

**MANOELA LOUREIRO PRATES MIRANDA**

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES E  
BIOSURFACTANTES ISOLADOS DO MANGUEZAL DA BAÍA BABITONGA  
- SC**

**JOINVILLE**

**2018**

**MANOELA LOUREIRO PRATES MIRANDA**

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES E  
BIOSURFACTANTES ISOLADOS DO MANGUEZAL DA BAÍA BABITONGA  
- SC**

Dissertação do Mestrado apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Maria Miranda Gern

**JOINVILLE**

**2018**

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

M672b	Miranda, Manoela Loureiro Prates Bioprospecção de microrganismos produtores de lipases e biosurfactantes isolados do manguezal da Baía da Babitonga - SC/ Manoela Loureiro Prates Miranda; orientadora Dra. Regina Maria Miranda Gem. – Joinville: UNIVILLE, 2018.  95 f. : il. ; 30 cm  Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)  1. Ecologia dos manguezais – Babitonga, Baía da (SC) 2. Bioprospecção. 3. Lipase. 4. Biosurfactantes. I. Regina Maria Miranda (orient.). II. Título.
-------	---

CDD 660.6

Elaborada por Christiane de Viveiros Cardozo – CRB-14/778

## Termo de Aprovação

### “Bioprospecção de Microrganismos Produtores de Lipases e Biossurfactantes Isolados do Manguezal da Baía da Babitonga - SC”

por

Manoela Loureiro Prates Miranda

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

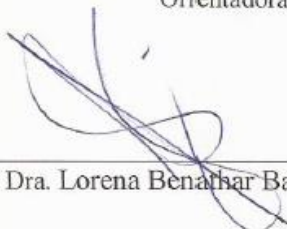
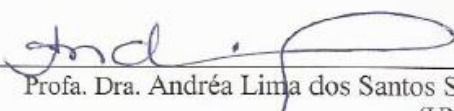


Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern  
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

#### Banca Examinadora:

  
Profa. Dra. Regina Maria Miranda Gern  
Orientadora (UNIVILLE)  
Profa. Dra. Lorena Benabar Ballo de Tavares  
(FURB)  
Profa. Dra. Andréa Lima dos Santos Schneider  
(UNIVILLE)

Joinville, 12 de março de 2018

## RESUMO

O manguezal constitui um ambiente único, sendo um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho. Estudos sobre a comunidade microbiana deste ecossistema são importantes e urgentes para a sua manutenção, uma vez que fungos e bactérias são extremamente importantes para a disponibilização de nutrientes para o ambiente e podem representar reservatórios genéticos para pesquisa e desenvolvimento de produtos biotecnológicos. A Baía Babitonga, localizada ao norte do Estado de Santa Catarina, abriga a maior parte das florestas de manguezal da região Sul do Brasil e pouco se sabe sobre a sua comunidade microbiana. Este trabalho tem como objetivo bioprospectar microrganismos com potencial de produção de lipases e biossurfactantes isolados de três diferentes pontos do manguezal da Baía Babitonga. Amostras do sedimento do manguezal foram inoculadas em meio líquido Marine Broth contendo óleo de soja como única fonte de carbono para a ativação dos microrganismos. O isolamento dos microrganismos foi realizado em placas de Petri contendo meios de cultivo seletivos para identificação da produção de lipase (Marine Broth adicionado do corante Rodamina B) e biossurfactante (meio ágar sangue). Os isolados positivos para ambos os testes foram identificados pela morfologia e taxonomia (biologia molecular) e cultivados em meio Marine Broth com óleo de soja como fonte de carbono para avaliação da cinética de crescimento celular por espectrofotometria, produção de biossurfactante (determinação da tensão superficial (TS) em tensiômetro interfacial e do índice de emulsificação (IE)) e da cinética de produção de lipase utilizando para-Nitrofenil Palmitato (pNPP) como substrato. Quatro isolados capazes de produzir ambos os metabólitos (lipase e biossurfactantes) foram identificados: *Psychrobacter maricola*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacillus pumilus* e *Enterobacteriaceae*. Os isolados *P. maricola*, *E. casseliflavus* e *B. pumilus* apresentaram concentração celular máxima de  $3,95 \pm 0,08$  g/L (72 h),  $9,06 \pm 0,99$  g/L (72 h) e  $3,44 \pm 0,20$  g/L (24 h), respectivamente. Em relação à produção de lipase, apenas *Psychrobacter maricola* foi capaz de produzir a enzima, em 96 h de cultivo, ainda que de forma bastante incipiente ( $0,0045 \pm 0,0001$  U/mL). Não foi possível detectar a redução da tensão superficial do meio de cultivo como indicativo da produção

de biossurfactantes por nenhum dos microrganismos testados. Somente *B. pumilus* foi capaz de proporcionar um aumento de 24,26 % no IE em 72 h de cultivo. No geral, os dados sugerem que o substrato e as condições de cultivo não foram ideais para a produção de lipases e biossurfactantes, indicando que novas pesquisas são necessárias. No entanto, descreve-se o primeiro estudo cinético com *Psychrobacter marincola*, e o primeiro registro de *Entereccocus casseliflavus* em manguezal.

**Palavras – chave:** Manguezal, Bioprospecção, Lipase, Biossurfactantes

## ABSTRACT

A mangrove consists in a unique environment, a transitional coastal ecosystem from terrestrial to marine system. Raised studies about that specific microbial community ecosystem are important and urgent for its maintenance, since bacteria and fungi are extremely important for nutrients reavailability of the environment and may represent genetic reservoirs for the research and biotechnological products development. Babitonga Bay, located in the North of Santa Catarina State, shelters the most part of mangrove forest of the south region and little is known about its microbial community. The objective of this study is to bioprospect microorganisms able to produce lipases and biosurfactants, isolated from three different locations of the mangrove of the Baía Babitonga. Sediment samples were inoculated in Marine Broth liquid medium containing soy oil as the only carbon source. The isolation of the microorganisms was carried out in Petri dishes containing selective cultivation medium for the identification of lipase production (Marine Broth added with Rodamine B) and biosurfactant production (Blood Agar). The isolated microorganisms that were positive for both of the tests were identified by morphology and taxonomy (molecular biology) and cultivated in Marine Broth medium with Soy oil as carbon source to the evaluation of the kinetics of cell growth by spectrophotometry, biosurfactant production (superficial tensions determination in interfacial tensiometer and emulsification index), and lipase production using para-Nitrophenyl Palmitate (pNPP) as substrate. Four isolated able to produce lipase and biosurfactant were isolated: *Psychrobacter maricola*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacillus pumilus* and *Enterobacteriaceae*. The isolated *P. maricola*, *E. casseliflavus* e *B. pumilus* showed maximum cell concentration of  $3.95 \pm 0.08$  g/L (72 h),  $9.06 \pm 0.99$  g/L (72 h) and  $3.44 \pm 0.20$  g/L (24 h), respectively. Regarding lipase production, only *Psychrobacter maricola* was able to produce the enzyme after 96 hours of culture, although in an incipient way of  $0.0045 \pm 0.0001$  U/mL. It wasn't possible to identify superficial tension reduction of the cultivation medium as an indicative of the biosurfactants production by none of the tested microorganisms. Only *B. pumilus* was able to provide an improve of 24,26 % in

IE, in 72 hours of cultivation. In general, data suggest that the substrate and the cultivation conditions were not ideal for the lipases and biosurfactants production, indicating that new research is required. However, this is the first study reporting a kinetic study with *Psychrobacter maricola* and the first register of *Enterococcus casseliflavus* in mangrove area.

Keywords: Mangrove, Bioprospection, Lipase, Biosurfactants



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagem ilustrativa da classificação do sedimento de acordo com o tamanho das partículas.....	19
<b>Figura 2.</b> Imagem ilustrativa da ação dos biossurfactantes sobre petróleo.....	24
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido.....	24
<b>Figura 4.</b> Estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> , enfatizando a tríade catalítica (em azul) e as estruturas secundárias alfa hélice e folha beta.....	31
<b>Figura 5.</b> Modelo ilustrativo de ação da atividade de lipase.....	32
<b>Figura 6.</b> Mapa da Baía Babitonga – Santa Catarina, com a localização dos pontos selecionados para amostragem. Fotos dos pontos selecionados (Controle, Porto, Moradia) .....	38
<b>Figura 7.</b> Diagrama esquemático da metodologia utilizada no trabalho.....	40
<b>Figura 8.</b> Amostra do sedimento e ativação dos microrganismos.....	41
<b>Figura 9.</b> Imagem ilustrativa da técnica de diluição seriada e seleção de colônias puras pela técnica de esgotamento.....	42
<b>Figura 10.</b> <i>Psychrobacter marincola</i> .....	57
<b>Figura 11.</b> <i>Enterococcus casseliflavus</i> .....	58
<b>Figura 12.</b> <i>Bacillus pumilus</i> .....	59
<b>Figura 13.</b> Concentração celular (g/L) em função do tempo de cultivo de <i>Psychrobacter marincola</i> em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	61
<b>Figura 14.</b> Atividade enzimática da lipase (U/L) em função do tempo de cultivo de <i>Psychrobacter marincola</i> em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	62
<b>Figura 15.</b> Tensão superficial (mN/m) em função do tempo do caldo de cultivo de <i>Psychrobacter marincola</i> em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	62
<b>Figura 16.</b> Índice emulsificante (%) em função do tempo do caldo de cultivo de <i>Psychrobacter marincola</i> em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	63
<b>Figura 17.</b> Concentração celular (g/L) em função do tempo de cultivo de <i>Enterococcus casseliflavus</i> em meio Marine Broth adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	64
<b>Figura 18.</b> Atividade enzimática da lipase (U/L) em função do tempo de cultivo de <i>Enterococcus casseliflavus</i> em meio Marine Broth adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	65
<b>Figura 19.</b> Tensão superficial (mN/m) em função do tempo do caldo de cultivo de <i>Enterococcus casseliflavus</i> em meio <i>Marine Broth</i> adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	65
<b>Figura 20.</b> Índice emulsificante (%) em função do tempo do caldo de cultivo de <i>Enterococcus casseliflavus</i> em meio <i>Marine Broth</i> adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	66
<b>Figura 21.</b> Concentração celular (g/L) em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus pumilus</i> em meio <i>Marine Broth</i> adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	67

