadas como agente emulsificante (0,5% m/v). Após realização do teste, a altura da fase aquosa foi medida com paquímetro e comparada com o bioemulsificante purificado, na

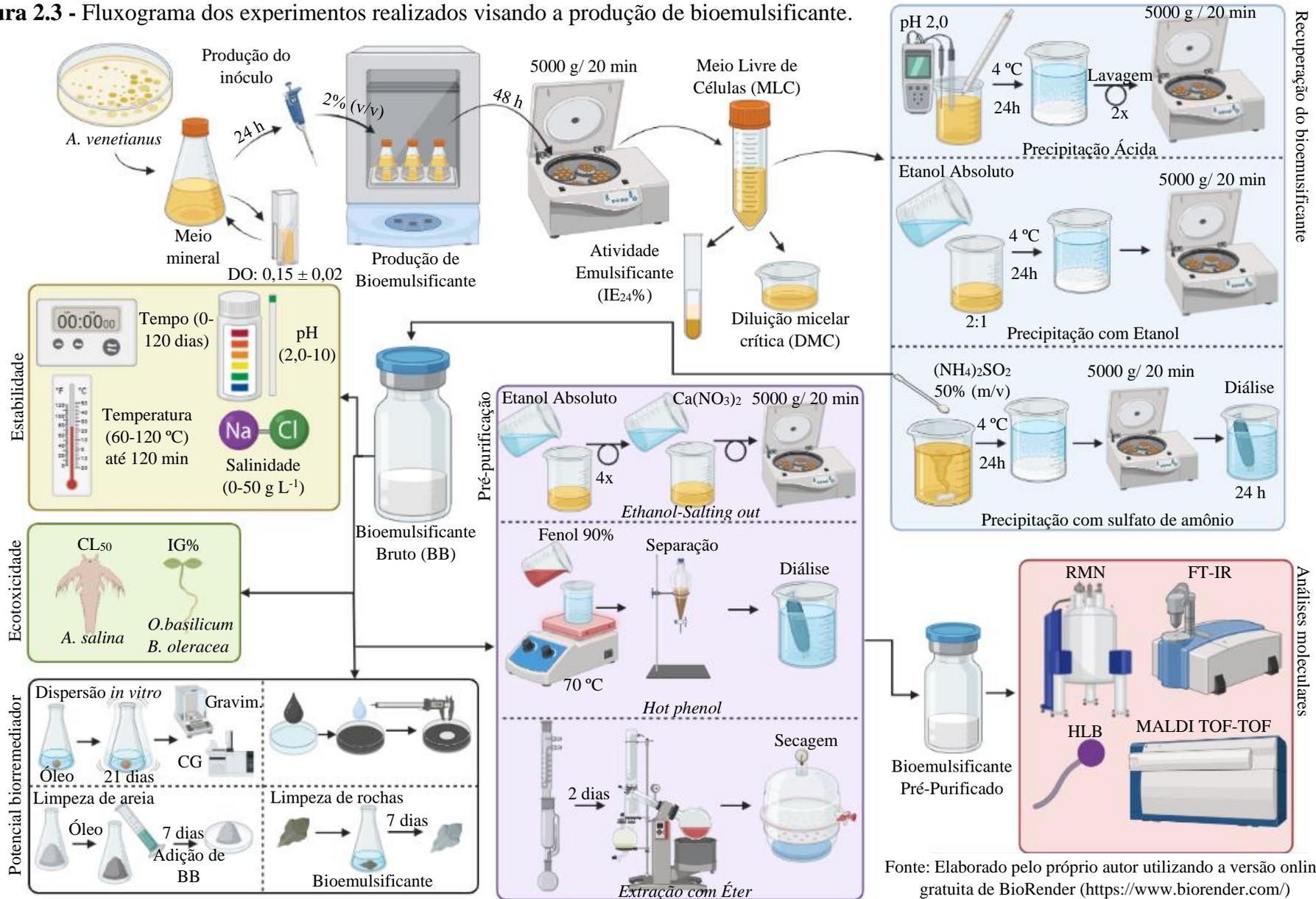
mesma concentração. O HLB do bioemulsificante foi considerado o mesmo da solução contendo o mesmo volume de fase aquosa.

### **2.10.8 Análises estatísticas**

A análise dos dados de significância estatística foi realizada por meio de uma análise de uma via de variância (ANOVA) a um nível de significância de 95%. Os dados também foram analisados pelo teste de *Tukey* utilizando software Microcal Origin 8.5 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, EUA) a um nível de significância de 95%.

Na Figura 2.3 é apresentado um fluxograma explorando todas as etapas realizadas durante a produção deste trabalho.

Figura 2.3 - Fluxograma dos experimentos realizados visando a produção de bioemulsificante.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

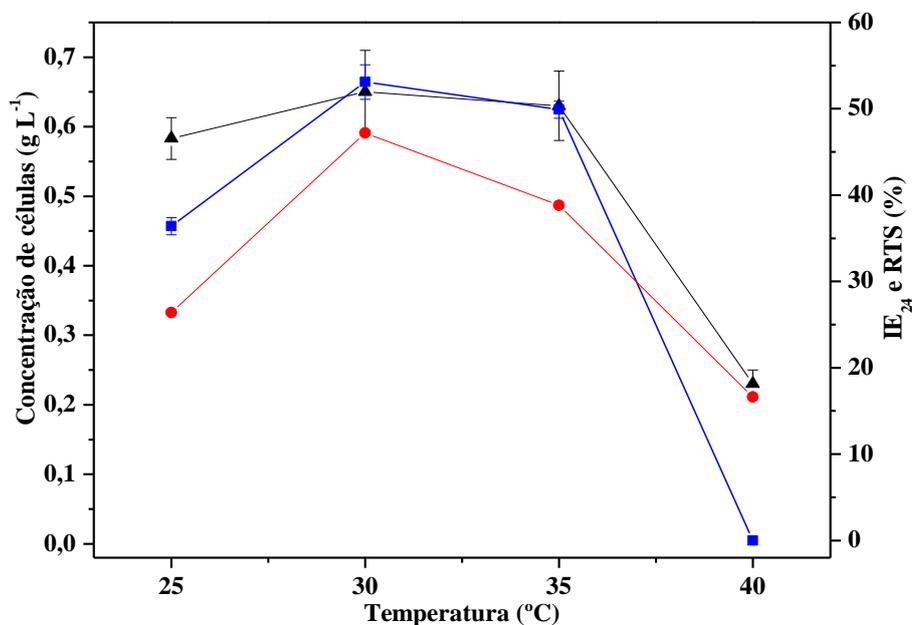
Os resultados aqui reunidos foram utilizados para elucidar a produção de bioemulsificante por uma cepa de *Acinetobacter venetianus* isolada a partir de amostras coletadas de petróleo vazado no oceano Atlântico (2019), mas que teve como um dos destinos a costa brasileira, levando a um dos principais acidentes ambientais registrados no Brasil. A utilização de emulsificantes possui ampla utilização industrial, e sua produção a partir de uma origem biológica, como o cultivo microbiano, pode ampliar os horizontes para o estabelecimento de tecnologias que sejam efetivamente verdes, consequentemente, que reduzam impactos ambientais.

#### 3.1 Otimização das condições de produção de bioemulsificante

Para estabelecimento das melhores condições de produção do bioemulsificante, os bioprocessos foram conduzidos a diferentes condições de temperatura, com meio de cultura a diferentes pHs e suplementado com diferentes concentrações de NaCl. A biomassa mensurada em peso seco foi adotada como parâmetro para avaliar o crescimento celular pela densidade ótica, o índice de emulsificação do meio livre de células (MLC) para estimar a atividade emulsificante, e a partir da redução da tensão superficial (RTS) avaliou-se a atividade surfactante.

A temperatura é um dos fatores cruciais para determinar a atividade celular de bactérias, afetando o metabolismo e, por consequência, a síntese de bioprodutos. Na Figura 2.4 é possível observar os efeitos da temperatura na produção de bioemulsificante por *Acinetobacter venetianus* AMO1502, um crescimento celular de  $0,58 \text{ g L}^{-1} \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$  a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  pode ser observado, aumentando para  $0,65 \text{ g L}^{-1} \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,63 \text{ g L}^{-1} \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$  a 30 e  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, porém diminuindo consideravelmente para  $0,23 \text{ g L}^{-1} \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  a  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . A atividade emulsificante ( $\text{IE}_{24}\%$ ) e redução da tensão superficial (RTS) foram mais altas ao conduzir o processo a  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , alcançando  $\text{IE}_{24}\%$  superior a 50% e RTS superior a 30%.

**Figura 2.4** - Influência da temperatura na produção de bioemulsificantes por *A. venetianus* AMO1502. (▲) Concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Índice de emulsificação (IE<sub>24</sub> %) e (●) Redução da tensão superficial (RTS%).

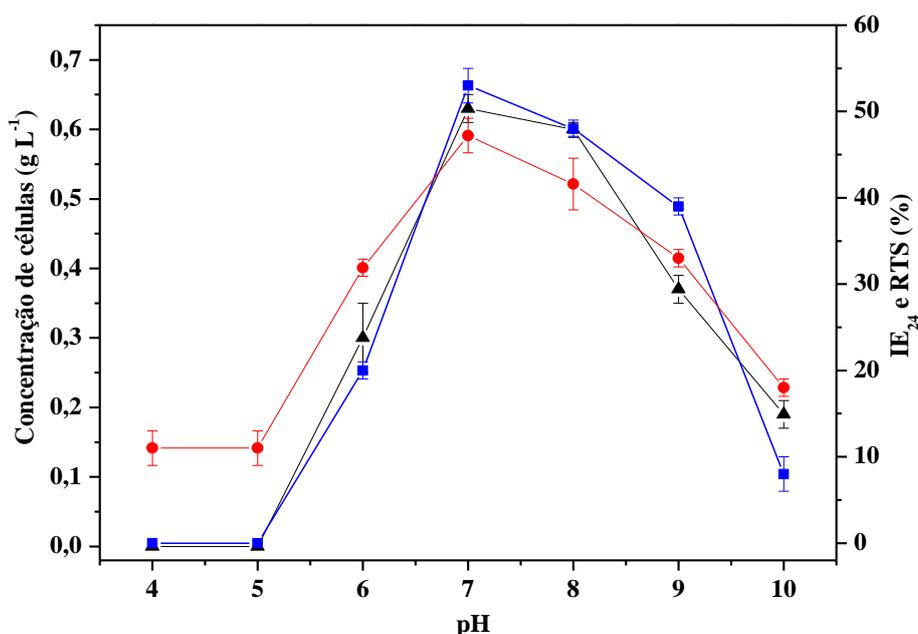


A 40 °C observa-se uma redução significativa no crescimento do microrganismo e ausência de atividade emulsificante, o que indica que temperaturas mais elevadas inibem o crescimento e afetam metabolismo de células do gênero *Acinetobacter* (MUTAI *et al.*, 2014). A redução da tensão superficial observada mesmo a essa temperatura, que alcançou 16%, pode ser atribuída a composição do meio mineral, que contém íons e outras substâncias que diminuem a tensão superficial da água de  $72 \pm 1 \text{ mN m}^{-1}$  para em torno de  $60 \pm 3 \text{ mN m}^{-1}$ .

Assim, a temperatura de 30 °C foi selecionada para produção, o que está de acordo com outros estudos que investigaram a produção de emulsificantes por cepas de *Acinetobacter* (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008). Essa condição é semelhante ao observado por outros autores, como Du Preez (1985), que reportaram, a partir de estudos cinéticos a temperatura ótima para o crescimento de bactérias da espécie *Acinetobacter calcoaceticus* como entre 30-36 °C, enquanto Mutai *et al.* (2014) observaram um melhor crescimento em temperatura de 30 °C, o que corrobora os resultados aqui encontrados.

Em relação a influência do pH na produção de bioemulsificante, observou-se um maior crescimento celular, atividade emulsificante e atividade tensoativa em pH 7,0 e 8,0, diminuindo conforme o meio de cultivo é mais alcalinizado, perfil apresentado na Figura 2.5, indicando que a concentração de  $H^+$  e  $OH^-$  no meio influencia no crescimento celular e produção de bioemulsificante (MUTAI *et al.*, 2014). Essa preferência por tal faixa ocorre primariamente pela origem da cepa, que foi isolada de amostras de óleo coletadas em praias no litoral cearense, o que pode ter promovido o desenvolvimento de resistência a meios neutros a levemente alcalinos devido o pH da água do mar (até em torno de 8,2) (MUTAI *et al.*, 2014).

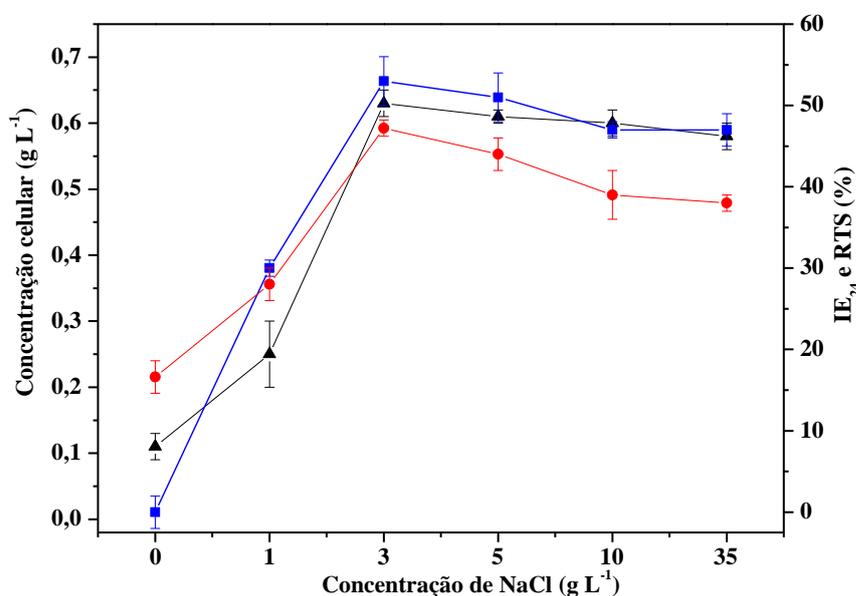
**Figura 2.5** - Influência do pH do meio de cultivo na produção de bioemulsificantes por *A. venetianus* AMO1502. (▲) Concentração de células ( $g L^{-1}$ ), (■) Índice de emulsificação (IE<sub>24</sub> %) e (●) Redução da tensão superficial (RTS%).



Diversos trabalhos têm reportado a presença de NaCl como um importante requisito para o crescimento de bactérias do gênero *Acinetobacter* (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008), que normalmente são encontradas em ambientes costeiros, e têm sido citados como microrganismos isolados de derramamentos de óleo no mar (HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012; MUTAI *et al.*, 2014).

Com base nos resultados apresentados na Figura 2.6, é possível se inferir que a concentração de NaCl exerce grande influência no crescimento celular, visto que no meio sem NaCl e no meio suplementado com apenas  $1 \text{ g L}^{-1}$  deste sal obteve-se as menores concentrações de células, reforçando a importância da salinidade do meio para estabilidade da pressão osmótica da célula desta espécie de microrganismos (MUTAI *et al.*, 2014). A partir de  $3 \text{ g L}^{-1}$  até  $35 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl, não é observada variação significativa na concentração celular, isso ocorre pela alta salinidade do ambiente de coleta da cepa, que são os manguezais, onde a salinidade do meio pode variar de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  a  $35 \text{ g L}^{-1}$ , dependendo da época do ano e efeitos de maresia, que induziu o desenvolvimento de resistência à altas concentrações de sais no meio (SAZON; MIGO, 2018). A redução da tensão superficial e atividade emulsificante do meio livre de células também se mostrou estável mesmo em altas concentrações de NaCl no meio, o que reforça tanto a resistência da célula quanto a estabilidade do emulsificante produzido.

**Figura 2.6** - Influência da concentração de NaCl do meio de cultivo na produção de bioemulsificantes por *A. venetianus* AMO1502. (▲) Concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Índice de emulsificação ( $\text{IE}_{24}$  %) e (●) Redução da tensão superficial (RTS%).



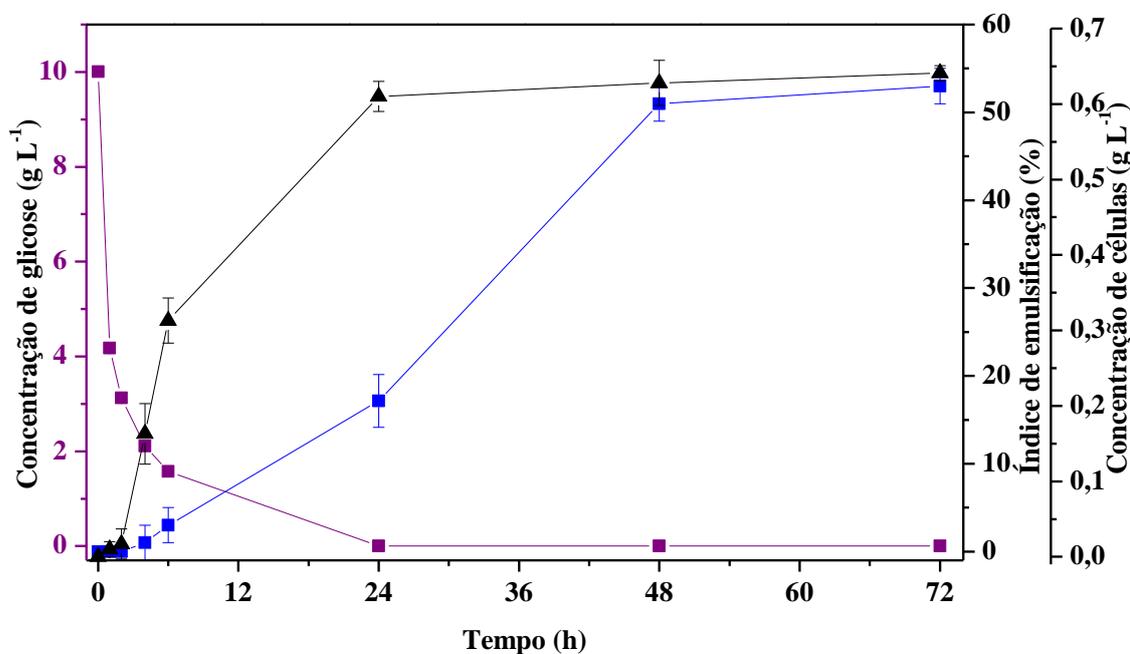
Esse comportamento também foi reportado por outros autores que observaram a necessidade do NaCl para o crescimento do gênero *Acinetobacter* (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; PHETRONG; H-KITTIKUN;

MANEERAT, 2008), que precisa da salinidade para o balanço de pressão osmótica entre o interior e o exterior da sua parede celular (MUTAI *et al.*, 2014). Assim, a *A. venetianus* AMO1502 se mostrou facilmente adaptável a meios salinos, apresentando baixa predileção por meios sem a presença de NaCl, o que é representativo do seu local de coleta.

Assim, para produção do bioemulsificante e maior crescimento celular, padronizou-se o meio de cultivo com pH 7,0 e suplementado com uma concentração de NaCl de 3 g L<sup>-1</sup> e o processo conduzido a 30 °C.

Após estudo das condições ótimas do meio, foi realizada a produção de bioemulsificante por 72 h, para estudo cinético do consumo de glicose, crescimento celular e índice de emulsificação do meio livre de células (MLC), de modo a avaliar o perfil de produção nessas condições, cujos resultados estão demonstrados nas Figura 2.7.

**Figura 2.7** - Perfil da produção de bioemulsificante no meio mineral em condições otimizadas: meio de cultivo a pH 7,0 e suplementado com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl e processo conduzido a 30 °C: concentração de células (▲), concentração de glicose (■) e índice de emulsificação (■).

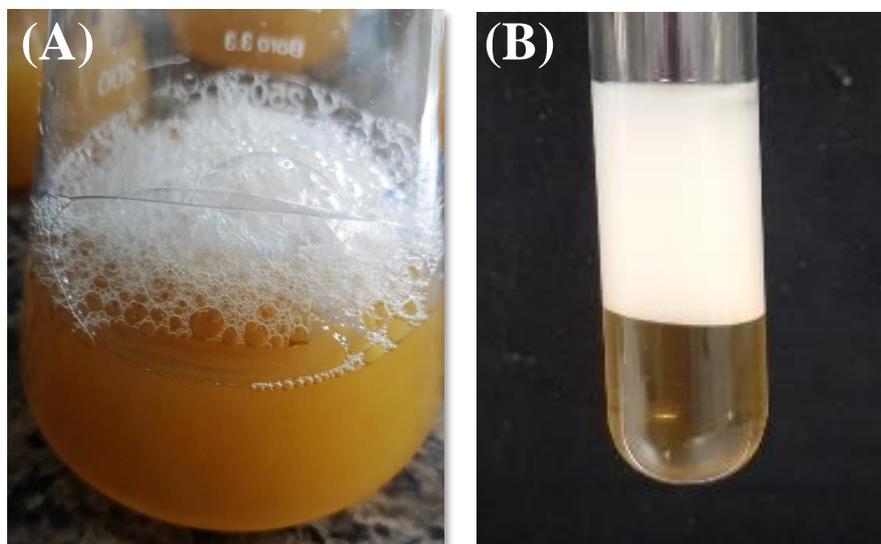


Observa-se que a produção de bioemulsificante se inicia ao final da fase exponencial, seguindo durante a fase estacionária, até 48 horas de processo fermentativo, comportamento

também observado por Rocha *et al.* (2006) na produção de um emulsificante a partir de uma cepa de *Acinetobacter calcoaceticus*, sendo uma rota de produção comum de bioemulsificantes de *Acinetobacter* (ROSENBERG *et al.*, 1988). A produção de emulsificante no meio foi acompanhada pela mensuração da atividade emulsificante do meio livre de células (MLC), avaliada pelo IE<sub>24%</sub>, observando-se, em 48 horas, um IE<sub>24%</sub> de  $53 \pm 2\%$ , apresentado na Figura 2.8. Esse perfil emulsificante é semelhante ao apresentado em outros trabalhos com outras cepas de *Acinetobacter* em meio mineral de composição semelhante, apresentando índice de emulsificação entre 40 e 70% (HYDER, 2015; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021). Desse modo, o tempo de produção no meio otimizado foi padronizado em 48 h.

Assim, a glicose se mostrou uma fonte de carbono eficiente para a produção de bioemulsificantes de *Acinetobacter* nas condições otimizadas, resultando em alto crescimento celular ( $0,64 \text{ g L}^{-1}$ ) e índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>: 53%).

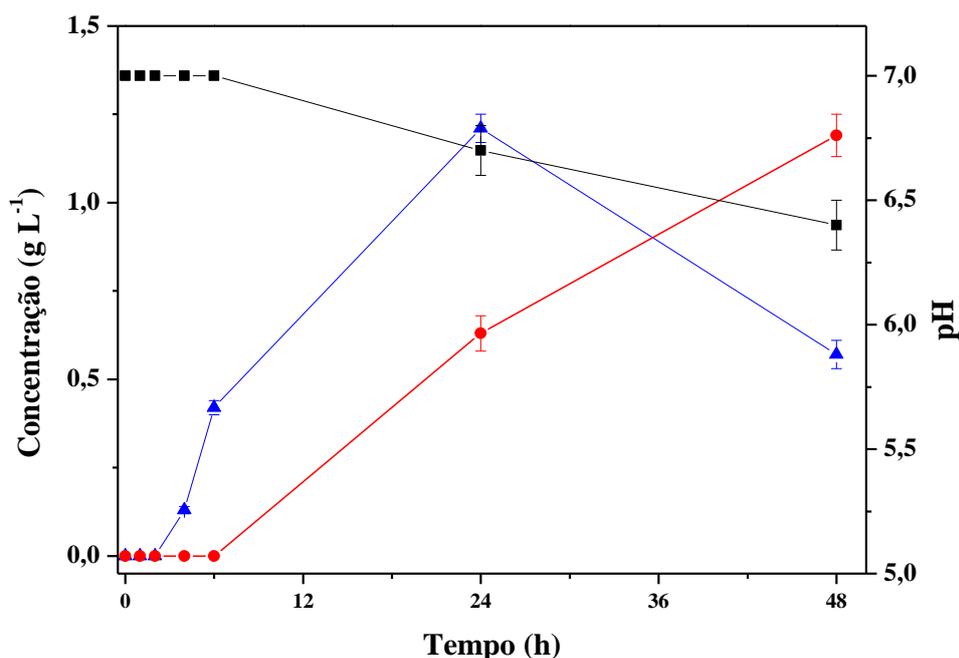
**Figura 2.8** - Meio livre de células (MLC) contendo bioemulsificante, o que é evidenciado pela produção de espuma (A) e emulsão do caldo de produção (MLC) utilizando querosene como fonte hidrofóbica a 25 °C (B).



Também foi avaliada a alteração do pH do meio em função de subprodutos gerados pela fermentação com *A. venetianus*, no qual observou-se uma leve redução do pH do meio de 7,0 para  $6,4 \pm 0,3$ , causado pela produção de ácido acético, confirmado por cromatografia líquida de alta eficiência, ocorrendo uma produção de  $1,19 \text{ g L}^{-1}$  deste ácido acético com 48 h de produção, assim como  $0,57 \text{ g L}^{-1}$  de etanol, como demonstrado na Figura 2.9. A produção de

etanol ocorre devido a rota metabólica que utiliza a glicose como fonte energética, o qual é convertido em ácido acético para posterior conversão em ATP pelo ciclo de Krebs (KOTHARI *et al.*, 2016).

**Figura 2.9** - Perfil do pH durante a produção de bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus*: (■) pH, (▲) concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (●) concentração de ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ ).



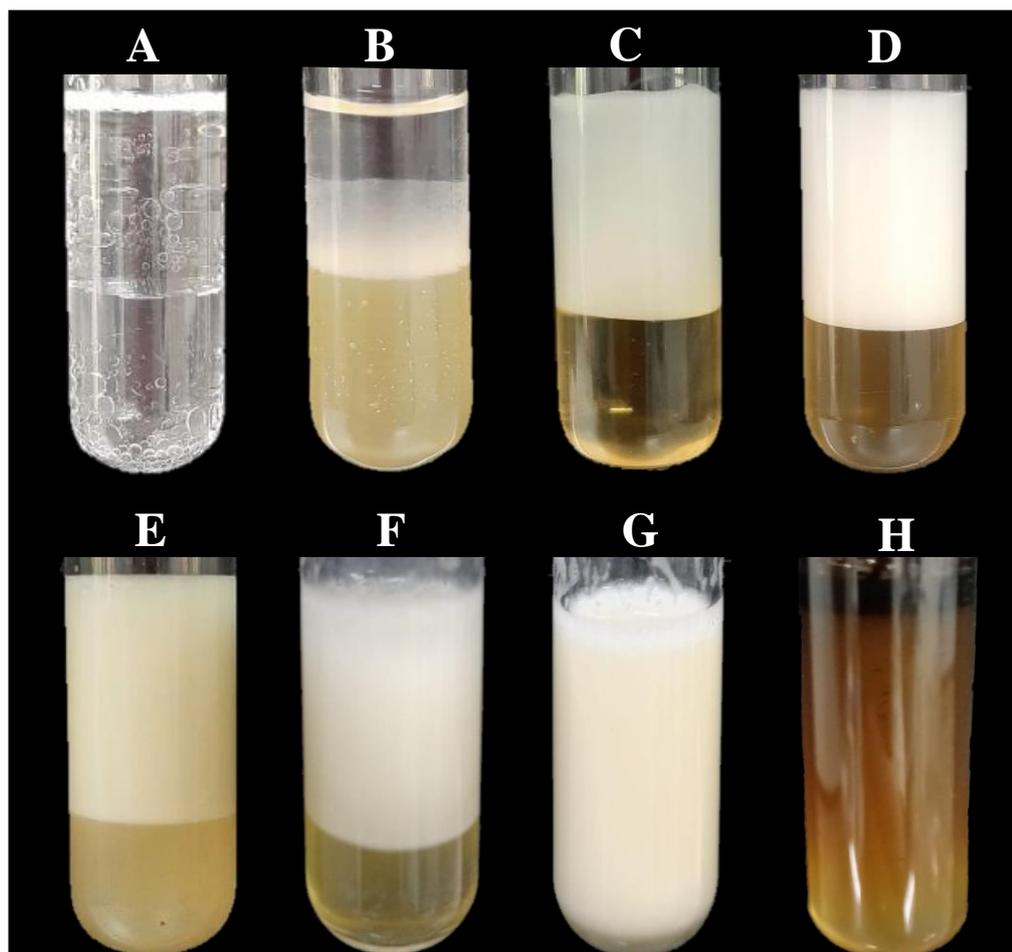
Assim, utilização de meios com características semelhantes ao meio de coleta da cepa (mangues de água salobra) resultou em maior crescimento, indicando uma mais fácil adaptação tanto durante a produção do inóculo quanto na produção de bioemulsificante, se refletindo na alta concentração de células e índice de emulsificação ( $\text{IE}_{24\%}$ ) do meio de produção.

### 3.2 Atividade emulsificante do MLC

Os bioemulsificantes produzidos por *Acinetobacter venetianus* se caracterizam como extracelulares (MERCALDI *et al.*, 2008), assim sendo possível sua utilização a partir do caldo de fermentação após separação do microrganismo, sendo denominado meio livre de células (MLC). Bioprodutos extracelulares apresentam vantagens em relação aos intracelulares, em especial no *downstream*, dispensando etapas de rompimento de parede celular e separação de organelas, facilitando a separação do produto.

Dessa forma, MLC apresentou elevada atividade emulsificante, cujas emulsões são apresentadas na Figura 2.10 e Tabela 2.2, para compostos complexos como óleo de ácidos graxos essenciais (AGE) (IE<sub>24</sub>%: 95%), petróleo (IE<sub>24</sub>%: 90%) óleo mineral (IE<sub>24</sub>%: 75%), óleo de soja (IE<sub>24</sub>%: 63%), querosene (IE<sub>24</sub>%: 53%), porém mostrou-se pouco eficaz para emulsionar hexano puro (IE<sub>24</sub>%: 11%), mas apresentou considerável atividade emulsificante para o hexano em misturas com óleo de soja (IE<sub>24</sub>%: 55%) e querosene (IE<sub>24</sub>%: 50%). Esse comportamento provavelmente ocorre devido a maioria dos compostos emulsificantes produzidos por cepas de *Acinetobacter* serem biopolímeros mais efetivos em moléculas de cadeias mais longas (C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>), sendo ineficazes para emulsionar hidrocarbonetos de cadeias mais curtas na sua forma pura, como pentano e hexano, porém sendo eficientes para emulsionar esses compostos menores em misturas com outros hidrocarbonetos (LIU *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 1999).

