

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

MATEUS HENRIQUE DEZZOTTI PRADO

Otimização da Produção de Biossurfactantes por Microrganismos Isolados
de Painéis Fotovoltaicos

Sorocaba – SP

2024

MATEUS HENRIQUE DEZZOTTI PRADO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BISSURFACTANTES POR
MICROORGANISMOS ISOLADOS DE PAINÉIS FOTOVOLTAICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências Humanas e Biológicas
da Universidade Federal de São Carlos *campus*
Sorocaba, para obtenção do título de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Sorocaba – SP

2024

MATEUS HENRIQUE DEZZOTTI PRADO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR
MICRORGANISMOS ISOLADOS DE PAINÉIS FOTOVOLTAICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Centro de Ciências Humanas e Biológicas
da Universidade Federal de São Carlos *campus*
Sorocaba, para obtenção do título de
Bacharelado em Ciências Biológicas.

Aprovado em 17 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Iolanda Cristina Silveira Duarte – Orientadora
UFSCar - Sorocaba



Ma. Mariana Amaral Azevedo – Membro Convidado
UFSCar - Sorocaba



Ma. Juliana Cristina Ramos De Oliveira – Membro Convidado
UFSCar - Sorocaba

Sorocaba – SP

2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me auxiliaram e inspiraram, não apenas durante a graduação, mas em toda minha formação.

À professora Iolanda Cristina Silveira Duarte por toda a orientação, confiança, paciência, dedicação e otimismo;

À todos colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA). Em especial à Mariana, Leticia e Juliana pelos ensinamentos e ajuda durante os diversos testes;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudo que permitiu a realização desta pesquisa;

Aos meus colegas de graduação Leticia Saraiva e João Naves pelo companheirismo durante esses anos;

Às minhas amigas Larissa Mariana e Gabriela Fernandes, pela amizade, apoio e por estarem sempre ao meu lado ao longo de todos esses anos;

E em especial, à minha mãe, Lilian Dezzotti, pelo investimento na minha formação, carinho, felicidade e por sempre acreditar em mim, mesmo quando nem eu conseguia.

RESUMO

Os biossurfactantes são moléculas anfifílicas com grande potencial de aplicação na indústria da biotecnologia, superando os surfactantes sintéticos em termos de sustentabilidade, degradabilidade, redução na toxicidade e resistência a diferentes temperaturas, pH e salinidade. Os microrganismos encontrados em ambientes antrópicos de condições extremas apresentam potencial para sintetizar tais moléculas de interesse biotecnológico devido sua capacidade de suportar condições extremas. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de biossurfactantes por *Serratia nematodiphila*, *Sphingomonas paucimobilis* e *Microbacterium hydrothermale* isolados de painéis fotovoltaicos. Após a confirmação da síntese por *M. hydrothermale*, a produção foi otimizada por meio de um experimento fatorial completo, no qual a cepa escolhida produziu uma molécula com baixa capacidade emulsificante, mas com propriedades de redução de tensão superficial de 72 mN.m⁻¹ para 34,20 mN.m⁻¹. O monitoramento do processo incluiu análises de crescimento celular, consumo de açúcares, redução da tensão superficial e pH, evidenciando a produção do biossurfactante predominantemente na fase estacionária de crescimento e uma produtividade de 9,93 g.L⁻¹ ao final das 120 horas de fermentação. Testes adicionais demonstraram a capacidade de emulsificação da molécula com óleos minerais variando entre 4,59% e 6,82%. Em seguida, análises físico-químicas apontaram a produção de um biossurfactante aniônico de natureza fosfolipídica com concentração micelar crítica de 3% (30 g.L⁻¹), resultado positivo para colapso de gota, alta capacidade proporcionar maior molhabilidade de superfícies e espalhamento de óleo com diâmetro da zona clara de 4,7 cm. Foi determinada a estabilidade da molécula dentro do intervalo de temperatura de 20 a 70°C em pH neutro e concentração de NaCl até 10 g.L⁻¹. Análises adicionais confirmaram a natureza glicofosfolipídica do biossurfactante produzido com concentração total de açúcares da molécula como 24,05%, enquanto a estimativa dos lipídios totais de 75,95%. Por fim, os principais grupos funcionais –OH, C=O, C=C, –CH₂, C–O–C e anéis aromáticos presentes na estrutura do biossurfactante foram determinados a partir de uma análise semi-estrutural em FTIR.

Palavras-Chave: Biossurfactante; Glicofosfolipídico; *Microbacterium hydrothermale*; Otimização; Tensoativo; Triagem.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic molecules with great potential for application in the biotechnology industry, surpassing synthetic surfactants in terms of sustainability, degradability, reduced toxicity and resistance to different temperatures, pH and salinity. Microorganisms found in extreme anthropogenic environments have the potential to synthesize such molecules of biotechnological interest due to their ability to withstand extreme conditions. In this sense, the present study aimed to evaluate the production of biosurfactants by *Serratia nematodiphila*, *Sphingomonas paucimobilis* and *Microbacterium hydrothermale* isolated from photovoltaic panels. After confirmation of the synthesis by *M. hydrothermale*, production was optimized through a full factorial experiment, in which the chosen strain produced a molecule with low emulsifying capacity, but with surface tension reduction properties from 72 mN.m⁻¹ to 34.20 mN.m⁻¹. Process monitoring included analyses of cell growth, sugar consumption, reduction of surface tension and pH, evidencing the production of the biosurfactant predominantly in the stationary growth phase and a productivity of 9.93 g.L⁻¹ at the end of the 120 hours of fermentation. Additional tests demonstrated the emulsification capacity of the molecule with mineral oils ranging from 4.59% to 6.82%. Subsequently, physicochemical analyses indicated the production of an anionic biosurfactant of phospholipid nature with a critical micellar concentration of 3% (30 g.L⁻¹), positive result for drop collapse, high capacity to provide greater surface wettability and oil spreading with a clear zone diameter of 4.7 cm. The stability of the molecule was determined within the temperature range of 20 to 70°C at neutral pH and NaCl concentration up to 10 g.L⁻¹. Further analysis confirmed the glycophospholipid nature of the produced biosurfactant with total sugar concentration of the molecule as 24.05%, while the total lipids estimate was 75.95%. Finally, the main functional groups –OH, C=O, C=C, –CH₂, C–O–C and aromatic rings present in the biosurfactant structure were determined from a semi-structural analysis in FTIR.

Keywords: Biosurfactant; Glycophospholipidic; *Microbacterium hydrothermale*; Optimization; Screening; Surfactant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de trabalhos encontrados no período de 2019-2024 com o gênero e espécie das cepas selecionadas.....	12
Figura 2 - Fluxograma de Ensaios de Produção, Análise das Propriedades Físicas, Caracterização Parcial e Aplicação do Biossurfactante.....	14
Figura 3 – Dados de monitoramento: biomassa microbiana, consumo de açúcares, tensão superficial e pH durante a fermentação para <i>M. hydrothermale</i> . Tempo de 120 horas (a). Tempo de 24 horas (b).....	23
Figura 4 - Testes de espalhamento de óleo e carga iônica: Carga iônica (a). Espalhamento de óleo: água sobre óleo (b), surfactante SDS (c), biossurfactante (d).....	24
Figura 5 - Medições do ângulo de contato das gotas em superfície. Gotas em superfície fotografadas com auxílio do software DROPimage Advanced.....	25
Figura 6 - Concentração do biossurfactante (%) e Tensão Superficial (TS).....	26
Figura 7 - Ensaios para Natureza do biossurfactante. Teste de biureto (a). Teste de ágar CTAB/azul de metileno (b). Teste de fosfato (c).....	27
Figura 8 - Efeito da temperatura (a), salinidade (b) e pH (c) na estabilidade do biossurfactante.....	29
Figura 9 - Análise FTIR do biossurfactante bruto produzido por <i>M. hydrothermale</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis de variação.....	15
Tabela 2 – Variáveis e média dos dados de TS e Índice de Emulsão.....	20
Tabela 3 – Grupos funcionais presentes no biossurfactante bruto.....	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo Geral.....	13
2.2	Objetivos Específicos.....	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1	Ensaio de Produção de Biossurfactantes.....	14
3.1.1	Seleção de variáveis.....	14
3.1.2	Padronização do Inóculo.....	15
3.1.3	Meio de Cultura.....	16
3.1.4	Índice de Emulsão.....	16
3.1.5	Extração do Biossurfactante.....	16
3.1.6	Tensão Superficial.....	17
3.2	Monitoramento das Produções de Biossurfactante Otimizadas.....	17
3.3	Análises das Propriedades Físicas do Biossurfactante.....	17
3.4	Determinação da Estabilidade do Biossurfactante.....	18
3.5	Caracterização Parcial da Molécula.....	18
3.5.1	Caracterização do Biossurfactante.....	18
3.5.2	Semi-Purificação do Biossurfactante.....	19
3.5.3	Análise Semi Estrutural (FTIR).....	19
3.6	Análise de Resultados.....	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1	Otimização da Produção de Biossurfactante.....	19
4.2	Crescimento microbiano, Consumo de açúcares, Tensão superficial, pH e Produtividade.....	22
4.3	Índice de Emulsão.....	23
4.4	Carga iônica, Espalhamento de óleo, Colapso de gota, Molhabilidade e CMC...24	24
4.5	Natureza do Biossurfactante.....	27
4.6	Estabilidade do Biossurfactante.....	28
4.7	Caracterização Parcial da Molécula.....	30
4.7.1	Caracterização do Biossurfactante.....	30

4.7.2	Análise Semi Estrutural (FTIR).....	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são moléculas anfífilas que possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e atuar como emulsificantes eficientes (Massarweh & Abushaikha, 2020; Farias *et al.*, 2021). Sua produção tem se tornado cada vez mais relevante comercialmente devido à ampla aplicação no setor industrial (Marinho *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022). Estes compostos se destacam por sua alta degradabilidade, baixa toxicidade e resistência a condições extremas, com variações significativas de temperaturas, salinidade e pH (Tang *et al.*, 2017; Rovina *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2021). Desse modo, a eficiência na produção de biossurfactantes é fortemente dependente da otimização do processo, a qual pode ser significativamente aprimorada por meio de técnicas estatísticas avançadas (Silva *et al.*, 2018).