<b>Figura 22.</b> Atividade enzimática da lipase (U/L) em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus pumilus</i> em meio <i>Marine Broth</i> adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	68
<b>Figura 23.</b> Tensão superficial (mN/m) em função do tempo do caldo de cultivo de <i>Bacillus pumilus</i> em meio <i>Marine Broth</i> adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	69
<b>Figura 24.</b> Índice emulsificante (%) em função do tempo do caldo de cultivo de <i>Bacillus pumilus</i> em meio <i>Marine Broth</i> adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, à 30°C, e 120 rpm.....	69
<b>Figura 25.</b> Determinação do Índice de Emulsificação.....	70
<b>Figura A1.</b> Curva de calibração resultante do plote da concentração celular de <i>Psychrobacter maricola</i> em função da absorbância (560 nm).....	94
<b>Figura A2.</b> Curva de calibração resultante do plote da concentração celular de <i>Enterococcus casseliflavus</i> em função da absorbância (560 nm).....	94
<b>Figura A3.</b> Curva de calibração resultante do plote da concentração celular de <i>Bacillus pumilus</i> em função da absorbância (560 nm).....	95
<b>Figura B1.</b> Logaritmo neperiano (ln) da concentração celular de <i>Psychrobacter maricola</i> em função do tempo de cultivo.....	96
<b>Figura B2.</b> Logaritmo neperiano (ln) da concentração celular de <i>Enterococcus casseliflavus</i> em função do tempo de cultivo.....	96
<b>Figura B3.</b> Logaritmo neperiano (ln) da concentração celular de <i>Bacillus pumilus</i> em função do tempo de cultivo. ....	97

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Principais aplicações comerciais dos biossurfactantes. ....	26
<b>Quadro 2.</b> Relação de biossurfactantes produzidos por microrganismos. ....	28
<b>Quadro 3.</b> Aplicações industriais de lipases microbianas. ....	35
<b>Quadro 4.</b> Microrganismos produtores de lipase e suas aplicações. ....	36
<b>Quadro 5.</b> Microrganismos isolados nos meios seletivos para lipase e biossurfactantes nos diferentes pontos do manguezal .....	50
<b>Quadro 6.</b> Relação dos microrganismos isolados nos diferentes pontos do manguezal (controle, moradia e porto) e sua morfologia.....	54

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Dados de crescimento celular, atividade de lipase, redução da tensão superficial, e aumento do índice de emulsificação obtidos para *Psychrobacter marincola*, *Enterococcus casseliflavus* e *Bacillus pumilus*.....72

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE QUADROS	
LITA DE TABELAS	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
2.1 O ambiente manguezal	17
2.2 Bioprospecção	21
2.3 Biossurfactantes	23
2.3.1 Aplicações dos Biossurfactantes	25
2.3.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes	27
2.4 Lipases	30
2.4.1 Aplicações das Lipases	33
2.4.1 Microrganismos produtores de Lipase	35
<b>3. METODOLOGIA</b>	38
3.1 Áreas de estudo	38
3.2 Seleção e isolamento dos microrganismos	41
3.2.1 Enriquecimento em meio de cultura líquido	41
3.2.2 Isolamento dos microrganismos	42
3.2.3 Isolamento de microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes	43
3.2.4 Meio seletivo para Lipase	43
3.2.5 Meio seletivo para Biossurfactantes	43
3.3.1 Morfologia	44
3.3.2 Identificação taxonômica	44
3.4 Avaliação da produção de biomassa, lipases e biossurfactantes	44
3.4.1 Determinação da concentração celular	45
3.4.2 Determinação da atividade lipolítica	46
3.4.3 Avaliação da produção de biossurfactantes	47
3.4.3.1 Tensão Superficial	47
3.4.3.2 Índice de emulsificação	47
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	49
4.1 Isolamento de microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes	49
4.2 Identificação morfológica e taxinômica das colônias	53
4.3 Cinética de crescimento celular e de produção de lipases e biossurfactantes pelos isolados	60
4.3.1 <i>Psychrobacter marincola</i>	60
4.3.2. <i>Enterococcus casseliflavus</i>	64
4.3.3. <i>Bacillus pumilus</i>	67
<b>5. INTERDISCIPLINARIDADE</b>	75
<b>6. CONCLUSÃO</b>	76
<b>REFERÊNCIAS</b>	77
APÊNDICE A: Curvas de calibração da concentração celular	94
APÊNDICE B: Determinação da velocidade específica máxima de crescimento	96

## 1. INTRODUÇÃO

O manguezal constitui um ambiente único, sendo um ecossistema costeiro de transição entre os ambientes terrestre e marinho, encontrado em regiões tropicais e subtropicais do planeta (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Devido ao rico ecossistema, sua localização em importantes regiões geográficas e a alta susceptibilidade à degradação, estudos sobre a comunidade microbiana destes ambientes são importantes e urgentes. A comunidade microbiana é fundamental na manutenção deste ecossistema, participando ativamente da ciclagem de nutrientes por meio do processamento da matéria orgânica, suprimindo nutricionalmente as plantas e animais que vivem nos manguezais (FASANELLA, 2012).

O Estado de Santa Catarina possui 94 km<sup>2</sup> de manguezais (PANITZ, 1993). A Baía Babitonga, o maior complexo estuarino do litoral norte do Estado, rodeado por florestas de mangue e importantes remanescentes da Mata Atlântica e restinga, tornando-se um berçário para espécies de importância comercial e ecológica, como aves migratórias, répteis e mamíferos marinhos, peixes, camarões e moluscos (KNIE, 2002; IBAMA 1998; SILVA, 2001; CONSEMA/002, 2011; GERHARDINGER *et al.*, 2006; MUNIZ; CUNHA CHAVES, 2008; SOUZA-CONCEIÇÃO *et al.*, 2013).

Situada numa localização geográfica privilegiada, a Baía Babitonga está na lista de *Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira*, elaborada pelo Ministério do Meio Ambiente desde 2007 (CREMER; MORALES; OLIVEIRA, 2006). A região sofre com a pressão antrópica, e estima-se no seu entorno 50 mil pessoas (IBGE, 2017), sobrecarregando o ecoturismo, a atividade portuária, imobiliária e a pesqueira.

Nesse ambiente, existem poucos estudos sobre a microbiota local e sobre os possíveis impactos das ações antrópicas sobre ela. Os microrganismos de origem marinha possuem grande potencial biotecnológico e a identificação destes permite explorar produtos valiosos geneticamente e com possíveis propriedades bioquímicas, com aplicações na indústria farmacêutica, na agroquímica, na indústria de cosméticos, de aromas e fragrâncias e na produção de enzimas industriais (ARTUSO, 2002; REID *et al.*, 1993).

Dentre as enzimas industriais, podemos citar as lipases microbianas que atuam na interface água-óleo hidrolisando lipídeos e hidrocarbonetos, não estando sujeitas às limitações de produção ou de suprimento, como as de origem vegetal ou animal (BENASSI *et al.*, 2012; MACHADO, 2011). Um estudo de revisão recente realizado por Choudhury; Bhunia (2015) define as lipases microbianas como o grupo mais importante de biocatalisadores para aplicações industriais, sendo utilizadas nas indústrias de óleos e gorduras, detergentes, processamento de alimentos, desenvolvimento de sabor, médica e farmacêutica, polpa e papel, biosensores, cosméticos, perfumaria e biodiesel.

Outro metabólito microbiano que vem se destacando nas pesquisas científicas é o biossurfactante. O termo surfactante (SURFace ACTive AgeNTS) inclui uma grande variedade de compostos sintéticos ou biológicos cuja principal característica é ser anfifílico (hidrofóbico e hidrofílico), permitindo sua existência na interface entre substâncias polares e apolares. Os biossurfactantes são assim denominados por serem produzidos por organismos vivos, principalmente por microrganismos (SATPUTE; PŁAZA; BANPURKAR, 2017). O interesse mundial nos biossurfactantes cresceu significativamente nos anos recentes, com um mercado avaliado em 3,99 bilhões de dólares em 2016 e projetado para alcançar 5,52 bilhões em 2022 (MARKETS; MARKETS, 2015). O interesse nos biossurfactantes se dá em função, principalmente, da habilidade destas moléculas em mitigar a maioria dos impactos dos surfactantes químicos, aliada a uma grande variedade de aplicações tais como biorremediação de água e solos, limpeza de reservatórios de óleos, aplicações terapêuticas como antimicrobianos, antivirais e antitumorais, uso na formulação de herbicidas e pesticidas, emulsificante na indústria de alimentos, bem como aplicações na indústria de tintas, papel e têxtil (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Considerando a vasta diversidade microbiana que pode ser encontrada em um ecossistema pouco explorado como o manguezal da Baía Babitonga em Santa Catarina, despontando como uma valiosa fonte de novos microrganismos e biomoléculas, este trabalho foi realizado de modo a contribuir para o conhecimento da microbiota marinha desse tipo de ecossistema.

## **1.1 OBJETIVO GERAL**

Prospectar microrganismos com potencial de produção de lipases e biossurfactantes isolados de diferentes pontos do manguezal da Baía Babitonga.