**Figura 2.10** - Emulsões formadas pelo bioemulsificante extracelular de *A. venetianus* AMO1502 presente meio livre de células (MLC), produzido utilizando glicose como fonte de carbono a 30 °C, pH 7,0, 150 rpm com adição de NaCl (3 g L<sup>-1</sup>), em diferentes fontes hidrofóbicas: (A) Água; (B) Hexano; (C) Heptano; (D) Querosene; (E) Óleo de Soja; (F) Óleo mineral; (G) Óleo AGE e (H) Petróleo.



**Tabela 2.2** - Índice de emulsificação (IE<sub>24%</sub>) do bioemulsificante extracelular de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 presente no meio livre de células (MLC) usando diferentes fontes hidrofóbicas.

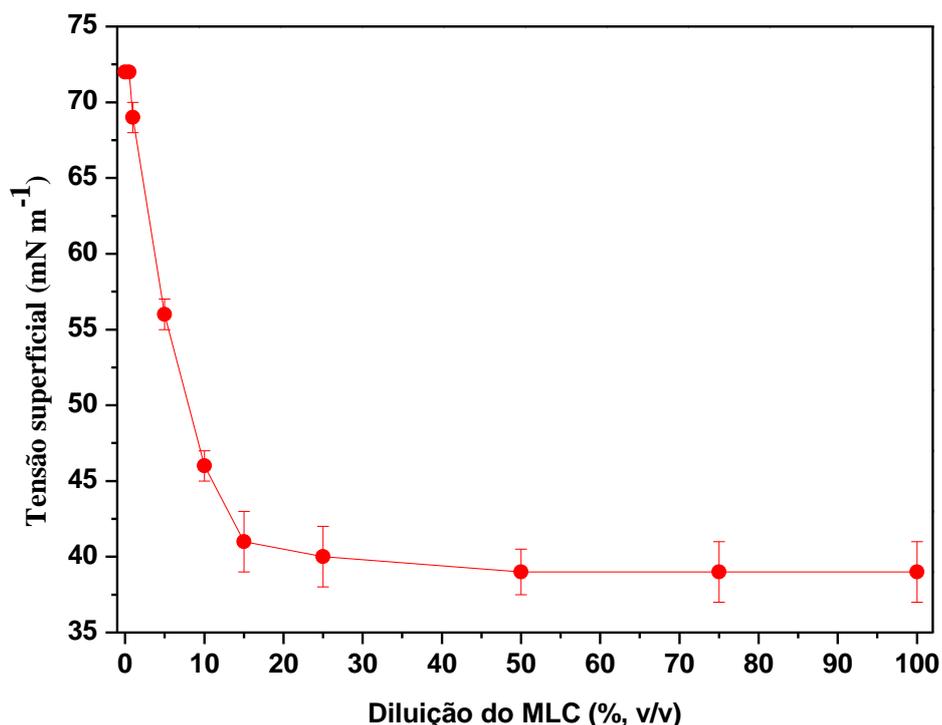
Fonte hidrofóbica	IE <sub>24%</sub>	Principais Componentes ou fórmula molecular
Hexano	11 ± 1	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
Heptano	48 ± 2	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>
Querosene	53 ± 1	C <sub>7</sub> -C <sub>17</sub>
Óleo de Soja	63 ± 2	Ácido Palmítico (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ), ácido oleico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ) e ácido linoleico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )
Hexano + Querosene	50 ± 2	
Hexano + Óleo de Soja	55 ± 1	
Óleo de Soja + Querosene	59 ± 1	
Óleo Mineral	72 ± 4	Parafinas, naftenos e óleos aromáticos (C <sub>18</sub> ou maiores)
Óleo AGE	95 ± 3	Ácido Palmítico (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ), ácido oleico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ), ácido Linoleico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ), vitamina A (C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O) e vitamina E (C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> )
Hexadecano	52 ± 1	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>
Petróleo Bruto	90 ± 4	C <sub>14</sub> -C <sub>37</sub>

\* A composição dos óleos vegetais foi determinada por JABEUR *et al.* (2014), do petróleo por DE OLIVEIRA *et al.* (2020), e dos óleos combustíveis por COLLINS (2007).

Inicialmente, o MLC foi caracterizado quanto à diluição micelar crítica (DMC), em que a tensão superficial foi reduzida somente até valores próximos de 40 mN m<sup>-1</sup>, conforme apresentado na Figura 2.11, reforçando que a molécula produzida tem um caráter emulsificante devido ao seu potencial de gerar emulsões estáveis, conforme apresentado anteriormente, porém não diminui expressivamente a tensão superficial como alguns biossurfactantes, por exemplo, como a surfactina de *Bacillus subtilis*, capaz de reduzir a tensão superficial da água até 27 mN m<sup>-1</sup>, (DE FRANÇA *et al.*, 2022; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Além

disso, observa-se que em altas diluições (15% v/v) o meio atinge a menor tensão superficial (próximo de  $40 \text{ mN m}^{-1}$ ) indicando que foi alcançada a concentração micelar crítica.

**Figura 2.11** - Diluição micelar crítica (DMC) do meio livre de células contendo bioemulsificante extracelular produzido nas condições otimizadas ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7,0 e na presença de NaCl ( $3 \text{ g L}^{-1}$ )).



O comportamento apresentado pelo bioemulsificante avaliado neste trabalho é reportado em outros estudos. Trabalhos anteriores reportaram *A. venetianus* como uma cepa produtora de bioemulsificantes poliméricos com alto poder de formação de emulsões persistentes, porém baixa atividade surfactante, isto é, não diminuem a tensão superficial como outros emulsificantes biológicos de menor peso molecular, entretanto possuem estabilidade superior (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995).

Assim, os resultados previamente reportados podem representar que a precipitação por etanol causa a separação de porções do bioemulsificante contendo menos proteínas que as presentes originalmente no meio, o que é corroborado pelos resultados apresentados na Tabela

2.2, na qual observa-se que a precipitação por etanol apresenta um BB com menor concentração de proteínas que o precipitado com sulfato de amônio.

### 3.3 Recuperação do bioemulsificante

A recuperação do bioemulsificante foi realizada por três métodos, a precipitação ácida, precipitação por etanol ou por saturação com sulfato de amônio.

A precipitação ácida não foi eficiente na separação do bioproduto obtido por *A. venetianus* AMO1502. Esse método tem sido amplamente reportado na literatura para processos de purificação de biomoléculas surfactantes, em especial de baixo peso molecular (DE FRANÇA *et al.*, 2022; KHOPADE, A. *et al.*, 2012; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; PEREIRA *et al.*, 2013). Esse método causa a desnaturação de proteínas alterando sua estabilidade eletrônica e diminuindo sua solubilidade, podendo causar perda de atividade da biomolécula, mas é considerado barato e eficiente para a precipitação de biosurfactantes de baixo peso molecular como surfactina, lipopetídeos e glicolipídeos (SATPUTE *et al.*, 2010).

A precipitação por etanol e por sulfato de amônio foram eficazes na precipitação de bioemulsificante bruto (BB), proporcionando concentrações de  $3,3 \text{ g L}^{-1} \pm 0,5$  e  $1 \text{ g L}^{-1} \pm 0,4$ , respectivamente, como apresentado na Tabela 2.3. Vale ressaltar que esses métodos de separação/recuperação não são seletivos, logo, o bioproduto obtido pode conter substâncias, como carboidratos e proteínas, que também têm sua solubilidade reduzida por influência do etanol e por sulfato de amônio.

**Tabela 2.3** - Concentração de proteínas no meio livre de células, BB-A e BB-E produzidos nas condições otimizadas (30 °C, pH 7,0 e  $3 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl).

Método de Precipitação	Concentração de BB ( $\text{g L}^{-1}$ )	Concentração de Proteínas ( $\text{mg L}^{-1}$ )*	Atividade Emulsificante (%)*
<i>MLC</i>	-	$242 \pm 28$	$53 \pm 1$
<i>BB-E</i>	$3,3 \pm 0,5$	$81 \pm 15$	$58 \pm 2$
<i>BB-SA</i>	$1,0 \pm 0,4$	$210 \pm 42$	$52 \pm 3$

\* As diluições foram realizadas a  $1 \text{ g L}^{-1}$

O isolamento de bioemulsificantes produzidos por *Acinetobacter venetianus* ainda é pouco explorado na literatura. Em geral, os diferentes métodos de precipitação aplicados para esses bioprodutos são baseados na supersaturação com sais para precipitação com proteínas (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MERCALDI *et al.*, 2008). Entretanto, para bioemulsificantes de alto peso molecular, como o caso dos produzidos por cepas de *Acinetobacter* sp., que possuem em torno de 1000 kDa (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; VÁZQUEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2017), a precipitação com solventes como etanol, acetona, acetato de etila, éter etílico e diclorometano tem sido aplicada com frequência (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008). Esse método de separação costuma ser indicado para moléculas com características de polissacarídeos (NOHATA; AZUMA; KURANE, 1996), como é o caso de alguns emulsificantes produzidos *Acinetobacter*, como o emulsan que é um lipoheteropolissacarídeo, contendo partes de sua molécula composta apenas por exopolissacarídeos, uma porção mais purificada que pode ser separada da parte proteica chamada “apoemulsan” (MERCALDI *et al.*, 2008).

Os resultados apresentados na Tabela 2.3 têm uma semelhança aos reportados por Phetrong *et al.* (2008) para a precipitação por etanol, que obtiveram concentrações de bioemulsificante similares ( $2,94 \text{ g L}^{-1}$ ) ao obtido no presente trabalho ( $3,3 \text{ g L}^{-1}$ ) para *Acinetobacter calcoaceticus*, um microrganismo de características filogenéticas semelhantes à *Acinetobacter venetianus* (VANECHOUTTE *et al.*, 1999).

Para avaliação das moléculas proteicas presentes no meio caldo de produção (meio livre de células) e em soluções de BB-E e BB-SA, foi realizada a análise da concentração de proteínas, de modo a avaliar a eficiência da etapa de separação do emulsificante. Os resultados mostram que o MLC apresentou maior concentração de proteínas ( $242 \text{ mg. L}^{-1}$ ). Já, em concentração de  $1 \text{ g L}^{-1}$ , o BB-SA ( $210 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentou uma concentração de proteínas 38,5% superior em comparação ao BB-E ( $81 \text{ mg. L}^{-1}$ ) na mesma concentração. Isso ocorre pela à adição de sulfato de amônio no meio, que diminui a solubilidade de proteínas, resultando na sua precipitação, desse modo o BB-SA apresenta menos impurezas proteicas presentes no meio de produção, oriundas do rompimento de células no processo fermentativo ou de origem do extrato de levedura presente no meio mineral, que o meio livre de células. Essa concentração de impurezas é ainda mais reduzida na precipitação com etanol, que é mais adequada para polissacarídeos.

Apesar de se tratar de um bioemulsificante proteico, o emulsan é composto por duas porções, uma proteica e outra composta de ácidos graxos e polissacarídeos (denominado apoemulsan), assim as duas estratégias de separação já foram utilizadas por diferentes autores para a precipitação da biomolécula (BACH; GUTNICK, 2006; BELSKY; GUTNICK; ROSENBERG, 1979; CHAMANROKH *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008). O apoemulsan, porção polissacarídica do emulsan, é considerada uma forma mais purificada do emulsan, possuindo peso molecular de 41-250 kDa, consideravelmente menor que a sua forma mais bruta (1000-1010 kDa) (DAMS-KOZLOWSKA *et al.*, 2008; GEORGE, 1985; MERCALDI *et al.*, 2008; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; VÁZQUEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2017). A menor concentração de proteínas no BB precipitado com etanol pode indicar uma maior precipitação dessa porção polissacarídica do emulsan, ao invés da parte proteica, o que está de acordo com a metodologia de precipitação com etanol que é adequada para precipitação de polissacarídeos (NOHATA; AZUMA; KURANE, 1996).

O bioemulsificante tanto precipitado com etanol (BB-E), quanto com sulfato de amônio (BB-SA), foram ressuspensos à concentração de  $1 \text{ g L}^{-1}$  para padronização dos resultados, e apresentaram atividades emulsificantes ( $\text{IE}_{24\%}$ ) de  $58\% \pm 2\%$  e  $52\% \pm 3\%$ , respectivamente, e atividade surfactante (RTS), de  $41,7\% \pm 3$  e  $37,5\% \pm 5\%$ , respectivamente, não apresentando diferença significativa para a RTS em análise de significância à nível de 95%.

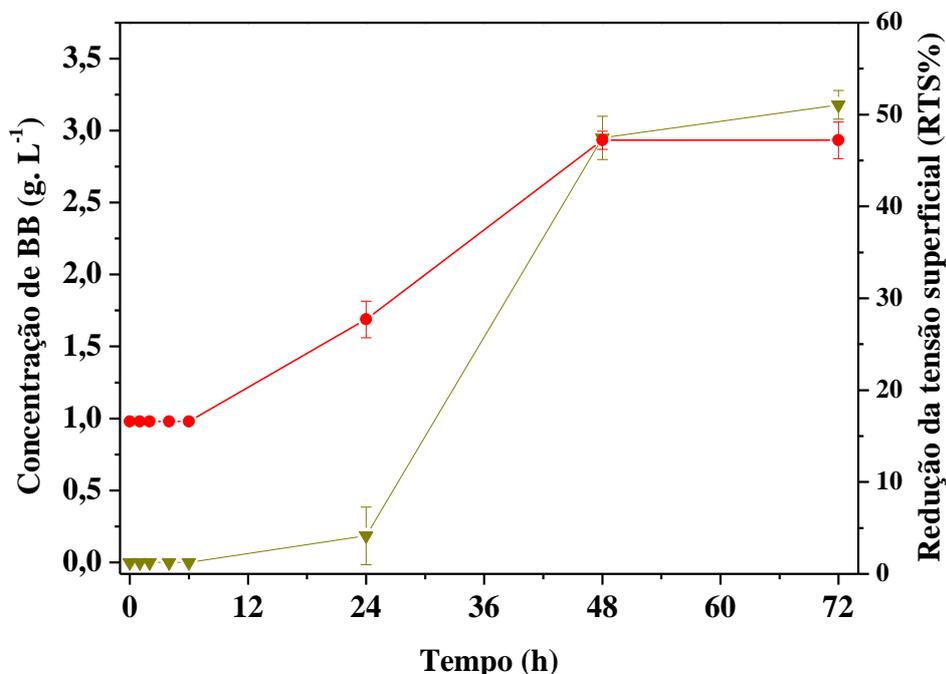
Assim, a precipitação por etanol, apresentada na Figura 2.12, foi escolhida para testes seguintes devido à alta recuperação de bioemulsificante e à baixa seletividade do sulfato de amônio que pode precipitar proteínas que resulta em mais etapas para a total purificação do produto.

**Figura 2.12** - Bioemulsificante bruto recuperado com etanol (BB-E) de *Acinetobacter venetianus*, produzido a 30 °C, pH 7,0 e 3,0 g L<sup>-1</sup> de NaCl: (A) após liofilização e (B) em aplicação como agente emulsificante (IE<sub>24%</sub>: 58%± 2%) à 1 g L<sup>-1</sup> utilizando querosene como fonte hidrofóbica.



Para estimativa do rendimento durante o bioprocesso, avaliou-se a concentração de bioemulsificante bruto precipitado com etanol (BB-E) por um período de 72 h usando o meio MM utilizando glicose como fonte de carbono e os resultados estão apresentados na Figura 2.13. A produção de bioemulsificante teve um considerado incremento após 24 h do bioprocesso, coincidindo com o esgotamento da glicose disponível, alcançando-se uma concentração de 3 g L<sup>-1</sup> a partir de 48 h, aumentando para 3,3 g L<sup>-1</sup> em 72 horas. A redução da tensão superficial (RTS) foi de cerca de 44% em relação à água em 72 h, sendo possível observar que a redução da tensão está diretamente ligada à produção de BB.

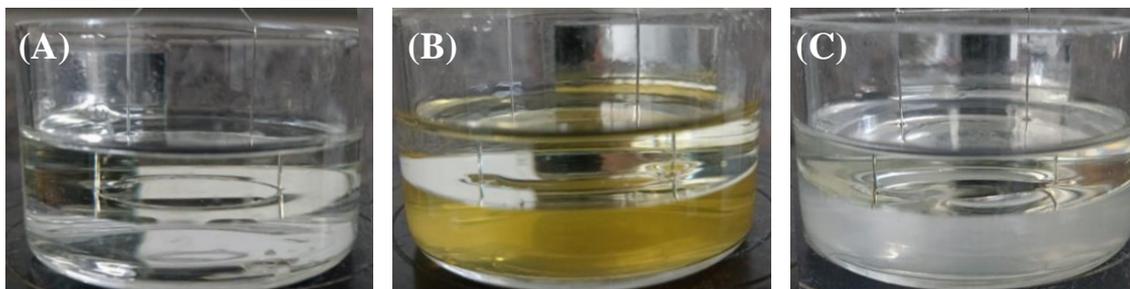
**Figura 2.13** - Perfil de produção de bioemulsificante bruto precipitado com etanol (BB-E) (▼) e da redução da tensão superficial (RTS%) (●) durante o processo de produção por *A. venetianus* AMO1502 usando MM (3 g L<sup>-1</sup> de NaCl) a pH 7,0 e conduzido a 30 °C e 150 rpm.



Comparou-se a atividade emulsificante do meio livre de células (MLC) e o bioemulsificante bruto (BB-E) para avaliar a influência processo de recuperação. O IE<sub>24%</sub> do MLC máximo foi de 53% ± 2%, aumentando para 58% ± 3 utilizando o BB-E ressuspenso (1 g L<sup>-1</sup>) o que indica um aumento na atividade emulsificante após o processo de precipitação, já que essa concentração de bioemulsificante é menor que a apresentada pelo meio livre de células (MLC) (3,3 g L<sup>-1</sup>).

Por fim, foi avaliada a tensão interfacial utilizando querosene como fonte hidrofóbica, como ilustrado na Figura 2.14. O bioemulsificante presente no MLC e recuperado (BB) se mostrou capaz de reduzir a tensão interfacial do sistema água/querosene de 43 ± 2 mN m<sup>-1</sup>, para 19 ± 2 mN m<sup>-1</sup> e 25 ± 1 mN m<sup>-1</sup>.

**Figura 2.14** - Ilustração do sistema heterogêneo composto por fase hidrofóbica (querosene) e fase aquosa: (A) água, (B) MLC e (C) BB ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ), para determinação da tensão interfacial (TI).



A redução da tensão interfacial costuma ser um método de avaliar o potencial de uma substância de superfície ativa de realizar interações entre a fase hidrofílica e fase hidrofóbica, sendo um ponto forte dos agentes de superfície de baixo peso molecular, que podem reduzir a tensão interfacial para até  $1 \text{ mN m}^{-1}$  (DE FRANÇA, 2014). A eficiência na diminuição da tensão interfacial costuma ser menor para bioemulsificantes, como os produzidos por *Acinetobacter*, que em sua forma bruta costumam diminuir a tensão interfacial entre água e hexadecano para cerca de  $15 \text{ mN m}^{-1}$  (ZHANG *et al.*, 1999; ZOU *et al.*, 2014), sendo essa redução influenciada pela proporção de proteínas presentes na biomolécula (Zosim, Gutnick & Rosenberg, 1987) Esse autores reportaram que moléculas contendo cerca de 20% (m/m) de proteínas eram capazes de reduzir a tensão interfacial para aproximadamente  $15 \text{ mN m}^{-1}$ , entretanto porções desproteïnadas desse emulsificante só eram capazes de reduzir a tensão interfacial para cerca de  $30 \text{ mN m}^{-1}$ .

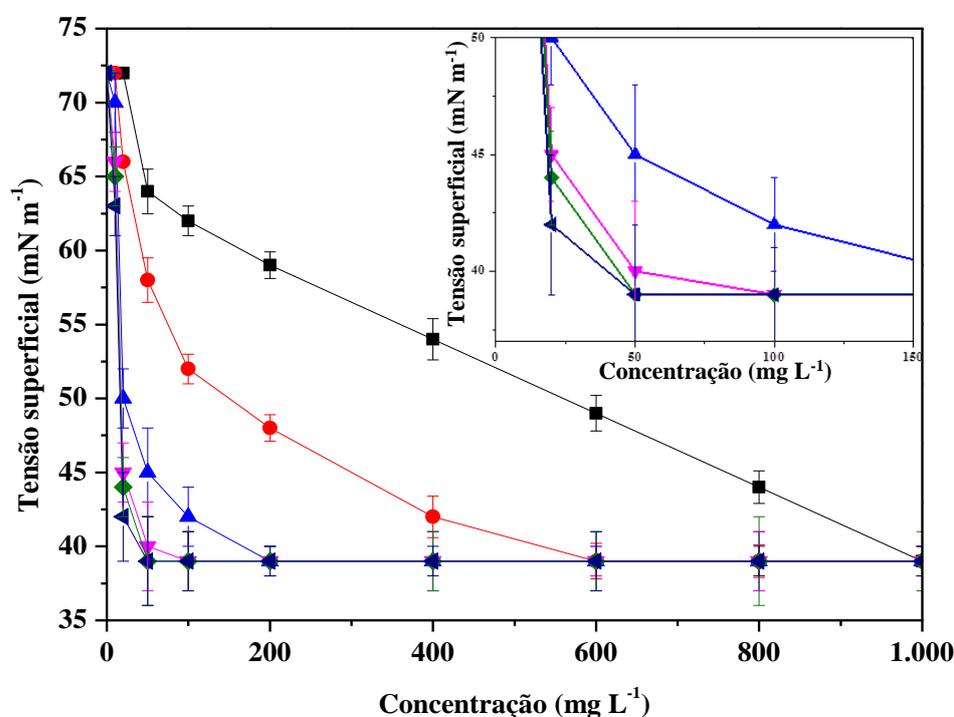
### 3.4 Pré-purificação do bioemulsificante

Uma forma de melhorar a atividade e possibilitar a aplicação na prática de um bioemulsificante é aumentando seu grau de pureza, assim foram aplicados métodos de separação específicas para bioemulsificantes de *Acinetobacter*, como a purificação *ethanol-salting-out*, a extração com éter e a purificação com fenol quente.

Para a purificação *ethanol-salting out*, que consiste em quatro lavagens com etanol, seguidas da separação *salting out* utilizando  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , repetida duas vezes. Pode-se observar uma diminuição significativa na CMC (Figura 2.15) do bioemulsificante no decorrer as

lavagens mesmo antes da etapa de cristalização. Já na terceira lavagem é possível observar uma redução na concentração micelar crítica de aproximadamente  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  na sua forma bruta, para  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , e na quarta (4ª) lavagem essa redução vai para entre  $50\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ , resultados semelhantes aos encontrados na literatura para bioemulsificantes em sua forma purificada (AMANI; KARIMINEZHAD, 2016; SU; CHEN; LIN, 2009). Não foi observada diferença expressiva na concentração micelar crítica após a etapa de cristalização, indicando que o produto já estava na forma mais pura a ser alcançada pelo método. A menor tensão superficial apresentada pelo emulsão produzido por *Acinetobacter venetianus* foi aproximadamente  $40 \pm 2 \text{ mN/m}$ , o que está de acordo com os dados reportados na literatura para esse biopolímero, que costumam apontar a menor tensão superficial do produto como próxima da apresentada nesse estudo (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; SU; CHEN; LIN, 2009).

**Figura 2.15** - Concentração micelar crítica obtida com o bioemulsificante purificado com etanol em diferentes estágios de processo: (■) Bioemulsificante bruto, (●) 2ª lavagem com etanol, (▲) 3ª lavagem com etanol, (▼) 4ª lavagem com etanol, (◆) 1ª cristalização com  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , (◄) 2ª cristalização com  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .



A extração utilizando fenol quente é uma metodologia aplicada para a purificação do apoemulsan, a porção polissacarídica do emulsan. Assim, após a etapa de purificação, diálise e liofilização, o bioemulsificante purificado foi pesado e seu rendimento foi quantificado em 25,7% (m/m) em relação a massa inicial de emulsificante, após ressolubilização do bioemulsificante a concentração de proteínas foi avaliada ( $\sim 0 \text{ mg L}^{-1}$ ), constando-se a ausência de proteínas que seguiram para a fase fenólica. O método de purificação com fenol é utilizado para separar a porção polissacarídica da porção proteica do emulsan, assim purificando-o em um composto chamado “apoemulsan”, composto apenas pelos ácidos graxos e polissacarídeos do bioemulsificante, logo, a ausência de proteínas é um indicativo do isolamento desse composto (JOHRI; BLANK; KAPLAN, 2002; JOHRI; YALPANI; KAPLAN, 2003; KAPLAN *et al.*, 1985)

A partir da extração com éter, obteve-se um rendimento final de 7,4% (m/m) em relação à massa inicial de bioemulsificante. Após solubilização do purificado em água destilada ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) avaliou-se a concentração de proteínas, obtendo-se  $0,58 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,05$ . Esse método de purificação é utilizado para solubilização do emulsan, um bioemulsificante de características proteicas, produzido por cepas de *Acinetobacter* (CHAMANROKH *et al.*, 2008; MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019), assim o aumento da concentração de proteínas em relação ao MLC ( $242 \text{ mg L}^{-1}$ ) é indicativo do isolamento dessa substância. Entretanto, após aplicação dessa técnica, foi observada a perda da atividade do bioemulsificante.

Assim, a purificação *etanol-salting out* se mostrou a mais eficaz para a pré-purificação do bioemulsificante, apresentando rendimento de 21,1% (m/m), aumentando a pureza do composto em poucas lavagens, porém a purificação com fenol quente foi mais eficaz para a separação do apoemulsan, de menor peso molecular que o emulsan.

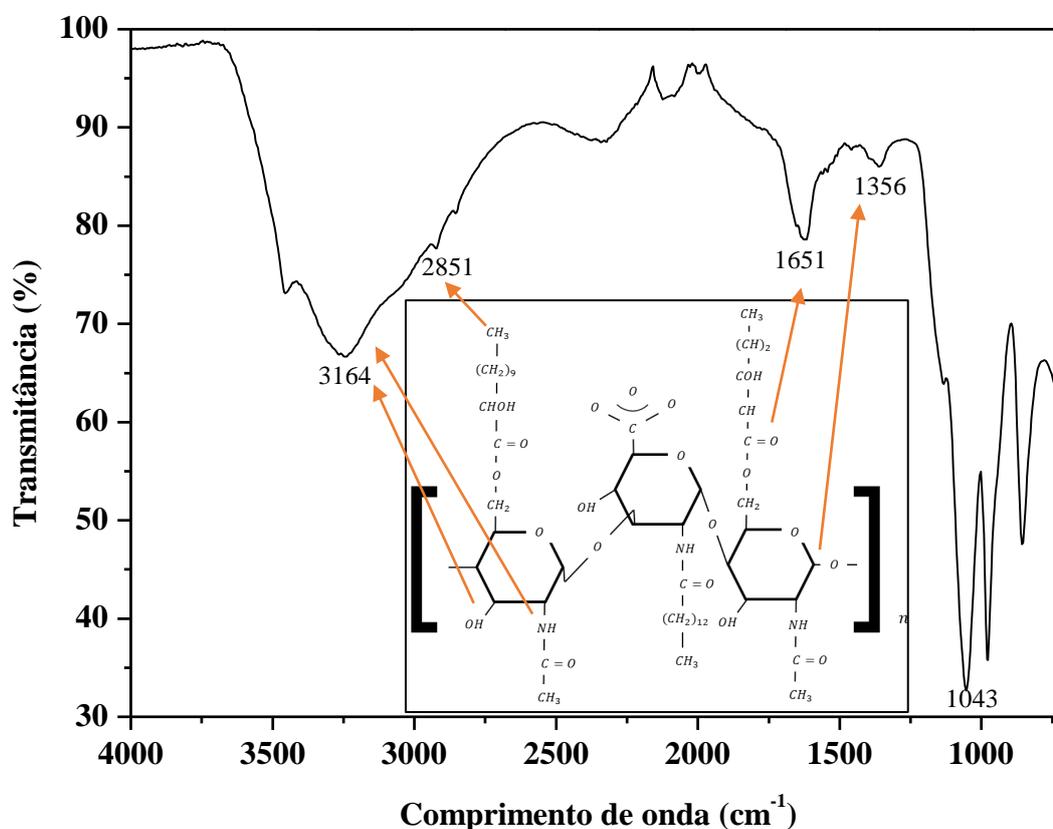
### 3.5 Análise molecular

#### 3.5.1 Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro FT-IR foi utilizado para averiguar os possíveis grupos químicos do bioemulsificante produzido pela *A. venetianus*. Os resultados alcançados (Figura 2.16) indicaram bandas em  $1000\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$ , representando ligações C–O e C–O–C em grupos

orgânicos (álcoois, éteres e ésteres), representativos da presença de carboidratos e polissacarídeos, realçando o pico em  $1043\text{ cm}^{-1}$ , que confirma a presença de ácido urônico ( $1000\text{-}1125\text{ cm}^{-1}$ ) em ligações O-acetil ester (AMANI, 2017). Bandas em  $1651\text{ cm}^{-1}$ , que se referem ao estiramento dos anéis de galactose e manose que compõem moléculas de emulsan (AMANI, 2017). Em  $2851\text{ cm}^{-1}$  encontram-se bandas representando ligações alifáticas C-H, e bandas em  $3164\text{ cm}^{-1}$  são representativas para ligações OH e NH, presentes em grupos álcoois e amins. Assim, a presença de cadeias alifáticas ( $-\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$ ) foi representada por bandas entre  $2930\text{-}2855\text{ cm}^{-1}$  e  $1364\text{-}1472\text{ cm}^{-1}$  representam ligações C-N e COO-. Essas bandas indicam a produção de uma molécula complexa, e os grupos funcionais identificados estão presentes em outras moléculas emulsificantes produzidas pelo gênero *Acinetobacter* (AMANI, 2017; CHAMANROKH *et al.*, 2010).

**Figura 2.16** - Espectro de FT-IR de bioemulsificante pré-purificado (BPP) por *etanol salting-out* produzido por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 ressaltando as bandas representativas da produção de emulsan.