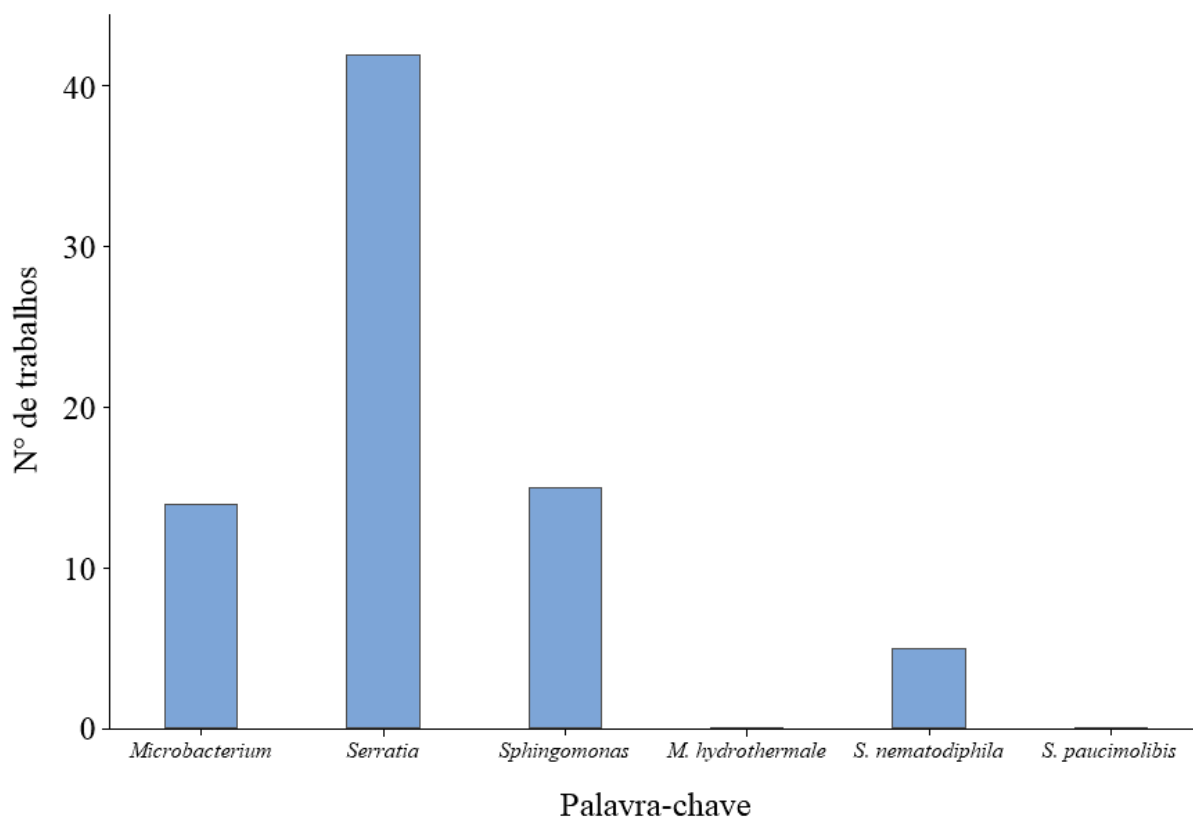
Existem diversas espécies de microrganismos capazes de sintetizar diferentes biossurfactantes (Ribeiro *et al.*, 2020). Neste caso, destaca-se o grupo de bactérias como produtores desses metabólitos (Hajfarajollah *et al.*, 2018). Esses microrganismos, quando encontrados em ambientes extremos antrópicos, como painéis fotovoltaicos, apresentam um potencial tecnológico notável devido à sua diversidade microbiana capaz de suportar condições extremas de irradiação solar, flutuações térmicas e efeitos dessecantes (Moura, *et al.*, 2021; Moura, 2021). Devido aos seus pigmentos, resistência à radiação e dessecação, esses microrganismos costumam sintetizar metabólitos de interesse biotecnológico (Tanner *et al.*, 2019; Schultz & Rosado, 2020).

No atual campo da biotecnologia, as dificuldades para aplicação industrial podem ser atribuídas aos microrganismos de produção, que por vezes são frágeis a contaminação por outros organismos e exigem condições de cultivo específicas (Chen & Jiang, 2018). Assim, os biossurfactantes produzidos por extremófilos parecem depender especificamente do uso de substratos abundantes e baratos para otimização das condições operacionais de cultivo, uma vez que têm adaptações particulares para manter a estabilidade em ambientes opostos (Makkar *et al.*, 2011; Barakat *et al.*, 2017).

A análise de artigos de pesquisa publicados entre 2019 e 2024 nas bases de dados Web of Science e Google Scholar, realizada entre outubro e novembro de 2024, utilizando as palavras-chave (“*Microbacterium hydrothermale*” AND “Biosurfactant”), (“*Microbacterium*” AND “Biosurfactant”), (“*Sphingomonas paucimobilis*” AND “Biosurfactant”), (“*Sphingomonas*” AND “Biosurfactant”), (“*Serratia nematodiphila*” AND “Biosurfactant”) e (“*Serratia*” AND “Biosurfactant”), resultou na identificação de apenas cinco artigos que

analisam a atividade surfactante da espécie *S. nematodiphila*. Não foram encontrados trabalhos sobre *M. hydrothermale* e *S. paucimobilis* no período considerado. Ao considerar apenas os gêneros, foram encontrados 14 trabalhos sobre *Microbacterium*, 15 sobre *Sphingomonas* e 42 sobre *Serratia* (Figura 1).

Figura 1 - Número de trabalhos encontrados no período de 2019-2024 com o gênero e espécie das cepas selecionadas.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Estudos apontam que a bactéria gram-negativa *Serratia nematodiphila* demonstrou produzir biossurfactante de natureza glicolipídica com um índice de emulsão de 86,60% e capacidade de reduzir a tensão superficial para 28 mN.m⁻¹ (Panjiar *et al.*, 2020). Similarmente, a cepa *Sphingomonas paucimobilis*, uma bactéria gram-negativa, é capaz de produzir um biossurfactante com um índice máximo de emulsão de 57% em petróleo, porém sem informações sobre a redução da tensão superficial (Ibrahim *et al.*, 2013).

Após revisão da literatura pode-se afirmar que estudos sobre a produção de biossurfactantes pela bactéria aeróbia gram-positiva *Microbacterium hydrothermale* ainda são escassos. Pesquisas de Ganbat *et al.* (2023) e Lima *et al.* (2017) indicaram a capacidade de cepas do gênero *Microbacterium* de metabolizar esses compostos. Estudos mostram variação nos índices de emulsão dentro do gênero, com valores entre 5% a 70%, dependendo

da fonte hidrofóbica, e uma redução da tensão superficial entre 58 e 34,60 mN.m⁻¹ (Lima *et al.*, 2017; Tripathi *et al.*, 2020; Akbari *et al.*, 2020). Portanto, são necessários mais estudos sobre a capacidade de *M. hydrothermale* em produzir biossurfactantes.

Dessa forma, o presente estudo visa a triagem, caracterização e avaliação da produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de painéis fotovoltaicos, determinar as propriedades físico-químicas da molécula e avaliar a estabilidade do biossurfactante em diferentes temperaturas, pH e salinidade.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a produção de biossurfactantes por bactérias isoladas de painéis fotovoltaicos.

2.2. Objetivos Específicos

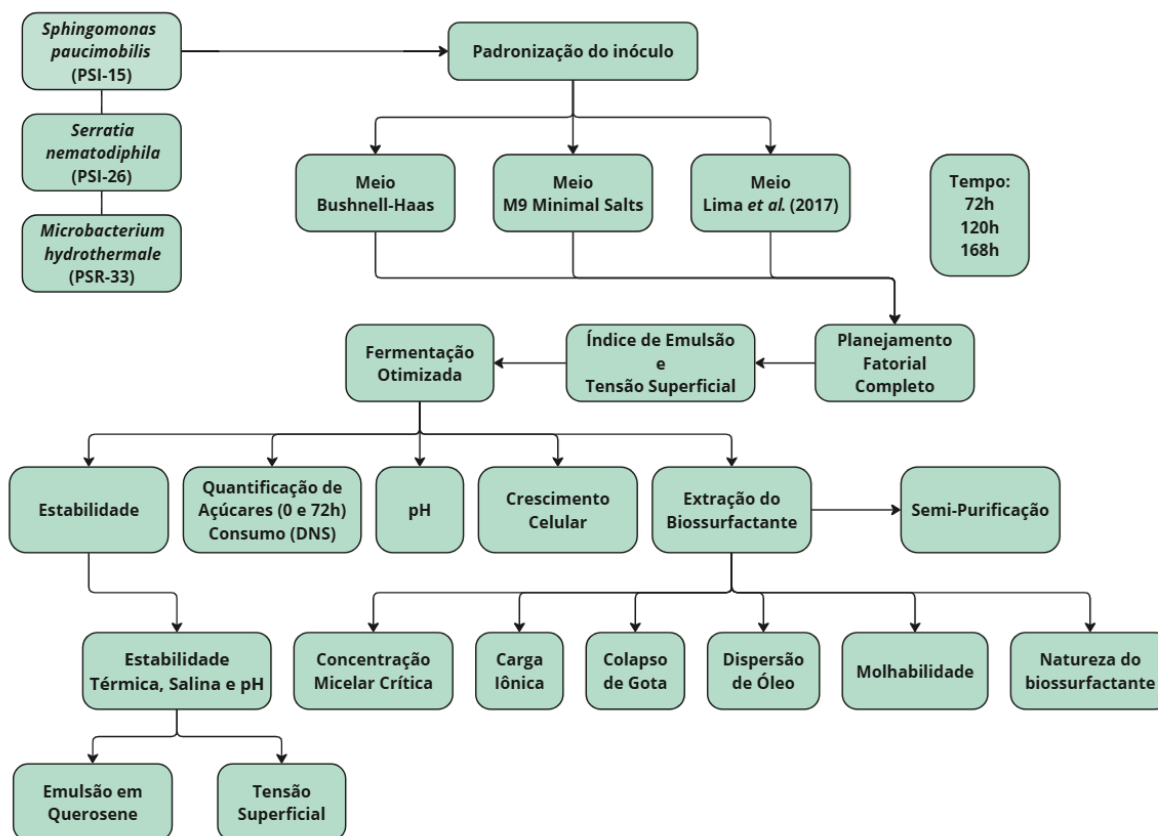
- Realizar uma triagem de produção;
- Selecionar as variáveis com melhores resultados;
- Otimizar a produção de biossurfactante;
- Caracterizar quimicamente o biossurfactante produzido pela cepa selecionada;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante em diferentes temperaturas, pH e salinidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 2 apresenta o fluxograma detalhado da metodologia proposta, que visa a produção e caracterização de biossurfactantes utilizando os microrganismos *Sphingomonas paucimobilis*, *Serratia nematodiphila* e *Microbacterium hydrothermale*. O estudo iniciou-se com a padronização do inóculo e a realização de fermentações em diferentes meios por 72, 120 e 168 horas, sob agitação de 200 rpm a 30°C. Após a seleção da cepa com base nos resultados de índice de emulsão e redução da tensão superficial, a fermentação foi conduzida em condições otimizadas, monitorando-se o crescimento microbiano, consumo de açúcares, variação de pH e a eficiência na redução da tensão superficial. A extração do biossurfactante foi seguida por uma caracterização físico-química abrangente, incluindo a determinação da concentração micelar crítica, carga iônica, capacidade de dispersão de óleo, molhabilidade, colapso de gota e a estabilidade térmica, salina e de pH. Finalmente, a molécula foi submetida

a uma semi-purificação e à caracterização parcial, visando compreender sua natureza e propriedades.