## **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I- Isolar microrganismos de três diferentes pontos do manguezal da Baía Babitonga;

II- Identificar, dentre os isolados, os microrganismos potencialmente produtores de lipases e biossurfactantes;

III- Avaliar a produção de lipases e biossurfactantes dos microrganismos isolados.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O ambiente manguezal

O manguezal consiste de um ecossistema costeiro, de transição entre os ambientes terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais, sujeito ao regime de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). A distribuição geográfica dos manguezais está relacionada aos locais que favorecem a deposição de sedimento, normalmente associados às planícies costeiras de baixa declividade ou vales fluviais alagados. Sua distribuição cobre de 60 a 75% da linha costeira mundial (VANNUCCI, 1999).

No Brasil, segundo Gamero (2001), tal ecossistema ocorre ao longo do litoral, desde o Cabo Orange, Amapá, até o município de Laguna em Santa Catarina, abrangendo uma área de 25.000 km<sup>2</sup>. O Brasil, a Indonésia e a Austrália são os países mais abundantes em ecossistemas de manguezal, cobrindo 400.000 hectares (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

O Estado de Santa Catarina possui 94,67 km<sup>2</sup> de seu território ocupados por manguezais (PANITZ, 1993). Na Baía Babitonga possui uma vegetação nativa típica de manguezais, correspondendo a 75 % do total deste ecossistema no estado, com área aproximada de 6.200ha (IBAMA,1998), onde compõe o maior complexo estuarino do litoral de Santa Catarina e seu entorno é rodeado por florestas de mangue e importantes remanescentes de Mata Atlântica e restinga (KNIE, 2002).

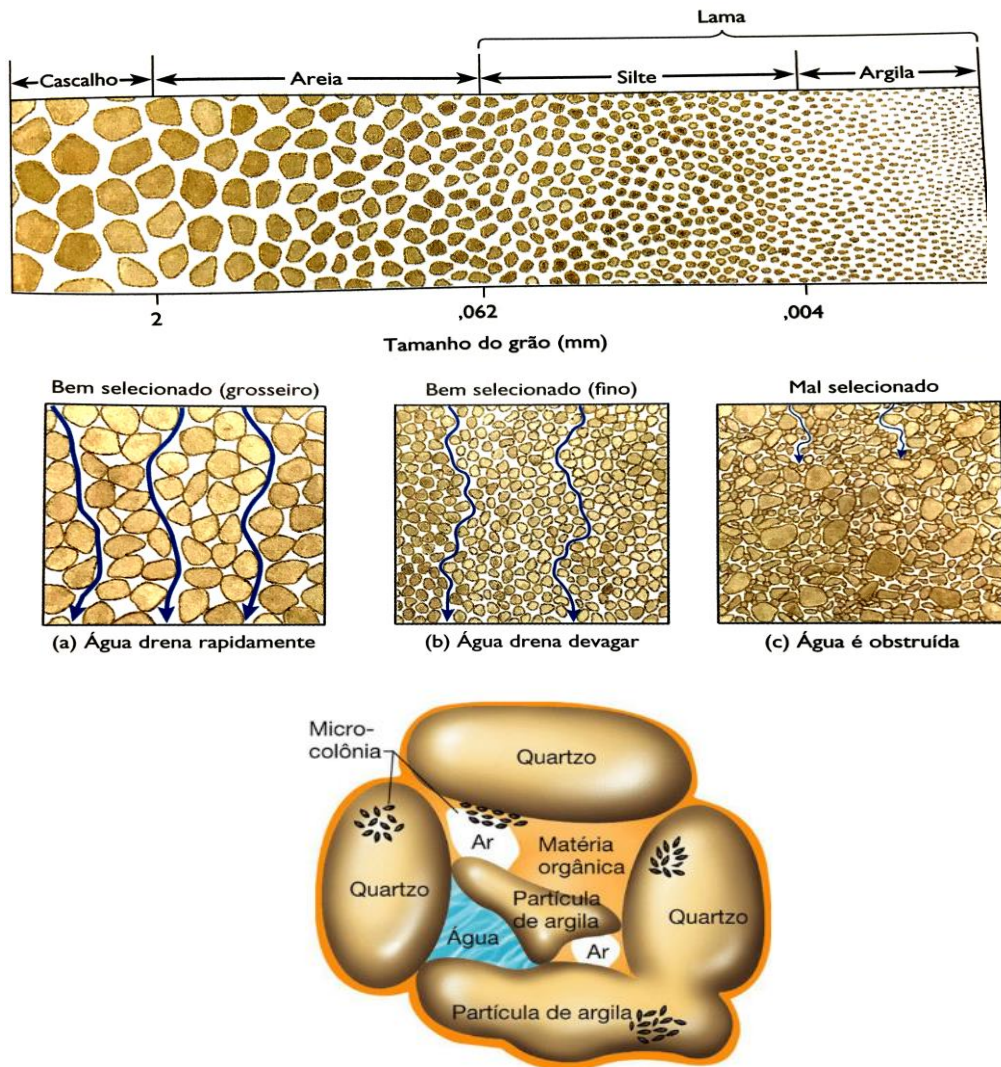
Na sua estrutura biológica, a vegetação do manguezal da Baía Babitonga hospeda exclusivamente *Laguncularia racemosa*, *Avicennia schaueriana* e *Rhizophora mangle* (SILVA, 2001). Na produtividade biológica animal o estuário é destino de aves migratórias neárticas, além de espécies ameaçadas de extinção como a toninha (*Pontoporia blainvillei*), a tartaruga-verde (*Chelonia mydas*) e o boto-cinza (*Sotalia guinensis*) (CONSEMA/002, 2011).

O estuário sustenta a atividade pesqueira local que realiza a captura de camarões (*Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Litopenaeus schimitti*), caranguejos (*Ucides cordatus*), peixes, sendo também uma área propícia para o cultivo de moluscos (GERHARDINGER *et al.*, 2006; MUNIZ; CUNHA CHAVES, 2008; SOUZA-CONCEIÇÃO *et al.*, 2013).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente em 2007, a região é candidata à criação de uma área protegida de uso sustentável, devido ao crescente estímulo ao ecoturismo na região, à força da tradicional pesca artesanal, ainda presente, e à preservação das espécies de importância comercial e ecológica. Além disso, a pressão antrópica sobre a baía, como a atividade portuária, a pesqueira e o processo de assoreamento impulsionado pelo aporte de sedimentos provenientes da bacia hidrográfica dos rios Cubatão e Cachoeira, levaram a área a ser incluída na lista de *Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira*, (CREMER; MORALES; OLIVEIRA, 2006).

Na estrutura físico-química, a água existente nos manguezais é constituída por uma mistura do escoamento superficial das águas da chuva, rios e da água do mar (VANNUCCI, 1999). Em relação ao solo do manguezal, conforme pode ser visto na Figura 1, nos sedimentos há predominância das frações mais finas (argila e silte). Elevadas quantidades de matéria orgânica provindas da serapilheira e de sais solúveis em decorrência do contato com o mar, se depositam aproximadamente na mesma taxa que as partículas de argila, tendendo a se depositarem juntas. E a partir da saturação pela água, os solos são de cores acinzentadas a pretas, com presença de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) podendo atingir vários metros de profundidade (PRADA-GAMERO; VIDAL-TORRADO; FERREIRA, 2004; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

O tipo de sedimento, especialmente o tamanho dos grãos, é um dos fatores mais importantes que afetam as comunidades dos fungos e bactérias dos fundos moles, uma vez que afeta a quantidade de oxigênio disponível e a água intersticial. O tamanho do grão e o grau de seletividade afetam fortemente quão poroso é um sedimento, por exemplo a circulação da água através de sedimentos finos, é extremamente restrita, limitando o suprimento de oxigênio para esse micro – hábitat entre os grãos, ocorrendo a seletividade das comunidades microbiológicas (Figura 1) (CASTRO; HUBER, 2012).



**Figura 1.** Imagem ilustrativa da classificação do sedimento de acordo com o tamanho das partículas. A seleção refere-se à uniformidade do tamanho do grão em relação a circulação da água intersticial. Fonte: CASTRO; HUBER (2012).

Este ambiente desempenha um papel essencial na manutenção da biodiversidade marinha (CURY, 2002). A disponibilidade de nutrientes no início da cadeia trófica ocorre pela atividade microbiana, principal via de ciclagem de nutrientes do manguezal, formando a base da cadeia alimentar da flora e fauna deste sistema, atuando na decomposição da matéria orgânica e de outros compostos (HANSON; HANSON, 1996; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). As bactérias e fungos constituem 91% da biomassa dos sedimentos de manguezais (ALONGI, 1988). A biomassa varia de acordo com o tipo de sedimento, sendo quantidades maiores vistas em regiões litorâneas rasas,

diminuindo rapidamente com a profundidade (GHIZELINI; MENDONÇA-HAGLER; MACRAE, 2012).

Devido às suas características peculiares, os sedimentos de manguezais possuem uma transição da zona aeróbica para anaeróbica. Outras características são as temperaturas elevadas, os altos níveis de salinidade, o alto pH, altos níveis de matéria orgânica e baixa aeração e umidade. Essa combinação proporciona infinitas condições de nichos extremamente pequenos com a presença de associação entre as comunidades (GHIZELINI; MENDONÇA-HAGLER; MACRAE, 2012). O estudo sobre a ocorrência e a distribuição dos microrganismos ao longo da profundidade, combinado com a atividade metabólica pode auxiliar a elucidar a forma como esses microrganismos lidam com esses desafios específicos (RAVENSCHLAG *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2009). Devido a estas características, é encontrada uma gama extremamente diversificada de bactérias, comunidade procariótica complexa, muito parecida com a encontrada em água do mar (maioria rara ou até ausente na água). As comunidades são classificadas por diversos grupos de acordo com a morfologia, sequência genética e bioquímica, ocorrendo as três principais Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Alphaproteobacteria, seguidas dos demais grupos Firmicutes, Actinobacteria e Bactérias verdes não sulfurosas. As (gama e beta) proteobactérias são os filos bacterianos dominantes da superfície do sedimento (0-5 cm), correspondendo a mais de 50 % da biomassa microbiana, sendo associadas a vários processos redutores de enxofre (GONZALEZ; MORAN, 1997; RAVENSCHLAG *et al.*, 1999, 2000; RAPPE; KEMP; GIOVANNONI, 1997; CAMPBELL *et al.*, 2001; ETTOUMI *et al.*, 2010; BOWMAN; MCCAMMON; DANN, 2005). A importância ecológica potencial destes grupos é discutida em relação à sua abundância, distribuição e a possível ocorrência de formas simbióticas e de vida livre (RAVENSCHLAG; SAHM; AMANN, 2001).