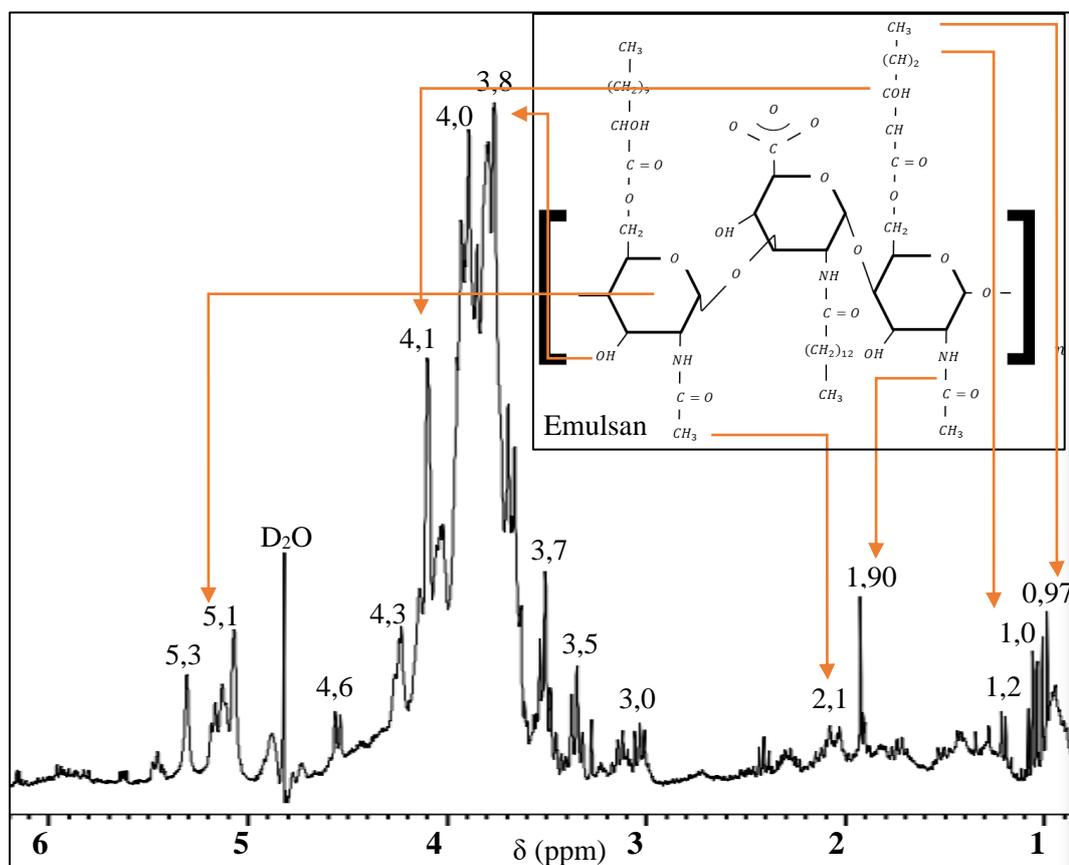


Assim, o espectro FT-IR confirma a presença de grupos alifáticos, metil e amins secundárias, e funções sacarídeos e ácido urônico. A identificação destes grupos e funções demonstra similaridade com molécula de emulsan, a qual é composta por monômeros de trissacarídeos (N-acetil-D-galactoseamina, ácido D-galacturônico e diamina-6-dioxi-D-glicose) e cadeias longas de ácidos graxos que podem variar em comprimento e saturação (MERCALDI *et al.*, 2008). Os resultados apresentam similaridade com outros trabalhos da literatura que utilizaram a análise de FT-IR como forma de identificar grupos únicos da molécula de emulsan, cuja cadeia polissacarídica é principalmente composta por amino açúcares (AMANI, 2017; CHAMANROKH *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2016).

### 3.5.2 Ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ RMN)

Foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear (RMN  $^1\text{H}$ ) a partir de amostras de bioemulsificante pré-purificado, apresentado na Figura 2.17. Picos observados de 0,80 a 0,97 ppm são dupletos representativos de ligações  $-\text{CH}_3$ , e entre 1,00 e 1,40 ppm indicam quintupletos representativos de cadeias alifáticas. O duplete significativo entre 1,90 e 2,00 ppm é representativo de agrupamentos metilas de *O*-acetil, e o duplete entre 2,00 e 2,20 indica ligações  $-\text{CH}_3$  em grupos acetamidas. Bandas largas entre 3,50 e 4,50 ppm costumam corresponder a prótons ligados a grupos carboidratos, onde as ligações  $-\text{OH}$  podem ser observadas de 3,8-4,3 ppm. A estrutura polissacarídica pode ser confirmada pelas bandas 5,00-5,30 ppm, representativas de prótons anomêricos. Assim, a análise  $^1\text{H}$  RMN, apresentou picos semelhantes a outros bioemulsificantes poliméricos produzidos por outras cepas de *Acinetobacter* (ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018).

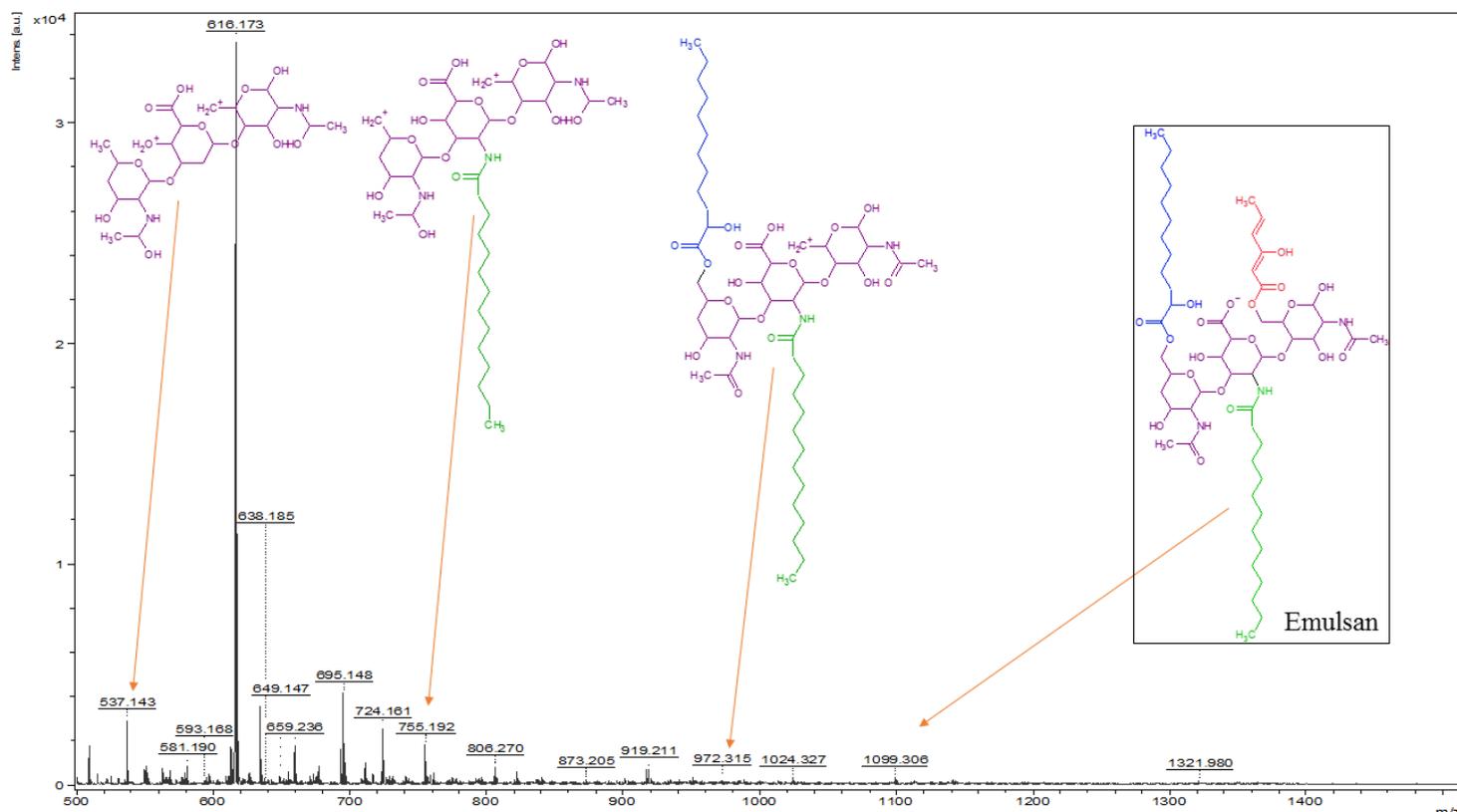
**Figura 2.17** - Espectro  $^1\text{H}$  RMN do bioemulsificante produzido por *A. venetianus* pré-purificado por método *etanol-salting out*.



### 3.5.3 Espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF)

A utilização de espectrometria de massa com matriz auxiliada por dessorção-ionização laser foi utilizada em trabalhos anteriores para avaliação de bioemulsificantes, em especial os bioemulsificantes poliméricos, como produzidos por *Acinetobacter* e *Cronobacter* (ALI *et al.*, 2019; JAIN *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2016). O resultado apresentado na Figura 2.18 foi obtida para o biossurfactante pré-purificado e o espectro apresentou picos para a reflexão de íons de modo positivo. O sinal identificado em 538,146 m/z representa a presença trissacarídeos contendo hexose, o sinal em 759,219 m/z corresponde a cadeia de oligossacarídeos contendo grupamentos amida, e os sinais em 973,192 m/z e 1099,306 m/z correspondem a ácidos graxos, que são as porções apolares da molécula.

**Figura 2.18** - Espectro MALDI-TOF/TOF do bioemulsificante de *A. venetianus* pré-purificado por método *etanol-salting out*, correlacionado com a molécula de emulsan.

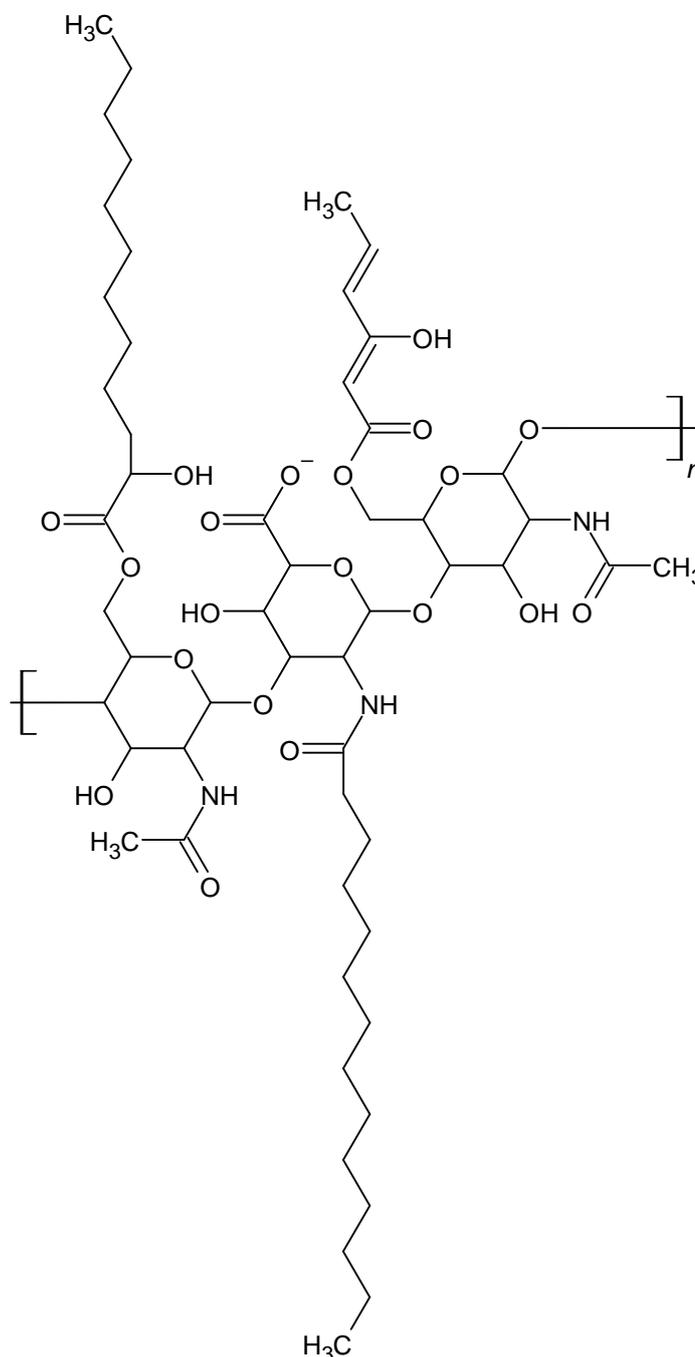


Provavelmente a molécula apresenta uma estrutura polissacarídica, composta por N-acetil-D-galactoseamina, ácido D-galacturônico e diamina-6-dioxi-D-glicose. A partir da massa inicial do monômero de 1099 Da e das etapas de fragmentação da molécula, foi possível supor uma cadeia de ácidos graxos longa, de aproximadamente 215 Da, e a presença de uma cadeia de trissacarídeos de massa 509 Da, ao final da fragmentação, formada por três hexoses.

Desse modo, as bandas de FT-IR observadas, bem como os espectros de MALDI-TOF/TOF e RMN  $^1\text{H}$  indicam a produção de emulsan de *Acinetobacter*, um lipoheteropolissacarídeo com alto poder emulsificante e alta complexidade molecular. Pode-se confirmar a presença de cadeias alifáticas pela presença de quintupletos e tripletos, bem como a presença de grupos acetil ligados a cadeias de sacarídeos, indicando a existência de amidas secundárias, características de amino açúcares, como a presença de prótons anoméricos em 5,1-5,3 ppm, o que indica a formação de polissacarídeos. Assim foi possível propor a cadeia final da molécula, conforme a Figura 2.19.

A determinação da estrutura química do emulsão costuma apresentar gargalos em relação devido a sua complexidade, grande variação molecular, em especial em sua porção hidrofóbica (BARNHART *et al.*, 2012; DESAI; BANAT, 1997; NAKAR; GUTNICK, 2001) e a difícil purificação devido à presença de contaminantes, em especial de origem proteica (BARNHART *et al.*, 2012; MERCALDI *et al.*, 2008; PANILAITIS *et al.*, 2002). Assim, apesar de aplicação de técnicas analíticas de alta eficiência, como  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN, a proposição de estruturas químicas detalhadas foi raramente proposta em trabalhos científicos (CHAMANROKH *et al.*, 2010; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2016).

**Figura 2.19** - Estrutura proposta para o polímero produzido por *A. venetianus* AMO1502 neste trabalho com base em análises  $^1\text{H}$  RMN, FT-IR e MALDI-TOF/TOF.

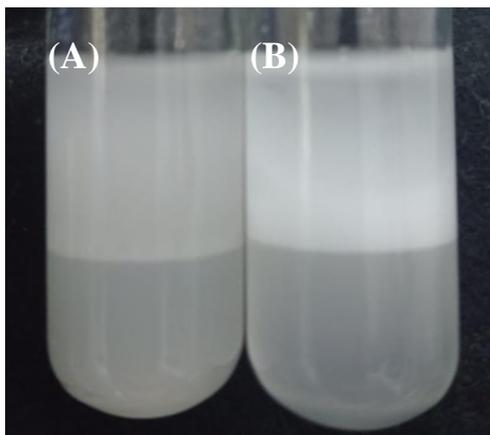


### 3.5.4 Avaliação do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB)

A afinidade de ligações e rápida aderência de bioemulsificantes e biossurfactantes está relacionada com o seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB). Esse potencial está relacionado ao potencial de um bioproduto de formar emulsões água em óleo ou óleo em água. Assim, após comparação com controles contendo diferentes valores de HLB, observou-se um volume de

fase aquosa semelhante entre a emulsão formada pelo BPP (0,5% m/v) e a solução com HLB 10 (*Span* 80:*Tween* 80 em razão 47,7:53,3), como apresentado na Figura 2.20. Segundo a escala de Griffin, indica se tratar de um bioemulsificante eficaz para a emulsão de óleo em água.

**Figura 2.20** - Emulsão formada com óleo de parafina em (A) meio contendo BPP (100 mg L<sup>-1</sup>) e (B) solução padrão de HLB 10.



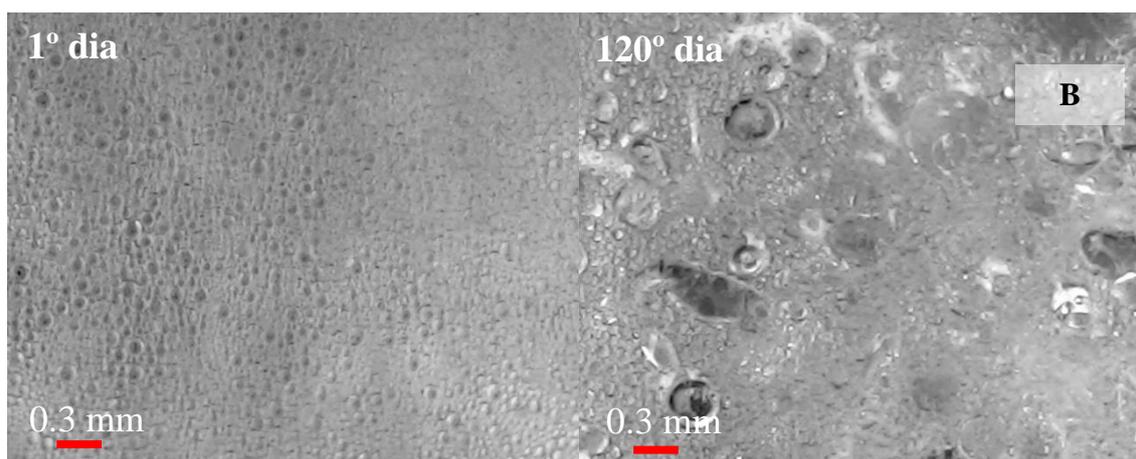
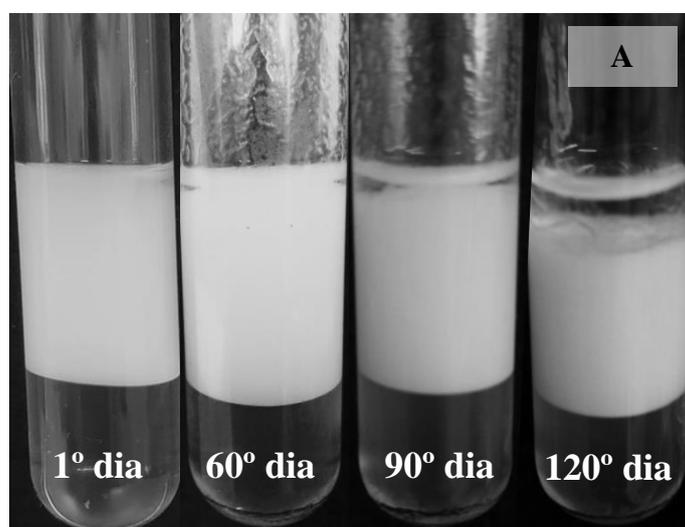
O HLB de bioemulsificantes de *Acinetobacter* já foi avaliado anteriormente por Ohadi *et al.* (2018), que encontrou valores próximos a 10, indicando a produção de um composto capaz de formar emulsões de óleo em água. Entretanto, tal valor pode ser alterado pelas condições do meio de produção, que podem induzir a produção de moléculas mais ou menos hidrofílicas, assim é definido que o HLB do emulsan de *Acinetobacter* pode apresentar grandes variações (HLB 8-17) (KIM *et al.* 2000).

### 3.6 Estabilidade do bioemulsificante e das emulsões formadas

A persistência da emulsão indica o potencial do bioproduto para aplicação como agente biorremediador, já que em processos de dispersão de óleo, é necessário que as fontes hidrofóbicas permaneçam emulsionadas tempo suficiente para que seja metabolizadas por microrganismos ou removidas em processos paralelos, como técnicas de adsorção (BARROS *et al.*, 2014). As emulsões obtidas com o bioemulsificante demonstraram alta estabilidade, reduzindo-se em apenas 8% após 120 dias a 25 °C, conforme ilustrado na Figura 2.21A. A diminuição da fase emulsionada está em concordância com o aumento observado no tamanho das gotas de emulsão observadas em microscópio, que tinha perfil de 0,03-0,15 mm em 24 horas, e em 120 dias o perfil aumentou para 0,05-0,58 mm (Figura 2.21B), indicando uma leve

atenuação da atividade emulsificante que se reflete em uma pequena diminuição da altura da fase emulsionada. Essa alta estabilidade é característica dos biopolímeros emulsificantes de *Acinetobacter* que costumam ser maiores que dos biossurfactantes de menor peso molecular (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002; NAVON-VENEZIA *et al.*, 1995).

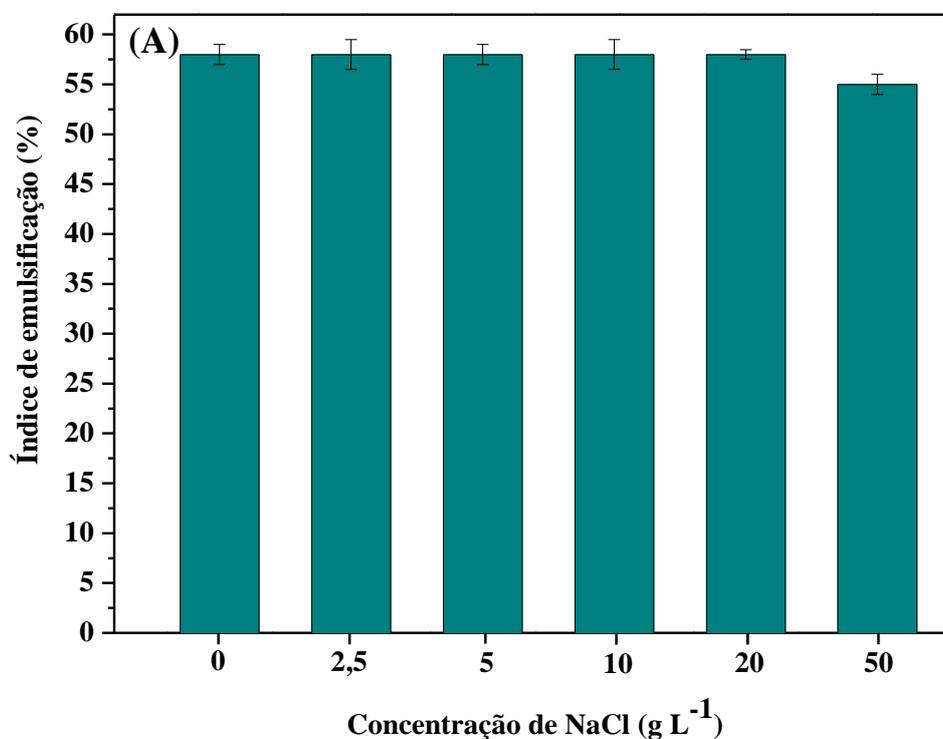
**Figura 2.21** - Estabilidade da emulsão formada por bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 no decorrer de 120 dias a 25 °C: (A) emulsões e (B) imagens mostrando as gotas observadas em microscópio ótico.

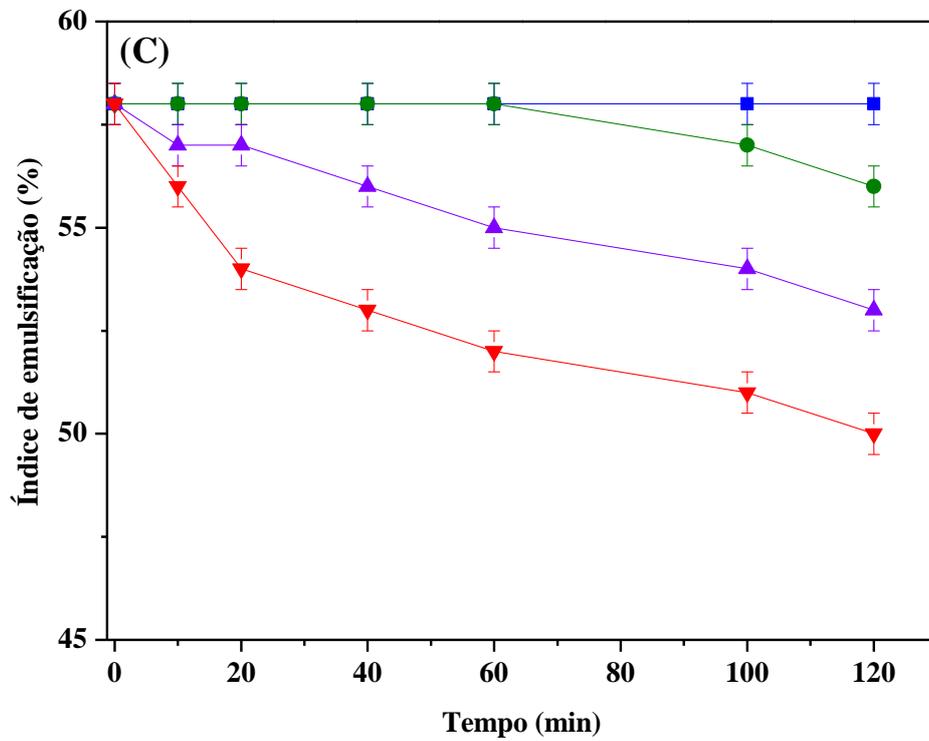
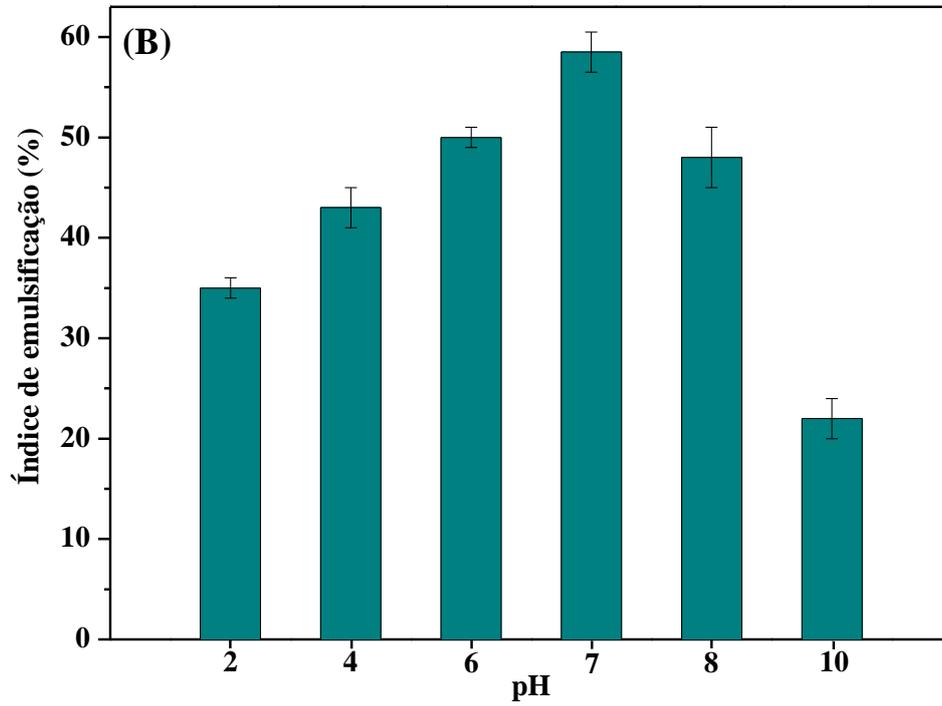


O bioemulsificante também demonstrou alta estabilidade em elevadas concentrações salinas (Figura 2.22A), no qual somente observou-se uma diminuição no IE<sub>24</sub>% quando utilizado 50% (m/v) de NaCl, evidenciando a alta resistência do BB em ambientes salinos quando comparado com outros biossurfactantes reportados na literatura que tendem a perder

atividade a partir de 15-20 g L<sup>-1</sup> de NaCl (KHADEMOLHOSSEINI *et al.*, 2019; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021). Essa estabilidade em altas concentrações salinas é essencial para a aplicação de bioemulsificante em ambientes costeiros, já que esses possuem alta salinidade.

**Figura 2.22** - Estabilidade do bioemulsificante bruto avaliado pelo índice de emulsificação em, (A) meios com diferentes concentrações salinas (0, 2,5, 5, 10, 20 e 50 g L<sup>-1</sup>), (B) quando exposto a diferentes valores de pH (2, 4, 6, 7, 8 e 10) e (C) quando exposto a diferentes temperaturas: (■) 60 °C, (●) 80 °C, (▲) 100 °C e (▼) 120 °C por 120 minutos.





Observou-se a maior atividade emulsificante em pH neutro, atingindo valores superiores a 50%, exposto na Figura 2.22B. No caso do presente estudo, em pH alcalino observou-se uma maior instabilidade, em especial uma diminuição abrupta na atividade do surfactante em pH 10. Entretanto, o bioemulsificante ainda mantém alta atividade emulsificante (EI<sub>24</sub>%: 48%) em pH 8,0, que é o pH da água do mar, onde o bioemulsificante será aplicado, contribuindo para sua utilização como agente biorremediador. Em meio alcalino, a característica mais viscosa de bioemulsificantes promove uma maior estabilidade até pH próximo de 9,0, após isso a emulsão começa a ser afetada pelas cargas do meio, diminuindo sua estabilidade (ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018).

Em pH ácido, o bioemulsificante manteve sua atividade, diminuindo gradualmente até atingir valores próximos de 35% em condições de extrema acidez (pH 2,0). Essa diminuição da atividade pode estar relacionada à protonação dos grupos carboxílicos da molécula, que resulta na aglomeração molecular que causa a precipitação, esse processo é chamado de “coalescência”(ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; TAO *et al.*, 2019), a resistência do bioemulsificante produzido neste estudo à pH ácido pode ser explicado pela baixa formação de precipitado pela separação por precipitação ácida (BHARALI *et al.*, 2018; KHOPADE, A. *et al.*, 2012). Assim, estabeleceu-se a faixa de pH ótimo para aplicação desse bioemulsificante como sendo de pH 4,0-8,0. Entretanto, a atividade emulsificante de 35% observada no meio ácido ainda é elevada para a condição estudada, o que indica que mesmo em condições de pH extremo o bioemulsificante ainda pode ser utilizado com eficácia.

O estudo da estabilidade térmica, apresentada na Figura 2.22C, indicou que a atividade emulsificante permaneceu acima de 50% mesmo quando submetido à altas temperaturas (de até 120 °C), mostrando uma redução menor que 10% no índice de emulsificação apenas após estresse térmico de 121 °C por 120 minutos. Adicionalmente, a estabilidade térmica do bioemulsificante impacta no espectro de sua aplicação, como em condensação de Knoevenagel, uma adição nucleofílica que necessita de catalisadores que podem ser emulsificantes biológicos (BARGE; SALUNKHE, 2014) e recuperação de óleos aprimorada microbiana (ROAM) (WU *et al.*, 2022), que podem ocorrer em altas temperaturas (>60 °C). Em comparação com outros biosurfactantes e bioemulsificantes apresentados na literatura (MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; ZHANG; FENG; XUE, 2022), o bioemulsificante de *A. venetianus* apresentou alta estabilidade em altas temperaturas mesmo após longos períodos.