Figura 2 – Fluxograma de Ensaio de Produção, Análise das Propriedades Físicas, Caracterização Parcial e Estabilidade do Biossurfactante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1. Ensaio de Produção de Biossurfactantes

3.1.1. Seleção de variáveis

Para realização dos ensaios de produção de biossurfactantes, foram selecionadas três variáveis visando o aprimoramento das condições de cultivo e dos componentes do meio de cultura: tempo, meio de cultura e cepa bacteriana.

As bactérias *Serratia nematodiphila* (PSI-26), *Sphingomonas paucimobilis* (PSI-15) e *Microbacterium hydrothermale* (PSR-33) foram previamente isoladas de painéis fotovoltaicos instalados nos municípios de Itatiba e Sorocaba e identificadas molecularmente por Moura (2021). Os meios de cultura foram escolhidos com base em estudos sobre a produção de biossurfactantes por cepas do mesmo gênero das selecionadas. Por fim, os níveis de tempo da fermentação seguiram o proposto por Azevedo (2024).

Em seguida, foi realizada triagem com base em planejamento fatorial completo, levando em consideração as variáveis tempo, cepa e meio (Tabela 1). As variáveis analisadas incluíram a porcentagem do índice de emulsão e a capacidade de reduzir a tensão superficial, em mN.m^{-1} . Com o intuito de identificar não-linearidades, foram incluídos pontos centrais com três repetições e três réplicas para cada ponto de extremidade, totalizando 81 experimentos.

Os resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) utilizando um software de análises estatísticas, com um intervalo de confiança de 95%. Os dados foram então aplicados em uma ferramenta de otimização de respostas para determinar as condições que proporcionaram a maior emulsão e a maior redução da tensão superficial.

Tabela 1 – Variáveis independentes e níveis de variação.

Variáveis	Níveis de Variação		
Tempo (h)	72	120	168
Cepas	<i>Serratia Nematodiphila</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Microbacterium hydrothermale</i>
Meio de Cultura	Meio Bushnell-Haas (Aboseoud <i>et al.</i> , 2008)	M9 Minimal Salts (Trudgeon <i>et al.</i> , 2020)	Meio Mineral (Lima <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2. Padronização do Inóculo

As cepas bacterianas foram cultivadas individualmente em Ágar Triptona de Soja (TSA) por 48 horas em estufa bacteriológica a 35°C. Após esse período, uma alça calibrada de 10 μL foi utilizada para transferir a colônia para 10 mL de caldo nutriente em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio (Hudson *et al.*, 1987). O inóculo foi incubado por 48 horas a 30°C com agitação de 150 rpm em incubadora com agitação orbital. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 7000 rpm para coletar a biomassa microbiana, a qual foi ressuspensa em solução salina estéril (0,85%) para padronização. A absorbância foi medida e ajustada para 1,0 a 600 nm. Para os ensaios de produção de biossurfactante, foram inoculados 10% da suspensão para 90% de meio (Marcelino *et al.*, 2019).

3.1.3. Meio de Cultura

Os meios de cultivo testados para a produção de biossurfactantes foram: (1) Bushnell-Haas, conforme a metodologia descrita por Abouseoud *et al.* (2008), contendo a seguinte composição em g.L⁻¹: 2.2, Na₂HPO₄; 0.01, FeSO₄ · 7H₂O; 0.05, NaCl; 1.4, K₂HPO₄; 0.02, CaCl₂ e 0.6, MgSO₄ · 7H₂O, suplementado com 5 mL da solução estoque contendo em g.L⁻¹: 0.56, H₃BO₃; 0.42, CoCl₂ · 6H₂O; 1.0, CuSO₄ · 5H₂O; 1.78, MnSO₄ · 4H₂O; 0.39, Na₂MoO₄ · 2H₂O; 2.32, ZnSO₄ · 7H₂O; 1.0, EDTA; 0.004, NiCl₂ · 6H₂O e 0.66 KI. (2) M9 Minimal Salts (Trudgeon *et al.*, 2020), constituído de (g.L⁻¹): 64, Na₂HPO₄ · 7H₂O; 15, KH₂PO₄; 2.5, NaCl; 5, NH₄Cl e óleo de soja estéril (2%) como fonte de carbono. (3) meio proposto por Lima *et al.* (2017), constituído por (g.L⁻¹): 0.5, MgSO₄ · 7H₂O; 1, KH₂PO₄; 3, NaNO₃; 1, extrato de levedura; 0.3, peptona, com pH de 6,8, e glicose a 1.0% como fonte de carbono.

Todas as fermentações foram conduzidas em Erlenmeyer de 500 mL, em que 250 mL de meio reacional foram adicionados e acondicionados em incubadora orbital, com agitação de 200 rpm e temperatura em 30°C (Hudson *et al.*, 1987). Durante o processo, foram coletadas alíquotas de 10 mL para análise do índice de emulsão e tensão superficial.

As amostras contendo 10 mL das fermentações realizadas com meio M9 Minimal Salts foram submetidas a extração com 2 mL de hexano e, em seguida, centrifugadas a 7800 rpm, a 24°C, por 5 minutos, para a retirada do óleo de soja residual.

Posteriormente, todas as demais amostras das fermentações foram centrifugadas a 7800 rpm, a 4°C, por 20 minutos, para se obter o sobrenadante (Das & Kumar, 2018).

3.1.4. Índice de Emulsão

Para a análise do índice de emulsão, óleo de soja e querosene foram utilizados como fontes hidrofóbicas. Em tubos de ensaio de 10 mL foram combinados 1 mL de fonte hidrofóbica com 1 mL do sobrenadante obtido. Essa mistura foi agitada no vórtex por 2 minutos e deixada em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. O valor final do índice de emulsão foi então calculado como a relação entre a altura da camada emulsificada e a altura total da camada (Cooper & Goldenberg, 1987).

3.1.5. Extração do Biossurfactante

Para a extração do biossurfactante, três porções de acetona a -15°C foram adicionadas a uma porção do sobrenadante e mantidas a 4°C por 24 horas. O biossurfactante foi então

recuperado por precipitação após centrifugação por 10 minutos a 2000 rpm e seco sob um fluxo de ar quente em um forno de esterilização a uma temperatura de 60°C (Pruthi & Cameotra, 2003).

3.1.6. Tensão Superficial

A tensão superficial foi analisada com o biossurfactante extraído através do método de gota pendente em micro seringa, em um medidor de ângulo de contato modelo Ramé-Hart 250 standard (Pruthi & Cameotra, 2003). A gota foi fotografada com auxílio do software DROPimage Advanced e a tensão foi mensurada através do software IMAGEJ (Daerr & Mogne, 2016). Outra metodologia utilizada, embora menos precisa, foi a técnica de análise de peso de gota, adaptada de Lee *et al.* (2009), empregada nos testes de estabilidade e concentração micelar crítica.

3.2. Monitoramento das Produções de Biossurfactante Otimizadas

Durante o monitoramento, foram coletadas amostras para análise do crescimento microbiano pelo método de biomassa seca (Sharma *et al.*, 2019a), consumo de açúcares pelo método do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), tensão superficial (Pruthi & Cameotra, 2003; Daerr & Mogne, 2016), pH por meio de um pHmetro (Almeida & Nohama, 2006) e produtividade de biossurfactante pelo método gravimétrico (Kanna *et al.*, 2014).

3.3. Análises das Propriedades Físicas do Biossurfactante

Para as análises das propriedades físicas do biossurfactante, foi medido o índice de emulsão utilizando o sobrenadante combinado com fontes hidrofóbicas vegetais (óleos de soja, canola, milho e oliva) e minerais (óleo de motor e diesel, querosene e parafina líquida). As propriedades físico-químicas foram feitas utilizando o biossurfactante extraído para avaliar sua carga iônica (Meylheuc, Van Oss & Bellon-Fontaine, 2001), o espalhamento de óleo (Morikawa, Hirata & Imanaka, 2000) e o colapso de gota (Youssef *et al.*, 2004; Nayak *et al.*, 2020). Além disso, a molhabilidade e a concentração micelar crítica (CMC) foram medidas por meio do ângulo de contato e da tensão superficial de diferentes concentrações do biossurfactante bruto (10^{-3} – 5,0%) (Pathak & Keharia, 2014; Daerr & Mogne, 2016; Hasan, Saxena & Pandey, 2018). O valor de CMC foi determinado como g.L⁻¹ de biossurfactante.

Por fim, a natureza do biossurfactante foi determinada através de três testes (Jamal, Nawawi & Alam, 2012): Teste de ágar CTAB/azul de metileno, para indicação da produção de glicolipídios; Teste de Biureto, para detectar biossurfactante lipopeptídico; e Teste de Fosfato, que indica a presença de biossurfactante fosfolipídico.

3.4. Determinação da Estabilidade do Biossurfactante

Para avaliar a estabilidade do biossurfactante produzido durante o processo de otimização foi adotada a metodologia de Araújo *et al.* (2020) na qual foi utilizado o índice de emulsão após 24h, com querosene como fonte de hidrocarbonetos, e a tensão superficial. Ambos os métodos foram aplicados seguindo a metodologia descrita nos itens 3.1.4 e 3.1.6, respectivamente.

O biossurfactante obtido ao final do ensaio foi submetido a um estudo de estabilidade em relação à temperatura, com variações de -4, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80 e 100°C, utilizando um banho-maria, por um período de 60 minutos, além de 121°C por 20 minutos. A estabilidade foi avaliada após o retorno à temperatura ambiente. Quanto à salinidade, diferentes concentrações de NaCl (0, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50 e 100 g.L⁻¹) foram adicionadas ao biossurfactante em proporção 1:1, agitadas em vórtex por 1 minuto e deixadas em repouso por 30 minutos, à temperatura ambiente, para análise de estabilidade (Barros, 2008; Verma *et al.*, 2020).

Por fim, o pH do biossurfactante foi ajustado para 2, 4, 6, 8, 10 e 12, adicionando soluções de NaOH 1 M e HCl 1 M, e colocado em banho-maria por 30 minutos, à temperatura ambiente, para análise de estabilidade (Barros, 2008; Verma *et al.*, 2020).

3.5. Caracterização Parcial da Molécula

3.5.1. Caracterização do Biossurfactante

A caracterização dos biossurfactantes foi realizada por meio da análise dos lipídios, aminoácidos e açúcares (Silva *et al.*, 2014; Derguine-Mecheriet *et al.*, 2021). A determinação dos carboidratos foi realizada utilizando o método fenol-sulfúrico, proposto por Dubois *et al.* (1956), sendo a glicose utilizada como padrão. A quantificação da proteína foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão. A estimativa do teor de lipídios totais foi realizada utilizando clorofórmio e metanol de acordo com a metodologia descrita por Manocha *et al.* (1980).

3.5.2. Semi-Purificação do Biossurfactante

A semi-purificação da molécula foi conduzida utilizando uma metodologia adaptada de precipitação ácida, conforme descrito por Van Hoogmoed *et al.* (2000). Inicialmente, o biossurfactante bruto, previamente extraído, foi ressuspenso em água destilada, e o pH da solução foi ajustado para 2,0 pela adição de HCl 1 M. A solução acidificada foi mantida sob refrigeração a 4°C por 24 horas, favorecendo a formação do precipitado. Este foi coletado por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o material foi submetido à secagem em estufa e armazenado para análises posteriores.