Por serem extremamente importantes para a disponibilização de nutrientes para o ambiente, promovendo a redução do sulfato, principal processo bacteriano em sedimentos marinhos, e atuando em até 50 % do ciclo do carbono orgânico, mais estudos sobre a comunidade bacteriana nos manguezais são necessários. Estas comunidades podem conter reservatórios genéticos para a pesquisa e o desenvolvimento de produtos biotecnológicos,

levando-se em conta que bactérias de diferentes grupos taxonômicos podem compartilhar ou ter papéis funcionais semelhantes (MENEZES *et al.*, 2010; PEIXOTO *et al.*, 2011; TAKETANI *et al.*, 2010).

## 2.2 Bioprospecção

O artigo 7º da Medida Provisória nº 2.186-16/2001 define bioprospecção como qualquer atividade exploratória que visa identificar componente do Patrimônio genético e informação sobre conhecimento tradicional associado, com potencial uso comercial.

Estudos de bioprospecção exploram e avaliam os materiais biológicos em busca de novos produtos valiosos geneticamente e com possíveis propriedades bioquímicas para o uso em humanos. A aplicação dos produtos biológicos são explorados na indústria farmacêutica, na agroquímica, de cosméticos, de aromas e fragrâncias, entre outras (ARTUSO, 2002; REID *et al.*, 1993).

Os investimentos do mercado competitivo na busca e desenvolvimento de bioativos de excelência de produção pode ser uma estratégia acertada no que tange a intensificação da conservação da biodiversidade natural, assim como da comunidade local. Essa ação pode fornecer acesso a fontes adicionais de ajuda ao desenvolvimento (ARTUSO, 2002).

Por meio da bioprospecção, países em desenvolvimento são confrontados com a oportunidade de ganho em moeda estrangeira, de forma relativamente fácil, e com isso têm a oportunidade de promover a conservação dos recursos bioquímicos de forma sustentável (DHILLION *et al.*, 2002). Estas atividades serão recorrentes, exigindo o desenvolvimento de produtos e serviços diferenciados, harmonizados com os conhecimentos dos povos indígenas e comunidades autóctones, alinhadas com pesquisas junto às instituições de pesquisa (ARTUSO, 2002).

Em alguns países, projetos de preservação ocorrem por meio da bioprospecção, como no caso da Costa Rica. Em 1999, a empresa farmacêutica Merck & Co e o *Instituto Nacional de Biodiversidad* (INBio), acordaram em contribuir com 10 % do orçamento e 50 % dos royalties para o Governo da Costa Rica para a conservação dos parques nacionais (DHILLION *et al.*, 2002). Em Cingapura, a Universidade Nacional criou o Instituto Nacional

de Biologia Molecular e Celular (IBMC), com financiamento público para o desenvolvimento de novos processos bioquímicos (ARTUSO, 2002). O Brasil, que possui cerca de 20 % da biodiversidade mundial (SOUZA *et al.*, 2004), a mais importante empresa de bioprospecção, a Extracta Moléculas Naturais S.A., foi criada em 1998 dentro da Fundação Bio Rio, uma incubadora de biotecnologia no Rio de Janeiro, voltada para fármacos (DIAS; COSTA, 2007).

Os microrganismos geralmente são vistos como agentes patogênicos, principalmente os fungos e as bactérias. Entretanto, estes também são úteis na produção de substâncias químicas de interesse. Na área da saúde, por exemplo, as actinobactérias endofíticas e actinobactérias marinhas do gênero *Streptomyces* apresentaram capacidade de produzir compostos com propriedades antibacterianas significativas, além de atividade citotóxica em células cancerígenas (MORAIS *et al.*, 2014).

Na área ambiental, a técnica conhecida como biorremediação utiliza microrganismos para transformar contaminantes em substâncias inertes (HOLLIGER *et al.*, 1997) em um processo que apresenta baixo consumo de energia, causando poucas mudanças nas características físicas, químicas e biológicas do ambiente (TONINI; DE REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), utilizados para fabricação de corantes, de fibras sintéticas e preservantes de madeira podem ser recuperados pela biorremediação, por meio de microrganismos que utilizam os compostos contaminantes como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Neste processo são necessárias várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HAPs em intermediários comuns das suas rotas catabólicas (JACQUES *et al.*, 2007).

Segundo Holguin *et al.* (2001) os fungos que decompõem a matéria orgânica do manguezal possuem enzimas como pectinase, protease e amilase. As enzimas vêm ganhando amplo destaque no mercado financeiro, movimentando aproximadamente cinco milhões de dólares em 2012, com previsão de crescimento de 6,3% ao ano (GRUPO FREEDONIA, 2014). Este mercado engloba enzimas usadas para aplicação em produção de alimentos e detergentes, no tratamento biológico de águas residuais, em medicamentos e cosméticos (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010; BURKERT; MAUGERI; RODRIGUES, 2004).

Os microrganismos de origem marinha no Brasil possuem grande potencial biotecnológico, sendo encontrados em vários ecossistemas. Segundo Dias e colaboradores (2009) foram isoladas 238 bactérias do manguezal da Ilha do Cardoso (SP) que apresentaram diferentes perfis de atividade enzimática como amilolítica, proteolítica, lipolítica e esterásica, sugerindo grande potencial biotecnológico. A Baía da Guanabara, no Rio de Janeiro, foi alvo de diversos estudos voltados ao isolamento e caracterização de consórcios de bactérias hidrocarbonoclasticas (*Marinobacter*, *Alcanivorax* e *Sphingomonas*) (BRITO *et al.*, 2006, 2009; MACIEL-SOUZA *et al.*, 2006)

Os estudos do manguezal brasileiro, na sua grande maioria estão localizados no sudoeste do país, direcionados para bioprospecção microbiana em áreas contaminadas, utilizando meios seletivos enriquecidos com o poluente de interesse (BRITO *et al.*, 2006, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2011; MACIEL-SOUZA *et al.*, 2006; PEIXOTO *et al.*, 2011; TAKETANI *et al.*, 2010; WASSERMAN *et al.*, 2006).

Dentre os produtos de interesse industrial intensamente bioprospectados encontram-se os biossurfactantes e as enzimas degradadoras de lipídeos chamadas de lipases.

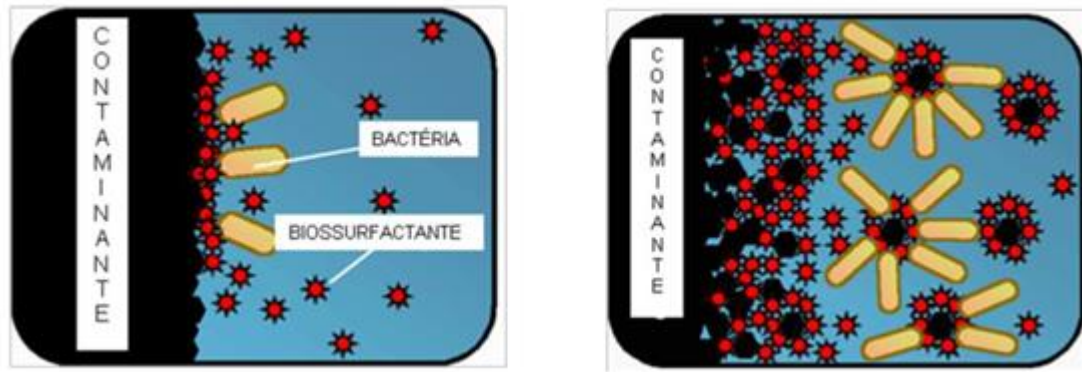
### **2.3 Biossurfactantes**

São denominados biossurfactantes os compostos de origem vegetal e microbiana que exibem propriedades surfactantes (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998) reduzindo a tensão superficial ou interfacial, agindo como emulsionantes.

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (DESAI *et al.*, 1994).

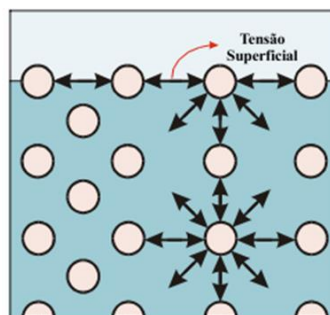
Quando são excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano, auxiliam o transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular (BOGNOLO, 1999). Na fase exponencial ou na fase estacionária, no momento de alta densidade celular, ocorre maior liberação dos biossurfactantes (CAMEOTRA; MAKKAR, 1998). Porém, alguns microrganismos mantêm os biossurfactantes associados à parede celular

(Figura 2), facilitando a penetração dos hidrocarbonetos no espaço periplasmático (KOCH *et al.*, 1991).



**Figura 2.** Imagem ilustrativa da ação dos biossurfactantes sobre petróleo. A) biossurfactante excretados no meio de cultivo durante o crescimento microbiano. B) biossurfactantes associados à parede celular. Fonte: SILVA (2001).