### 3.7 Avaliação da ecotoxicidade do bioemulsificante

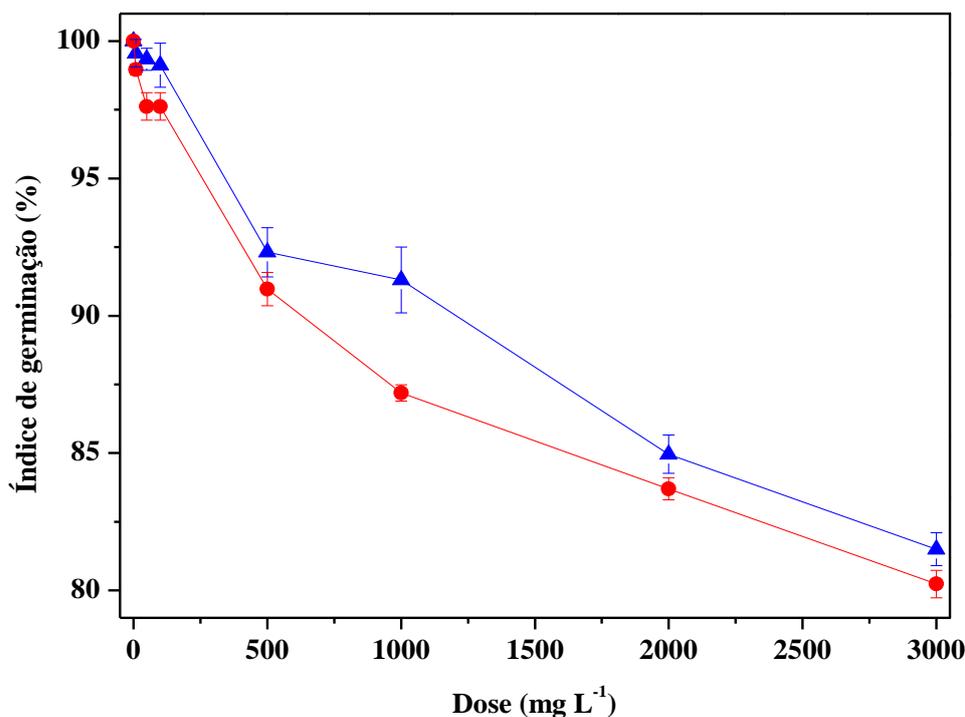
A toxicidade de um agente biorremediador é muito importante para a viabilidade de sua utilização, pois desse parâmetro dependerá uma possível futura aplicação do bioemulsificante. Surfactantes químicos comumente aplicados em processos de biorremediação, como COREXIT™, apesar de eficientes na dispersão de óleos, têm seu uso restringido devido aos problemas ambientais causados pela sua aplicação (ARNOLD *et al.*, 2022; DUKE, 2016; ZENGEL *et al.*, 2022).

#### 3.7.1 Avaliação da fitotoxicidade

A fitotoxicidade é importante para essa análise pois estuda os impactos que o bioproduto pode ter em plantas que habitam as regiões de derramamento, em especial mangues. É sabido que o uso de métodos agressivos de limpeza pode dificultar a regeneração de plantas afetadas por acidentes ambientais em decorrência de derramamentos de petróleo, assim a utilização de bioemulsificantes menos tóxicos é vista como uma solução menos nociva às plantas (ZENGEL *et al.*, 2022).

Nesse trabalho utilizou-se sementes de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e couve (*Brassica oleracea*) devido a sua fácil germinação para avaliação dos efeitos de fitotoxicidade, no qual leva-se em conta o número de sementes germinadas e o a influência do bioproduto no tamanho das raízes, cujos resultados estão apresentados na Figura 2.23.

**Figura 2.23** - Fitotoxicidade do bioemulsificante bruto de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 em: (▲) *Ocimum basilicum* e (●) *Brassica oleracea*, representado pelo índice de germinação (%) de sementes expostas a diferentes concentrações de BB.

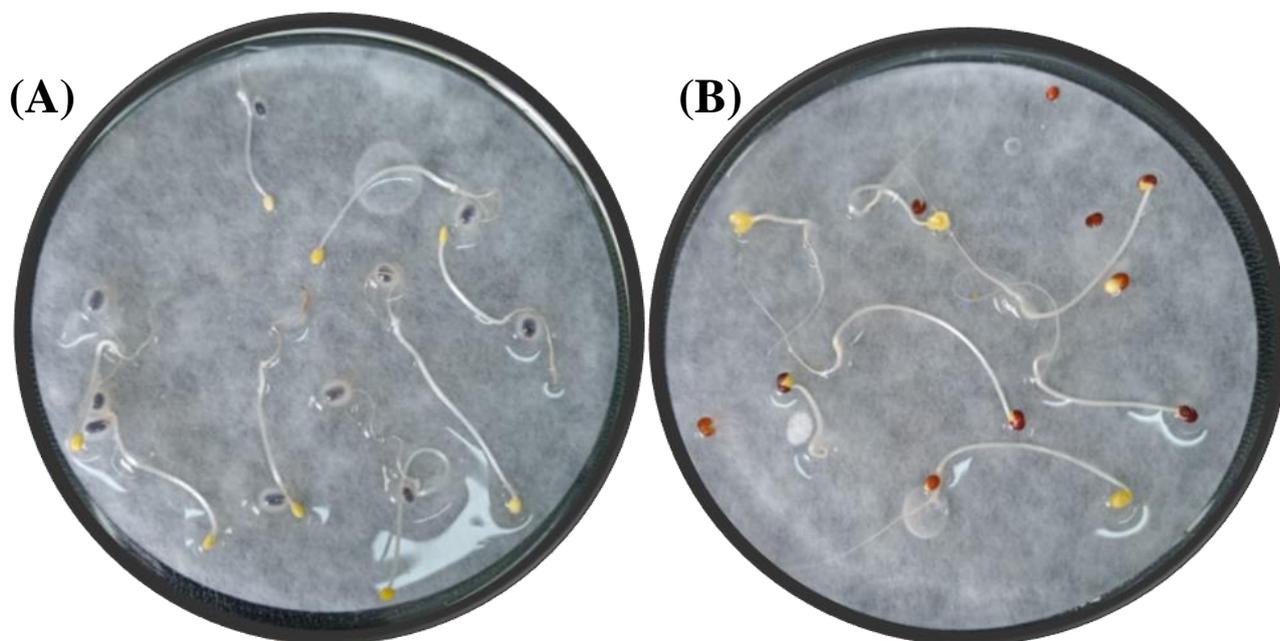


Assim, considerou-se IG de 80% como limite de fitotoxicidade (FELIX *et al.*, 2019; TIQUIA; TAMA; HODGKIS, 1996), se em algum dos ensaios ser observado um IG menor que esse valor, seria considerado que o bioemulsificante teve efeitos inibitórios no crescimento da planta.

Assim, os resultados obtidos indicam que não houve inibição no desenvolvimento das plantas por efeito do bioemulsificante, apresentando IG menor que 90% apenas em concentrações de 2000 mg L<sup>-1</sup> (84,95%) e 3000 mg L<sup>-1</sup> (81,5%), para *Ocimum basilicum* e em 1000 mg L<sup>-1</sup> (87,19%), 2000 mg L<sup>-1</sup> (83,70%) e 3000 mg L<sup>-1</sup> (80,23%) para *Brassica oleracea*. Entretanto em todos os casos, o índice de germinação (IG) ainda é maior que 80%, o que indica que mesmo em concentrações elevadas o bioemulsificante bruto (BB) não apresentou efeitos no desenvolvimento das raízes ou na germinação das sementes, como ilustrado na Figura 2.24. A baixa toxicidade de bioemulsificantes e biossurfactantes já foi relatada anteriormente na

literatura, como é o caso da surfactina de *Bacillus subtilis*, que em sua forma purificada, apresenta IG superior a 80% para concentrações de até 500 mg L<sup>-1</sup> (FELIX *et al.*, 2019).

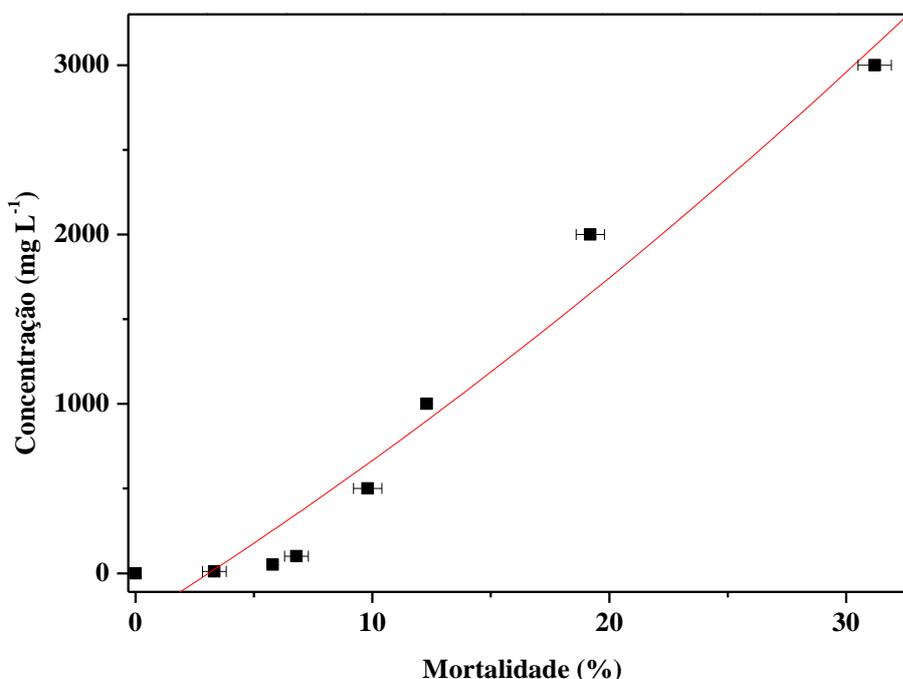
**Figura 2.24** - Fitotoxicidade do bioemulsificante bruto precipitado com etanol (BB-E) na concentração de 3000 mg L<sup>-1</sup> em (A) *Ocimum basilicum* e (B) *Brassica oleracea*.



### 3.7.2 Avaliação da citotoxicidade

Diversos invertebrados habitam em regiões de mangue, sendo seres sensíveis às mudanças nas condições do meio, por isso a determinação da citotoxicidade com *Artemia salina* foi conduzido para avaliar os efeitos do bioemulsificante na microfauna do meio ambiente. Assim foram realizados experimentos para avaliar a toxicidade do bioemulsificante sobre esses pequenos crustáceos, assim foi realizada a contagem de mortos após o período de exposição ao emulsificante e em seguida realizou-se cálculo para averiguação da concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>), apresentada na Figura 2.25.

**Figura 2.25** - Relação entre a concentração de bioemulsificante bruto de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 e o número de *Artemia salinas* mortas devido a exposição ao biocomposto.



Mesmo em concentrações mais elevadas (3000 mg L<sup>-1</sup>), observou-se uma taxa de mortalidade relativamente baixa (31%). A partir da regressão linear foi obtida a Equação 7 e o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) igual 0,965, a partir dos quais a concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>), que é a concentração letal para 50% dos organismos expostos, foi calculada de modo a determinar o grau de toxicidade da substância.

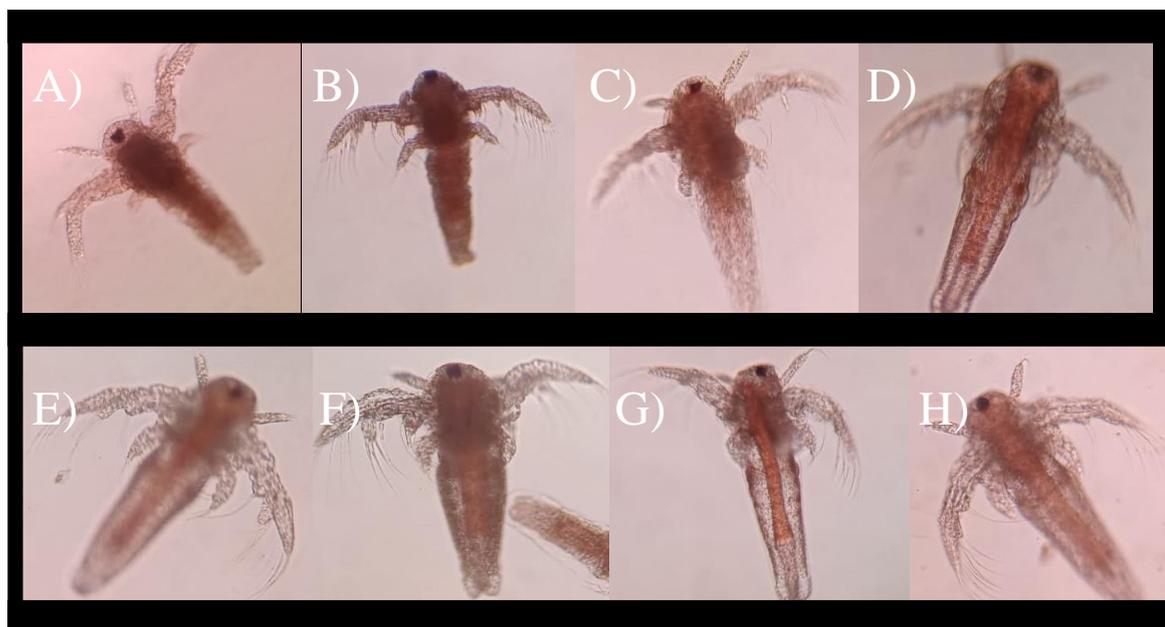
$$\text{Concentração} = (0,6788 \times \text{mortalidade}^2) + (87,496 \times \text{mortalidade}) - 277,24 \quad (7)$$

Segundo classificação reportada por Dolabella (1997), e a diretriz do regulamento n° 1907/2006 do Parlamento Europeu, reconsolidada em 28 de maio de 2023 (UNIÃO EUROPÉIA, 2006), uma substância é considerada altamente tóxica quando sua CL<sub>50</sub> for inferior a 80 mg.L<sup>-1</sup> e moderadamente tóxica quando estiver entre 80 e 250 mg L<sup>-1</sup>, sendo considerada atóxica para CL<sub>50</sub> superiores a 250 mg L<sup>-1</sup>. O bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 apresentou CL<sub>50</sub> de aproximadamente 5795 mg L<sup>-1</sup>, o que indica que o bioemulsificante é atóxico. Essa baixa toxicidade pode ser observada em outros

biossurfactantes, como o produzido a partir de *Trichoderma asperellum*, um fungo filamentosso, cujo  $CL_{50}$  foi de aproximadamente  $5700 \text{ mg L}^{-1}$  (ALVES, 2020).

Avaliando-se os náupilos na presença dos ensaios com o bioproduto, observou-se que não tiveram dilatação intestinal, apresentando lúmen intestinal translúcido e sem partículas aderidas (Figura 2.26). Os resultados indicam que o bioemulsificante de *A. venetianus* não causou danos a essas espécies vegetais e de microcrustáceo, apresentando  $IG\% < 80\%$  e  $CL_{50}$  ( $5795 \text{ mg L}^{-1}$ ) superiores a CMC, sendo 3 vezes e 5,7 vezes a CMC, respectivamente. Entretanto, vale ressaltar que nesses testes foi aplicado o bioemulsificante bruto (CMC:  $1 \text{ g L}^{-1}$ ), um produto de baixa pureza, com intuito de melhorar a viabilidade da aplicação, no caso da aplicação do bioemulsificante pré-purificado (BPP) é provável que a relação entre CMC e a toxicidade apresentasse valores mais favoráveis. Assim, esse bioemulsificante pode ser utilizado com segurança como agente biorremediador, ainda que em sua forma pré etapas de purificação sem riscos ambientais à microfauna e flora local.

**Figura 2.26** - Imagens de *Artemia salina* em microscópio ótico (ampliação x100) demonstrando corpos intactos e lúmen intestinal de tamanho normal em diferentes concentrações de bioemulsificante: (A)  $0 \text{ mg L}^{-1}$ , (B)  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , (C)  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , (D)  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , (E)  $500 \text{ mg L}^{-1}$ , (F)  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , (G)  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ , (H)  $3000 \text{ mg L}^{-1}$ .

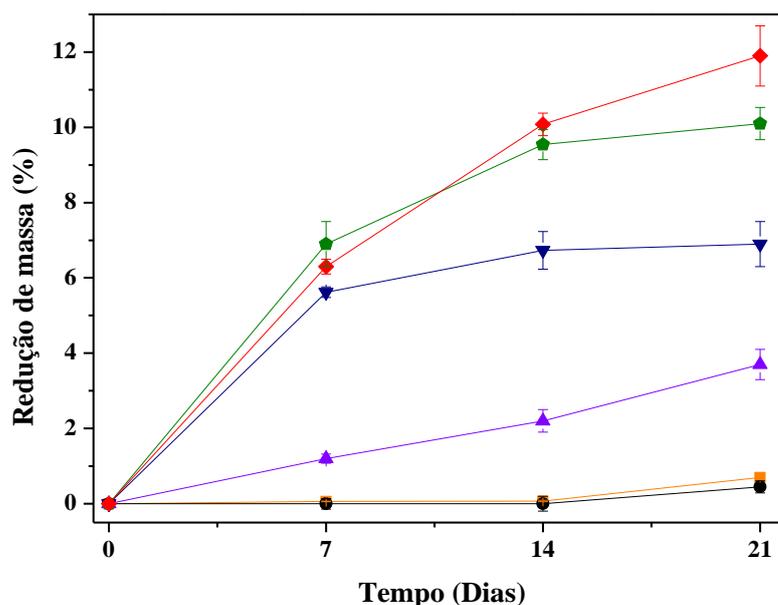


### 3.8 Aplicação do bioemulsificante como agente biorremediador na dispersão de óleos

#### 3.8.1 Aplicação do bioemulsificante na dispersão de óleos *in vitro*

Com o intuito de avaliar o potencial biorremediador do bioemulsificante produzido pela cepa *A. venetianus* AMO1502 foi avaliado pela dispersão de óleo em ambiente marinho, assim manteve-se a amostra óleo, coletada de derramamento ocorrido em Aquiraz (3°56'46" S, 38°16'36" W), Ceará, em contato com o bioemulsificante por 21 dias, apresentado na Figura 2.26, avaliando-se a redução da massa gravimetricamente e, na Figura 2.27, por cromatografia gasosa. Vale ressaltar as características do óleo derramado, que apresenta alta viscosidade e densidade, sendo de difícil emulsão e metabolização por microrganismos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). Na Figura 2.27, a máxima redução de massa (12%) foi atingida utilizando 10% (m/v) BB, apresentando resultados levemente superior (diferença de 16%) em relação ao teste com MLC. O processo de biorremediação utilizando 1% (m/v) BB apresentou resultados mais eficientes (6,9 %) em relação aos apresentados pelo SDS (3,7%) como agente dispersante.

**Figura 2.27** - Ação do bioemulsificante na redução de massa de petróleo (%) adicionada ao meio no decorrer do tempo e comparação com controles: Bioemulsificante precipitado com etanol (BB-E) na concentração de 10% (m/v) (◆), BB-E Concentração de 1% (m/v) (▼), Meio livre de células (MLC) (◆), SDS (▲), Meio Mineral (■) e Água do mar (●).



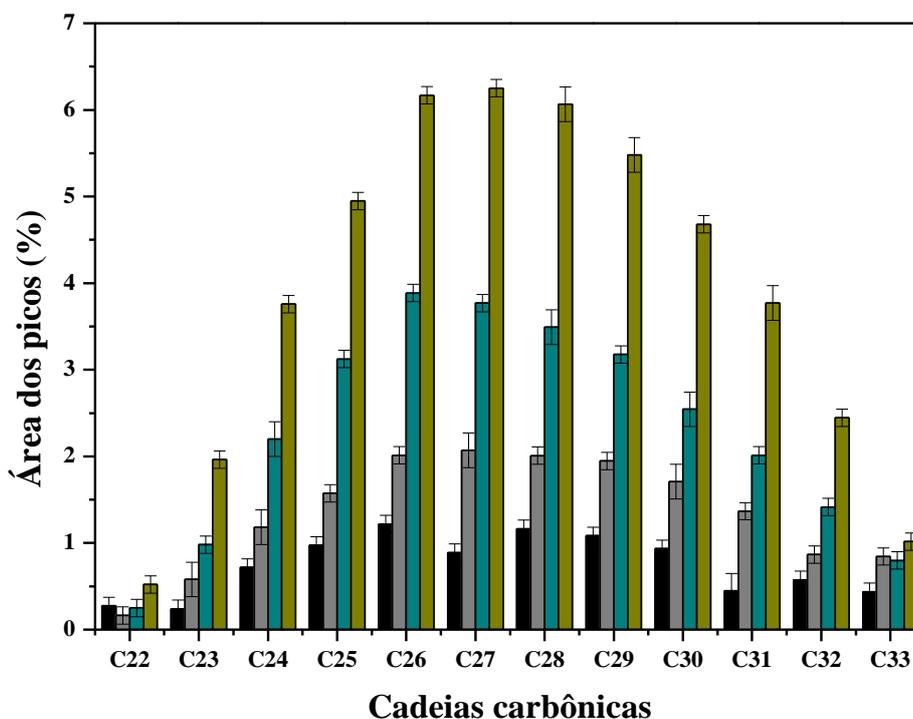
Quando comparado com ao surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), o bioemulsificante de origem biológica apresentou maior redução na massa de óleo, indicando a eficiência como um possível agente biorremediador. Entretanto nenhum dos experimentos apresentou redução de massa superior a 15% após 21 dias, reforçando a resiliência do óleo derramado que mantém seu potencial contaminante por muito tempo, como reportado por estudos anteriores que buscaram a caracterização do óleo oriundo do mesmo acidente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Desse modo, pode-se observar que o bioemulsificante ainda no meio livre de células (MLC) ou em sua forma bruta precipitada (BB-E) foi capaz de reduzir consideravelmente a massa do óleo contaminante, apresentando resultados superiores aos obtidos com o surfactante químico analisado (SDS) (3,7%), o que é representativo do alto poder dispersante do bioproduto mesmo diante de amostras de óleo pesadas e de difícil remediação.

Uma forma utilizada para a avaliação da dispersão de óleos é determinação do perfil de hidrocarbonetos emulsionados em meio aquoso. Inicialmente é realizada a extração desses compostos por *n*-hexano e após analisada por cromatografia gasosa. Na Figura 2.28 observa-se o perfil dos hidrocarbonetos obtidos nos ensaios de dispersão do controle (água do mar simulada) e para todas as amostras analisadas, no tempo zero não foram identificados picos representativos de hidrocarbonetos grandes, apenas picos de substâncias polares solubilizadas no meio.

Após 21 dias, observa-se que a água do mar simulada foi capaz de solubilizar uma pequena parte do óleo em comparação com os emulsificantes avaliados, apresentado na Figura 2.28, isso ocorre devido a presença de NaCl (KHOPADE, A. *et al.*, 2012; MANEERAT; PHETRONG, 2007), íons metálicos (XIA *et al.*, 2011) como  $Mg^{2+}$  e a agitação do sistema, o que está de acordo com o resultado apresentado, no qual é possível se observar uma leve redução na massa do óleo adicionado ao sistema. Observa-se também a ausência de cadeias menores que  $C_{22}$  no óleo, isso ocorre devido à exposição do material às ações climáticas, que provavelmente causaram a volatilização de cadeias menores.

**Figura 2.28** - Dispersão de petróleo *in vitro* após 21 dias de biorremediação utilizando: (■) água do mar, (■) meio livre de células (MLC), (■) bioemulsificante bruto (1% m/v) e (■) bioemulsificante bruto 10% (m/v).



Na Figura 2.28 é apresentada a dispersão promovida pelo bioemulsificante presente no meio livre de células (MLC) e precipitado com etanol (BB-E), observa-se um aumento significativo de hidrocarbonetos dispersos no meio, representando a ação do bioproduto, promovendo a emulsão de cadeias grandes de carbono e lipossolúveis, em especial entre C<sub>22</sub>-C<sub>33</sub>. O meio livre de células (MLC) propiciou uma dispersão de hidrocarbonetos na faixa de C<sub>22</sub>-C<sub>33</sub> em comparação com o controle (água salina), causada pela ação do bioemulsificante extracelular. Entretanto a dispersão foi consideravelmente maior utilizando o bioemulsificante em sua forma precipitada, tanto usando uma proporção de 1% (m/v) ou 10% (m/v). Observa-se que a maior ação dispersiva ocorre utilizando-se o BB-E em concentração de 10% (m/v) que após 21 dias causou considerável diminuição na massa de óleo (12%) e apresentou maiores picos em relação em relação ao BB-E 1% (m/v), observado pelo aumento dos picos referentes a cadeias carbônicas emulsionadas (C<sub>22</sub>-C<sub>33</sub>), o aumento foi mais pronunciado em cadeias mais

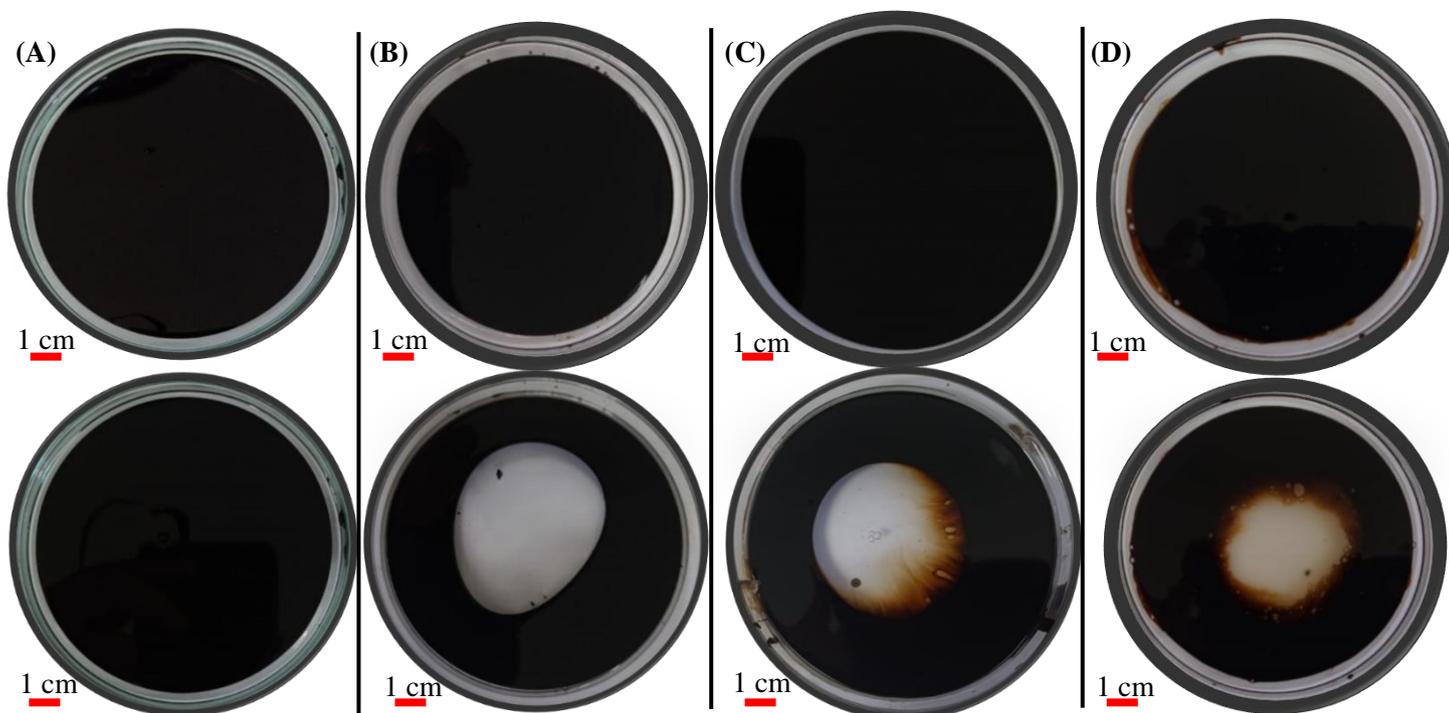
longas (C<sub>25</sub>-C<sub>31</sub>), indicando que maiores concentrações de bioemulsificantes promovem um aumento na dispersão dessas moléculas.

Assim, os resultados apresentados são promissores devido ao alto potencial do bioemulsificante que se mostrou capaz de dispersar cadeias pequenas (<C<sub>20</sub>), parafinas (>C<sub>20</sub>) e asfaltenos (>C<sub>30</sub>). Esse alto poder dispersivo para alcanos de cadeias grandes (>C<sub>20</sub>) é de alto interesse para derramamentos de petróleo, pois o óleo acumulado em praias e rochas costuma conter as porções mais pesadas do óleo derramado, que são mais resistentes a ação do clima e de agentes degradadores, como parafinas e asfaltenos (ARNOLD *et al.*, 2022). Esse é o caso do óleo derramado no Brasil em 2019, que possuía principalmente cadeias C<sub>20-26</sub> em sua estrutura, mas também altas concentrações de cadeias C<sub>30-36</sub>, que costumam ser de difícil degradação por bactérias produtoras de emulsificantes (ATAKPA *et al.*, 2022; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015; ZHANG; FENG; XUE, 2022).

### 3.8.2 Aplicação do bioemulsificante na dispersão de óleos em superfícies aquosas

O potencial dispersante de um bioemulsificante também pode ser avaliado pela dispersão de óleo em superfícies aquosas, assim foi verificado a área da zona limpa causada pela ação do tensoativo sobre petróleo, ilustrado na Figura 2.29. Os testes de dispersão superficial com petróleo usando o meio livre de células (MLC) e o bioemulsificante bruto (BB) (Figura 2.29C e 2.29D) apresentaram elevada área de dispersão de óleo (ADO), 78,5 cm<sup>2</sup> e 50,3 cm<sup>2</sup>, respectivamente. O maior potencial de dispersivo do MLC deve-se à presença de NaCl residual e íons metálicos no caldo livre de células no caldo de produção, que alteram as propriedades das emulsões formadas e promovem uma diminuição maior da tensão superficial (KHOPADE, A. *et al.*, 2012; MANEERAT; PHETRONG, 2007; XIA *et al.*, 2011). Entretanto, tanto o MLC quanto o BB apresentaram diâmetro maior que alguns surfactantes, como o detergente comercial composto por tensoativos aniônicos (44 cm<sup>2</sup>) e que outros biossurfactantes com alto poder dispersante reportados na literatura, como o de *Serratia marcescens* (50 cm<sup>2</sup>) (DOS SANTOS *et al.*, 2021; MILAGRE *et al.*, 2018). Já o meio livre de células apresentou aproximadamente o mesmo diâmetro de área limpa que outros surfactantes sintéticos como o SDS (84,9 cm<sup>2</sup>), indicando que o bioemulsificante tem um potencial dispersivo semelhante ao de surfactantes químicos mesmo sem passar por nenhum processo de separação/recuperação após o bioprocessamento, apenas separação das células microbianas.