3.5.3. Análise Semi Estrutural (FTIR)

As análises foram realizadas utilizando o espectrômetro modelo Cary 630 FTIR da Agilent, equipado com um cristal de diamante e acessório de refletância total atenuada (ATR). A faixa de número de ondas de 600 a 4000 cm^{-1} foi utilizada para a análise espectral de FTIR (Kiran *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2014).

3.6. Análise de Resultados

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados analisados por ANOVA ($p > 0,05$) utilizando um software de análise estatística. Os erros padrão para os valores médios foram calculados com um nível de confiança de 95% e apresentados como barras de erro padrão em todas as representações gráficas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização da Produção de Biossurfactante

O maior índice de emulsão foi obtido com 72 horas de duração para os ensaios com *Sphingomonas paucimobilis* em meio mineral proposto por Lima *et al.* (2017), atingindo, aproximadamente, 34,50% de emulsão em querosene e 38,47% em óleo de soja. A tensão superficial para esse ensaio foi reduzida de 72 mN.m^{-1} para 56,93 mN.m^{-1} .

Contudo, devido ao resultado pouco satisfatório para o índice de emulsão e baixa redução na tensão superficial da água, foi feita uma nova otimização de resultados, dessa vez levando em consideração apenas a redução da tensão superficial.

Os novos resultados apontam que a cepa *Microbacterium hydrothermale* em meio mineral Lima com 120 horas de fermentação resultou em redução significativa de tensão superficial de 72 mN.m⁻¹ para 34,20 mN.m⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2 – Variáveis e médias dos dados de TS e Índice de Emulsão.

(Continua)

Meio	Tempo (h)	Cepas	TS Média (mN.m ⁻¹)		%E ₂₄ Média Óleo de soja		%E ₂₄ Média Querosene	
BH	72	<i>M. hydrothermale</i>	65,60	± 2,82	0	± 0	0	± 0
LM	72	<i>M. hydrothermale</i>	39,28	± 3,90	0	± 0	0	± 0
M9	72	<i>M. hydrothermale</i>	54,23	± 9,85	0	± 0	0	± 0
BH	72	<i>S. nematodiphila</i>	48,94	± 5,78	0	± 0	0	± 0
LM	72	<i>S. nematodiphila</i>	53,59	± 7,65	0	± 0	25,30	± 3,30
M9	72	<i>S. nematodiphila</i>	61,37	± 3,02	0	± 0	0	± 0
BH	72	<i>S. paucimobilis</i>	52,90	± 8,91	41,92	± 2,10	0	± 0
LM	72	<i>S. paucimobilis</i>	56,93	± 5,79	38,47	± 4,00	34,50	± 10,70
M9	72	<i>S. paucimobilis</i>	65,45	± 1,80	21,03	± 4,80	0	± 0
BH	120	<i>M. hydrothermale</i>	56,79	± 4,57	0	± 0	0	± 0
LM	120	<i>M. hydrothermale</i>	34,20	± 1,38	0	± 0	0	± 0
M9	120	<i>M. hydrothermale</i>	55,15	± 4,10	0	± 0	0	± 0
BH	120	<i>S. nematodiphila</i>	53,73	± 5,82	0	± 0	0	± 0
LM	120	<i>S. nematodiphila</i>	43,04	± 10,76	0	± 0	33,80	± 2,35
M9	120	<i>S. nematodiphila</i>	59,36	± 3,50	0	± 0	0	± 0
BH	120	<i>S. paucimobilis</i>	64,71	± 3,67	22,77	± 1,25	0	± 0
LM	120	<i>S. paucimobilis</i>	55,77	± 9,44	0	± 0	36,70	± 14,30
M9	120	<i>S. paucimobilis</i>	49,85	± 0,90	0	± 0	0	± 0
BH	168	<i>M. hydrothermale</i>	62,82	± 5,02	0	± 0	0	± 0
LM	168	<i>M. hydrothermale</i>	50,17	± 5,76	0	± 0	0	± 0
M9	168	<i>M. hydrothermale</i>	52,37	± 2,11	0	± 0	0	± 0

(Conclusão)

Meio	Tempo (h)	Cepas	TS Média (mN.m ⁻¹)		%E ₂₄ Média Óleo de soja		%E ₂₄ Média Querosene	
BH	168	<i>S. nematodiphila</i>	58,47	± 1,43	0	± 0	0	± 0
LM	168	<i>S. nematodiphila</i>	53,81	± 11,00	0	± 0	26,40	± 18,65
M9	168	<i>S. nematodiphila</i>	39,17	± 1,02	0	± 0	0	± 0
BH	168	<i>S. paucimobilis</i>	70,19	± 3,97	0	± 0	0	± 0
LM	168	<i>S. paucimobilis</i>	58,88	± 2,42	0	± 0	33,60	± 10,56
M9	168	<i>S. paucimobilis</i>	53,80	± 3,74	0	± 0	0	± 0

BH: Bushnell-Haas; LM: Meio Mineral proposto por Lima *et al.* (2017); M9: M9 Minimal Salts.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora não existam estudos que comprovem a produção de biossurfactantes por *M. hydrothermale*, é demonstrado que o gênero *Microbacterium* possui capacidade de metabolizar moléculas com propriedades tensoativas. Akbari *et al.* (2020) relataram que *M. maritpicum* ABR5 apresentou um índice de emulsão de 70% em petróleo bruto e redução de tensão superficial de 72 mN.m⁻¹ para 34,60 mN.m⁻¹. Camacho-Chab *et al.* (2013) e Nayarisseri *et al.* (2020) reportaram %E₂₄ de 76% e 72%, respectivamente, para *Microbacterium* sp.

Hassanshahian *et al.* (2012) observaram uma emulsão de apenas 5% em fonte hidrofóbica pela cepa *M. aquimaris*, juntamente com uma redução da tensão superficial para 43 mN.m⁻¹. De maneira semelhante, Cruz-Hernández *et al.* (2021) avaliaram um biossurfactante sintetizado por uma cepa de *M. petrolearium* e encontraram um índice de emulsão de 0% para petróleo bruto após 24 horas de repouso. Por fim, Machado *et al.* (2022) relataram ausência de emulsão para *M. liquefaciens* em óleo diesel e uma emulsão próxima de 5% em gasolina.

Assim, a revisão da literatura indica que alguns membros do gênero *Microbacterium* produzem biossurfactantes que, apesar de apresentarem baixos índices de emulsão, têm redução satisfatória da tensão superficial da água.

A alta redução da tensão superficial proporcionada pelo biossurfactante oferece vantagens significativas em comparação com a baixa capacidade de emulsão, especialmente em aplicações que não requerem estabilidade de emulsões a longo prazo. Essa característica é

essencial em processos como, por exemplo, a biorremediação de contaminantes, onde a redução da tensão superficial e interfacial é relevante para promover a solubilização e mobilização de poluentes tóxicos (Sarubbo *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2021). Na indústria de petróleo, essa propriedade contribui para o aumento da mobilidade do óleo bruto e, conseqüentemente, aumenta sua separação do solo devido à redução da força capilar que mantém o solo e o óleo juntos (Urum & Pekdemir, 2004).

Desse modo, enquanto a baixa capacidade de emulsão pode ser uma limitação em formulações que exigem estabilidade, como cosméticos ou alimentos, não afeta aplicações onde a formação de emulsões não é o objetivo principal. Assim, a redução da tensão superficial é particularmente valiosa em processos de limpeza, biorremediação e extração de petróleo, destacando-se como um atributo crucial em contextos industriais e ambientais.

4.2. Crescimento microbiano, Consumo de açúcares, Tensão superficial, pH e Produtividade

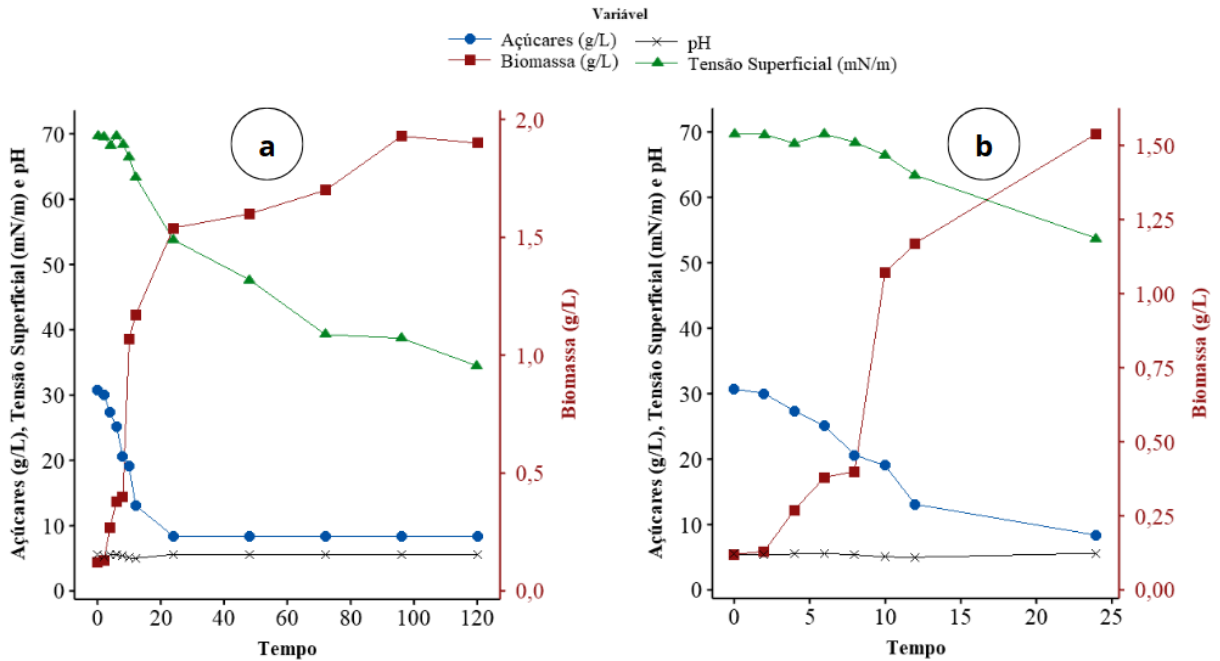
O crescimento celular, o consumo de açúcares, a tensão superficial e o pH foram monitorados durante as 120 horas de fermentação de *M. hydrothermale*. Já a produtividade foi medida ao final do período de monitoramento.

A análise conjunta dos resultados mostrou que, simultaneamente ao aumento do consumo de açúcares, houve um crescimento exponencial da biomassa, tendo início a partir do tempo de 2 horas de fermentação. Neste ponto, inicia-se a quebra e o consumo da glicose, bem como o aumento da biomassa celular durante a fermentação, que passou de 0,13 g.L⁻¹ para 1,54 g.L⁻¹, estabilizando-se após 24 horas (Figura 3). Além disso, o pH variou de 5,0 a 5,6 durante toda a fermentação.