A característica da redução das tensões superficial e interfacial é o resultado das ligações de hidrogênio, que são forças intermoleculares causadas pela atração dos hidrogênios (polos positivos ( $H^+$ )) com os oxigênios das moléculas vizinhas (polos negativos ( $O^-$ )). Estas moléculas se atraem mutuamente com a mesma força por todo o líquido. Porém às moléculas da superfície não apresentam moléculas acima delas, e suas ligações de hidrogênio se restringem às moléculas ao lado e abaixo (Figura 3). Essa desigualdade de atrações na superfície cria uma força chamada tensão superficial, formando uma película elástica na superfície da água (PIRÔLLO, 2006; DESAI; BANAT, 1997)



**Figura 2.** Esquema ilustrando as forças intermoleculares no interior e na superfície de um líquido. Fonte: PIRÔLLO (2006).



A tensão superficial da água destilada é 72 mN/m, e a adição de surfactante reduz este valor para 30 mN/m. Em solução aquosa ou em mistura de hidrocarbonetos, auxiliam na dispersão de um líquido em outro, como óleo em água (BUENO, 2008; DESAI; BANAT, 1997, MULLIGAN, 2005). A eficiência da quebra da tensão está associada a estruturas supramoleculares como micelas, bicamadas e vesículas.

No caso da emulsão, consiste em um sistema heterogêneo contendo pelo menos um líquido imiscível intimamente disperso em outro sob a forma de gotículas, cujo diâmetro em geral excede 0,1 mm. O sistema possui uma estabilidade mínima (meses ou anos), que pode ser acentuada por aditivos tais como agentes tensoativos (surfactantes), perfazendo dois perfis de emulsão (óleo em água ou água em óleo) (NITSCHKE; COSTA, 2007; VELIKONJA; KOSARIC, 1993).

Os biossurfactantes mostram várias propriedades, tornando-se úteis em muitos campos da indústria, sendo que suas características particulares sugerem uma possível aplicação como ingredientes ou aditivos multifuncionais.

### **2.3.1 Aplicações dos Biossurfactantes**

Segundo Kosaric (2001), as vantagens de uso, com as características de alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, eficácia em condições extremas de temperatura, pH e salinidade em relação ao surfactante sintético, permite uma vasta aplicação na indústria (Quadro 1), com papel principal ou em segundo plano, como emulsionantes no processamento de matérias-primas.

Devido as propriedades físico-químicas, quase todos os surfactantes sintéticos (carboxilatos, sulfonatos e ésteres de ácido sulfatado) atuam especialmente na indústria petroquímica, indústria alimentar e farmacêutica (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000; DESAI; BANAT, 1997; VAN DYKI *et al.*, 1991).

Entretanto, com os rápidos avanços da biotecnologia e o aumento das preocupações ambientais entre os consumidores, aliado ao surgimento de novas legislações (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000), o interesse em surfactantes de origem microbiana tem crescido.

Na área ambiental, destaca-se o uso dos biossurfactantes na biorremediação, dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e na recuperação de petróleo (RAHMAN *et al.*, 2002b; BUENO, 2008; VATER, 1986). Na agricultura, podem ser utilizados para obter uma distribuição uniforme de fertilizantes e na formulação de herbicidas e pesticidas (ROSENBERG; RON, 1999).

Na área da saúde, possui várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, a formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana, antiviral, antitumoral e antifúngica e inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas (PEYPOUX *et al.*, 1999).

Na indústria de alimentos, possuem aplicação em panificação e produtos derivados de carne, influenciando nas características da farinha e na emulsificação de gorduras, para formulações de sorvetes e cremes (NITSCHKE; COSTA, 2007; BUENO, 2008).

**Quadro 1.** Principais aplicações comerciais dos Biossurfactantes.

<b>Funções</b>	<b>Campo de aplicação</b>
<b>Emulsionantes e dispersantes</b>	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos
<b>Solubilizantes</b>	Produtos farmacêuticos e de higiene
<b>Agentes molhantes e penetrantes</b>	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
<b>Detergentes</b>	Produto de limpeza e agricultura
<b>Agentes espumantes</b>	Produtos cosméticos e flotação de minérios
<b>Agentes espessantes</b>	Tintas e alimentos
<b>Sequestrantes de metais</b>	Mineração
<b>Formadores de vesículas</b>	Cosméticos
<b>Fator de crescimento microbiano</b>	Tratamento de resíduos oleosos
<b>Desemulsificantes</b>	Recuperação de petróleo
<b>Redutores de viscosidade</b>	Transporte em tubulações
<b>Dispersantes</b>	Mistura carvão-água; calcário-carvão

Fonte: Adaptado de BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA (2000)

### 2.3.2 Microrganismos produtores de biossurfactantes

O crescente interesse na produção de surfactantes microbianos têm permitido o desenvolvimento de métodos quantitativos e qualitativos rápidos e eficientes para a seleção e análise de organismos produtores de biossurfactantes (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998; JENNINGS; TANNER, 2000; SIEGMUND; WAGNER, 1991; YOUSSEF *et al.*, 2004). As técnicas empregadas segundo a literatura correspondem ao método do anel de Platina (Du Nouy), teste de colapso de gota, lâmina de vidro inclinada, hemólise (meio ágar sangue) e teste colorimétrico (YOUSSEF *et al.*, 2004; BENTO *et al.*, 2005; BODOUR; MAIER, 1998, 2002).

Os biossurfactantes encontrados por meio destas técnicas podem ser classificados com base em sua natureza bioquímica, origem microbiana e massa molar. As principais classes incluem: glicolipídeos, fosfolipídios, lipoproteínas e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e em partículas (DESAI; DESAI, 1997).

Para obter um ótimo rendimento, o potencial para a produção é determinado pela origem do microrganismo, além de outros fatores como condições ambientais e a natureza do substrato que influenciam no nível de expressão (RAHMAN *et al.*, 2002a), necessitando conhecimento da fisiologia, genética e bioquímica dos microrganismos produtores. No Quadro 2 são apresentados alguns dos principais biossurfactantes e os microrganismos que os produzem.

**Quadro 2.** Relação de biossurfactantes produzidos por microrganismos.

<b>Tipo de Surfactante</b>	<b>Microrganismo</b>
Lipídios de Trehalose	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp.
Ramnilipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. AB-2 <i>Serratia rubidea</i>
Lipídios de Soporoso	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
Glicolípídeos	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurella</i> sp.
Lípidos de Celobiose	<i>Ustilago maydis</i>
Lipídios de polioli	<i>Rhodotorula glutinus</i> , <i>Rhodotorula graminus</i>
Diglicósidos diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lipopolissacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1), <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida lipolytica</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.
Sulfonilipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium Alkanolyticum</i>
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>

Fonte: Adaptado de MULLIGAN (2005); NITSCHKE; PASTORE (2002).

Dentre os microrganismos, as bactérias extremófilas sobressaem-se em habitats salinos e hipersalinos, altas temperaturas e pH (ZAHARAN, 1997), tornando-se as mais indicadas como produtoras de biossurfactantes, principalmente os isolados encontrados em solos contaminados por hidrocarbonetos e por bactérias de ecossistema marinho (COELHO *et al.*, 2003; JENNINGS; TANNER, 2000).

Um dos fatores limitantes para produção dos biossurfactantes relaciona-se ao tipo de substrato disponível, associado com o problema ou situação a ser aplicada. Como o caso dos óleos de frituras (óleo de coco, soja, milho,

azeitona, girassol), que são produzidos em grandes quantidades na indústria alimentícia e na escala doméstica, considerados substratos alternativos de baixo custo para a produção de Ramnolipídeos. Segundo Nitschke *et al.* (2005), *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de produzir 11,7 g/L de ramnolipídeo, com 75 % de rendimento utilizando substrato *soapstock* (refino químico do óleo bruto). Para Benincasa; Contiero; Manresa; Moraes (2002), a produção de surfactante final rendeu 12 g/L em fermentação submersa utilizando frascos agitados e 16 g/L em biorreator (Braun Biotech International) ambos também utilizados como substrato *soapstock*.

Devido a sua alta atividade emulsificante e sua atuação na redução da tensão superficial, os ramnolipídeos podem ser aplicados como agentes solubilizantes de compostos hidrofóbicos, na remoção de metais pesados por meio do processo de biorremediação (DÉZIEL *et al.*, 2003; LANG; PHILP, 1998; BRAUD *et al.*, 2006; WEI; CHOU; CHANG, 2005) e para lavagem do solo (MAIER; SOBERÓN- CHÁVEZ, 2000).

Microrganismos do gênero *Bacillus* são versáteis, tornando-os os mais estudados por produzirem surfactantes lipoprotéicos como iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina, bacilomicina e surfactina (BARROS *et al.*, 2007). Dentre estes, a surfactina possui um potencial de redução da tensão superficial da água para 28 mN/m utilizando o glicerol e glicose como substratos (BUGAY, 2009), ocorrendo também com naftaleno e gasolina (MARTINEZ-TOLEDO *et al.*, 2006; BENTO *et al.*, 2005). A aplicabilidade da surfactina ocorre também na área da saúde, inibindo tumores, agindo contra as bactérias, fungos e vírus (VOLLENBROICH *et al.*, 1997; QUEIROGA; NASCIMENTO; SERRA, 2003; LANG, 2002; BARROS *et al.*, 2007).

Dentre outros biossurfactantes com aplicação na área da saúde, estão os glicolipídeos e lipopeptídeos, produzidos por microrganismos oriundos de sedimentos marinhos, conhecidos como *Streptomyces* sp. e *Bacillus circulans* (GUDIÑA *et al.*, 2016).