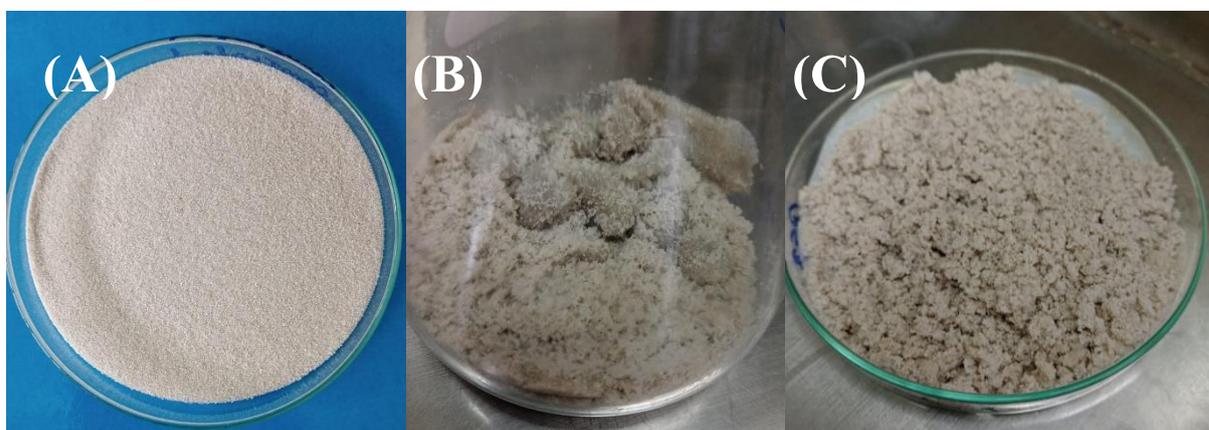
**Figura 2.29** - Potencial dispersante (A) da água do mar simulada; (B) SDS, (C) meio livre de células (MLC) e (D) do bioemulsificante precipitado com etanol (BB) a concentração de 1 g L<sup>-1</sup>.



### 3.8.3 Aplicação do bioemulsificante na limpeza solo arenoso e rochas

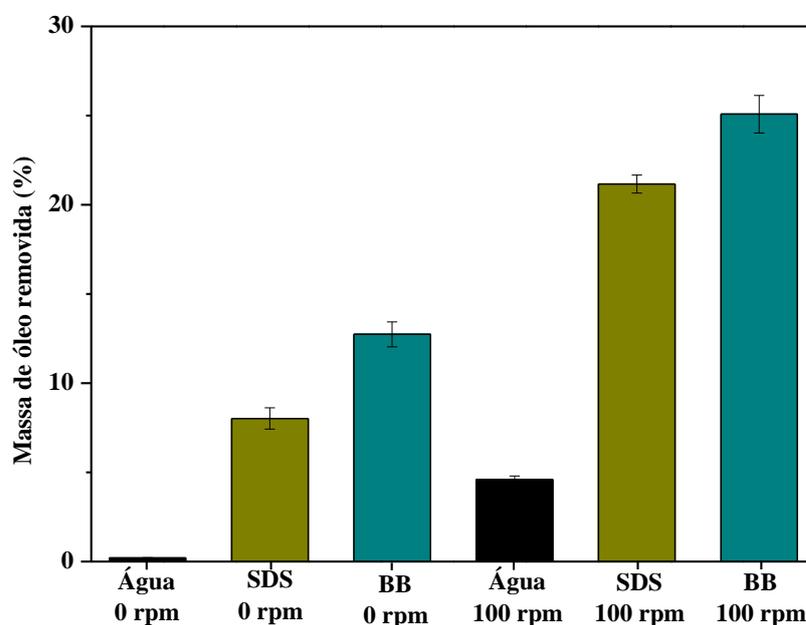
Outra forma de se avaliar o potencial biorremediador de um emulsificante biológico é avaliando o seu potencial de dispersão sobre solos contaminados, como é o caso da areia de praias e mangues, assim foi avaliada a remoção de óleo de motor de areia contaminada por este composto pela ação do bioemulsificante, demonstrado na Figura 2.30.

**Figura 2.30** - Areia (A) antes, (B) após contaminação com óleo de motor e (C) após tratamento com o bioemulsificante.



A Figura 2.31 demonstra que sob agitação, o BB foi capaz de remover aproximadamente 25% do óleo de motor da areia, apresentando um aumento de aproximadamente 100% em relação ao teste sem agitação. A agitação tem um papel muito importante na remoção do óleo da areia, podendo ocorrer pelo movimento dos mares em uma aplicação prática. Entretanto, sob condições estáticas o bioemulsificante ainda foi capaz de remover quantidade superior de óleo (13%) ao observado com o experimento utilizando SDS (8%) (Figura 2.31).

**Figura 2.31** - Ação do bioemulsificante na remoção de óleo de motor da areia sob agitação e sem agitação comparado com controles (SDS 1 g L<sup>-1</sup> e água do mar simulada) por sete dias.

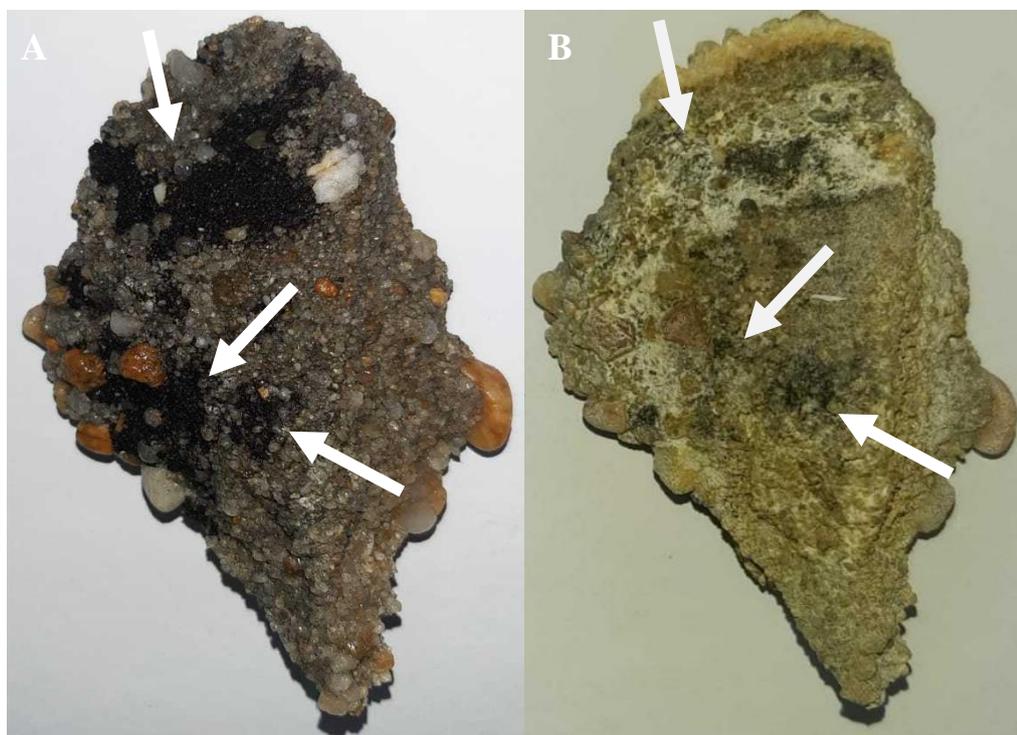


Estudos anteriores demonstraram o potencial biorremediador de biossurfactantes produzidas a partir *Candida sphaerica*, 25% de remoção de óleo de motor em 15 dias (CHAPRÃO *et al.*, 2015). Isso reforça a eficiência do bioemulsificantes de *A. venetianus* AMO1502 na remoção de óleos de ambientes contaminados, já que foi possível remover-se aproximadamente 25% da massa de óleo em um tempo menor (sete dias) e sem a presença de microrganismos metabolisadores de hidrocarbonetos.

O bioemulsificante também dispersou o óleo adsorvido em rochas coletadas de praias contaminadas pelo óleo derramado no acidente ambiental de 2019 no Nordeste brasileiro, demonstradas na Figura 2.32. Depois de sete dias em tratamento com solução de

bioemulsificante, observou-se uma grande diminuição no tamanho das manchas de óleo. Esse resultado é promissor, pois torna viável a aplicação do bioemulsificante obtido em biorremediação com devido a característica do óleo derramado que tende a permanecer adsorvido em superfícies ou enterrado na areia, e sua dispersão facilita a ação de microrganismos nativos que degradarão o óleo.

**Figura 2.32** - Ação do bioemulsificante produzido por *Acinetobacter venetianus* em rochas contaminadas por óleo contaminante, coletadas da praia de Iguape, Aquiraz, que foi afetada pelo acidente ambiental de 2019 no Nordeste brasileiro. (A) Rocha no tempo zero e (B) rocha após 7 dias de tratamento com o bioemulsificante produzido. As setas adicionadas representam pontos com expressiva diminuição das manchas.



A concentração do bioemulsificante presente MLC é  $3,3 \text{ g L}^{-1}$ , comprovando a segurança na aplicação deste bioproduto mesmo em sua forma não precipitada. Nos ensaios de dispersão de óleo em meio marinho (*in vitro*) foram utilizadas concentrações mais altas que a  $CL_{50}$  (1% (m/v) e 10% (m/v)). Contudo, a concentração de 1% (m/v), capaz de dispersar  $6,9\% \pm 0,6\%$  do óleo, ainda está abaixo do  $CL_{95}$ , concentração letal para 95% dos organismos, que é de  $14,1 \text{ g L}^{-1}$ , obtendo resultados superiores aos apresentados pelo SDS nessa mesma

concentração, um composto com maior letalidade para microcrustáceos ( $CL_{50}$  8,5 mg L<sup>-1</sup>) (EKONOMOU *et al.*, 2019).

Então, o bioemulsificante bruto apresentou alto potencial biorremediador em ensaios anteriores, assim como uma baixa toxicidade, sendo essa uma característica do emulsan de *Acinetobacter*, um potente agente emulsificante mesmo em baixas concentrações (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019). Tais características apontam que esse produto é adequado para a aplicação em ambientes marinhos contaminados, ressaltando que não é necessário processos de purificação que costumam ser onerosos.

#### 4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos a cepa de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 se mostrou eficaz na produção de bioemulsificante. As condições ótimas atribuídas para o bioprocessamento foram temperatura de 30 °C usando o meio de cultivo a pH 7,0 e suplementado com 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl usando glicose como fonte de carbono. A precipitação por etanol se mostrou mais eficaz para a separação do bioproduto por se tratar de um emulsificante polissacarídico, e a pré-purificação por *etanol-salting out* se mostrou a mais promissora, resultando em bioproduto com alto poder emulsificante com grupos semelhantes ao emulsan.

As emulsões formadas pelo bioemulsificante bruto se mostraram estáveis por até 120 dias, reduzindo o índice de emulsificação em apenas 8% após 120 dias, além de apresentarem alta estabilidade à temperatura (até 121 °C), concentração de NaCl (até 50% m/v) e pH entre 4,0 e 8,0, sendo capaz de emulsionar uma alta variedade de hidrocarbonetos e óleos.

O bioemulsificante bruto apresentou baixa citotoxicidade contra *Artemia salina*, apresentando  $CL_{50}$  de 5794 mg L<sup>-1</sup>, consideravelmente mais baixa que surfactantes químicos, o que indica que o bioemulsificante pode ser aplicado em ambientes marinhos. Quanto a fitotoxicidade, também foi possível observar que o bioemulsificante não apresentou toxicidade sobre sementes de *Ocimum basilicum* e *Brassica oleracea*, onde mesmo em altas concentrações de bioemulsificante (3000 mg L<sup>-1</sup>), não foram observados índices de germinação inferiores a 80%.

Quanto ao potencial biorremediador, o emulsificante biológico de *A. venetianus* foi capaz de remover 12% da massa de óleo contaminante em ambiente marinho, dispersando principalmente cadeias C<sub>21</sub>-C<sub>35</sub>. Em testes com areia contaminada, o bioemulsificante foi capaz

de remover até 25% do óleo de motor misturado com a areia, valores próximos aos do surfactante químico avaliado (SDS). O emulsificante também foi capaz de remover a maior parte das manchas de óleo presentes em rochas contaminadas.

Apesar do elevado potencial de aplicação dos bioemulsificantes, alguns gargalos devem ser transpostos como, por exemplo, baixos rendimentos e efetivos estudos de aplicação, tornando relevante os resultados e discussões que aqui foram apresentados. Assim a nova cepa de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 apresentou grande potencial na produção de emulsificantes biológicos potentes e de baixa toxicidade para aplicação em derramamentos de petróleo e em outras indústrias, contribuindo para o escopo de aplicação de bioemulsificantes em substituição aos surfactantes sintéticos.

---

## **CAPÍTULO 3**

---

### CAPÍTULO 3

#### PRODUÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE POR *Acinetobacter venetianus* AMO1502 UTILIZANDO HIDROCARBONETOS COMO FONTE DE CARBONO

##### RESUMO

O potencial de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos para aplicação em processos de biorremediação *in situ* e para a produção de biossurfactantes e bioemulsificantes é reconhecido na comunidade científica, sendo alvo de várias pesquisas. Cepas de *Acinetobacter venetianus* se destacam como microrganismos degradadores de cadeias de alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>), as quais são metabolizadas pela célula por intermédio dos emulsificantes biológicos produzidos em seu cerne e excretados para o meio de cultura. A utilização de hidrocarbonetos como fontes de carbono pode aumentar a produção de bioemulsificantes, devido à baixa biodisponibilidade de fontes hidrofóbicas no meio de cultura, que causa uma pressão adaptativa, induzindo a produção de agentes emulsificantes. Assim, nesta etapa do estudo apresentada no presente capítulo busca-se avaliar a produção de agentes de superfície-ativa por *A. venetianus* utilizando diferentes fontes hidrofóbicas (óleo diesel, hexadecano, querosene e petróleo) como fonte de carbono, analisando o crescimento celular, produção de bioemulsificante bruto e hidrofobicidade das células. Para tal, a produção ocorreu em condições otimizadas (usando meio suplementado com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl, a pH 7,0 e o processo conduzido a 30 °C), sob agitação de 150 rpm por 120 horas. Também foi avaliada a influência da suplementação do meio de cultivo com fonte de carbono hidrossolúveis (glicose ou etanol) nos ensaios que se apresentou maior atividade emulsificante. O microrganismo apresentou alto crescimento (>1 g L<sup>-1</sup>) em meio contendo óleo diesel e hexadecano como única fonte de carbono, entretanto o maior índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>%) foi observado no meio contendo querosene. Estudos cinéticos demonstraram que apesar do menor crescimento em comparação com outras fontes de carbono, a cepa apresentou alta produção de bioemulsificante bruto no meio contendo querosene (6,5 g L<sup>-1</sup>). Após 35 dias de produção, o meio contendo petróleo como fonte de carbono apresentou alta atividade emulsificante (IE<sub>24</sub>%: 58%). A célula apresentou alta aderência para querosene (96%) e petróleo (64%). A adição de glicose e etanol se mostrou eficiente para melhorar a produção de bioemulsificantes, em especial a glicose que acelerou o crescimento celular no meio contendo querosene em 24 h e aumentou a produção de bioemulsificante bruto para 7,5 g L<sup>-1</sup>. Dessa forma foi constatada a importância da adição de fontes de carbono hidrofóbicas para o aumento da produção de bioemulsificantes de *Acinetobacter venetianus*, aumentando o escopo de meios de cultura a serem utilizados durante a produção como alternativa a meios sintéticos.

**Palavras-Chave:** *Acinetobacter*, degradação, emulsan, hidrofobicidade, hidrocarbonetos.

## 1 INTRODUÇÃO

Diferentes substratos como resíduos agroindustriais são comumente utilizados para a produção de emulsificantes biológicos, por exemplo, matéria-prima agrícola (PANILAITIS *et al.*, 2007), suco de caju (ROCHA *et al.*, 2006), óleo vegetal (CHAMANROKH *et al.*, 2008) e efluentes agroindustriais (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Entretanto, fontes lipossolúveis mais complexas, como o petróleo e suas frações, também são utilizadas, em especial na produção de emulsificantes complexos devido a menor biodisponibilidade da fonte de carbono no meio (CHAMANROKH *et al.*, 2008; HASSANSHAHIAN; EMTIAZI; CAPPELLO, 2012; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008; THRONE-HOLST *et al.*, 2006).

Microrganismos degradadores de hidrocarboneto vêm chamando atenção da comunidade científica pela sua aplicação na limpeza de poluentes orgânicos como agentes biorremediadores *in situ*, através da produção de emulsificantes no local da contaminação, ou em reatores para aplicação posterior nos locais de contaminação (AMANI, 2017; JOSHI; DESAI, 2013; MOSHTAGH; HAWBOLDT; ZHANG, 2021; THRONE-HOLST *et al.*, 2006).

Diversos microrganismos são capazes de crescer em meio contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono, como *Alcanivorax* (SINHA; KRISHNAN; KURIAN, 2021), *Corynebacterium* (THRAEIB *et al.*, 2022), *Rhodococcus* (HU *et al.*, 2020) e *Pseudomonas* (KEZRANE *et al.*, 2020). Dentre esses microrganismos destaca-se a *Acinetobacter venetianus*, um conhecido microrganismo degradador de hidrocarbonetos e produtor de potentes agentes emulsificantes (LIU *et al.*, 2021, 2017; MERCALDI *et al.*, 2008).

A metabolização de hidrocarbonetos por *A. venetianus* ocorre por intermédio do bioemulsificante produzido, o emulsan, responsável pela captação da fonte de carbono, levada para o interior da célula por vesículas extra celulares (FONDI *et al.*, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Em seguida os hidrocarbonetos serão degradados por ação de enzimas *AlkB*, uma proteína de membrana integral que realiza a hidroxilação de n-alcenos, resultando em álcoois que são convertidos em ácidos graxos por enzimas álcool desidrogenase (ABBOTT; LASKIN; MCCOY, 1973; LIU *et al.*, 2021; THRONE-HOLST *et al.*, 2006).

A utilização dessas fontes de carbono, bem como suplementações, pode aumentar a produção de bioemulsificante e melhorar suas características, como índice de emulsificação (CHAMANROKH *et al.*, 2008; PANILAITIS *et al.*, 2007, 2002). Assim, a utilização dessas fontes de carbono alternativas aos meios sintéticos surge como uma alternativa para os baixos rendimentos e, em alguns casos, redução dos custos com substrato.

Desse modo, esse capítulo tem como objetivo avaliar a produção de bioemulsificantes por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 utilizando fontes de carbono hidrofóbicas (óleo diesel, hexadecano, querosene e petróleo). Em seguida, serão selecionadas as fontes de carbono que

apresentarem maior potencial para produção de bioemulsificante para estudo cinético e de aderência celular. Por fim, essas fontes mais complexas serão suplementadas com outras fontes de mais fácil metabolização (glicose e etanol) como estratégia para aumentar os rendimentos da produção de bioemulsificantes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagentes

Óleo diesel e querosene foram adquiridos no mercado local de Fortaleza – CE. O petróleo foi recolhido da praia do Iguape, no município de Aquiraz (03°56'46" S, 38°16'36" W), oriundo de um derramamento. Extrato de levedura e hexadecano foram adquiridos da SigmaAldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO); fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e glicose da Neon Comercial® (Suzano, SP); ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), bórax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de sódio (NaCl), etanol, fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de manganês ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) da Dinâmica Química Contemporânea LTDA® (Indaiatuba, SP).

#### 2.1.2 Microrganismo

A cepa de *Acinetobacter venetianus* AMO1502 utilizada foi coletada de amostras de óleo de um derramamento ocorrido em Amontada (03°01'25.0" S, 39°38'17.3" W), e registrada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo número de acesso MT478042.1. A cepa foi armazenada a 4 °C em meio ATGE (15 g L<sup>-1</sup> de ágar, 5 g L<sup>-1</sup> de triptona, 1 g L<sup>-1</sup> de glicose e 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura) com adição de 3% (m/v) de NaCl, pH 7,0 e, quando necessário, ativada em meio de mesma composição.

### 2.2 Produção de bioemulsificante

Para obtenção do inóculo, inicialmente três colônias isoladas em meio Ágar ATGE foram transferidas para Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral (MM)

composto por: Glicose ( $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{Na}_4\text{HO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $6,0 \text{ g L}^{-1}$ ), Extrato de levedura ( $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{NaCl}$  ( $3,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $3,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,6 \text{ g L}^{-1}$ ) (adaptado de D'almeida, 2022). O meio foi esterilizado a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos e em seguida suplementado com solução de micronutrientes a 0,1% (v/v):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $10,95 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $1,54 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ( $0,39 \text{ g L}^{-1}$ ),  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0,25 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  ( $0,17 \text{ g L}^{-1}$ ), a qual foi esterilizada por filtração com membranas de diâmetro  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>, USA). Então o pH do meio foi ajustado para 7,0. Após isso, o inóculo foi incubado a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 150 rpm por 24 horas. Para padronizar a concentração de células inicial do sistema, ajustou-se a densidade óptica do inóculo para  $0,15 \pm 0,02$ , a  $600 \text{ nm}$ , através de diluições em meio de cultivo estéril.

Após o crescimento do inóculo, a avaliação da produção de bioemulsificante utilizando diferentes fontes de carbono ocorreram em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio mineral com  $\text{NaCl}$  (MM) e 2% (v/v ou m/v) de hidrocarbonetos inoculado com 2% (v/v) da cultura, a 150 rpm,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias. Ao final do período o caldo foi centrifugado a 5000g por 20 minutos (Hettich<sup>®</sup>, 420R) para obter o meio livre de células (MLC). O crescimento celular, o índice de emulsificação e a tensão superficial foram considerados parâmetros para avaliação da adaptação da cepa e da produção de bioemulsificante. O processo utilizando petróleo como fonte de carbono também foi conduzido por um tempo maior (35 dias) devido a maior complexidade do metabólito. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 2.3 Recuperação do bioemulsificante bruto

A separação do bioemulsificante bruto foi realizada por precipitação adicionando etanol absoluto à proporção de 2:1 (Etanol:MLC) no MLC, apresentado na seção 2.4 do Capítulo 2. A solução obtida no método avaliado foi mantida por 24 h a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  e o precipitado bruto, chamado de bioemulsificante bruto (BB) foi recolhido por centrifugação a 5000g,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 20 minutos e, ao final, pesado para cálculo da concentração.

### 2.4 Influência da glicose e etanol na degradação de hidrocarbonetos

Investigou-se a produção de bioemulsificante utilizando hidrocarbonetos selecionados no tópico 2.2 suplementados com glicose ou etanol, fontes de carbono hidrossolúveis reportadas anteriormente na literatura por melhorar a produção de bioemulsificantes de *Acinetobacter* (PANILAITIS *et al.*, 2007). Nesses experimentos usou-se o meio MM contendo as 1% (m/v ou v/v) das fontes de carbono selecionadas e glicose 1% (m/v) ou etanol 1% (v/v) como

suplementação, como controle utilizou-se o meio MM com 2% (m/v) glicose e 2% (v/v) etanol. O processo foi conduzido nas mesmas condições expressas na sessão 2.2. O consumo de glicose ou etanol foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrita na seção 2.5.4. A cinética da produção também foi estudada, bem como a concentração de BB presente no meio a partir do método de recuperação descrito na sessão 2.3.

## 2.5 Métodos Analíticos

### 2.5.1 Atividade emulsificante

Para determinação da atividade emulsificante, adaptou-se a metodologia descrita por Iqbal *et al.* (1995), na qual avalia-se a altura da emulsão de uma fonte hidrofóbica líquida, pura ou em mistura. Adicionou-se 2 mL de querosene, como fonte hidrofóbica, em 2 mL de MLC, em seguida agitou-se vigorosamente o sistema em *vórtex* por 2 minutos e a emulsão foi mantida por 24 horas a 25 °C. O índice de emulsificação (IE<sub>24</sub>%) foi determinado pela proporção entre a altura da fase emulsionada (A<sub>FE</sub>) e altura total do sistema (A<sub>T</sub>), conforme apresentado na Equação 1.

$$IE_{24}(\%) = \frac{A_{FE}}{A_T} \times 100 \quad (1)$$

### 2.5.2 Redução da tensão superficial (RTS%)

A tensão superficial do meio foi medida pelo método Du nouy (1925) em tensiômetro Kruss e a redução da tensão superficial (RTS%) em relação a condição inicial foi calculada conforme a Equação 2, pela relação entre a tensão superficial inicial do sistema (TS<sub>i</sub>) e tensão superficial final do sistema (TS<sub>f</sub>). Para cada análise 20 mL de MLC a 25 °C foram analisadas em triplicata.

$$RTS(\%) = \frac{TS_i - TS_f}{T_i} \times 100 \quad (2)$$

### 2.5.3 Determinação da biomassa

O crescimento celular foi acompanhado por densidade óptica (DO), à comprimento de onda de 600 nm, em espectrofotômetro *Biochrom Libra S11*, e a concentração celular foi determinada por curva de calibração previamente obtida.

#### 2.5.4 Determinação da concentração de glicose e etanol

A concentração de glicose e etanol foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Waters, Milford, MA, USA), em conjunto com detector de índice de refração (Model 2412) e coluna Supelco 610-H. O eluente utilizado foi uma solução aquosa de 0,1% (v/v) de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ao fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, com o volume de injeção da amostra de 20 µL e a temperatura de análise a 65 °C.

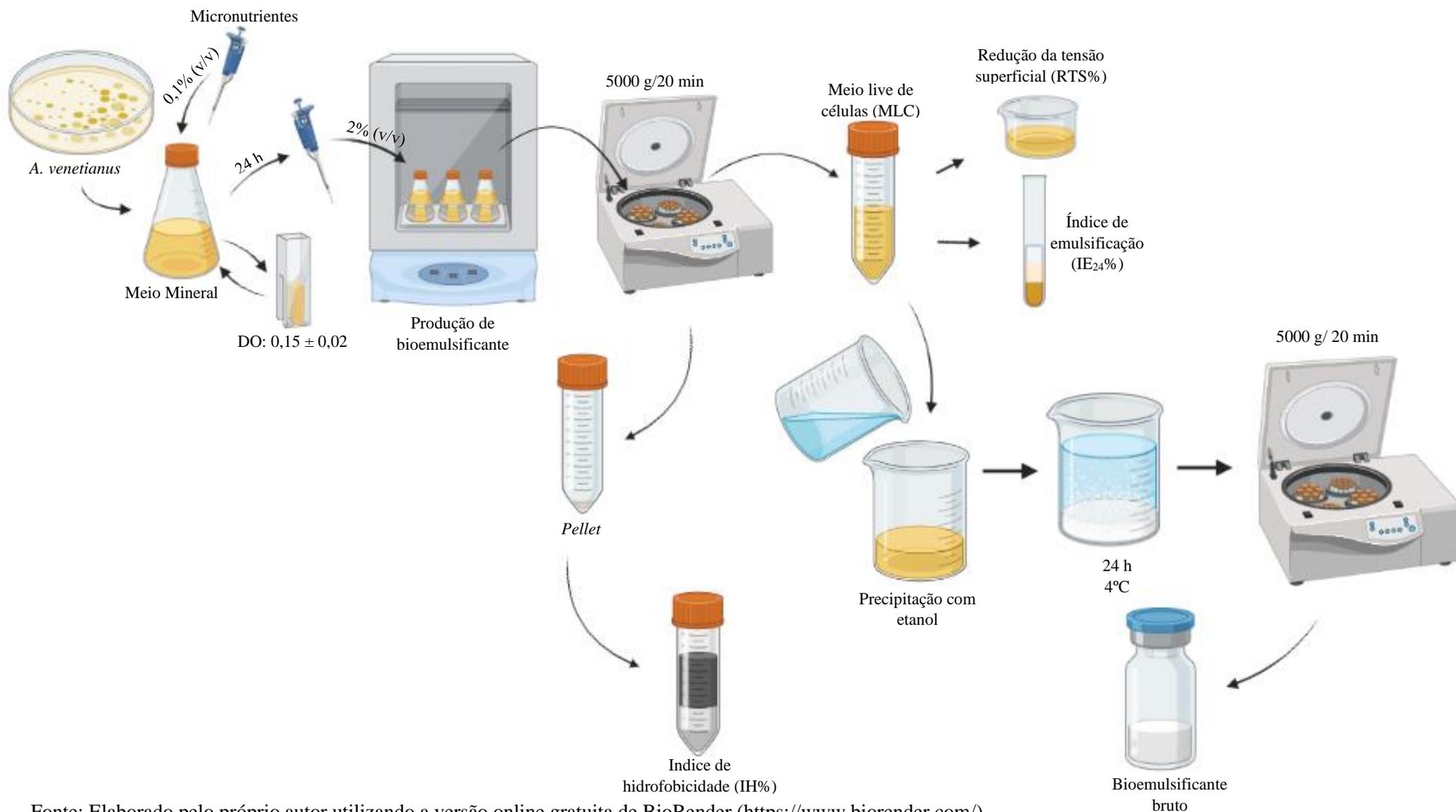
#### 2.5.5 Determinação da hidrofobicidade celular

A aderência celular a hidrocarbonetos foi calculada com base em metodologia adaptada de Zhang *et al.* (2022). As células foram separadas do caldo por centrifugação a 5000 g por 20 minutos, em seguida lavado duas vezes com solução salina (0,85% m/v). O pellet foi ressuspenso em água a uma densidade ótica de 0,3-0,4 nm a 600 nm (sendo acompanhado em um espectrofotômetro *Biochrom Libra S11*). Então, 400 µL de hexano foram adicionados a 4 mL da suspensão bacteriana, em seguida, o sistema foi agitado vigorosamente em *vórtex* por 2 minutos. Após, a mistura foi deixada em repouso por 1 hora e então a densidade ótica da fase aquosa foi medida a 600 nm. O índice de hidrofobicidade (IH%) foi calculado conforme a Equação 3, pela relação entre a densidade ótica da fase aquosa (DO<sub>a</sub>) e a densidade ótica inicial (DO<sub>i</sub>). Todos os ensaios e análises foram realizadas em triplicata.

$$IH(\%) = \left[ 1 - \frac{DO_a}{DO_i} \right] \times 100 \quad (3)$$

A Figura 3.1 apresenta um fluxograma das etapas realizadas neste capítulo, como um resumo das metodologias supracitadas.