A análise adicional dos resultados sugere que, concomitantemente a estabilização do crescimento celular, ocorre o declínio da tensão superficial, atingindo valor de 53,78 mN.m⁻¹ ao tempo de 24 horas e 34,45 mN.m⁻¹ após as 120 horas. Sendo assim, a produção do biossurfactante ocorreu predominantemente durante a fase estacionária, sugerindo que o mesmo se trata de um metabólito secundário, o qual pode estar auxiliando na sobrevivência e manutenção do microrganismo no meio de cultura, conforme descrito por Shah *et al.* (2016).

Ao final das 120 horas de fermentação, a bactéria *M. hydrothermale* foi capaz de produzir 9,93 g.L⁻¹ de biossurfactante bruto.

Figura 3 – Dados de monitoramento: biomassa microbiana, consumo de açúcares, tensão superficial e pH durante a fermentação para *M. hydrothermale*. Tempo de 120 horas (a).
Tempo de 24 horas (b).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3. Índice de Emulsão

O sobrenadante, quando agitado em óleos de soja, canola, milho e oliva, além do óleo de motor, apresentou índice de emulsão nulo após 24 horas de repouso em temperatura ambiente. Isso sugere que o biossurfactante não é eficaz na emulsão de óleos vegetais. Por outro lado, nas fontes hidrofóbicas óleo diesel, querosene e parafina líquida mostraram índices de emulsão de 4,59%, 6,82% e 6,58%, respectivamente. Estes resultados indicam que a molécula produzida por *M. hydrothermale* tem alguma eficácia na formação de emulsões com óleos minerais.

Os biossurfactantes de baixo peso molecular têm como principal característica a redução da tensão superficial nas interfaces ar/água e a tensão interfacial nas interfaces óleo/água, enquanto os de alto peso molecular, também chamados de bioemulsificantes, são mais eficazes na estabilização de emulsões (Rosenberg & Ron, 1999; Banat, *et al.*, 2010). Desse modo, é possível propor que o biossurfactante produzido por *M. hydrothermale* seja de baixo peso molecular.

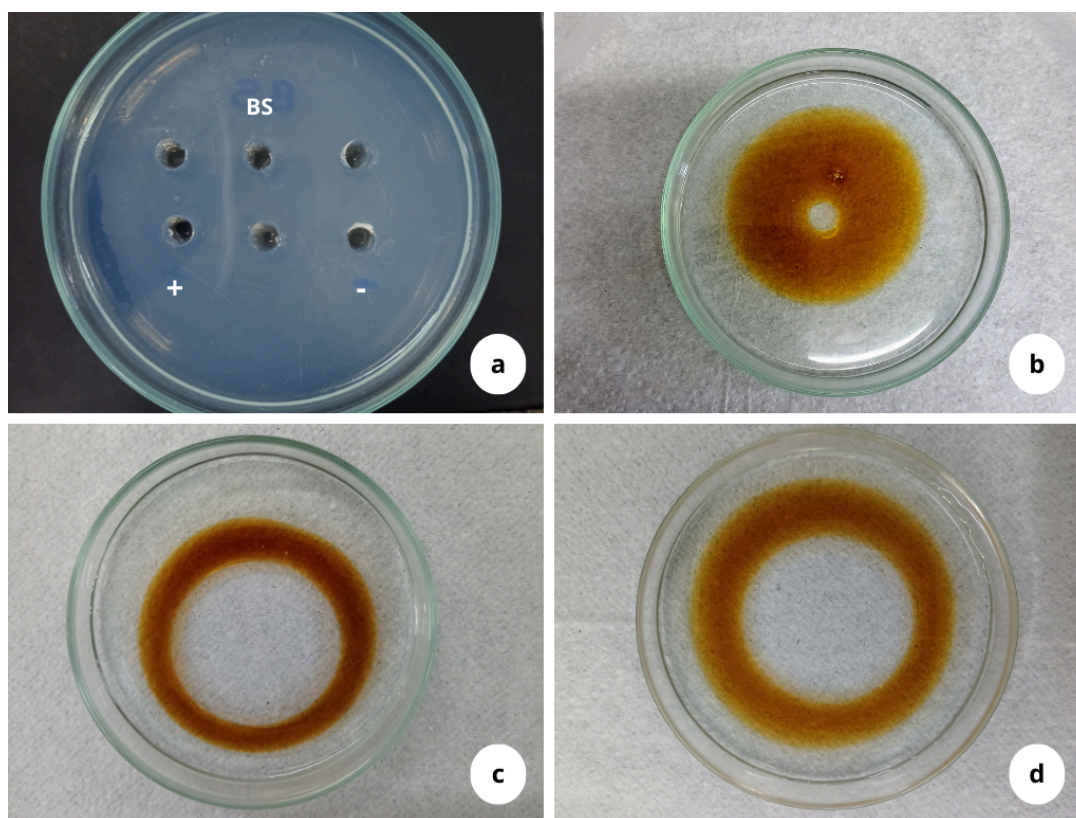
Em termos de aplicações práticas, a eficácia limitada do biossurfactante com óleos vegetais sugere que ele pode não ser adequado para aplicações que requerem emulsificação

dos mesmos, como na indústria alimentícia (Ribeiro *et al.*, 2022). No entanto, os índices de emulsão para os óleos minerais indicam que o biossurfactante pode ser útil em processos que envolvem a emulsão desses óleos, como na indústria petroquímica ou em processos de biorremediação (Lopes, 2014).

4.4. Carga iônica, Espalhamento de óleo, Colapso de gota, Molhabilidade e CMC

A partir da análise da carga iônica, foi determinado que o biossurfactante produzido pela cepa é de natureza aniônica, devido à presença de uma linha de precipitação entre o extraído e o composto catiônico CTAB (Figura 4a).

Figura 4 - Testes de espalhamento de óleo e carga iônica: Carga iônica (a). Espalhamento de óleo: água sobre óleo (b), surfactante SDS (c), biossurfactante (d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

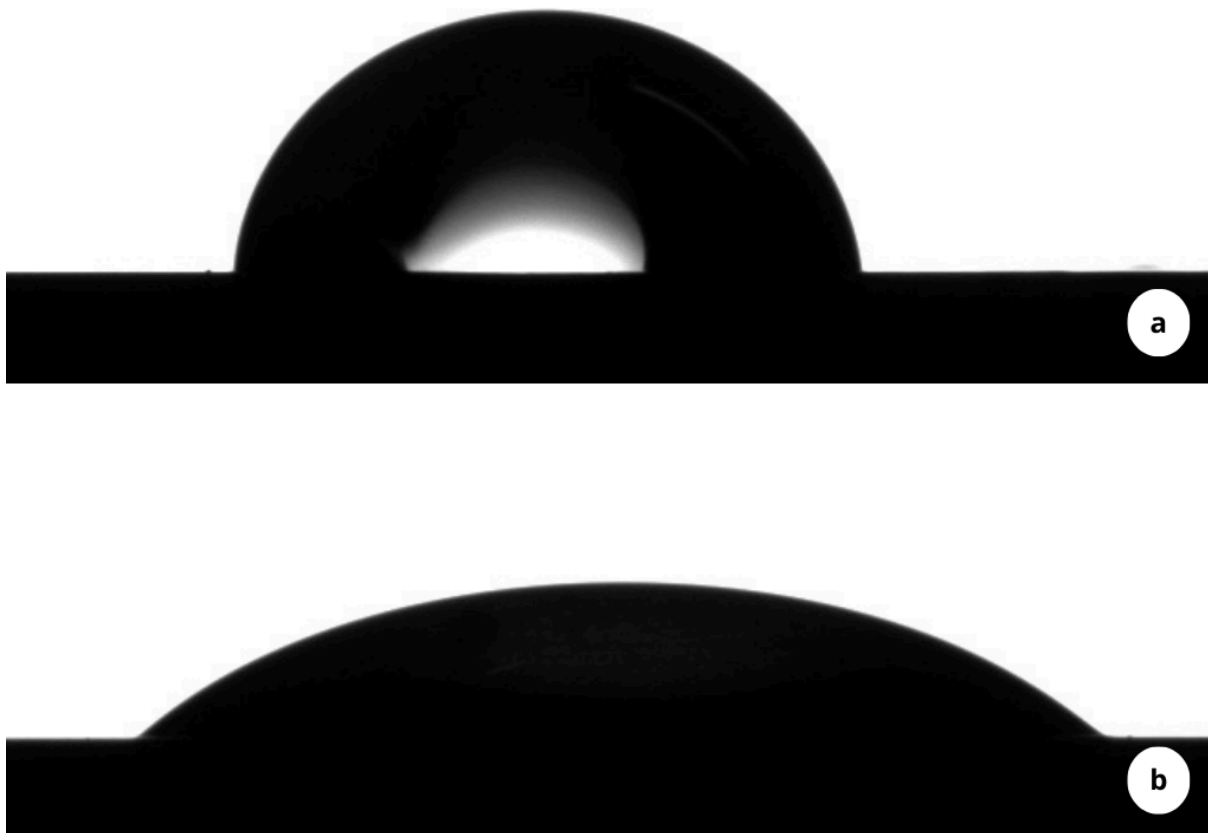
O resultado do teste de dispersão em óleo mostrou que, no controle negativo feito com água destilada, não houve espalhamento de óleo (Figura 4b), e o surfactante sintético SDS, utilizado como controle positivo, produziu uma zona clara medindo 5,0 cm de diâmetro (Figura 4c). Já o biossurfactante sintetizado por *M. hydrothermale* apresentou diâmetro de

zona clara semelhante ao do SDS, com 4,70 cm de diâmetro (Figura 4d), mostrando que o biossurfactante produzido pela bactéria possui atividade superficial.

O teste de colapso de gota apresentou resultado positivo para a produção do biossurfactante. Observou-se que, após 1 minuto, a gota manteve uma forma plana sobre a superfície do óleo, correspondendo ao espalhamento completo na superfície do óleo, indicando a presença de biossurfactante.

A molhabilidade do biossurfactante produzido por *M. hydrothermale* foi determinada através da medição do ângulo de contato (θ) da gota em superfície pelo software IMAGEJ. Todas as medições foram feitas à temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) e pressão 1 atm. A Figura 5 mostra os ângulos de contato do controle feito com água destilada (Figura 5a) e com o biossurfactante extraído diluído em água destilada (Figura 5b).

Figura 5 - Medições do ângulo de contato das gotas em superfície. Gotas em superfície fotografadas com auxílio do software DROPimage Advanced.