Em alguns casos, o cultivo em laboratório por bactérias marinhas em cultivo submerso se torna difícil, fazendo-se necessária a fermentação em estado sólido ou o uso de hospedeiros heterólogos. Lawrance e colaboradores (2014) reportaram a clonagem e expressão de três genes (*sfp*, *sfpO* e *srfA*) envolvidos na biossíntese de biossurfactantes pela bactéria marinha *Bacillus*

*licheniformis*, em *Escherichia coli*, resultando no aumento da produção de biossurfactante de 3 mg/mL para 11,7 g/L com petróleo bruto de substrato.

Algumas pesquisas têm como objetivo bioprospectar bactérias produtoras de biossurfactantes utilizando substratos disponíveis nos ambientes contaminados com petróleo. Cai e colaboradores (2014) estudaram oito gêneros de bactérias, sendo: *Alcanivorax*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*. *Acinetobacter* apresentou a mais alta taxa de emulsificação (maior que 50%), com 0,67 g/L de biomassa usando petróleo como fonte de carbono.

Vários substratos (glicerol, glicose, amido, sacarose, querosene, petróleo, óleo de coco etc.) podem ser utilizados como fonte de carbono na produção de biossurfactantes. Segundo Sarafin e colaboradores (2014), as melhores atividades emulsificantes foram obtidas por *Halococcus* sp. utilizando querosene (70,90 %) e azeite (65,12 %). Já *Kocuria marina* BS-15 alcançou a maior atividade emulsificante utilizando óleo de girassol (63,27 %) e óleo de coco (56,06 %).

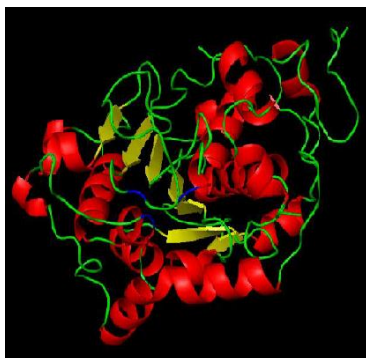
## 2.4 Lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases - E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxílicas de triacilgliceróis a fim de liberar ácidos orgânicos e glicerol (BERGLUND, 2001). São biocatalisadores responsáveis por catalisar reações de hidrólise de óleos em ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

São comumente encontradas nos animais (lipases pancreática, hepática e gástrica), em vegetais (extraída da soja, do centeio e do algodão) e em microrganismos (bactérias e fungos) (COSTA; DE AMORIM, 1999). As lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento, como a vegetal e animal (BENASSI *et al.*, 2012; MACHADO, 2011).

A estrutura da lipase apresenta um núcleo central composto por fitas  $\beta$  paralelas rodeado por porções em  $\alpha$ -hélice. As fitas  $\beta$  têm orientação para a esquerda, sendo que a primeira e a última fita são arrançadas em um ângulo de

aproximadamente 90° entre si (MACHADO, 2011). Essas enzimas atuam na interface água-óleo, catalisando, preferencialmente, a hidrólise de ésteres de ácidos graxos insolúveis em água, o que as diferencia de outras esterases que agem sobre ésteres solúveis (WHITAKER, 1972). Na Figura 4 está representada a estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica*.



**Figura 3.** Estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica*, enfatizando a tríade catalítica (em azul) e as estruturas secundárias alfa hélice e folha beta. Fonte: ROBERT (2015)

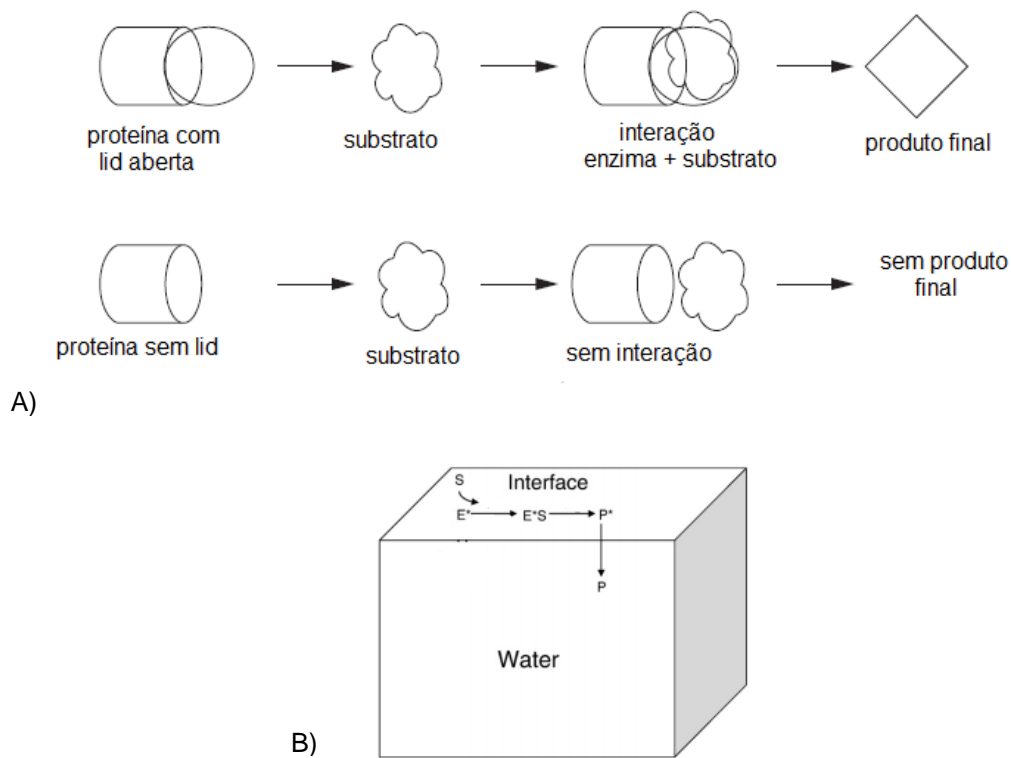
De modo geral, a massa molecular das lipases microbianas varia entre 20 e 60 kDa (MALA; TAKEUCHI, 2008). A lipase de menor estrutura conhecida pertence à bactéria anaeróbica *Propionibacterium acidipropionici* que apresenta massa molecular entre 6,0- 8,0 kDa (SARADA; JOSEPH, 1992). Uma exceção de massa molecular mais alta pode ser representada pelas lipases das bactérias psicrótróficas isoladas de sedimentos de mar profundo do Oeste Pacífico, *Psychrobacter* sp. wp37 e *Pseudoalteromonas* sp. wp27, cuja massa molecular apresentou 85 kDa (ZENG *et al.*, 2004).

As Lipases são classificadas em duas categorias principais de reações catalisadas: a hidrólise e a síntese, esta última com subcategorias: esterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise. As três últimas reações podem ser agrupadas em transesterificação a longo prazo (REIS *et al.*, 2009).

Seu funcionamento mantém o critério de ativação interfacial: a lipase é ativada quando em contato com a interface formada entre a água e o lipídio (VERGER, 1997). Na ausência da fase apolar, o subdomínio *Lid* (tampa) ou *Flap* (alça) da lipase permanece em uma conformação que cobre o sítio ativo da enzima, tornando a mesma inacessível para as moléculas do substrato. Quando a lipase entra em contato com a interface entre a água e o lipídio, ocorre uma mudança isométrica do subdomínio, causando o movimento da

tampa, expondo o sítio ativo, aumentando a interação hidrofóbica entre a enzima e a superfície do lipídeo (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991).

Na interface lipídica-água, a enzima ( $E^*$ ) liga-se a uma molécula de substrato (S), resultando na formação de um complexo enzima-substrato ( $E^*S$ ). Depois de dois processos catalíticos dimensionais, o produto ( $P^*$ ) é gerado e solubilizado na fase aquosa, conforme mostrado na Figura 5. Portanto, as reações são fortemente dependentes da atividade interfacial, cinética de difusão e disponibilidade dos substratos (REIS *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Modelo ilustrativo de ação da atividade de lipase. A) Modelo da ação da “lid” em relação à atividade enzimática. Fonte: PATNALA *et al.*, (2016). B) Modelo cinético para a ação da lipase em um substrato insolúvel. Fonte: Adaptado de REIS *et al.*, (2009)



As bactérias *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida antartica* apresentam lipases que possuem o domínio *lid*, porém não apresentam ativação interfacial (JAEGER *et al.*, 1993; NOBLE *et al.*, 1993; UPPENBERG *et al.*, 1994). Lipases de *Bacillus subtilis* não apresentam ativação interfacial e nem o domínio *lid* (EGGERT *et al.*, 2001) produzindo hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (VERGER, 1997).

Para aproveitar ao máximo estas enzimas, bem como compreender seus papéis biológicos, os modelos cinéticos devem levar em consideração os processos envolvidos na interface, como a reorganização molecular e a segregação dos produtos insolúveis (REIS *et al.* 2009).

#### **2.4.1 Aplicações das Lipases**

As lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e especificidade pelo substrato, o que as tornam muito atraentes para aplicações industriais na confecção de papéis, na produção de alimentos, na formulação de detergentes, na obtenção de fármacos e na produção de biodiesel (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). O mercado de lipases está projetado para alcançar 590 milhões de dólares em 2020, num crescimento de 6,5% entre 2015 e 2020 (MARKETS e MARKETS, 2015).

A primeira utilização biotecnológica comercial ocorreu em 1994, com a Lipolase™, originada do fungo *Thermomyces lanuginosus* cujo gene da lipase foi expresso em *Aspergillus oryzae*. No ano seguinte, duas lipases bacterianas foram introduzidas - Lumafast™ de *Pseudomonas mendocinaand* e Lipomax™ de *Pseudomonas alcaligenes* (JAEGER; REETZ, 1998).