**Figura 3.1** - Fluxograma dos experimentos realizados visando avaliar a influência da utilização de diferentes fontes de carbono.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor utilizando a versão online gratuita de BioRender (<https://www.biorender.com/>)

Produção, Caracterização e Aplicação em Biorremediação de Bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus* Isolada de Amostras de Petróleo

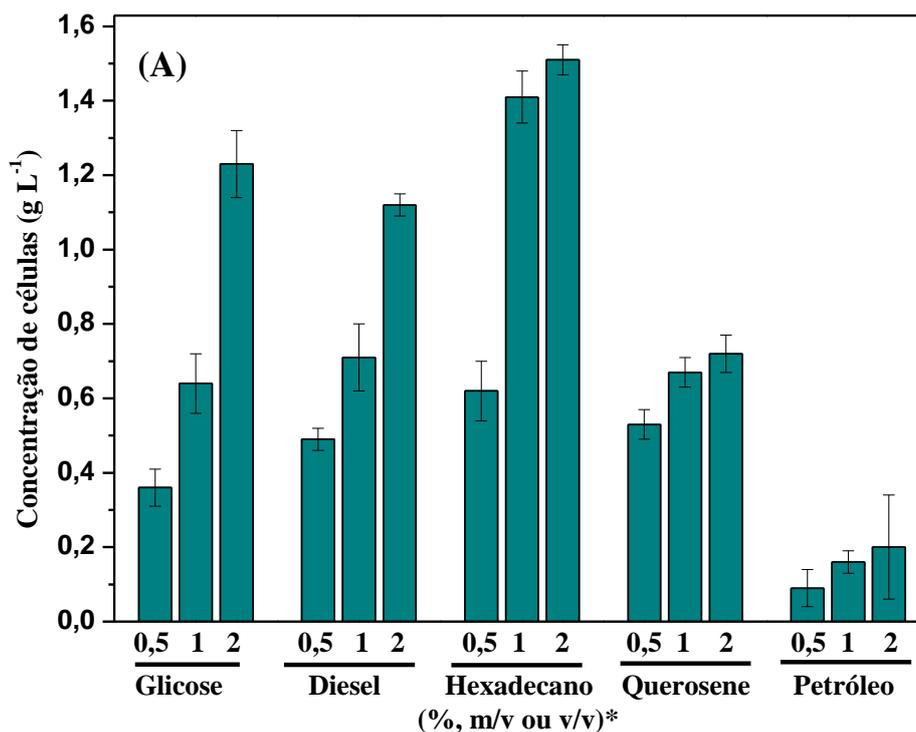
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

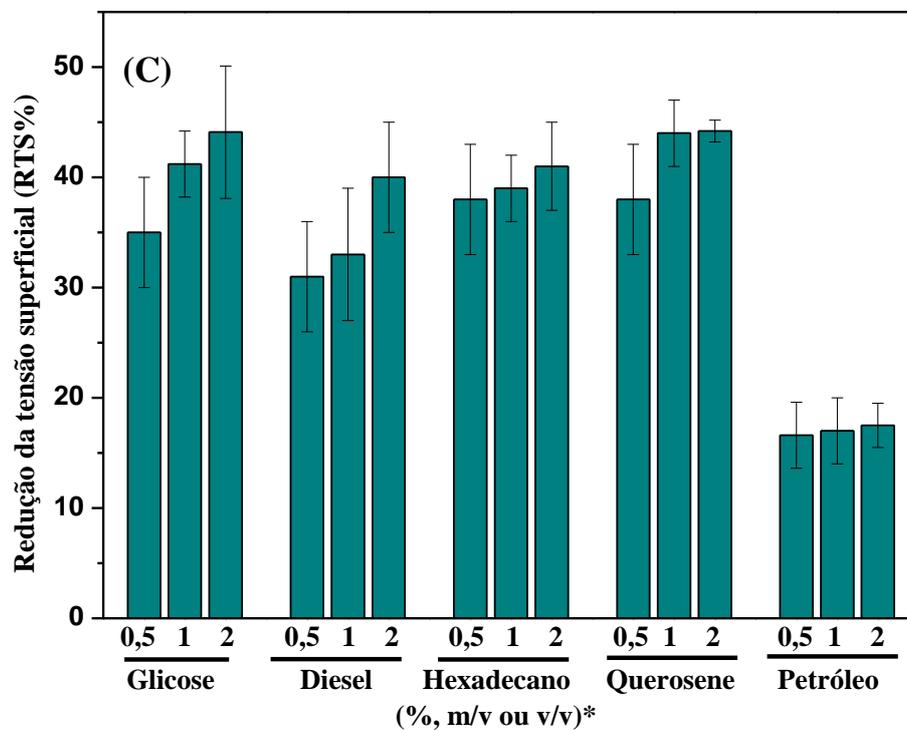
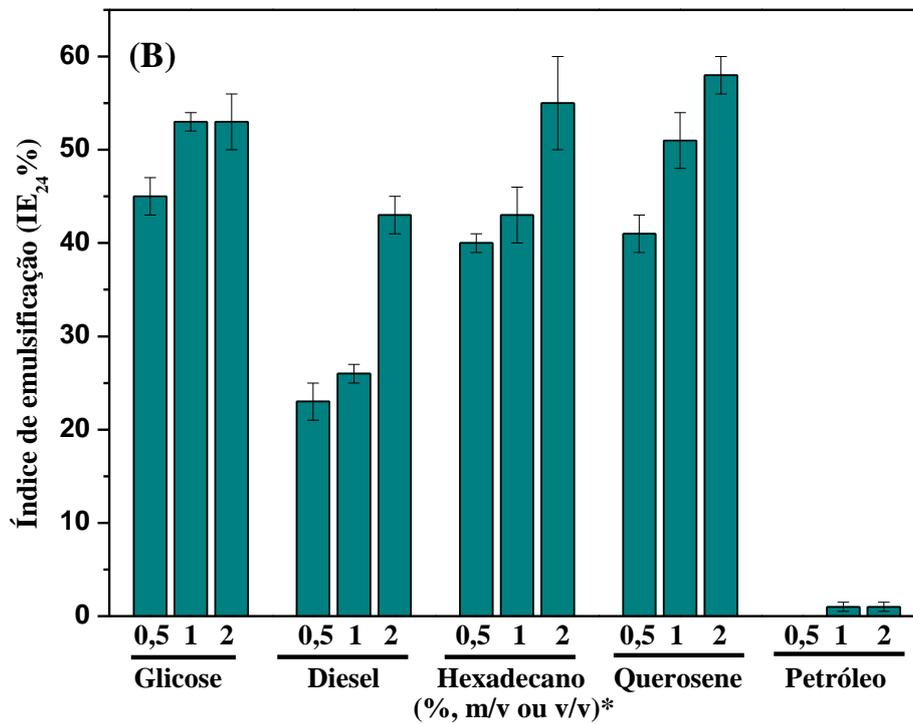
A utilização de microrganismos diretamente como agentes biorremediadores para produção de bioemulsificantes *in situ* pode ser considerada uma estratégia de recuperação de áreas contaminadas. Assim, o potencial da cepa AMO1502 na produção de bioemulsificantes utilizando hidrocarbonetos como fonte de carbono também foi avaliada em relação a querosene (C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>), óleo diesel (C<sub>8</sub>-C<sub>21</sub>), hexadecano (C<sub>16</sub>) e petróleo (>C<sub>22</sub>) (HYDER, 2015; LIU *et al.*, 2021; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018).

#### 3.1 Produção de bioemulsificante por *A. venetianus* AMO1502 utilizando fontes de carbono hidrofóbicas

O gênero *Acinetobacter* é capaz de metabolizar hidrocarbonetos, como hexadecano (PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008), óleo diesel (ONUR; YILMAZ; ICGEN, 2015) e petróleo bruto (ZHAO *et al.*, 2016). Assim foi avaliado crescimento da cepa *Acinetobacter venetianus* na presença de hidrocarbonetos (óleo diesel, querosene, hexadecano e petróleo) e acompanhar a produção de uma substância de superfície ativa por determinação da atividade emulsificante e da redução da tensão superficial do meio, como apresentado na Figura 3.2, que apresenta o crescimento, índice de emulsificação e redução de tensão superficial para o meio contendo fontes de carbono hidrofóbicas. Para impulsionar o uso dessas fontes hidrofóbicas, devido a sua complexidade estrutural, é comum que os microrganismos necessitem de um tempo maior para a metabolização (ANTONIOU *et al.*, 2015), assim a fermentação foi conduzida por até 120 horas, comparando-se com o crescimento em glicose no mesmo período.

**Figura 3.2** - Análise do crescimento celular (A) e produção de emulsificante determinada por Índice de emulsificação ( $IE_{24\%}$ ) (B) e Redução da tensão superficial (RTS%) (C) por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 usando diferentes fonte de carbono e o processo conduzido a 30 °C e 150 rpm.





\* A proporção de óleo diesel, hexadecano e querosene foi calculada em v/v, e a de glicose e petróleo em m/v.

Observou-se um maior crescimento celular, no tempo avaliado, na presença de cadeias predominantemente alifáticas e *n*-alcanos, como hexadecano (C<sub>16</sub>) e óleo diesel (C<sub>8</sub>-C<sub>21</sub>) (Figura 3.2A), o que demonstra o potencial da célula a adaptação ao consumo dessas cadeias longas. Bao *et al.* (2014) reportaram o crescimento celular em diferentes fontes de carbono para bactérias do gênero *Acinetobacter*, observando maior crescimento celular em fontes mais complexas, como óleo vegetal, óleo cru, e em cadeias menos ramificadas como misturas de *n*-alcanos, como óleo diesel, ou compostos puros como o hexadecano, comprovando que microrganismos deste gênero conseguem crescer e atingir maiores concentrações celulares ao degradar essas misturas de alcanos ou óleos vegetais. Contudo, os autores encontraram os menores crescimentos celulares para cadeias cíclicas e aromáticas como ciclohexano, tolueno, naftaleno, xileno e, principalmente, fenol, o que corrobora com o crescimento celular reduzido apresentado neste trabalho pela cepa em querosene, na concentração de 2% (v/v), uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos menores (C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>), cíclicos e aromáticos (COLLINS, 2007). O crescimento mais elevado a partir misturas de *n*-alcanos maiores se dá pela predileção que a *A. venetianus* tem por cadeias maiores (C<sub>20</sub>-C<sub>40</sub>) e imiscíveis em água, nas quais a célula forma uma capsula de polissacarídeo que permite que ela consiga aderir nestas substâncias, conferindo a célula alta hidrofobicidade, e proteção à exposição ao solvente, para então realizar a degradação dos hidrocarbonetos por ação de enzimas alcano hidroxilases, resultando em compostos de menor toxicidade como CO<sub>2</sub> (BALDI; PEPI; CAPONE, 2003; THRONE-HOLST *et al.*, 2006).

As Figuras 3.2B e 3.2C apresentam a produção de bioemulsificante representada pelo aumento da atividade emulsificante e redução da tensão superficial do meio. Observa-se que a maior atividade emulsificante ocorre no meio contendo querosene como fonte de carbono, o que é um indicativo de que apesar do baixo crescimento, a alta complexidade do meio de cultura foi capaz de induzir a produção de altas concentrações de bioemulsificante de modo a aumentar a biodisponibilidade da fonte de carbono para a célula (THRONE-HOLST *et al.* 2006). A concentração da fonte de carbono apresentou grande influência na produção de emulsificante, obtendo um bioproduto que propiciou um maior índice de emulsificação em meios com maior abundância da fonte de carbono, o que pode ser indicativo da sua maior biodisponibilidade. A redução da tensão superficial foi semelhante nos ensaios, o que é indicativo que a produção de

bioemulsificante atingiu valores próximos ou maiores que a concentração micelar crítica do bioemulsificante produzido. O petróleo apresentou baixa produção de bioemulsificante, observando-se baixo IE<sub>24%</sub> (<5%) e RTS% (<20%), indicando que essa fonte de carbono, rica em parafinas e asfaltenos (>C<sub>22</sub>), exige maior tempo de fermentação para ser metabolizada, assim, posteriormente também foi avaliada a produção de bioemulsificante utilizando o petróleo como fonte de carbono em um tempo maior que 120 h.

A rota metabólica da *Acinetobacter venetianus* em processos de degradação aeróbia já foi reportada em estudos anteriores que apontaram genomas determinantes na cepa para a sobrevivência em meios impactados ecologicamente (FONDI *et al.*, 2013, 2016; KOTHARI *et al.*, 2016). Foram encontrados genes ligados a metabolização de grandes cadeias carbônicas e a sintetização de enzimas importantes para a degradação de hidrocarbonetos (*AlkMa*, *AlkMb* e *AlmA*) (KOTHARI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2021). A aderência celular aumenta devido a glicosilação de proteínas da membrana celular, que formam uma capsula de polissacarídeos capaz de envolver gotas de hidrocarbonetos dispersos, seguido pela internalização dessas cadeias carbônicas por ação dos bioemulsificantes produzidos, como o emulsan, um lipoheteropolissacarídeo aniônico biosintetizado no cerne do microrganismo a partir de produção de amino açúcares (FONDI *et al.*, 2016; MERCALDI *et al.*, 2008).

Assim, devido à maior produção de bioemulsificante (IE<sub>24%</sub> > 50%) e escassez de trabalhos científicos, o querosene foi escolhido como fonte de carbono para estudo cinético. O petróleo oriundo de derramamentos também foi selecionado para avaliar o potencial da cepa em processos de biorremediação *in situ*, porém utilizando um tempo de produção maior, 35 dias.

### 3.2 Estudo cinético da degradação de querosene e petróleo.

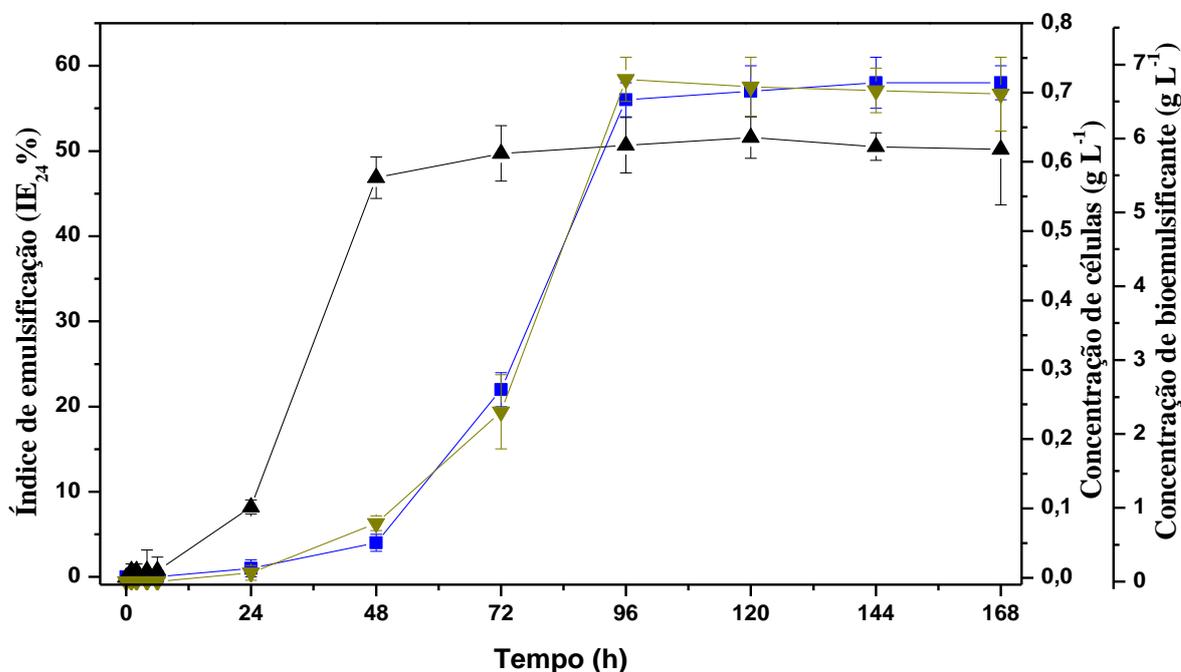
Assim, foram realizadas novas fermentações utilizando querosene e petróleo, por 7 e 35 dias, respectivamente, de modo a avaliar o crescimento e produção de bioemulsificante de *A. venetianus* utilizando essas fontes de carbono.

No meio contendo querosene (MM-Q), uma mistura de hidrocarbonetos contendo parafinas (*n*-alcanos), cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos, é possível observar-se um crescimento mais demorado (Figura 3.3) em relação à meios utilizando glicose como fonte de carbono (Figura 2.7), o que é indicativo de um maior tempo de adaptação para metabolização dos hidrocarbonetos. A partir de 24 horas é possível observar-se um aumento na concentração

de células e bioemulsificante no meio, à medida que o índice de emulsificação também aumenta. Essa “demora” para atingir a fase exponencial ocorre pela complexidade do querosene como fonte de carbono, que necessita de um tempo maior para metabolização da célula em comparação com a glicose.

A concentração de bioemulsificante no meio se estabiliza em 96 horas, atingindo concentrações superiores a  $6,5 \text{ g L}^{-1}$ , superior aos  $3,3 \text{ g L}^{-1}$  produzidos na presença de glicose no meio livre de células, apresentado na Tabela 2.2. Essa maior produção é devido a presença de fontes de carbono hidrofóbicas no meio, que induzem a produção de emulsificantes pela célula para degradação de óleos (MERCALDI *et al.*, 2008; THRAEIB *et al.*, 2022).

**Figura 3.3:** Produção de bioemulsificante por *Acinetobacter venetianus* utilizando querosene como fonte de carbono a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 150 rpm (MM-Q). ( $\blacktriangledown$ ) Concentração de bioemulsificante ( $\text{g L}^{-1}$ ); ( $\blacksquare$ ) Índice de emulsificação do meio livre de células (MLC) (%) e ( $\blacktriangle$ ) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ).



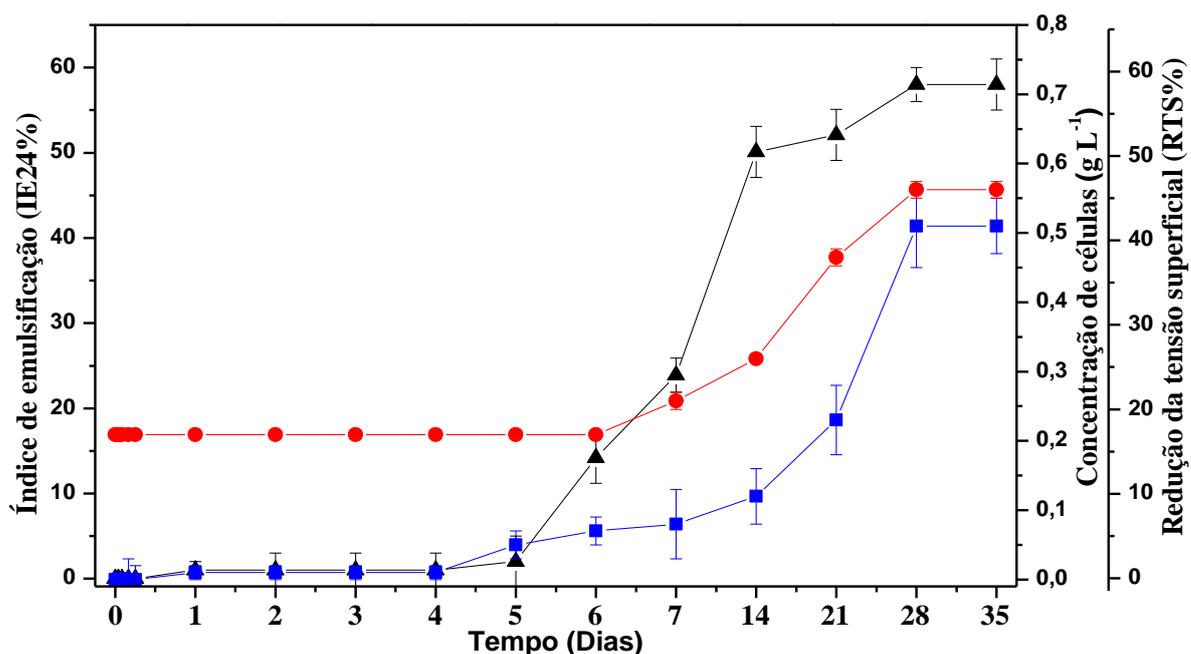
Assim, foi avaliada a produção de bioemulsificante em meio contendo petróleo recolhido de praias do litoral do Brasil por 35 dias. Esse tempo mais longo foi aplicado devido hidrocarbonetos maiores exigirem tempo maior de metabolização devido sua complexidade

(ANTONIOU *et al.*, 2015). Assim, por se tratar de uma fonte de hidrocarbonetos complexos, composto por parafinas e asfaltos, expresso pela densidade do material que é sólido e pastoso, foram realizadas bateladas com tempo maior para averiguação do tempo de adaptação e degradação dessa fonte de carbono com intuito da aplicação em biorremediação, avaliado pela diminuição da tensão superficial do meio, atividade emulsificante (IE<sub>24%</sub>) e crescimento celular (Figura 3.4).

Assim, observa-se que o IE<sub>24%</sub> do meio contendo petróleo (MM-P) (Figura 3.4) leva cerca de 7 dias para atingir valores superiores a 10%, o que, assim como o querosene, é representativo da baixa biodisponibilidade da fonte de carbono para a célula e resulta em tempos maiores de bioprocessamento.

No meio MM-P, em cerca de 28 dias houve estabilização na biomassa e na atividade emulsificante do meio, gerando índices de emulsificação semelhantes aos observados no MM-Q (IE<sub>24%</sub>: 58%), levemente superior ao apresentado em meio com glicose como fonte de carbono (IE<sub>24%</sub>: 53%).

**Figura 3.4** - Produção de bioemulsificante por *Acinetobacter venetianus* AMO1502 a 30 °C e 150 rpm utilizando petróleo como fonte de carbono (MM-P). (▲) concentração de células (g L<sup>-1</sup>), (●) Redução da tensão superficial (%) e (■) Índice de emulsificação do meio livre de células (MLC) (%).

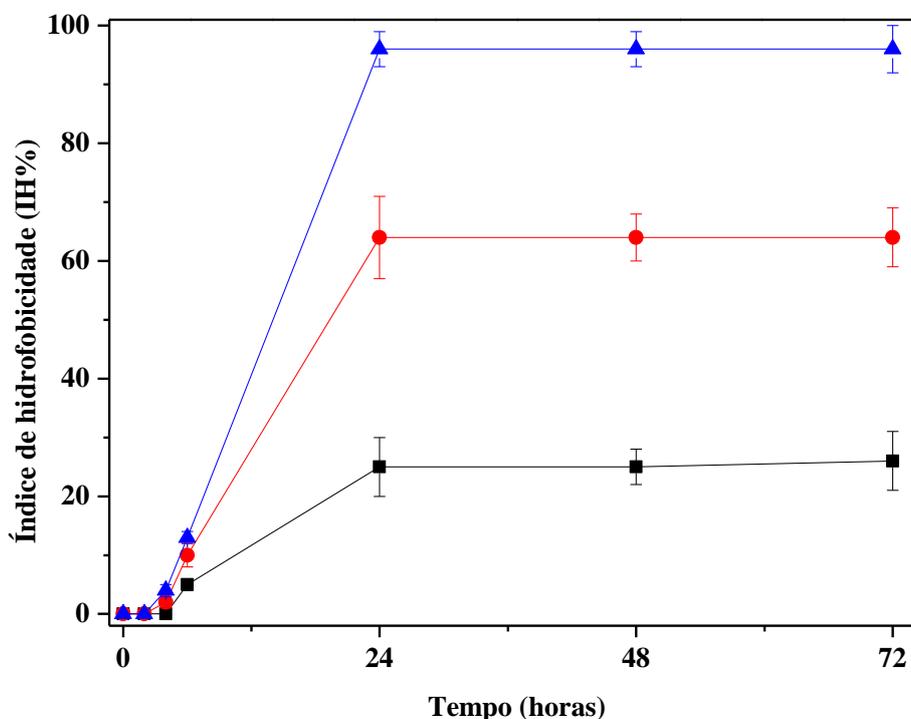


Dentre os trabalhos que reportam o uso de fontes alternativas para produção de substâncias com caráter surfactante, alguns se destacam: Chamaronkh *et al.* (2010), por exemplo, utilizaram óleo cru como fonte de carbono para cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*, obtendo um bioproduto que diminui a tensão superficial final para 29 mN/m, menor tensão que alcançada pelo bioproduto menor que o observado com etanol (30 mN/m) em 72 horas de cultivo utilizando *A. calcoaceticus* RAG-1. Hassanshahian *et al.* (2012) analisaram a degradação de óleo cru por de diversas bactérias após 10 dias, obtendo os melhores resultados de degradação de óleo a partir de cepas de *A. calcoaceticus* e *Alcanivorax diesolei*, tendo sido removidos 82% do óleo pela primeira espécie, que apresenta semelhanças filogenéticas com a cepa estudada nesse trabalho. Por fim, Throne-Holst *et al.* (2006) estudaram o potencial da *A. venetianus* na degradação de hidrocarbonetos, que se mostrou capaz de degradar cadeias C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> como única fonte de carbono em fermentação por 7 dias por ação de enzimas *AlkB*. Estes

estudos apontaram que as células de *Acinetobacter* necessitam de um tempo maior para a metabolização de petróleo oriundo de derramamentos como o de 2019, uma fonte de carbono mais complexa, densa, viscosa e de baixa biodisponibilidade em comparação com outros óleos e hidrocarbonetos. Sendo assim ao final dos 35 dias do experimento realizado nessa pesquisa, a tensão superficial, crescimento celular e índice de emulsificação apresentaram valores próximos dos encontrados para outras fontes de carbono, por exemplo, usando glicose com fonte de carbono com tempos de produção consideravelmente menores, demonstrando que o tempo necessário para que os microrganismos consigam assimilar o óleo oriundo do derramamento foi atingido.

A aderência das células a meios hidrofóbicos é considerada um indicativo da degradação de hidrocarbonetos e da produção de bioemulsificantes por microrganismos do gênero *Acinetobacter*, onde o aumento da aderência ocorre paralelamente a produção de bioemulsificantes extracelulares pela cepa (ROSENBERG *et al.*, 1983; ZHANG; FENG; XUE, 2022). Assim a hidrofobicidade da parede celular da cepa também foi avaliada. Observou-se que em todas as repetições o índice de hidrofobicidade celular (IH%) aumentou ainda nas primeiras horas de processo (entre 4 e 6 horas) estabilizando em 24 horas em todas os processos, alcançando  $25\% \pm 5\%$  em MM,  $64\% \pm 7\%$  em MM-P e  $96\% \pm 3\%$  em MM-Q (Figura 3.5). A menor aderência observada no meio MM, que contém apenas glicose como fonte de carbono, deve-se a ausência de hidrocarbonetos no meio, que induzem a formação de cápsulas polissacarídicas para a aderência da célula a essas substâncias (MERCALDI *et al.*, 2008). Já a maior hidrofobicidade da cepa ocorreu no meio usando querosene como fonte de carbono (MM-Q), isso se deve, provavelmente, ao menor tempo de degradação do querosene em relação ao petróleo e a alta densidade e viscosidade do óleo, que reduz sua biodisponibilidade para a cepa.

**Figura 3.5** - Índice de hidrofobicidade em diferentes meios: (■) MM, (●) MM-P e (▲) MM-Q a 30 °C e 150 rpm.



Essa aderência ocorre pelos finos pilos na superfície celular e pela formação de polissacarídeos na parede da *Acinetobacter venetianus* que promovem a aderência da célula a nano gotas de hidrocarbonetos e outras fontes hidrofóbicas antes da produção de bioemulsificante (KOTHARI *et al.*, 2016; MERCALDI *et al.*, 2008). A formação dessa camada de polissacarídeo é uma estratégia utilizada por bactérias degradadoras de hidrocarbonetos para a produção de emulsificantes que virão a dissolver as substâncias na água, de modo a impedir o contato direto do solvente com a célula e conferindo a elas um alto potencial emulsificante (BALDI; PEPI; CAPONE, 2003).

Cepas de *Acinetobacter* apresentam índices de hidrofobicidade altos (até 98%) para hidrocarbonetos líquidos como óleo diesel e hexadecano corroborando com os altos índices de hidrofobicidade dos resultados anteriores deste estudo, o que é um indicativo da degradação e metabolização dos hidrocarbonetos por ação das enzimas liberadas pelo microrganismo (BALDI; PEPI; CAPONE, 2003; MEA; YONG; WONG, 2021; ROSENBERG; GOTTLIEB; ROSENBERG, 1983). Essa alta hidrofobicidade aumenta a biodisponibilidade dessas fontes de

carbono para o microrganismo, estimulando a produção de bioemulsificantes extracelulares, como observado em trabalhos que apresentaram alta produção de bioemulsificante por *Acinetobacter* na presença de fontes hidrofóbicas como óleo diesel e hexadecano (CHAMANROKH *et al.*, 2010; HYDER, 2015; ORTEGA-DE LA ROSA *et al.*, 2018; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008; ZHAO *et al.*, 2016).

### 3.3 Efeitos da adição de glicose e etanol na degradação de querosene e petróleo

A utilização de fontes de carbono mais simples, mais metabolizáveis para uma cepa, pode acelerar seu crescimento e adaptação à um meio contendo hidrocarbonetos. Desse modo, a adição de glicose ou etanol para bioprocessos com *Acinetobacter*, pode ser uma forma de acelerar a degradação de hidrocarbonetos complexos, como querosene e petróleo.

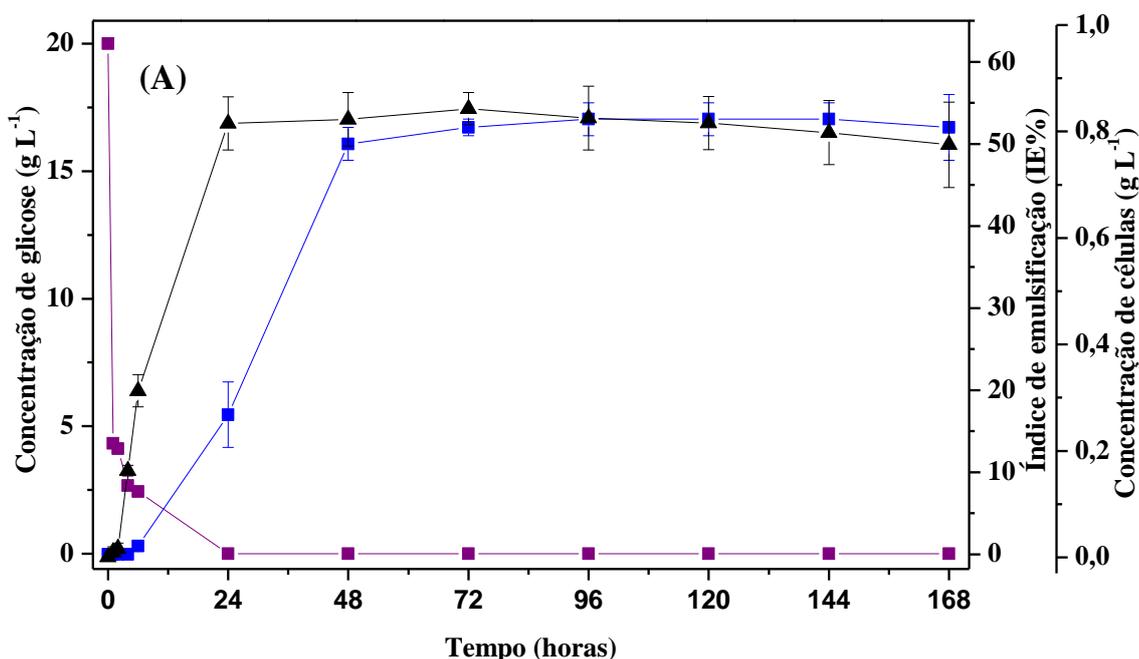
Assim, essas fontes carbono menos complexas e de mais fácil metabolização, como glicose e etanol, costumam ser uma estratégia empregada para melhorar a produção de um bioproduto (PANILAITIS *et al.*, 2007), podendo acelerar a degradação de substâncias mais complexas (ANTONIOU *et al.*, 2015). Na Figura 3.6 pode-se avaliar o potencial da glicose e do etanol como únicas fontes de carbono em concentração de 2% (m/v e v/v, respectivamente), e associadamente, em concentração de 1% (m/v e v/v) cada. Observa-se que a glicose é consumida rapidamente do sistema em aproximadamente 24 horas, enquanto o etanol leva dias para ser metabolizado, diminuindo sua concentração lentamente no decorrer do processo. A concentração celular no meio com etanol como fonte de carbono levou mais tempo para alcançar a concentração máxima, em 48 h, porém ambos os meios apresentaram concentrações celulares finais semelhantes (0,84 g L<sup>-1</sup> para glicose e 0,73 g L<sup>-1</sup>, para o etanol).