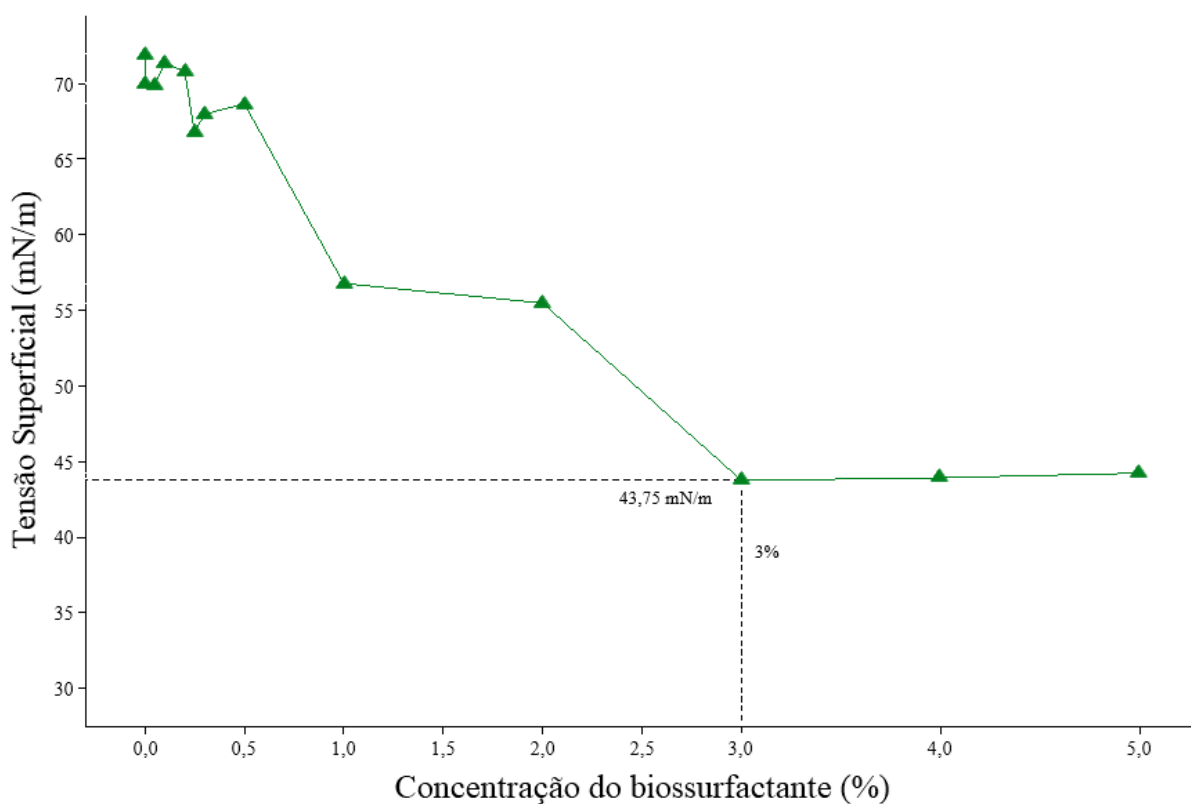


Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise dos resultados indica que o biossurfactante, ao diminuir o ângulo de contato do líquido com a superfície de 88,71° para 39,67°, conseguiu modificar a afinidade umectante da superfície para a água destilada. Isso demonstra o potencial desse metabólito para aumentar a molhabilidade, permitindo que o líquido se espalhe com maior facilidade sobre a superfície (Al-Sulaimani *et al.*, 2012).

A determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) foi realizada utilizando diferentes concentrações do biossurfactante produzido por *M. hydrothermale*, variando de 10⁻³ a 5,0% (m/v). A presença do surfactante promoveu a redução da tensão superficial na interface ar/água, comportamento diretamente relacionado à concentração do metabólito na solução até alcançar a CMC (Ron & Ronsenberg, 2001). Esse ponto foi identificado quando o aumento na concentração da molécula deixou de influenciar a diminuição da tensão superficial, indicando estabilização do sistema (Felix *et al.*, 2019). A análise dos resultados revelou que concentrações inferiores a 1% não apresentam impacto significativo na redução da tensão superficial da água (Figura 6).

Figura 6 - Concentração do biossurfactante (%) e Tensão Superficial (TS).



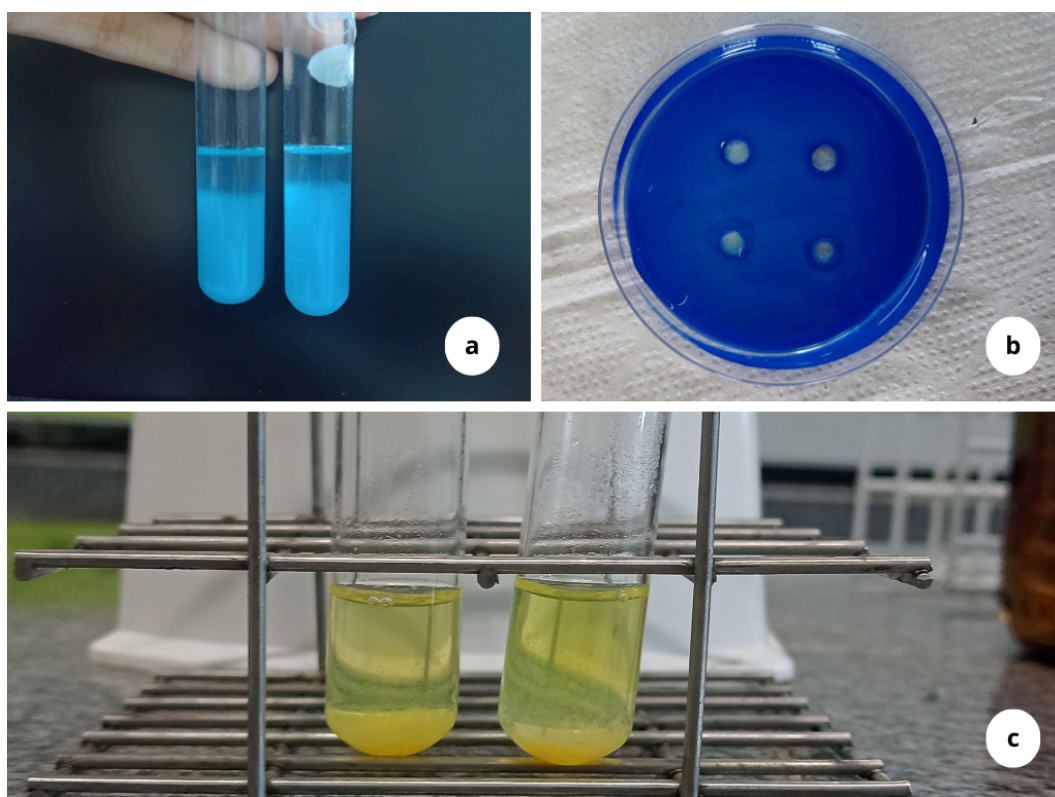
Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme mostrado na Figura 6, o biossurfactante bruto produzido por *M. hydrothermale* apresentou uma concentração correspondente à CMC de aproximadamente 3% (30 g.L^{-1}), resultando em uma redução na tensão superficial de 72 mN.m^{-1} para $43,75 \text{ mN.m}^{-1}$. Após esse ponto, o aumento na concentração da molécula não exerceu efeito adicional sobre a tensão superficial, que permaneceu constante devido à saturação característica da CMC (Felix *et al.*, 2019). Apesar dos valores observados serem relativamente elevados, eles estão em concordância com estudos semelhantes conduzidos por Luna *et al.* (2009), os quais encontraram CMC de 2,5%.

4.5. Natureza do Biossurfactante

Quanto a natureza do biossurfactante produzido pela bactéria *M. hydrothermale*, o resultado para o teste de biureto foi negativo, uma vez que não houve formação de anel violeta ou rosa durante a adição do reagente biureto (Figura 7a).

Figura 7 - Ensaio para Natureza do biossurfactante. Teste de biureto (a). Teste de ágar CTAB/azul de metileno (b). Teste de fosfato (c).



Fonte: Elaborado pelo autor.

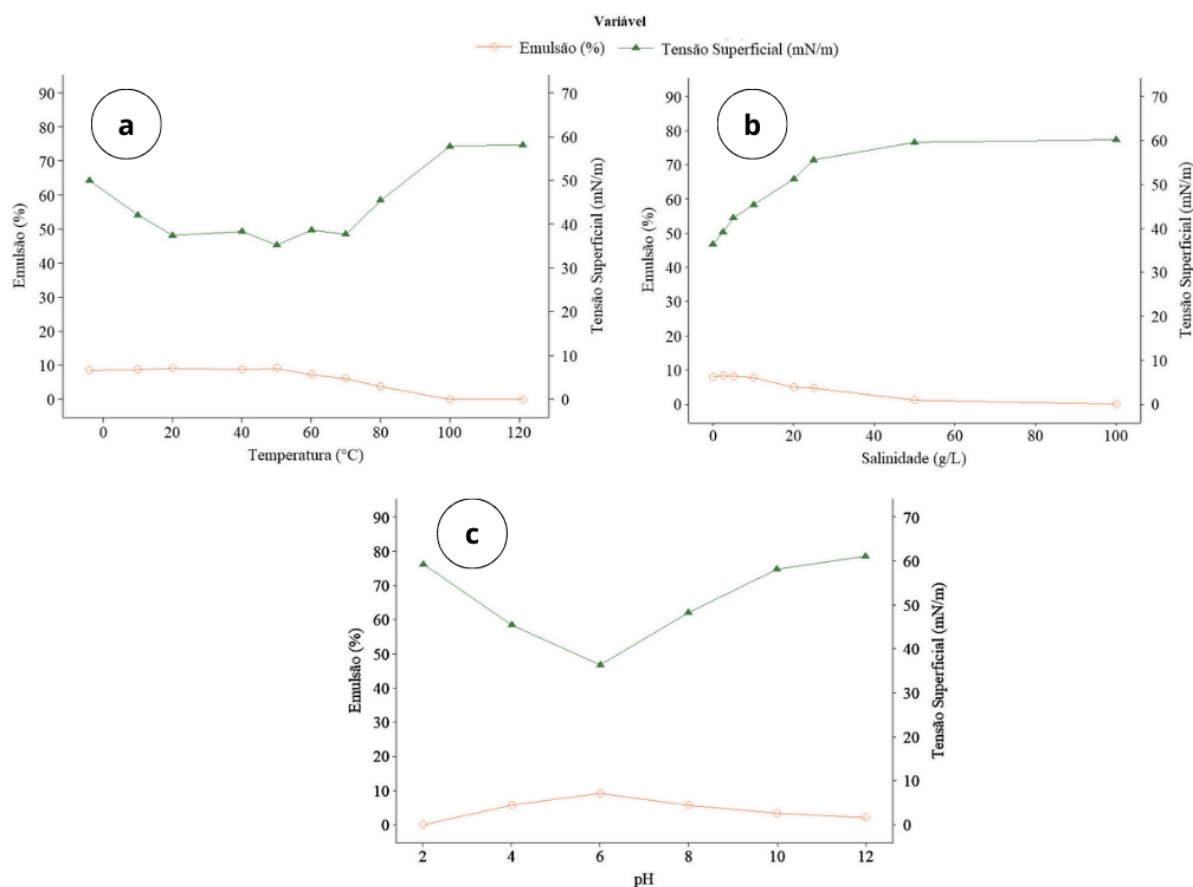
O resultado positivo para o teste de ágar CTAB/azul de metileno confirmou a presença de grupos funcionais associados a glicolipídios no biossurfactante produzido por *M. hydrothermale* (Figura 7b). A formação de halos de coloração azul-escura ao redor dos poços contendo o biossurfactante ocorreu devido à interação entre o tensoativo catiônico CTAB e o biossurfactante aniônico, caracterizando a reação esperada nesse tipo de análise (dos Santos, 2022).