Devido à característica de versatilidade e de catalisar inúmeras reações, não apenas a hidrólise de triacilgliceróis, mas também reações de síntese reversa (esterificação, transesterificação e interesterificação) (OSORIO; GUSMÃO; DA FONSECA, 2001), as lipases são usadas em duas formas distintas: na elaboração de produtos químicos finos e como catalisadores biológicos para a fabricação de outros produtos (ingredientes alimentares) (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na indústria de alimentos, por meio da produção de ácidos graxos livres, as lipases são responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor e pela

síntese de ésteres em queijos e na panificação (AKIN *et al.*, 2003), além de sua aplicação nos produtos lácteos (queijo, manteiga, margarina, bebidas alcoólicas, chocolate com leite e doces) (JAEGER; REETZ, 1998).

Na área ambiental, nota-se a presença das lipases na produção e remoção da polpa produzida para a fabricação de papel, aplicando o método de controle usando a lipase fúngica de *Candida rugosa* (SHARMA *et al.*, 2001). No meio ambiente é considerado um indicador da biodegradação de óleo diesel em solos recém-contaminados, por degradar os resíduos de óleo no ecossistema costeiro (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Paralelamente a estas atuações, são extremamente úteis na indústria farmacêutica e química. Isoladas de *Streptomyces*, as *Lactonas* naturais (octalactinas), resultantes da reação de lactonização catalisada por lipases, apresentam atividade citotóxica contra células de melanoma e de tumor de cólon. Também apresentam efeito inibitório sobre a síntese do colesterol mediante a síntese de Lactonas (nonanolídeos), isoladas de *Penicillium* (LONGO JÚNIOR; BOMBONATO; FERRAZ, 2007).

O campo comercial mais importante para aplicação das lipases encontra-se na indústria de detergentes e limpeza (JAEGER; REETZ, 1998). A principal vantagem do uso de lipases nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais, (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), além de facilitarem os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água (PANDEY *et al.*, 1999).

Dada a importância da lipase, a enzima é encontrada em vários outros setores industriais (Quadro 3), necessitando cada vez mais estudos direcionados para a alteração do meio de produção de modo a otimizar a obtenção e a excreção de lipases (LIMA *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2003).

**Quadro 3.** Aplicações industriais de lipases microbianas.

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto ou Aplicação</b>
Detergentes	Hidrólise de gordura	Remoção de resíduos oleoso de tecidos
Laticínios	Maturação do queijo; Hidrólise de gordura do leite; Modificação de manteigas	Desenvolvimento de agentes <i>flavorizantes</i> no queijo, no leite e manteiga
Panificação	Melhorar o <i>flavour</i>	Prolongar o tempo de prateleira
Bebidas	Melhorar o aroma	Bebidas
Alimentos	Melhora da qualidade	Maionese e molhos; Alimentos saudáveis
Carne e Peixe	Desenvolvimento de <i>flavour</i>	Remoção de Gorduras
Óleos e Gorduras	Transesterificação; Hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, diglicerídeos
Farmacêutica	Transesterificação; Hidrólise	Lípideos especiais, remédios para digestão
Cosméticos	Síntese	Emulsionantes e cremes
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Papel com qualidade

Fonte: Adaptado de SHARMA *et al.*, (2001); HOUDE (2004).

### 2.4.1 Microrganismos produtores de Lipase

A produção de lipases por microrganismos tem sido desenvolvida principalmente por fermentação submersa (FS) (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), com eficácia, mas de custo elevado de produção, contudo com a facilidade de controlar parâmetros como pH, temperatura e oxigenação. Para redução de custos, opta-se pela fermentação em estado sólido (FES), no entanto, ocorre a limitação de transferência de massa, além da dificuldade de monitorar e controlar os parâmetros operacionais (PANDEY, 2003; BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Normalmente, para bactérias e leveduras, é recomendada a fermentação submersa (FS) porque as bactérias requerem alto teor de umidade, enquanto os fungos podem ser cultivados tanto em FS ou FES (PATNALA *et al.*, 2016)

A estrutura química e as características cinéticas das lipases microbianas variam dependendo do microrganismo, gênero e espécie

(MESSIAS *et al.*, 2011). A lipase de *Bacillus megaterium* apresentou temperatura ótima de reação a 55 °C (LIMA *et al.*, 2004), enquanto outras lipases bacterianas, como a de *Bacillus stearothermophilus* MC 7, apresentaram atividade máxima acima dos 70 °C (KAMBOUROVA *et al.*, 2003). Isso demonstra que para cada microrganismo pode haver uma aplicação diferente (Quadro 4), ainda que o mesmo produto seja a lipase.

**Quadro 4.** Microrganismos produtores de lipase e suas aplicações.

<b>Microrganismo</b>	<b>Aplicação</b>
<i>Candida antarctica</i>	Biocatalisador na produção de ésteres flavorizantes
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> L62	Produção de biodiesel
<i>Rhizopus oryzae</i>	Emulsificantes e surfactantes na indústria de alimentos; atividade antimicrobiana e antioxidante
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Síntese orgânica
<i>Photobacterium lipolyticum</i>	Produção de biodiesel
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biocatalisador

Fonte: Adaptado de MESSIAS (2011); PAQUES (2006); ROBERT (2015).

A produção de lipase bacteriana é influenciada por mais de um fator (PATNALA *et al.*, 2016). Além do pH e da temperatura, a produção de lipases bacterianas, sofrem alterações por fontes de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos, oxigênio e detergentes (KIRAN *et al.*, 2014). Sendo uma enzima induzível, na presença de fontes lipídicas, como ácidos graxos, Tween, ésteres hidrolisáveis, triacilgliceróis, torna-se rápida a detecção do seu efeito. Já as bactérias marinhas *Psychrobacter submarinus* e *Psychrobacter maricola*, apresentaram atividade positiva para lipase em contato com Tween 40 e 80 (ROMANENKO *et al.*, 2002).

Sob o mesmo ponto de vista da produção, certas lipases microbianas do gênero *Candida* possuem ótimas habilidades de esterificações sem especificidades de posições para triglicerídeos e a lipase possui potencial de aplicação na síntese de ésteres de cadeia curta como compostos para biocombustíveis (biodiesel) (TAN *et al.*, 2003).

Membros do gênero *Bacillus* são onipresentes e conhecidos por produzirem uma gama de enzimas que têm potencial para aplicações industriais. A lipase extracelular produzida por *B. smithii* isolado de sedimento

marinho, apresentou massa molecular 45 kDa e atividade máxima de 210 U/mL na temperatura ideal de 50 °C, decaindo após 60°C, utilizando p-nitrofenil butirato (pNPB) como substrato (LAILAJA; CHANDRASEKARAN, 2013).

Wang e colaboradores (2009) utilizaram a bactéria *Pseudomonas monteilii* TKU009 com o intuito de conferir qual o melhor meio de cultivo para a produção de lipase. O melhor resultado (1,81 U/mL) foi alcançado com 125 mL de meio de cultivo contendo 2 % de farelo de soja, no quarto dia de incubação, com pH 9,5 e temperatura de 25 °C. A adição de Triton X-100 e Tween 40 resultou no aumento da atividade de lipase em 354 % e 132 %, respectivamente, quando comparado à atividade obtida no controle (1,81 U/mL).

Dheeman; Frias; Henehan (2010) avaliaram Triton X-100 e Tween 20 a 80 (20, 40, 60 e 80) para a produção de lipase por *Amycolatopsis mediterranei* DSM 4330. Os resultados mostraram que a maior atividade foi encontrada quando Tween 80 foi utilizado (0,067 U/mL) e a menor, quando Triton X-100 foi utilizado (0,016 U/mL). Os autores também observaram que a atividade máxima de lipase (0,128 U/mL) foi encontrada quando a concentração celular foi máxima (0,16 mg/mL), em 96-120 h de cultivo, pH em torno de 8,0-9,0, utilizando óleo de linhaça como substrato.

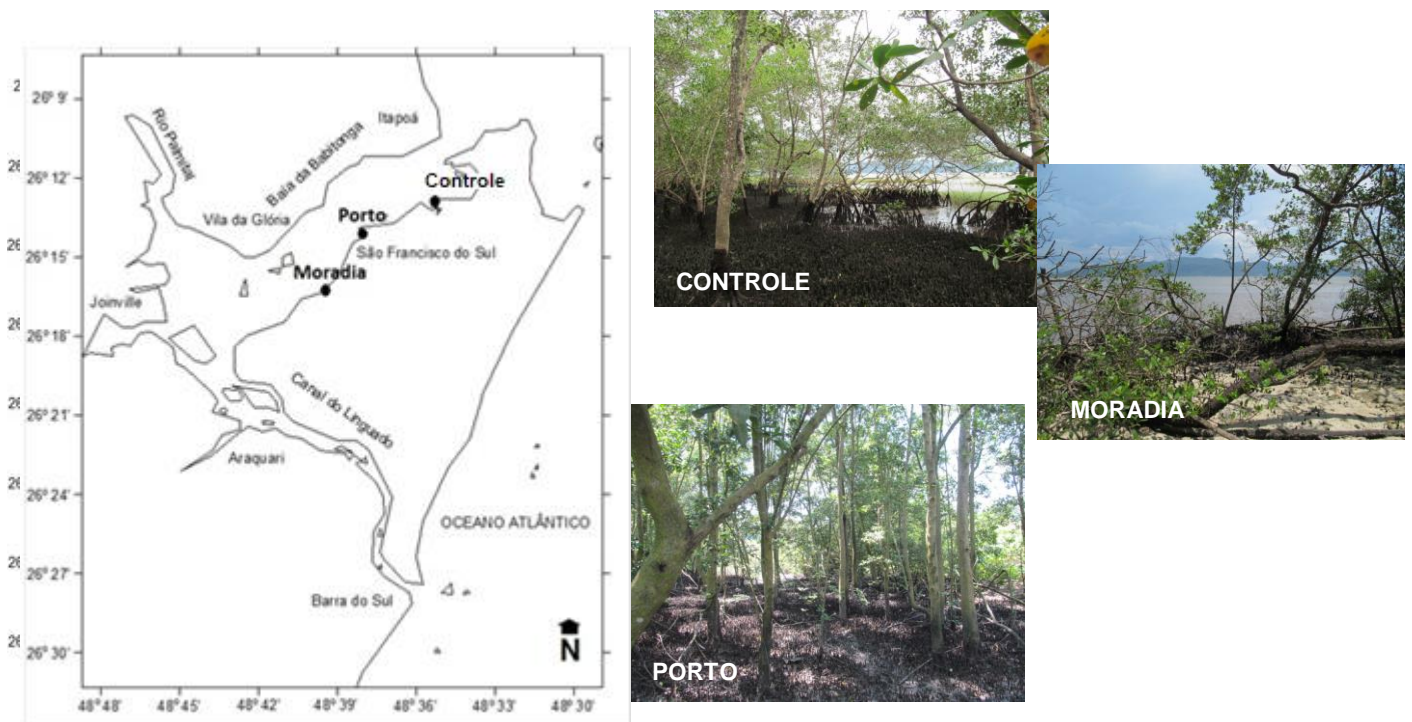
Burkert e colaboradores (2004) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para otimizar a concentração de nutrientes no meio de cultura para a produção de lipases por *Geotrichum* sp. A composição do meio que levou a melhor produção de lipase (20 U/L) foi 2,1 a 2,5 % de nitrato de amônio, 13 a 15% de água de maceração de milho e 0,6 % de óleo de soja como fonte de carbono. Utilizando óleo de oliva, a atividade máxima alcançada foi de 17 U/mL.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Áreas de estudo