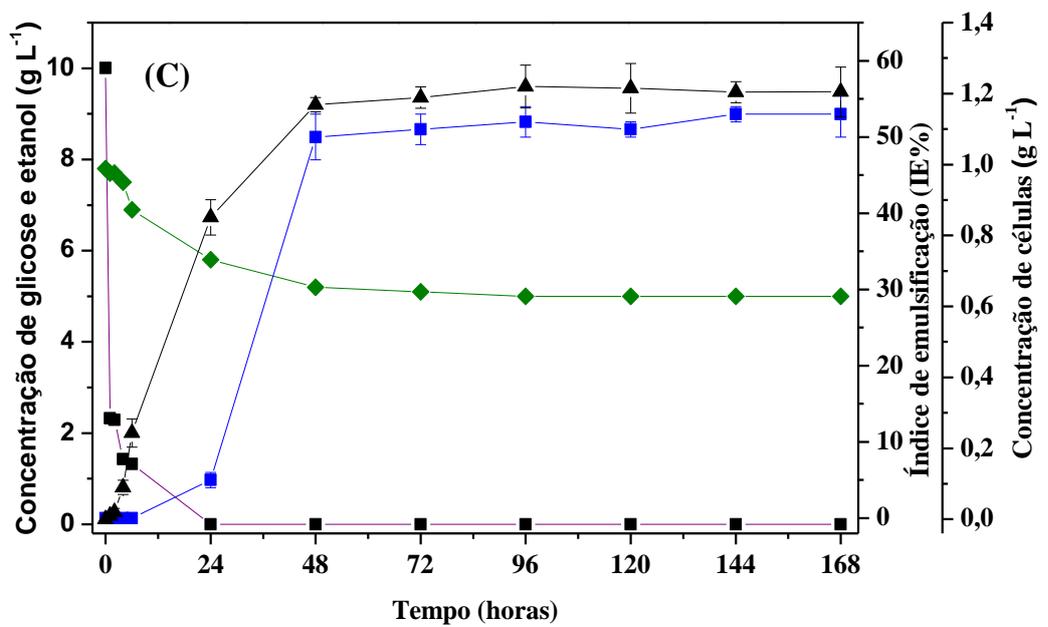
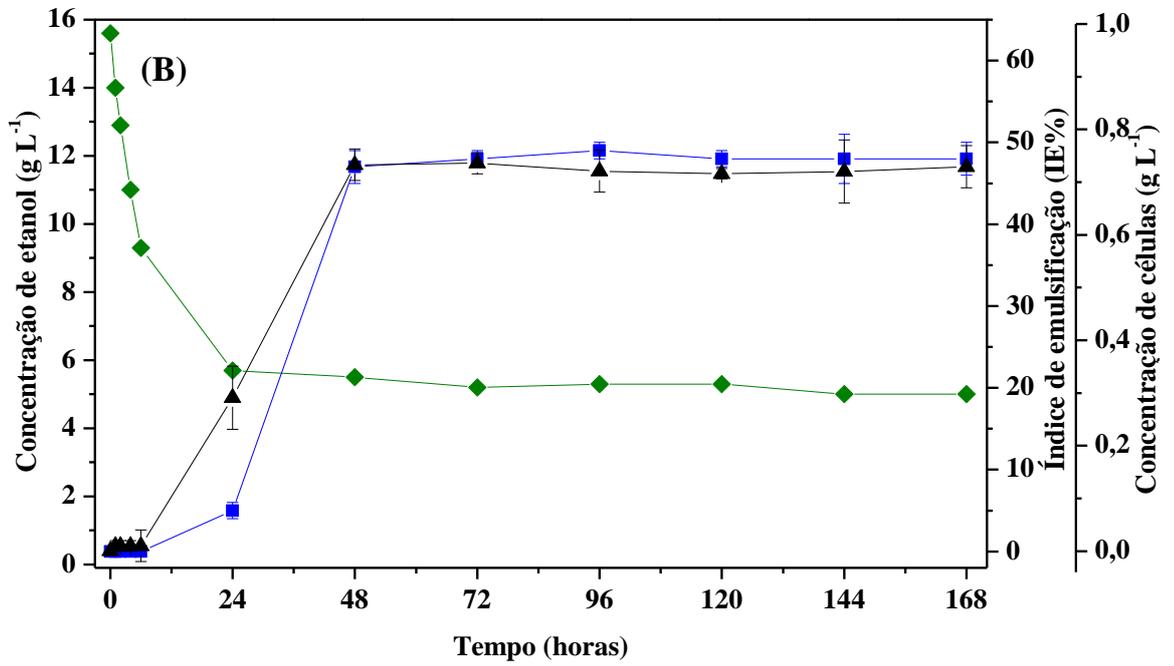
Em ambos os casos é possível observar que a produção de bioemulsificante começa mais rapidamente que em meios contendo apenas hidrocarbonetos, iniciando-se em 24 horas. O índice de emulsificação de ambos os meios permaneceu constante após 48 horas.

Na Figura 3.6 é possível observar-se a produção de bioemulsificante utilizando glicose e etanol como fonte de carbono em conjunto. Assim como na Figura 3.6A a glicose é consumida em até 24 horas a partir do início da fermentação, o etanol permanece no meio por mais tempo, estabilizando sua concentração. É possível observar uma menor taxa de consumo de etanol nas primeiras 24 horas (Figuras 3.6B e 3.6C), indicando uma predileção do microrganismo pela glicose. Essa predileção do microrganismo por certas fontes de carbono em relação ao etanol, já foi reportada anteriormente na literatura e pode ser atribuída a repressão de certas enzimas

como a álcool desidrogenase que causa uma maior demora no consumo de álcoois (ABBOTT; LASKIN; MCCOY, 1973). O maior crescimento em relação aos meios contendo apenas glicose ou apenas etanol, pode ser atribuído a um tempo maior de adaptação da cepa ao etanol devido a presença de uma fonte de carbono menos complexa (glicose), e a presença de uma fonte de carbono de mais difícil degradação, que não se esgota do meio tão rapidamente como a glicose, que é o caso do etanol.

**Figura 3.6** - Perfil do crescimento celular e produção de bioemulsificante em meios contendo: (A) glicose 2% (m/v) (MM-G2), (B) etanol 2% (v/v) (MM-E2) e (C) glicose 1% (m/v) e etanol 1% (v/v) (MM-GE) como fonte de carbono e o processo conduzido a 30 °C e 150 rpm. (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), (◆) Concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (■) índice de emulsificação (%).





Após a produção de bioemulsificante utilizando glicose e etanol como fontes de carbono, foram observadas altas concentrações de bioemulsificante no final do processo (MM-

G2,  $3,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ; MM-E2,  $3,4 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ ; MM-GE,  $4,1 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$ ). A concentração de bioemulsificante obtida no meio MM-G2 foi levemente superior que a obtida usando o meio MM-E2, porém com pouca variação, indicando, que tanto a glicose quanto o etanol, possuem potencial semelhante como fonte de carbono de mais fácil metabolização. Entretanto, é possível observar que a glicose se esgota com apenas 24 horas de processo (Figura 3.6), enquanto o etanol persiste no sistema por mais tempo, o que pode ser uma desvantagem para a degradação visto que a predileção da cepa por essa fonte de carbono pode inibir a produção de enzimas que induzam a degradação de fontes de carbono hidrofóbicas (ABBOTT; LASKIN; MCCOY, 1973; THRONE-HOLST *et al.*, 2006).

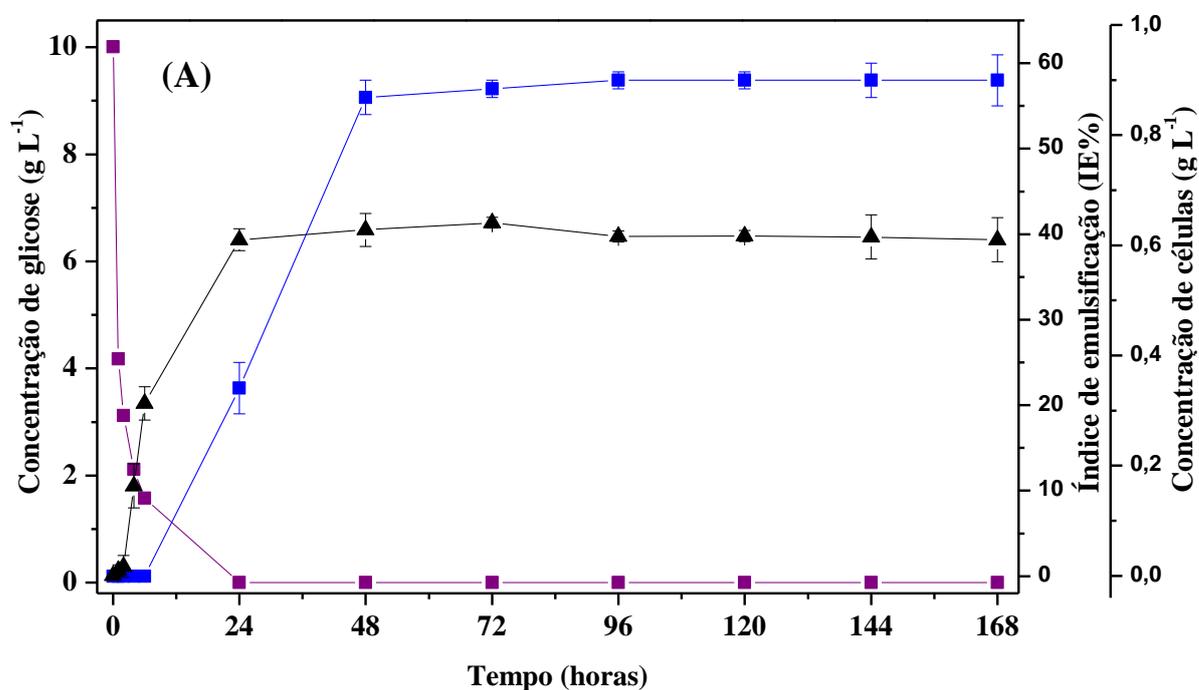
A metabolização de etanol e outros álcoois por cepas de *Acinetobacter* já foi muito estudada por outros autores (ABBOTT; LASKIN; MCCOY, 1973; GOVEAS; NAYAK; SELVARAJ, 2022; LIU *et al.*, 2021), que identificaram que a metabolização dessas moléculas ocorre pela ação de enzimas álcool dehidrogenase, que fazem parte da rota metabólica para a degradação de hidrocarbonetos, cuja síntese, no caso das cepas de *Acinetobacter* pode ser reprimida pela presença de algumas fontes de carbono, como acetato, assim apresentando comportamento diaúxico. Então, a presença de glicose no meio pode gerar uma rota metabólica preferencial para consumo de glicose em relação a outras fontes de carbono.

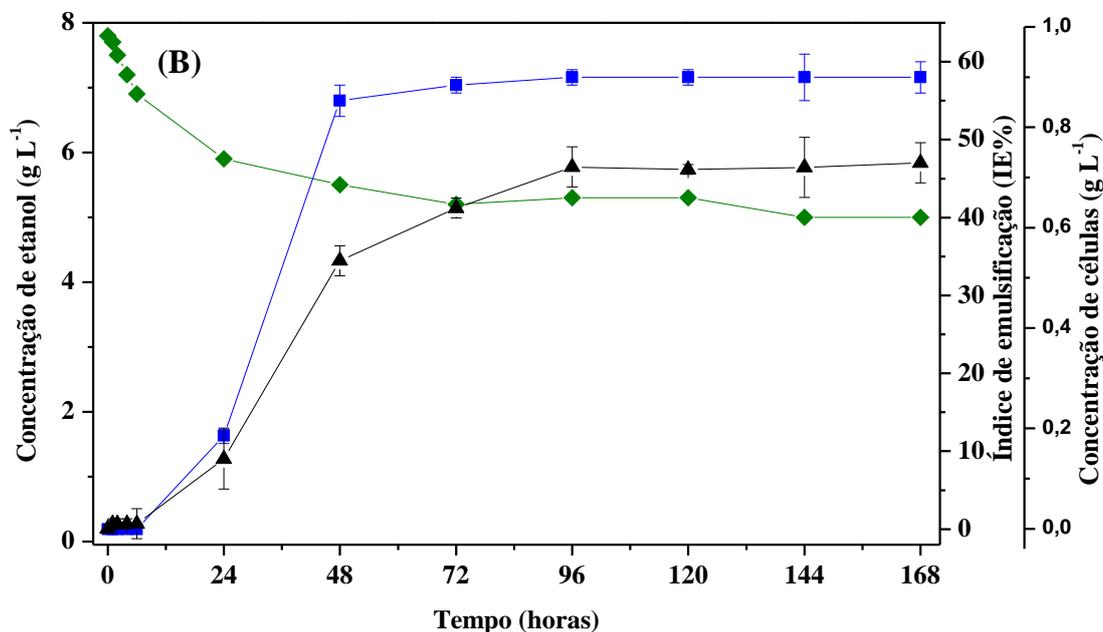
Em seguida, a glicose foi adicionada a meios de cultivo com hidrocarbonetos de difícil degradação (querosene e petróleo). Em meios contendo querosene (Figura 3.6) é possível observar-se uma aceleração no crescimento celular em relação a experimentos anteriores (Figura 3.2), ocorrendo cerca de 24 horas antes. O índice de emulsificação é ligeiramente maior no final do procedimento ( $58\% \pm 3\%$ ) em comparação com o meio contendo apenas glicose (53%), o que é compatível com a concentração final de bioemulsificante precipitado ( $7,5 \pm 0,6 \text{ g L}^{-1}$ ), sendo aproximadamente duas vezes maior que a produzida apenas com glicose como fonte de carbono ( $3,8 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ), sendo ligeiramente maior que a obtida usando o meio contendo apenas querosene ( $6,5 \text{ g L}^{-1}$ ), indicando uma aceleração da produção do bioemulsificante.

O etanol também foi avaliado como fonte de carbono para acelerar a adaptação e degradação de querosene. Na Figura 3.7B observa-se o meio MM-QE, que apresenta um comportamento semelhante ao apresentado na metabolização de etanol. O consumo de etanol é lento em comparação com a glicose, estabilizando sua concentração após 72 horas e mantendo-se no meio. A produção de bioemulsificante para a metabolização dos óleos é mais acelerada

em comparação ao meio MM-Q (Figura 3.2), atingindo o maior índice de emulsificação em 48 horas. A concentração final de bioemulsificante foi ligeiramente menor que a do meio MM-QG (7,5 g L<sup>-1</sup>), sendo 6,4 ± 0,4 g L<sup>-1</sup>, o que indica que no caso do querosene a glicose é mais adequada como acelerador para a degradação em comparação com o etanol, provavelmente devido ao seu consumo acelerado nas primeiras 24 h, que reduz sua biodisponibilidade, induzindo a produção de enzimas degradadoras de hidrocarbonetos pela cepa, diferente do etanol que permanece por mais tempo no meio, assim sua biodisponibilidade não é tão reduzida.

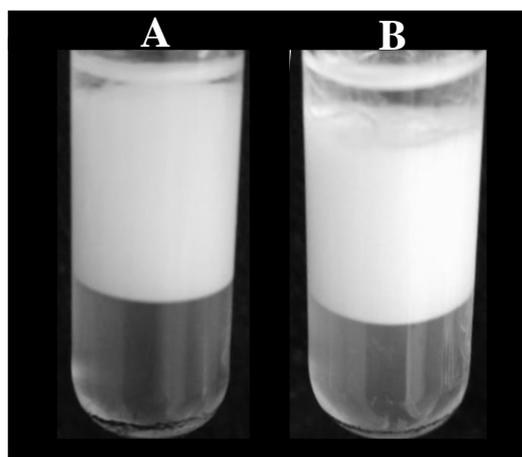
**Figura 3.7** - Produção de bioemulsificante utilizando querosene (1% v/v) como fonte de carbono por *Acinetobacter venetianus* acelerado pela presença de: (A) glicose 1% (m/v) (MM-QG) e (B) etanol 1% (v/v) (MM-QE) no processo conduzido a 30 °C e 150 rpm. (▲) concentração de células (g L<sup>-1</sup>), (■) Concentração de glicose (g L<sup>-1</sup>), (◆) Concentração de etanol (g L<sup>-1</sup>) e (■) índice de emulsificação (%).





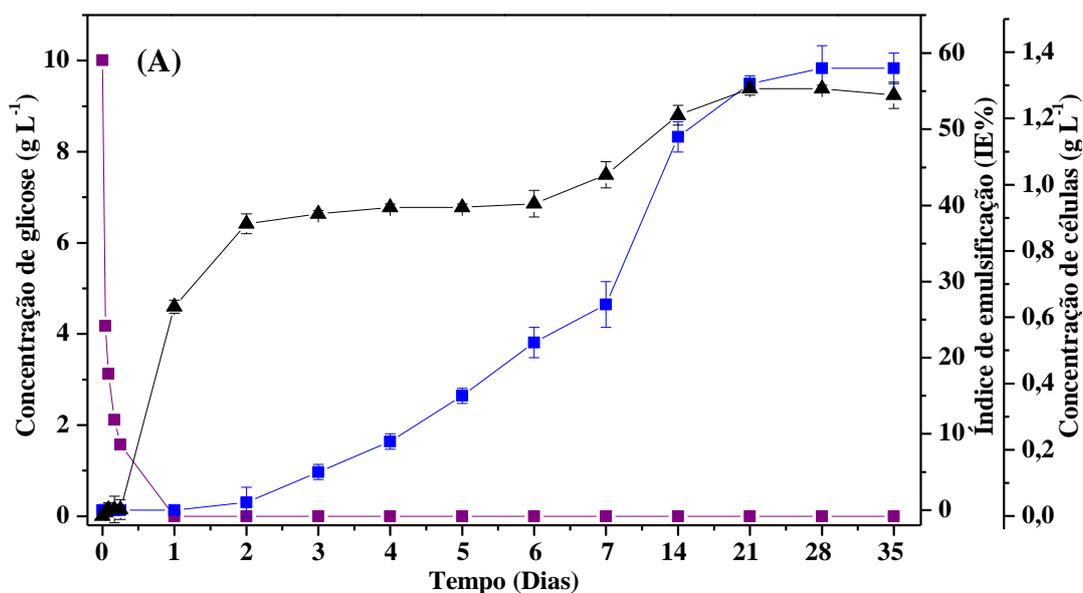
Entretanto, no meio MM-PG (Figura 3.8A), observa-se uma demora maior na produção de bioemulsificante, o que é representativo da maior complexidade do petróleo como fonte de carbono. Apesar disso, a glicose tem um efeito positivo na produção de bioemulsificante, que começa em 48 horas de fermentação e progride lentamente no decorrer dos dias. Esse crescimento mais acelerado em comparação ao MM-P (Figura 3.3) se deve pela glicose agir como uma aceleradora para o crescimento da cepa no meio, facilitando sua adaptação à presença desses óleos pesados.

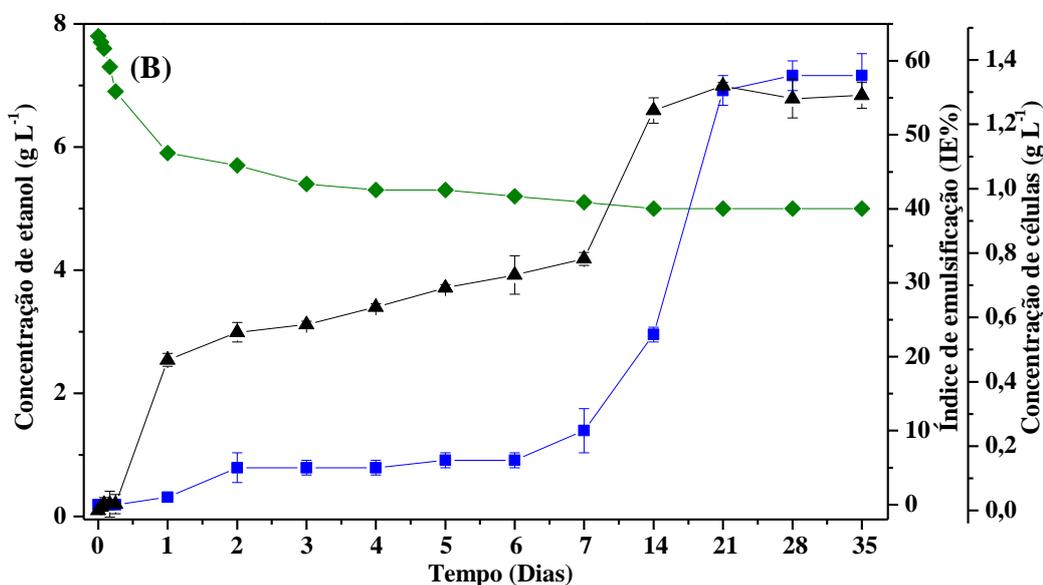
**Figura 3.8** - Atividade emulsificante do MLC obtido com querosene como fonte de carbono suplementado com (A) glicose e (B) etanol.



O etanol também foi capaz de proporcionar uma aceleração do crescimento celular no meio MM-PE (Figura 3.8B), levando a um aumento significativo no crescimento celular em comparação com o meio MM-P ainda nas primeiras horas, indicando que o etanol também é um potente agente acelerador da degradação do petróleo. Entretanto o maior crescimento celular foi apresentado pela glicose, provavelmente pelos mesmos motivos apresentados pelos meios MM-QG e MM-QE, a glicose se esgota rapidamente do ambiente, reduzindo sua biodisponibilidade, o que não ocorre com o etanol que permanece no meio como fonte de carbono durante toda a fermentação, provavelmente inibindo a geração de enzimas degradadoras de hidrocarbonetos pela célula.

**Figura 3.9** - Produção de bioemulsificante utilizando petróleo (1% m/v) como fonte de carbono por *Acinetobacter venetianus* acelerada pela presença de: (A) glicose 1% (m/v) (MM-PG) e (B) etanol 1% (v/v) (MM-PE) com o processo conduzido a 30 °C e 150 rpm, por 35 dias. (▲) concentração de células ( $\text{g L}^{-1}$ ), (■) Concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ), (◆) Concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) e (■) índice de emulsificação (%).





No meio contendo petróleo como fonte de carbono, um perfil diáuxico é observado na Figura 3.8A e 3.8B, o que é um indicativo de que a cepa primeiro consome uma fonte de carbono, para em seguida produzir enzimas metabolizadoras da segunda, assim ocorrendo o esgotamento da fonte de carbono de mais fácil metabolização antes da metabolização de hidrocarbonetos.

Assim, a Tabela 3.1 apresenta um comparativo entre as concentrações obtidas do bioemulsificante nos ensaios usando as diferentes fontes de carbono, sem e com suplementações do meio de cultivo. A maior produção de bioemulsificante foi alcançada usando querosene, que apresentou rendimento consideravelmente maior que no meio contendo apenas fontes hidrossolúveis, como etanol e glicose. Entretanto, não foi possível medir a concentração do bioproduto obtido nos ensaios contendo petróleo como fonte de carbono, devido as partículas de óleo pesado dispersas no meio, que impossibilitaram a separação do precipitado.

**Tabela 3.1** - Parâmetros de resposta da produção de bioemulsificante de *Acinetobacter venetianus* utilizando glicose, etanol e/ou querosene como fonte de carbono, a 30 °C e 150 rpm por 120 h.

Fonte de Carbono (%) *	Suplementação (%)	Crescimento Celular (g L <sup>-1</sup> )	Índice de Emulsificação (IE <sub>24</sub> %)	Concentração de Bioemulsificante (g L <sup>-1</sup> )
Glicose 1%	-	0,64 ± 0,03	53 ± 1	3,3 ± 0,5
Glicose 2%	-	0,84 ± 0,03	53 ± 2	3,8 ± 0,4
Etanol 2%	-	0,74 ± 0,02	48 ± 1	3,4 ± 0,5
Glicose 1%	Etanol 1%	1,22 ± 0,06	53 ± 1	4,1 ± 0,3
Querosene 2%	-	0,61 ± 0,04	58 ± 1	6,4 ± 0,4
Querosene 1%	Glicose 1%	0,62 ± 0,02	58 ± 1	7,5 ± 0,6
Querosene 1%	Etanol 1%	0,73 ± 0,03	58 ± 3	6,9 ± 0,3

\*- A proporção de etanol e querosene foi calculada em v/v, enquanto a glicose foi calculada em m/v

A produção de bioemulsificante foi maior no meio contendo glicose como suplementação, provavelmente devido ao seu esgotamento que ocorreu antes do meio suplementado com etanol. Devido as características de viscosidade e densidade, que impossibilitaram a separação do óleo do bioemulsificante bruto, a produção de bioemulsificante foi acompanhada pela atividade emulsificante do meio de cultura (IE<sub>24</sub>%) e redução da tensão superficial (RTS).

Assim, após avaliação da produção do bioemulsificante, ambos a glicose e o etanol se mostraram suplementações eficazes para acelerar a produção de bioemulsificante em meio contendo hidrocarbonetos complexos, entretanto, a glicose apresentou-se mais eficiente.

## 4 CONCLUSÕES

Diante do exposto, pode se concluir que a cepa de *A. venetianus* AMO1502 também se mostrou eficaz na metabolização de *n*-alcanos (óleo diesel, hexadecano e querosene), apresentando elevado crescimento celular e produção de emulsificante. Um maior tempo de fermentação foi necessário para a metabolização de petróleo, em que com 35 dias de processo a redução da tensão superficial atingiu valores semelhantes ao processo usando glicose como fonte de carbono ( $40 \text{ mN m}^{-1}$ ). A adição de etanol e glicose se mostraram eficientes para acelerar a degradação de hidrocarbonetos complexos (querosene e petróleo), aumentando a produção de bioemulsificante e acelerando crescimento celular, que iniciou antes em meios contendo essas fontes de carbono.

Assim, foi possível aumentar a produção de bioemulsificante para  $7,5 \text{ g L}^{-1}$ , utilizando querosene suplementado com glicose como fonte de carbono. Esse maior rendimento apresenta uma nova visão para a produção de bioemulsificante, aumentando a viabilidade da utilização de emulsificantes biológicos em sua forma bruta e purificada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria *Acinetobacter venetianus* AMO1502, uma cepa isolada do derramamento de petróleo, produziu um eficiente bioemulsificante com potencial para aplicações em biorremediação. O emulsificante produzido apresentou baixa toxicidade para microcrustáceos (*A. salina*) e plantas (*O. basilicum* e *B. oleracea*), em comparação aos compostos sintéticos geralmente aplicado, e elevado poder dispersante para óleos contaminantes em ambiente marinho e na limpeza de areia e rochas contaminados. O bioproduto, pré-purificado por método *etanol-salting out*, foi molecularmente identificado como semelhante ao emulsan de *Acinetobacter*, um bioemulsificante polimérico de alto potencial para biorremediação. A produção do bioemulsificante por *A. venetianus* AMO1502 foi maior utilizando fontes hidrofóbicas como fonte de carbono, como querosene, e pode ser incrementada pela suplementação com glicose. Conclui-se, assim, que o bioemulsificante produzido pela cepa *A. venetianus* AMO1502 é um viável agente biorremediador para contaminações por derramamento de petróleo, apresentando baixo impacto na fauna e flora local e alta eficiência.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, B. J.; LASKIN, A. I.; MCCOY, C. J. Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on Ethanol. **Applied Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 787–792, 1973.
- ALIZADEH-SANI, M. *et al.* Bioemulsifiers derived from microorganisms: Applications in the drug and food industry. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 191–199, 2018.
- ALVES, M. F. **Produção de biossurfactantes por fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera L.*) para potencial aplicação na indústria de alimento**. 2020. 131 f. (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2020.
- AMANI, H. Synergistic effect of biosurfactant and nanoparticle mixture on microbial enhanced oil recovery. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, n. 3, p. 589-597, 2017.
- AMANI, H.; KARIMINEZHAD, H. Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation. **Petroleum Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 216-222, 2016.
- AMARAL, P. F.F. *et al.* Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1894–1898, 2006.
- ANTONIOU, E. *et al.* Biosurfactant production from marine hydrocarbon-degrading consortia and pure bacterial strains using crude oil as carbon source. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–14, 2015.
- APOLIANO, M. L. S.; SOARES FILHO, A. A.; ASANO, G. L. Caracterização da ictiofauna e da pesca artesanal na Praia do Iguape, Aquiraz - Ceará. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 52, n. 2, p. 24–35, 2020.
- ARNOLD, S. *et al.* Estimation of Aerosol Concentrations of Oil Dispersants COREXIT™ EC9527A and EC9500A during the Deepwater Horizon Oil Spill Response and Clean-up Operations. **Annals of Work Exposures and Health**, v. 66, n. S1, p. i188–i202, 2022.
- ATAKPA, E. O. *et al.* Improved degradation of petroleum hydrocarbons by co-culture of fungi and biosurfactant-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 290, p. 1-10, 2022.
- BACH, H.; GUTNICK, D. L. A unique polypeptide from the C-terminus of the exocellular esterase of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 modulates the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier apoemulsan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 2, p. 177–183, 2006.

- BALDI, F.; PEPI, M.; CAPONE, A. Envelope glycosylation determined by lectins in microscopy sections of *Acinetobacter venetianus* induced by diesel fuel. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 417–424, 2003.
- BANAT, I. M. *et al.* Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. **Bioresource Technology**, v. 320, p. 1-13, 2021.
- BANAT, I. M. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BARGE, M.; SALUNKHE, R. Aqueous extract of *Balanites roxburghii* fruit: a green dispersant for C – C bond formation. **RSC Advances**, v. 4, p. 31177–31183, 2014.
- BARROS, F. C. F. *et al.* Removal of Petroleum Spill in Water by Chitin and Chitosan. **Orbital**, v. 6, n. 1, p. 70–74, 2014.
- BARNHART, D. *et al.* Structural details of the Polyelectrolytic Exopolysaccharide (APE), the stabilizing component of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 emulsan complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 257-262, 2012.
- BELSKY, I.; GUTNICK, D. L.; ROSENBERG, E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids. **FEBS Letters**, v. 101, n. 1, p. 175–178, 1979.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 168–178, 2015.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 98, p. 354–364, 2015.
- BHARALI, P. *et al.* Characterization and assessment of biosurfactant producing indigenous hydrocarbonoclastic bacteria: Potential application in bioremediation. **Nova Biotechnologica et Chimica**, v. 17, n. 2, p. 103–114, 2018.
- BRAKSTAD, O. G.; LEWIS, A.; BEEGLE-KRAUSE, C. J. A critical review of marine snow in the context of oil spills and oil spill dispersant treatment with focus on the Deepwater Horizon oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, n. July, p. 346–356, 2018.
- BRASIL. RESOLUÇÃO Nº- 472, DE 27 DE NOVEMBRO DE 2015. Brasília, 2015.
- BRASIL. RESOLUÇÃO Nº 482, DE 03 DE OUTUBRO DE 2017. Brasília, 2017.