Já a alteração da coloração da solução incolor para amarela no ensaio de fosfato indicou a presença de grupos relacionados a fosfolipídios (Figura 7c). Como descrito por Okpokwasili & Ibiene (2006), a solução amarelada e a formação de um precipitado amarelo fino após alguns minutos são provenientes da reação do molibdato de amônio 5% e do 6 M HNO₃ com o biossurfactante bruto. Desse modo, os resultados da identificação preliminar revelam que o biossurfactante produzido por este estudo é do tipo glicofosfolipídico.

4.6. Estabilidade do Biossurfactante

A aplicabilidade de biossurfactantes em vários campos depende de sua estabilidade em diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de NaCl (Khopade *et al.*, 2012). Como esperado, as três variáveis-chave influenciaram a atividade emulsificante e tensoativa da molécula produzida, mas seus efeitos ocorreram em níveis diferentes.

Figura 8 - Efeito da temperatura (a), salinidade (b) e pH (c) na estabilidade do biossurfactante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O biossurfactante sintetizado por *M. hydrothermale* apresentou, de maneira geral, estabilidade térmica dentro do intervalo de temperatura de 20 a 70°C (Figura 8a). O aquecimento a 70°C não provocou alterações significativas no desempenho funcional do composto, uma vez que a atividade emulsificante permaneceu constante nas temperaturas entre -4 e 70°C. Contudo, ao atingir 80°C, observou-se uma queda no índice $E_{24}\%$ para 3,80%, com a tensão superficial alcançando 45,50 mN.m⁻¹. Esse resultado indica uma correlação inversa entre o aumento da temperatura e a eficiência emulsificante e tensoativa. Tal comportamento pode ser atribuído às mudanças estruturais que ocorrem na molécula do biossurfactante em temperaturas elevadas, impactando diretamente suas propriedades físicas (Marcelino *et al.*, 2019).

Quanto ao efeito da adição de NaCl no biossurfactante, verificou-se que o composto se manteve estável em baixas concentrações de sal, conforme evidenciado pelos dados apresentados (Figura 8b). A atividade emulsificante manteve-se superior a 8% em concentrações de até 10 g.L⁻¹ de NaCl. Entretanto, ao atingir 20 g.L⁻¹, foi notada uma

diminuição significativa na atividade emulsificante, chegando a 1,20% em 50 g.L⁻¹ e cessando completamente a 100 g.L⁻¹. A capacidade tensoativa, por sua vez, decresceu de forma gradual com o aumento da salinidade, estabilizando-se apenas em concentrações até 2,5 g.L⁻¹.

A estabilidade do biossurfactante em diferentes valores de pH indicou que apenas em condições neutras a emulsão se manteve estável, com um valor de 9,2% (Figura 8c). Nos demais pHs, a atividade emulsificante foi consideravelmente inferior, variando de 0% em pH 2,0 a 2,1% em pH 12,0. Quanto à redução da tensão superficial, o pH 6,0 destacou-se com o menor valor registrado, 36,4 mN.m⁻¹, corroborando a estabilidade do composto nessa condição. Em pHs extremos (2,0 e 12,0), a tensão superficial foi significativamente maior, indicando uma menor eficácia do biossurfactante em ambientes excessivamente ácidos ou alcalinos.

4.7. Caracterização Parcial da Molécula

4.7.1. Caracterização do Biossurfactante

A determinação dos carboidratos do biossurfactante bruto, realizada pelo método fenol-sulfúrico, avaliou a concentração total de açúcares da molécula como 24,05%. O princípio básico desta metodologia é que os açúcares, quando desidratados pela reação com ácido sulfúrico concentrado, produzem derivados de furfural. A reação posterior entre esses derivados e o fenol desenvolve uma solução de cor amarelo-alaranjada detectável em comprimento de onda de 490 nm, com intensidade proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra (Albalasmeh *et al.*, 2013).

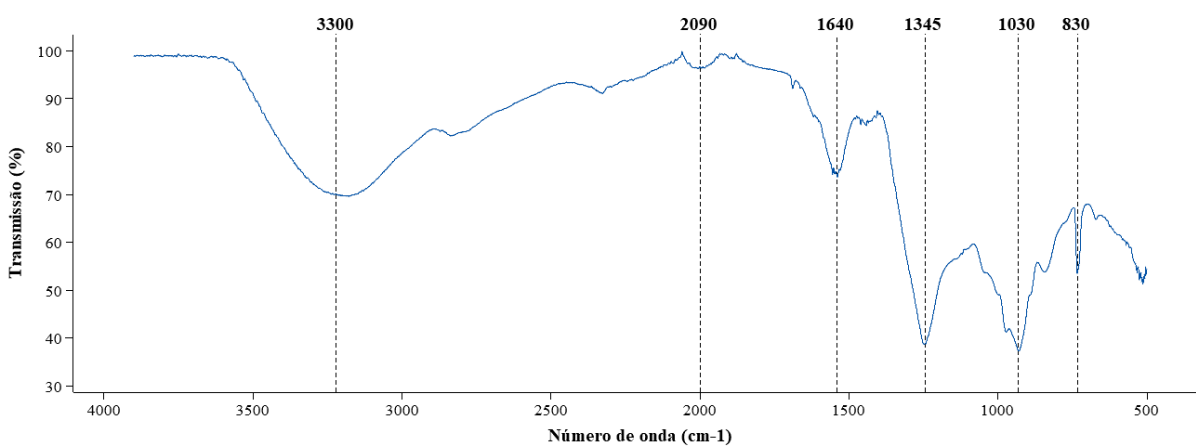
A estimativa dos lipídios totais, realizada utilizando clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 (v:v), exibiu um alto teor lipídico de 75,95%. A vantagem garantida pelo uso do clorofórmio e do metanol é a capacidade destes solventes extraírem tanto os lipídios neutros como os lipídios polares, obtendo-se resultados mais eficientes da estimativa do teor lipídico presente da molécula (Rydlewski *et al.*, 2020).

No que se refere à quantificação de proteínas, baseada na interação entre o corante "Coomassie brilliant blue" BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas, o resultado indicou a ausência de proteínas detectáveis, com um valor nulo. Nesse teste, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em comprimento de onda de 595 nm (Zaia *et al.*, 1998).

4.7.2. Análise Semi Estrutural (FTIR)

Os principais grupos funcionais presentes na estrutura do biossurfactante bruto produzido por *M. hydrothermale* foram determinados a partir de uma análise semi-estrutural em Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Figura 9). O espectro FTIR foi obtido no modo de transmitância com intervalo de número de onda de 600 a 4000 cm^{-1} e estão representados na tabela 3.

Figura 9 - Análise FTIR do biossurfactante bruto produzido por *M. hydrothermale*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 – Grupos funcionais presentes no biossurfactante bruto.

Número de onda (cm^{-1})	Grupos funcionais	Referências
3300	O–H	Sangeetha <i>et al.</i> , 2013
2090	C=O	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2013
1640	C=C	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2013
1345	–CH ₂	Sangeetha <i>et al.</i> , 2013
1030	C–O–C	Alvionita & Hertadi, 2019
830	Anéis aromáticos	Sharma, <i>et al.</i> , 2019 (b)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O pico largo em 3300 cm^{-1} é atribuído ao estiramento das ligações O–H (Sangeetha *et al.*, 2013), possivelmente relacionadas a grupos hidroxila na cabeça polar da molécula glicofosfolipídica. Em 2090 cm^{-1} , observou-se a presença de grupos carbonila, enquanto a banda em 1640 cm^{-1} indicou a presença de grupos alquenos (Mukhopadhyay *et al.*, 2013), que

podem ser originados de ácidos graxos insaturados na região apolar das caudas hidrofóbicas. A faixa em 1345 cm^{-1} é atribuída à vibração dos grupos CH_2 (Sangeetha *et al.*, 2013), típicos das longas cadeias alifáticas dos ácidos graxos. O pico em 1030 cm^{-1} pode corresponder ao estiramento C-O-C (Alvionita & Hertadi, 2019), essencial nos grupos éster que ligam os ácidos graxos ao glicerol presente na estrutura molecular. Por fim, a banda em 830 cm^{-1} , indicando ligações C-H fora do plano associadas a anéis aromáticos (Sharma, *et al.*, 2019b), pode sugerir modificações estruturais, como a presença de compostos aromáticos conjugados ao glicofosfolipídio.

Apesar da escassez de informações sobre a caracterização de biossurfactantes glicofosfolipídicos, a partir dos resultados obtidos, é possível sugerir que o biossurfactante apresenta propriedades compatíveis com glicofosfolipídios. No entanto, são necessárias análises adicionais, como espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, para determinar com precisão sua estrutura.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos ao longo desta pesquisa é possível afirmar que, a partir da otimização na produção de biossurfactante, a cepa *Microbacterium hydrothermale* (PSR-33), isolada de painéis fotovoltaicos, foi capaz de sintetizar um biossurfactante aniônico de natureza glicofosfolipídica e de baixo peso molecular, com concentração micelar crítica de 3%, tensão superficial reduzida para $34,2\text{ mN.m}^{-1}$ e estabilidade sob $20\text{--}70\text{ }^\circ\text{C}$, pH 6,0 e NaCl 0–1%. O ineditismo desta pesquisa destaca-se pelo uso de *M. hydrothermale* para essa finalidade, uma vez que não foram encontradas outras referências que investigassem a produção de biossurfactantes a partir desta espécie. Assim, em estudos futuros, esse microrganismo pode ser considerado um candidato promissor para o desenvolvimento de processos biotecnológicos inovadores e bioprodutos com diversas aplicações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSEOUD, M. et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, v. 223, n. 1-3, p. 143-151, 2008.
- AKBARI, Elham et al. Isolation and identification of current biosurfactant-producing *Microbacterium maritypicum* ABR5 as a candidate for oily sludge recovery. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 23, n. 1, p. 137-144, 2020.
- ALBALASMEH, Ammar A. et al. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, v. 97, n. 2, p. 253-261, 2013.
- ALMEIDA, Niza Helena de; NOHAMA, Percy. Proposal of methodology and test protocol for evaluating and qualifying pH measuring devices. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, p. 25-30, 2006.
- AL-SULAIMANI, Hanaa et al. Residual-oil recovery through injection of biosurfactant, chemical surfactant, and mixtures of both under reservoir temperatures: induced-wettability and interfacial-tension effects. *SPE Reservoir Evaluation & Engineering*, v. 15, n. 02, p. 210-217, 2012.
- ALVIONITA, Mieke; HERTADI, Rukman. Bioconversion of glycerol to biosurfactant by halophilic bacteria *Halomonas elongata* BK-AG18. *Indonesian Journal of Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 48-57, 2019.
- ARAÚJO, S.C.d.S.; SILVA-PORTELA, R.C.B.; LIMA, D.C. et al. MBSP1: a biosurfactant protein derived from a metagenomic library with activity in oil degradation. *Sci Rep* 10, 1340, 2020.
- AZEVEDO, Mariana Amaral. Avaliação da produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos: screening, otimização e uso de substrato alternativo. 2024.
- BANAT, Ibrahim M. et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 87, p. 427-444, 2010.