- BURGHERR, P. In-depth analysis of accidental oil spills from tankers in the context of global spill trends from all sources. **Journal of Hazardous Materials**, v. 140, n. 1–2, p. 245–256, 2007.
- CAHYANI, C. N.; ISMAYANA, A.; YANI, M. Crude Oil Biodegradation Potential using *Acinetobacter baumannii* CYA20 and *Bacillus subtilis* CYA27 from the Bekasi Coast, Indonesia. **Hayati Journal of Biosciences**, v. 29, n. 5, p. 701–711, 2022.
- CÂMARA, S. F. *et al.* Socioeconomic vulnerability of communities on the Brazilian coast to the largest oil spill (2019–2020) in tropical oceans. **Ocean and Coastal Management**, v. 202, 2021.
- CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. **Applied and environmental microbiology**, v. 54, n. 6, p. 1420–1425, 1988.
- CARMONA, S. L.; GHERARDI, D. F. M.; TESSLER, M. G.; Dados De Sensoriamento Remoto E De Geoprocessamento Para Apoio Aos Planos De Contingência Durante Eventos De Derramamentos De Óleo Em Regiões Costeiras: O Caso Do Litoral Norte Do Estado De Sao Paulo. **INPE**, p. 431–438, 2003.
- CARNEIRO, B.; TORTELLA, T. Óleo encontrado no Nordeste em 2022 não tem ligação com o de 2019, diz governo. **CNN BRASIL**, São Paulo, 12/09/2022. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/nacional/oleo-encontrado-no-nordeste-em-2022-nao-tem-ligacao-com-o-de-2019-diz-governo/>. Acesso em 12/05/2023.
- CHAMANROKH, P. *et al.* Cleaning oil-contaminated vessel by emulsan producers (Autochthonous Bacteria). **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 7, n. 3, p. 209–222, 2010.
- CHAMANROKH, P. *et al.* Emulsan analysis produced by locally isolated bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 101–108, 2008.
- CHAPRÃO, M. J. *et al.* Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 471–479, 2015.
- CHEN, J. *et al.* Oil spills from global tankers: Status review and future governance. **Journal of Cleaner Production**, v. 227, p. 20–32, 2019.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915–929, 2002.

- CIAPINA, E.M.P *et al.* Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 131, p. 880–886, 2006.
- CIOTTI, C. S. *et al.* Acidente Ecológico Na Baía De Guanabara: O Direito Ambiental E a Tragédia Envolvendo Sua Sustentabilidade. *In: III Encontro de Sustentabilidade em Projeto do Vale do Itajaí*, 2009. **Anais eletrônicos Ensus 2009**. Florianópolis, 2009.
- COLLINS, C. D. Implementing Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons. **Methods in Biotechnology**, p. 99–108, 2007.
- CONAN, G. Long-Term Effects of the Amoco Cadiz Oil Spill. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 297, p. 323–333, 1982.
- COREXIT. **COREXIT™ EC9500A** Safety Data Sheet. 2019. Disponível em: <https://www.corexit.com/wp-content/uploads/2019/09/COREXIT%E2%84%A2-EC9500A-GHS-SDS-USA.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2023.
- COUTO, C. R. A. *et al.* Chemical and biological dispersants differently affect the bacterial communities of uncontaminated and oil-contaminated marine water. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 691–700, 2020.
- D'ALMEIDA, A. P. *et al.* Biosurfactant Production by *Acinetobacter venetianus* and Its Application in Bioremediation. **Chemical Engineering & Technology**, v. 46, p. 1–10, 2023.
- D'ALMEIDA, A. P. **Produção De Biossurfactante Por Microrganismos Isolados De Derramamento De Petróleo E Sua Aplicação Em Biodegradação**. 2022. 96 f. (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- DAMS-KOZLOWSKA, H. *et al.* Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 201–210, 2008.
- DENÍZ, P. Oil Prices and Renewable Energy: Oil Dependent Countries. **Journal of Research in Economics**, v. 3, n. 2, p. 139–150, 2019.
- DE FRANÇA, Í. W. L. *et al.* Production of surfactin by *Bacillus subtilis* LAMI005 and evaluation of its potential as tensoactive and emulsifier. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 1, p. 1-14, 2022.
- DE FRANÇA, Í. W. L. *et al.* Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10–15, 2015.

- DE FRANÇA. **Estudo Da Produção E Aplicabilidade De Biosurfactante Bacteriano Produzido Por Cepa Isolada De Manguezal Cearense**. 2014. 136 f. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- DEHGHAN-NOUDEH, G.; HOUSAINDOKHT, M.; BAZZAZ, B.S.F. Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **The Microbiological Society of Korea**, v. 43, n. 3, p. 272-276, 2005.
- DE OLIVEIRA, O. M.C. *et al.* Environmental disaster in the northeast coast of Brazil: Forensic geochemistry in the identification of the source of the oily material. **Marine Pollution Bulletin**, v. 160, p. 1–7, 2020.
- DE OLIVEIRA, R. M. **Contribuição às ações de contingência para incidentes de poluição por óleo no contexto offshore no Brasil**. 2016. 104 f. (Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential, **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.
- DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997
- DOS SANTOS, R. A. *et al.* Novel production of biodispersant by *Serratia marcescens* UCP 1549 in solid-state fermentation and application for oil spill bioremediation. **Environmental Technology**, v. 43, n. 19, p. 2956–2967, 2021.
- DUKE, N. C. Oil spill impacts on mangroves: Recommendations for operational planning and action based on a global review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 2, p. 700–715, 2016.
- DU NOÛY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use. **The Journal of General Physiology**, v. 7, n. 5, p. 625–632, 1925.
- DU PREEZ, J. C. The effect of temperature on the growth of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 89, n. 1970, p. 643–653, 1985.
- EDWARDS, K. R.; LEPO, J. E.; LEWIS, M. A. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 1309–1316, 2003.
- EKONOMOU, G. *et al.* Effects of sodium lauryl sulfate (SLS) on *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) nauplii. In: 3<sup>rd</sup> International Congress on Applied, Ichthyology & Aquatic Environment, **Anais eletrônicos Hydromedit 2018**, Volos, Grécia, 2018.

- EKONOMOU, G. *et al.* Mortality and effect on growth of *Artemia franciscana* exposed to two common organic pollutants. **Water**, v. 11, n. 8, 2019.
- ESCOBAR, H. Mystery oil spill threatens marine sanctuary in Brazil. *In: American Association for the Advancement of Science*, v. 366, n. 6466, 2019.
- FATAJEVA, E. *et al.* The use of *Acinetobacter* sp. for oil hydrocarbon degradation in saline waters. **Biologija**, v. 60, n. 3, p. 126–133, 2014.
- FELIX, A. K. N. *et al.* Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256–263, 2019.
- FELIX, A. K. N. **Caracterização E Estudo Da Aplicabilidade Do Biossurfactante Produzido Por *Bacillus subtilis* Lami005 a Partir Do Suco De Caju**. 2012. 102 f. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- FONDI, M. *et al.* Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12 2016.
- FONDI, M. *et al.* The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 5, p. 439–449, 2013.
- FONDI, M. *et al.* Draft genome sequence of the hydrocarbon-degrading and emulsan-producing strain *Acinetobacter venetianus* RAG-1T. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4771–4772, 2012.
- FREITAS, B. G. *et al.* Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.
- GALIERIKOVÁ, A.; MATERNA, M. World Seaborne Trade with Oil: One of Main Cause for Oil Spills?. **Transportation Research Procedia**, v. 44, p. 297–304, 2020.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial Surfactants: A Review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, n. 4, p. 155–166, 2006.
- GEORGE, S. Exocellular Esterase and Emulsan Release from the Cell Surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n. 3, p. 1176–1181, 1985.
- GHARAEI, S. *et al.* Isolation, optimization and structural characterization of glycolipid biosurfactant produced by marine isolate *Shewanella algae* e b12 and evaluation of its antimicrobial and anti - biofilm activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, p. 1755–1774, 2022.

- GIRO, M. E. A *et al.* Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. 738–747, 2009.
- GORKOVENKO, A. *et al.* Bioengineering of emulsifier structure: Emulsan analogs. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 384-390, 1997.
- GOVEAS, L. C.; NAYAK, S.; SELVARAJ, R. Concise review on bacterial degradation of petroleum hydrocarbons: Emphasis on Indian marine environment, **Bioresource Technology Reports**, v. 19, 10136, 2022.
- GUNDLACH, E. R. *et al.* The fate of Amoco Cadiz oil. **Science**, v. 221, n. 4606, p. 122–129, 1983.
- GUPTA, E. Oil vulnerability index of oil-importing countries. **Energy Policy**, v. 36, n. 3, p. 1195–1211, 2008.
- HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G.; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 7–12, 2012.
- HENTATI, D. *et al.* Biodegradation of hydrocarbons and biosurfactants production by a newly halotolerant *Pseudomonas* sp. strain isolated from contaminated seawater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, p. 1-11, 2021
- HERCULANO, S. Conflitos ambientais e territoriais: pesca e petróleo no litoral fluminense. **Nature and Conservation**, v. 5, n. 1, p. 39–52, 2012.
- HORN, S. A.; NEAL, C. P. The atlantic empress sinking-a large spill without environmental disaster. *In: 2005 International Oil Spill Conference*, **Anais eletrônicos IOSC 2005**, Miami Beach, USA, p. 510, 2005.
- HU, Xin *et al.* Enhancement of solubilization and biodegradation of petroleum by biosurfactant from *Rhodococcus erythropolis* HX-2. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, n. 2, p. 159–169, 2020.
- HU, X.; WANG, C.; WANG, P. Optimization and characterization of biosurfactant production from marine *Vibrio* sp. strain 3B-2. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 976, p. 1–13, 2015.
- HUA, Z. *et al.* Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. **Water Research**, v. 37, n. 17, p. 4143–4150, 2003.

- HYDER, N. H. Production, characterization and antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Acinetobacter baumannii* AC5 utilizing edible oils. **Iraqi Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 55–70, 2015.
- IBGE. Regiões metropolitanas, aglomerações urbanas e regiões integradas de desenvolvimento. Rio de Janeiro, 2018.
- IPECE. Turismo no Ceará cresce 15,2% no primeiro trimestre de 2023, 2023. Disponível em: <https://www.ipece.ce.gov.br/2023/06/05/turismo-no-ceara-cresce-152-no-primeiro-trimestre-de-2023/>. Acesso em: 28/06/2023.
- INFANTE, C. S.; *et al.* Impacto da contaminação de sedimento de mangue com óleo na atividade de microrganismos. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 2, p. 6, 2008.
- IQBAL, S.; KHALID, Z. M.; MALIK, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 176–179, 1995.
- IVANOVA A. E.; SOKOLOVA D. Sh.; KANAT'EVA A. Yu. Hydrocarbon Biodegradation and Surfactant Production by Acidophilic *Mycobacteria*. **Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 317–324. 2016.
- JABEUR, H. *et al.* Detection of chemlali extra-virgin olive oil adulteration mixed with soybean oil, corn oil, and sunflower oil by using GC and HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 4893–4904, 2014.
- JOHN, V. *et al.* The Role of Dispersants in Oil Spill Remediation: Fundamental Concepts, Rationale for Use, Fate, and Transport Issues. **Oceanography**, v. 29, n. 3, p. 108–117, 2016.
- JOHNSON, M. K.; BOESE-MARRAZZO, D. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 29, n. 3, p. 1028–1033, 1980.
- JOHRI, A. K.; YALPANI, M.; KAPLAN, D. L. Incorporation of fluorinated fatty acids into emulsan by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 175–181, 2003.
- JOHRI, A. K.; BLANK, W.; KAPLAN, D. L. Bioengineered emulsans from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 transposon mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 217–223, 2002.
- JOSHI, S. J.; DESAI, A. J. Bench-Scale Production of Biosurfactants and their Potential in *Ex situ* MEOR Application. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 22, n. 6, p. 701–715, 2013.

- KAPLAN, N. et al. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD 4. **European Journal of Biochemistry**, v. 152, p. 453–458, 1985.
- KEZRANE, I. et al. Use of hydrocarbons sludge as a substrate for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 5, p. 1–16, 2020.
- KHADEMOLHOSSEINI, R. et al. Physicochemical characterization and optimization of glycolipid biosurfactant production by a native strain of *Pseudomonas aeruginosa* HAK01 and its performance evaluation for the MEOR process. **RSC Advances**, v. 9, n. 14, p. 7932–7947, 2019.
- KHIRE, J. Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). Heidelberg: **Springer Berlin Heidelberg**, 2010.
- KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311–318, 2012.
- KHOPADE, A. et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. **Desalination**, v. 285, p. 198–204, 2012.
- KIM, H. S. et al. Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 19, p. 1637–1641, 2002.
- KIM, P.; OH, D. K.; LEE, J. K.; KIM, S. Y.; KIM, J. H. Biological modification of the fatty acid group in an emulsan by supplementing fatty acids under conditions inhibiting fatty acid biosynthesis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 3, p. 308-312, 2000.
- KIM, J.-S. et al. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 257–266, 1990.
- KINGSTON, P. F. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 7, n. 1-2, p. 53–61, 2002.
- KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I. E.; MEDRZYCKA, K.; KARPENKO, E. Biosurfactants – biodegradability, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants. **Research and Application of New Technologies in Wastewater Treatment and Municipal Solid Waste Disposal in Ukraine, Sweden and Poland**, v. 17, p. 141–149, 2013.
- KOTHARI, A. et al. Transcriptomic analysis of the highly efficient oil-degrading bacterium *Acinetobacter venetianus* RAG-1 reveals genes important in dodecane uptake and utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 20, p. 1-9, 2016.

- KOUTINAS, M. *et al.* Enhanced biodegradation and valorization of drilling wastewater via simultaneous production of biosurfactants and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* SJTE-3. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 1-9, 2021.
- LIN, S. Review Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109–120, 1996.
- LINDBLOM, G. P.; EMERY, B. D.; LARA, M. A. G. Aerial Application of Dispersants At the Ixtoc I Spill. **International Oil Spill Conference Proceeding**, v.1, p. 259–262, 1981.
- LIRA, I. R. A. S. *et al.* Biosurfactant production from *Candida guilliermondii* and evaluation of its toxicity. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 457–462, 2020.
- LIU, J. *et al.* Enhanced degradation of different crude oils by defined engineered consortia of *Acinetobacter venetianus* RAG-1 mutants based on their alkane metabolism. **Bioresource Technology**, v. 327, p. 124787, 2021.
- LIU, Y. *et al.* Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test, **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 12, p. 1838–1846, 2017.
- LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 715–720, 2003.
- LUNA, J. M. *et al.* Application of *Candida sphaerica* biosurfactant for enhanced removal of motor oil from contaminated sand and seawater. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 565–570, 2017.
- LUONG, T. M. *et al.* Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 1-10, 2018.
- LYRA, A. P. L. C. C. Avaliação do sistema de separação e armazenamento de óleo em operações de resposta a derramamentos no mar. 2013. 116 f. (Dissertação de Mestrado em Engenharia Oceânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, p. 1-3, 2020.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 1, 2011.

- MANEERAT, S.; PHETRONG, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 781–791, 2007.
- MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 247, p. 1-12, 2021.
- MERCALDI, M. P. *et al.* Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1988–1996, 2008.
- MEYER, D. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.
- MILAGRE, A. P. *et al.* Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 150–157, 2018.
- MOLDAN, A. G. S. *et al.* Some aspects of the Castillo de Bellver oilspill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 16, n. 3, p. 97–102, 1985.
- MORAIS, R. K. S.; ABUD, A. K. S. Use of biosurfactants produced from waste oil agribusiness in the bioremediation. **Scientia Plena**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2012.
- MOSHTAGH, B.; HAWBOLDT, K.; ZHANG, B. Biosurfactant production by native marine bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 11, p. 2386–2397, 2021.
- MUJUMDAR, S.; JOSHI, P.; KARVE, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 277-287, 2019.
- MUTAI, B. *et al.* Lipopeptide biosurfactant production bacteria *Acinetobacter* sp. D3-2 and its biodegradation of crude oil. *Environmental Science Processes & Impacts*, v. 16, p. 897–903, 2014.
- NAKAR, D.; E GUTNICK, D. L. Analysis of the Wee Gene Cluster Responsible for the Biosynthesis of the Polymeric Bioemulsifier from the Oil-Degrading Strain *Acinetobacter lwoffii* RAG-1 The GenBank/EMBL Accession Number for the Sequence Analysis of the Eight Fragments Determined in This Work Is AJ243431. **Microbiology**, v. 147, n. 7, p. 1937–46, 2001.

- NASER, A. Z.; DEIAB, I.; DARRAS, B. M. Poly(lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 28, p. 17151–17196, 2021.
- NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 9, p. 3240–3244, 1995.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- NOHATA, Y.; AZUMA, J.; KURANE, R. Structural studies of a neutral polysaccharide produced by *Alcaligenes latus*. **Carbohydrate Research**, v. 293, n. 2, p. 213–222, 1996.
- OHADI, M. *et al.* Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 712–719, 2018.
- O'SULLIVAN, A. J. The Amoco Cadiz oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 9, n. 5, p. 123–128, 1978.
- OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 47, n. 2, p. 209–214, 1995.
- OLIVEIRA, C. H. *et al.* Coconut (*Cocos nucifera* L.) surfactants and skin sensitivity. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 28, n. 3, p. 155–160, 2005.
- ONUR, G.; YILMAZ, F.; ICGEN, B. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 18, n. 4, p. 707–717, 2015.
- ORTEGA-DE LA ROSA, N. D. *et al.* Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 6, p. 859–869, 2018.
- PANILAITIS, B. *et al.* Adjuvant Activity of Emulsan, a Secreted Lipopolysaccharide from *Acinetobacter calcoaceticus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1240–1247, 2002.
- PANILAITIS, B. *et al.* Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 531–537, 2007.
- PATIL, J. R.; CHOPADEV, B. A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 290–298, 2001.

- PATÍÑO, A. D. *et al.* Dereplication of antimicrobial biosurfactants from marine bacteria using molecular networking. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021.
- PEEKATE, P. L.; ABU, G. O. Optimizing C:N ratio, C:P ratio, and pH for biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 1-14, 2017.
- PEREIRA, J. F. B. *et al.* Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.
- PHETRONG, K.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 297–305, 2008.
- PIEGZA, M. *et al.* Biosurfactants from *Trichoderma* filamentous fungi—a preliminary study. **Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 1–13, 2021.
- PIROG, T. P.; LUTSAI, D. A.; MUCHNYK, F. V. Biotechnological potential of the *Acinetobacter* genus bacteria. **Мікробіол. журн**, v. 83, n. 3, p. 92–109, 2021.
- PROCTOR, R.; FLATHER, R. A.; ELLIOTT, A. J. Modelling tides and surface drift in the Arabian Gulf-application to the Gulf oil spill. **Continental Shelf Research**, v. 14, n. 5, p. 531–545, 1994.
- RADZUAN, M. N.; BANAT, I. M.; WINTERBURN, J. Production and characterization of rhamnolipid using palm oil agricultural refinery waste. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 99–105, 2017.
- RAJENDRAN, N.; MARAHIEL, M. Multifunctional peptide synthetases required for nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. **Comprehensive Natural Products Chemistry**, Pergamon, 1999.
- REBELLO, S. *et al.* Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 2, p. 275–287, 2014.
- REDDY, C. M. *et al.* The West Falmouth Oil Spill after Thirty Years: The Persistence of Petroleum Hydrocarbons in Marsh Sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 22, p. 4754–4760, 2002.
- RIBEIRO, L. C. S. *et al.* Blue water turns black: economic impact of oil spill on tourism and fishing in Brazilian Northeast. **Current Issues in Tourism**, v. 24, n. 8, p. 1042–1047, 2021.

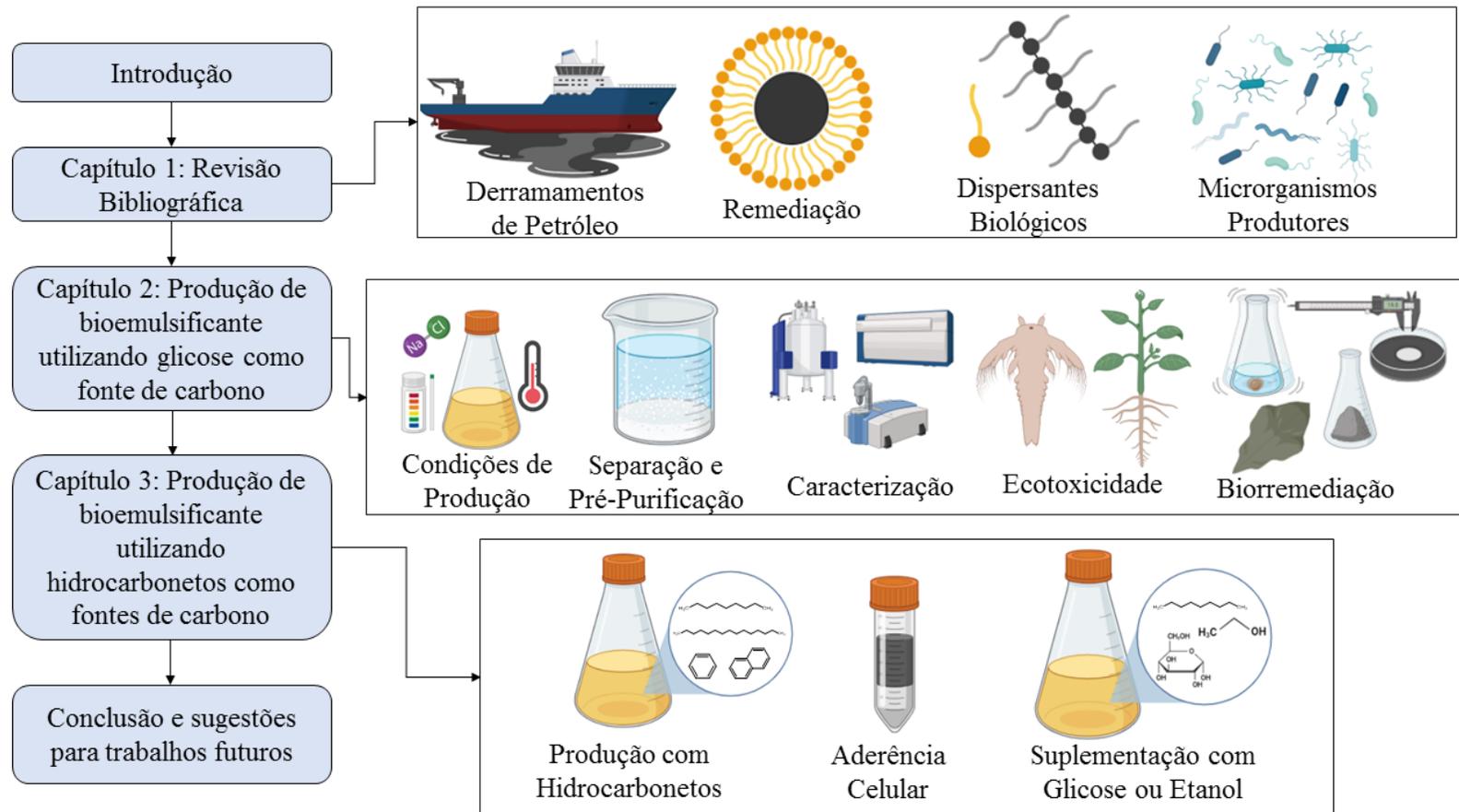
- RIZZATTI, I. M.; ZANETTE D. R. Determinação potenciométrica da concentração micelar crítica de surfactantes: uma nova aplicação metodológica no ensino de química. **Química Nova**, v. 32, n 2, p.518-521, 2009.
- ROCHA, M. V. P. *et al.* Biosurfactant production by *Pseudomonas Aeruginosa* MSIC02 in cashew apple juice using a 24 full factorial experimental design. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 20, n. 1, p. 49–58, 2014.
- ROCHA, M. V. P. **Produção de Biosurfactantes por Fermentação Submersa Usando Substrato Não Convencional**. 2007. 144 f. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ROCHA, M. V. P. *et al.* Biosurfactant production by *Pseudomonas Aeruginosa* grown on cashew apple juice. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137, p. 185–194, 2007.
- ROCHA, M. V.P. *et al.* Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295–1299, 2006.
- ROSENBERG, E. *et al.* Production of Biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 317–322, 1988.
- ROSENBERG, E.; GOTTLIEB, A.; ROSENBERG, M. Inhibition of bacterial adherence to hydrocarbons and epithelial cells by emulsan. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 3, p. 1024–1028, 1983.
- ROSENBERG *et al.* Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 402-408, 1979.
- SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 105, p. 168–177, 2015.
- SANTOS, E. M. S. *et al.* Application of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* as a bioremediation agent. **Chemical Engineering Transactions**, v. 79, p. 451–456, 2020.
- SATPUTE, S. K. *et al.* Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.
- SAZON, R. R.; MIGO, V. Water quality and phytoplankton density in Alinsaog River, Zambales, Central Luzon, Philippines: Implications on its land use. **Journal of Applied Environmental Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 1–12, 2018.
- SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 110-116, 1987.

- SHOHAM, Y.; ROSENBERG, M.; ROSENBERG, E. Bacterial degradation of emulsan. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 573–579, 1983.
- SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Techniques**, v. 5, n. 4, p. 265–268, 1991.
- SILVA, E. J. *et al.* Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 127–135, 2018.
- SINHA, R. K., KRISHNAN, K. P., & KURIAN, P. J. Complete genome sequence and comparative genome analysis of *Alcanivorax* sp. IO\_7, a marine alkane-degrading bacterium isolated from hydrothermally-influenced deep seawater of southwest Indian ridge. **Genomics**, v. 113, p. 884-891, 2021.
- SOARES, M. O. *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, v. 115, p. 1-7, 2020.
- SOARES, M. O. *et al.* The most extensive oil spill registered in tropical oceans (Brazil): the balance sheet of a disaster. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 13, p. 19869–19877, 2022.
- SOUSA, R. D. R.; GOMES, E. T. A. Os principais estados produtores de petróleo no Brasil e os efeitos da aplicação dos recursos dos royalties do petróleo. **Research, Society and Developmen.**, v. 11, n. 12, p. 1-14, 2022.
- SPERB, J. G. C. *et al.* Simultaneous production of biosurfactants and lipases from *Aspergillus niger* and optimization by response surface methodology and desirability functions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 857–868, 2018.
- STANCU, M. M. Characterization of new diesel - degrading bacteria isolated from freshwater sediments. **International Microbiology**, v. 26 n. 1, p. 109-122, 2022.
- SU, W. T.; CHEN, W. J.; LIN, Y. F. Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 271–279, 2009.
- TAMIS, J. E. *et al.* Rational application of chemicals in response to oil spills may reduce environmental damage. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 8, n. 2, p. 231–241, 2012.
- TAO, W. *et al.* Designer bioemulsifiers based on combinations of different polysaccharides with the novel emulsifying esterase AXE from *Bacillus subtilis* CICC 20034. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019.

- THE BUSINESS RESEARCH COMPANY. Oil and Gas Global Market Report. The Business Research Company, 2023.
- THRAEIB, J. Z. *et al.* Production and Characterization of a Bioemulsifier Derived from Microorganisms with Potential Application in the Food Industry. **Life**, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2022.
- THRONE-HOLST, M. *et al.* Utilization of N-Alkanes by a Newly Isolated Strain of *Acinetobacter Venetianus*: The Role of Two AlkB-Type Alkane Hydroxylases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 353–60, 2006.
- TIQUIA, S M; TAMA, N F Y; HODGKIS, I J. Effects pig-manure on phytotoxicity sawdust litter of spent. **Environmental Pollution**, v. 93, n. 3, p. 249–256, 1996.
- UNIÃO EUROPEIA. Resolução N° – 1907/2006, DE 18 DE DEZEMBRO DE 2006. Bruxelas, 2006.
- UZOIGWE, C. *et al.* Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–6, 2015.
- VANEECHOUTTE, M. *et al.* Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as “*Acinetobacter venetianus* sp. nov.” belong to the same genomic species. **Research in Microbiology**, v. 150, n. 1, p. 69–73, 1999.
- VAN GELDEREN, L. *et al.* Importance of the slick thickness for effective in-situ burning of crude oil. **Fire Safety Journal**, v. 78, p. 1–9, 2015.
- VÁZQUEZ-VÁZQUEZ, J. L. *et al.* Novel exopolysaccharide produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25: Production, characterization and PAHs bioemulsifying capability. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 16, n. 3, p. 721–733, 2017.
- VENTIKOS, Nikolaos P. *et al.* A high-level synthesis of oil spill response equipment and countermeasures. **Journal of Hazardous Materials**, v. 107, n. 1–2, p. 51–58, 2004.
- WICKEN, A. J.; EVANS, J. D.; KNOX, K. W. Critical micelle concentrations of lipoteichoic acids. **Journal of Bacteriology**, v. 166, n. 1, p. 72–77, 1986.
- WU, B. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SL and its potential for enhanced oil recovery in low permeability reservoirs. **Scientific Reports**, v. 12, p. 1–10, 2022.
- XIA, W. *et al.* Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p. 124–130, 2011.
- ZENGEL, S. *et al.* Meta-analysis of salt marsh vegetation impacts and recovery: a synthesis following the Deepwater Horizon oil spill. **Ecological Applications**, v. 32, n. 1, p. 1–18, 2022.

- ZHANG, Y. *et al.* Acceleration of organic removal and electricity generation from dewatered oily sludge in a bioelectrochemical system by rhamnolipid addition. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 820–827, 2017.
- ZHANG, J. *et al.* Prevention and mitigation of paraffin deposition by biosurfactant-producing and paraffin-degrading *Bacillus amyloliquefaciens* strain 6-2c. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 510–519, 2018.
- ZHANG, J.; FENG, W.; XUE, Q. Biosurfactant production and oil degradation by *Bacillus siamensis* and its potential applications in enhanced heavy oil recovery. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 169, p. 1–9, 2022.
- ZHANG, J. *et al.* Surface properties of emulsan-analogs. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 765, p. 759–765, 1999.
- ZHAO, Y. H. *et al.* Characterization and application of a novel bioemulsifier in crude oil degradation by *Acinetobacter beijerinckii* ZRS. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 184–195, 2016.
- ZOSIM, Z.; GUTINICK, D. L.; ROSENBERG, E. Effect of protein content on the surface activity and viscosity of emulsan. **Colloid & Polymer Science**, v. 265, p. 442–447, 1987.
- ZOU, C. *et al.* Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 49–58, 2014.

## ANEXO A - DIAGRAMA CONCEITUAL DA DISSERTAÇÃO.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor utilizando a versão online gratuita de BioRender (<https://www.biorender.com/>)