BARAKAT, Khoulood M.; HASSAN, Sahar WM; DARWESH, Osama M. Biosurfactant production by haloalkaliphilic Bacillus strains isolated from Red Sea, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 43, n. 3, p. 205-211, 2017.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades Emulsificantes e Estabilidade do Biossurfactante Produzido por Bacillus subtilis em Manipueira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p.979-985, 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* v.72, p.248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>, 1976.

CAMACHO-CHAB, Juan Carlos et al. Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by Microbacterium sp. MC3B-10. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 9, p. 18959-18972, 2013.

CHEN, Guo-Qiang; JIANG, Xiao-Ran. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current opinion in biotechnology*, v. 50, p. 94-100, 2018.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. *Applied and Environmental Microbiology*. v.53, p.224-229, 1987.

CRUZ-HERNÁNDEZ, María Antonia et al. Characterization of a Microbacterium sp. strain isolated from soils contaminated with hydrocarbons in the burgos basin, Mexico. *Revista internacional de contaminación ambiental*, v. 37, 2021.

DAERR, Adrian; MOGNE, Adrien. Pendent_drop: an imagej plugin to measure the surface tension from an image of a pendent drop. *Journal of Open Research Software*, v. 4, n. 1, 2016.

DAS, Amar Jyoti; KUMAR, Rajesh. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource technology*, v. 260, p. 233-240, 2018.

DERGUINE-MECHERI, L.; KEBBOUCHE-GANA, S.; DJENANE, D. Biosurfactant production from newly isolated Rhodotorula sp.YBR and its great potential in enhanced removal of hydrocarbons from contaminated soils. *World J Microbiol Biotechnol*, v.37, n.1. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02983-3>, 2021.

DOS SANTOS, Yasmim Senden et al. Produção e caracterização de biossurfactantes por novas espécies de leveduras do gênero *starmerella*. 2022.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J; REBERS, P.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* v.28, n.3, p.350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>, 1956.

FARIAS, Charles Bronzo B. et al. Production of green surfactants: Market prospects. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 51, p. 28-39, 2021.

FELIX, Anne Kamilly Nogueira 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.

GANBAT, Dariimaa et al. Description of *Microbacterium neungamense* sp. nov. isolated from a hot spring. *Archives of microbiology*, v. 205, n. 1, p. 23, 2023.

HAJFARAJOLLAH, Hamidreza et al. Biosurfactants from probiotic bacteria: A review. *Biotechnology and applied biochemistry*, v. 65, n. 6, p. 768-783, 2018.

HASSANSHAHIAN, Mehdi et al. 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.

HUDSON, M. JANE et al. Relationship of CDC group EO-2 and *Psychrobacter immobilis*. *Journal of clinical microbiology*, v. 25, n. 10, p. 1907-1910, 1987.

IBRAHIM, M. L. et al. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 81, p. 28-34, 2013.

JAMAL, Parveen; NAWAWI, W. M. F. W.; ALAM, Md Zahangir. Optimum medium components for biosurfactant production by *Klebsiella pneumoniae* WMF02 utilizing sludge palm oil as a substrate. *Aust J Basic Appl Sci*, v. 6, n. 1, p. 100-108, 2012.

KANNA, Rajesh; GUMMADI, Sathyanarayana N.; KUMAR, G. Suresh. Production and characterization of biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC 2467. *Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 6, p. 436, 2014.

KHOPADE, Abhijit et al. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, v. 285, p. 198-204, 2012.

KIRAN, G.S.; HEMA, T.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T.A.; RAVJI, T.R.; Natarajaseenivasan. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, v.73, n.2, p. 250-256, 2009.

KUMAR, P. Senthil et al. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: types, production, properties and its application in the bioremediation process. *Journal of Hazardous Materials*, v. 407, p. 124827, 2021.

LEE, Boon-Beng; RAVINDRA, Pogaku; CHAN, Eng-Seng. New drop weight analysis for surface tension determination of liquids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 332, n. 2-3, p. 112-120, 2009.

LIMA, João Marcelo Silv et al. Biosurfactants produced by *Microbacterium* sp., isolated from aquatic macrophytes in hydrocarbon-contaminated area in the Rio Negro, Manaus, Amazonas. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 39, n. 1, p. 13-20, 2017.

LIU, Kang et al. Rational design, properties, and applications of biosurfactants: a short review of recent advances. *Current opinion in colloid & interface science*, v. 45, p. 57-67, 2020.

LOPES, Paulo Renato Matos. Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2014.

LUNA, Juliana Moura de et al. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP 1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, p. 785-793, 2009.

MACHADO, Fernanda Ferreira et al. Production of biosurfactants by bacteria collected in soil contaminated by diesel oil on the Antarctic Continent. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 13, p. e426111335593-e426111335593, 2022.

MAKKAR, Randhir S.; CAMEOTRA, Swaranjit S.; BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, v. 1, p. 1-19, 2011.

MANOCHA, M.S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracciodioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. *Journal of General Microbiology*, v.117, n.1, p.147–154, 1980.

MARCELINO, Paulo Ricardo Franco et al. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Industrial crops and products*, v. 129, p. 212-223, 2019.

MARINHO, Patrícia Suzanne da Silva; DA SILVA, Renata Raianny; DE LUNA, Juliana Moura. Biosurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 12, p. e103111234123-e103111234123, 2022.

MASSARWEH, Osama; ABUSHAIKHA, Ahmad S. The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances. *Energy Reports*, v. 6, p. 3150-3178, 2020.

MEYLHEUC, T.; VAN OSS, C. J.; BELLON-FONTAINE, M.-N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 5, p. 822-832, 2001.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MISHRA, Sandhya et al. Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, v. 418, p. 126253, 2021.

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

MOURA, Juliane B. et al. Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. *FEMS Microbiology Letters*, v. 368, n. 16, p. fnab105, 2021.

MOURA, Juliane Brittez de. Taxonomic and biotechnological potential assessment of microbial diversity on photovoltaic panels surfaces in a tropical environment. 2021.

MUKHOPADHYAY, Soumyadeep et al. Comparison of a plant based natural surfactant with SDS for washing of As (V) from Fe rich soil. *Journal of Environmental Sciences*, v. 25, n. 11, p. 2247-2256, 2013.

NAYAK, Nisha S. et al. Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant *Bacillus licheniformis* LRK1. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 29, p. 101808, 2020.

NAYARISSERI, Anuraj et al. Identification and characterization of Lipopeptide biosurfactant producing microbacterium sp isolated from Brackish River water. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 24, p. 2221-2234, 2020.

OKPOKWASILI, G. C.; IBIENE, A. A. Enhancement of recovery of residual oil using a biosurfactant slug. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 5, p. 453-456, 2006.

PANJIAR, Neha et al. Valorization of xylose-rich hydrolysate from rice straw, an agroresidue, through biosurfactant production by the soil bacterium *Serratia nematodiphila*. *Science of the Total Environment*, v. 729, p. 138933, 2020.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, Swaranjit Singh. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—a Gujarat oil field isolate. *Journal of Surfactants and Detergents*, v. 6, n. 1, p. 65-68, 2003.

RIBEIRO, Beatriz G.; GUERRA, Jenyffer MC; SARUBBO, Leonie A. Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, v. 36, n. 5, p. e3030, 2020.

RIBEIRO, Beatriz Galdino et al. Production of a biosurfactant from *S. cerevisiae* and its application in salad dressing. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 42, p. 102358, 2022.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. *Mini Rev Environ Microbiol* 3: 229–236 [em linha]. 2001.

ROSENBERG, Eugene; RON, E. Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROVINA, Fernanda et al. Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis*. *Scientia Plena*, v. 14, n. 4, 2018.

RYDLEWSKI, Adriela Albino et al. Métodos analíticos utilizados para a determinação de lipídios em leite humano: uma revisão. *Revista Virtual de Química*, v. 12, n. 1, 2020.

SANGEETHA, J. et al. Functionalization of iron oxide nanoparticles with biosurfactants and biocompatibility studies. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 9, n. 5, p. 751-764, 2013.

SARUBBO, L. A. et al. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. *Chemistry and Ecology*, v. 31, n. 8, p. 707-723, 2015.

SCHULTZ, Júnia; ROSADO, Alexandre Soares. Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles*, v. 24, p. 189-206, 2020.

SHAH, Nikhil et al. Biosurfactant: types, detection methods, importance and applications. *Indian Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 1, p. 5-10, 2016.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S.; CHAUHAN, N.; BANSAL, A.; PROCHA, S.; Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *Scientific World J.* p.1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/493548>, 2014.

SHARMA, S.; DATTA, P.; KUMAR, B.; TIWARI, P.; PANDEY, L.M. Production of novel rhamnolipids via biodegradation of waste cooking oil using *Pseudomonas aeruginosa* MTCC7815, *Biodegradation* 30, p.301–312, <https://doi.org/10.1007/s10532-019-09874-x>, 2019.

SHARMA, Swati. et al. Crude oil degradation and biosurfactant production abilities of isolated *Agrobacterium fabrum* SLAJ731. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101322, 2019.

SILVA, Ana Carolina Borges et al. Modelagem e otimização da produção de biossurfactante utilizando melão de soja. 2018.

SILVA, E.J et al. 2014. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, v.117, p.36–41. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.01.>, 2014.

SILVA, Renata Raianny da et al. Recent advances in environmental biotechnology: role of biosurfactants in remediation of heavy metals. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 5, p. e4411527453-e4411527453, 2022.

SMYTH, Thomas et al. Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. In: Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, 2010. p. 3705-3723.

TANG, Jian et al. Removal of heavy metal from sludge by the combined application of a biodegradable biosurfactant and complexing agent in enhanced electrokinetic treatment. Chemosphere, v. 189, p. 599-608, 2017.

TANNER, Kristie et al. Bioprospecting the solar panel microbiome: high-throughput screening for antioxidant bacteria in a *Caenorhabditis elegans* model. Frontiers in Microbiology, p. 986, 2019.

TRIPATHI, Varsha et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by PAH-degrading bacteria isolated from contaminated oily sludge environment. Environmental Science and Pollution Research, v. 27, p. 27268-27278, 2020.

TRUDGEON, Benjamin et al. Low-temperature biosurfactants from polar microbes. Microorganisms, v. 8, n. 8, p. 1183, 2020.

URUM, Kingsley; PEKDEMIR, Turgay. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere, v. 57, n. 9, p. 1139-1150, 2004.

VAN HOOGMOED, C. G. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* NS adhesion to glass with and without a salivary conditioning film by biosurfactant-releasing *Streptococcus mitis* strains. Applied and environmental microbiology, v. 66, n. 2, p. 659-663, 2000.

VERMA, R.; SHARMA, S.; KUNDU, L.M.; PANDEY, L.M. Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant, Journal of Water Process Engineering, v.38, 101632, ISSN 2214-7144, 2020.

YOUSSEF, Noha H. et al. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of microbiological methods, v. 56, n. 3, p. 339-347, 2004.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaïs BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química nova, v. 21, p. 787-793, 1998.