O manguezal estudado está localizado na Baía Babitonga, maior complexo estuarino do Estado de Santa Catarina, com uma área de aproximadamente 160 km<sup>2</sup>. Sua bacia hidrográfica atinge mais de 1.560 km<sup>2</sup>, drenando os terrenos dos seis municípios do entorno: São Francisco do Sul, Itapoá, Barra do Sul, Araquari, Joinville e Garuva (CREMER; MORALES; OLIVEIRA, 2006).

Os pontos selecionados estão localizados na mesma linha da baía, a fim de minimizar os efeitos de possíveis diferenças de salinidade pela ação das marés e aporte dos rios (Figura 6).



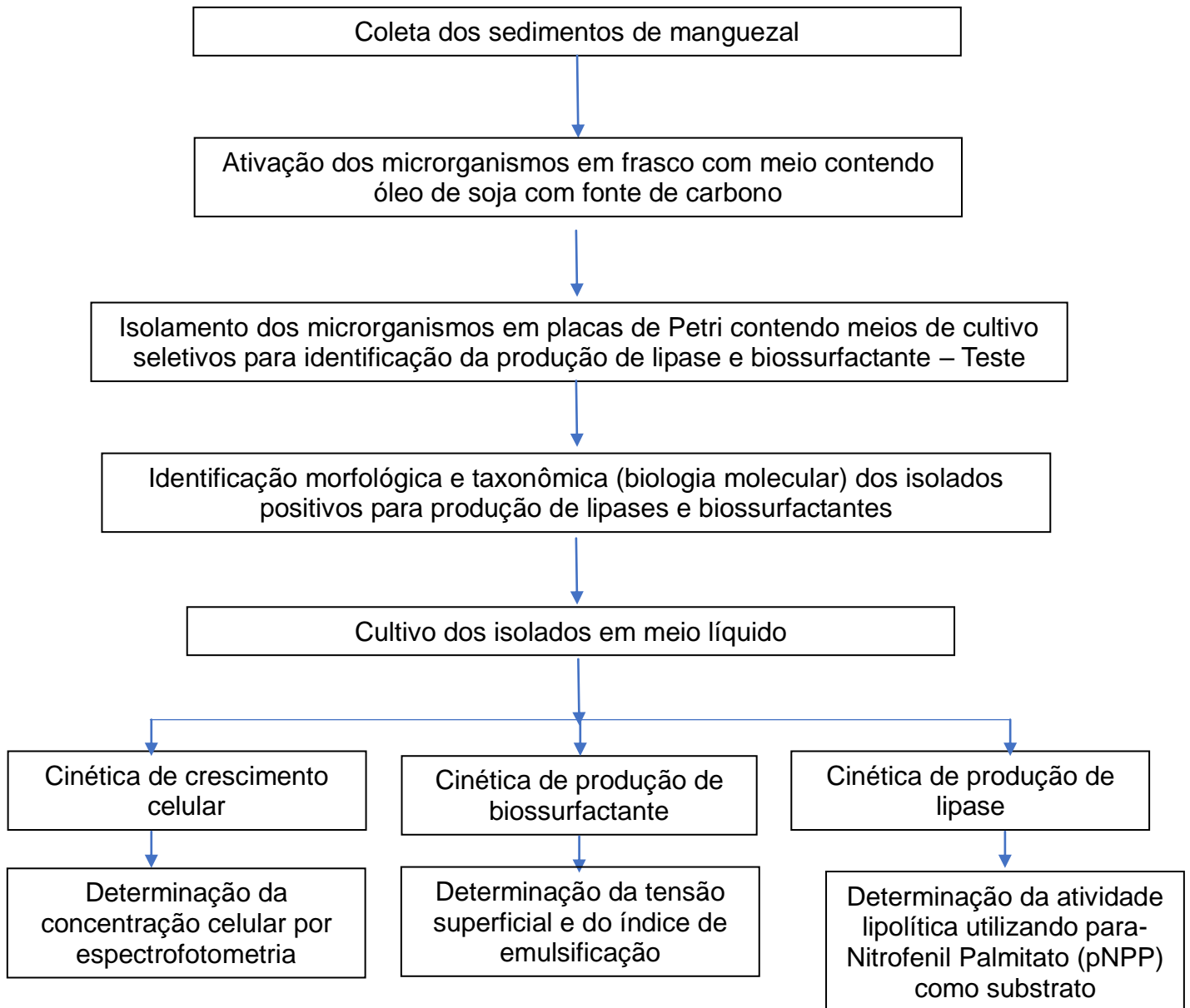
**Figura 5.** Mapa da Baía Babitonga – Santa Catarina, com a localização dos pontos selecionados para amostragem. Fonte: Mapa – LORENZI (2016). Fotos dos pontos selecionados (Controle, Porto, Moradia) - a autora (2017)

Três pontos foram selecionados no manguezal da Baía Babitonga. Um ponto localizado na região do Saco do Iperoba (S26° 12.907' W048° 35.661), onde não há supressão de vegetação e nem moradias em seu entorno, sendo o ponto com o menor impacto possível na região, considerado como **controle**. O segundo ponto, denominado **porto** (S26° 14.431' W048° 38.272), está localizada próximo ao Porto de São Francisco do Sul, uma área com intenso

fluxo de embarcações e que passa por dragagens a cada 22 meses (PETCON, 2003). O último ponto, chamado de **moradia** (S26° 15.701' W048° 38.852), está localizado na Praia do Lixo, e sofre com a influência da construção de residências e despejo constante de esgoto doméstico.

Os pontos de manguezal selecionados localizam-se na zona de franja do bosque (CINTRON; SCHAEFFER-NOVELLI, 1985). Para diminuir a ação da variabilidade do ambiente, cada ponto foi composto de três sub-amostras de sedimento do manguezal, com um metro de distância entre si obtidas por um amostrador de 10 cm de comprimento, com 7 cm de diâmetro. Estas sub-amostras foram homogeneizadas *in situ* e armazenadas em tubos Falcon (50 mL) esterilizados e devidamente etiquetados. As amostras foram imediatamente resfriadas e transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo e levadas para o Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) para congelamento a -80 °C.

Para uma melhor compreensão do trabalho, um diagrama esquemático dos experimentos realizados é apresentado na Figura 7.



**Figura 6.** Diagrama esquemático da metodologia utilizada no trabalho. Fonte: a autora



## 3.2 Seleção e isolamento dos microrganismos

### 3.2.1 Enriquecimento em meio de cultura líquido

Dos três pontos do manguezal selecionados (Controle, Porto e Moradia), retirou-se 1g de amostra para inoculação no meio de enriquecimento (Figura 8).

Para a seleção de microrganismos com potencial para produzir biossurfactantes e lipases, utilizou-se a técnica de enriquecimento de culturas (COSTA *et al.*, 2009). Em ambos os casos, foi utilizado o meio *Marine Broth* (DIFCO) composto de 5,0 g de Peptona, 0,008 g de Fosfato Dissódico, 1 g de Extrato de Levedura, 0,016 g de Nitrato de Amônio, 0,1 g de Citrato Férrico, 19,45 g de Cloreto de Sódio, 5,9 g de Cloreto de Magnésio, 3,24 g de Sulfato de Magnésio, 1,8 g de Cloreto de Cálcio, 0,55 g de Cloreto de Potássio, 0,16 g de Bicarbonato de Sódio, 0,08 g de Brometo de Potássio, 0,034 g de Cloreto de Estrôncio, 0,022 g de Ácido Bórico, 0,004 g de Silicato de Sódio e 0,0024 g de Fluoreto de Sódio, dissolvidos em um litro de água destilada e autoclavado a 121 °C e 1 atm durante 15 minutos. Como fonte de carbono, o meio foi adicionado de 1% de óleo de soja. Um grama de cada amostra foi inoculado em frascos de Erlenmeyer, com volume de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo e incubados sob agitação de 180 min<sup>-1</sup> (movimento rotatório) em temperatura de 30°C e por um período de 48 horas, visando isolar microrganismos mesófilos.

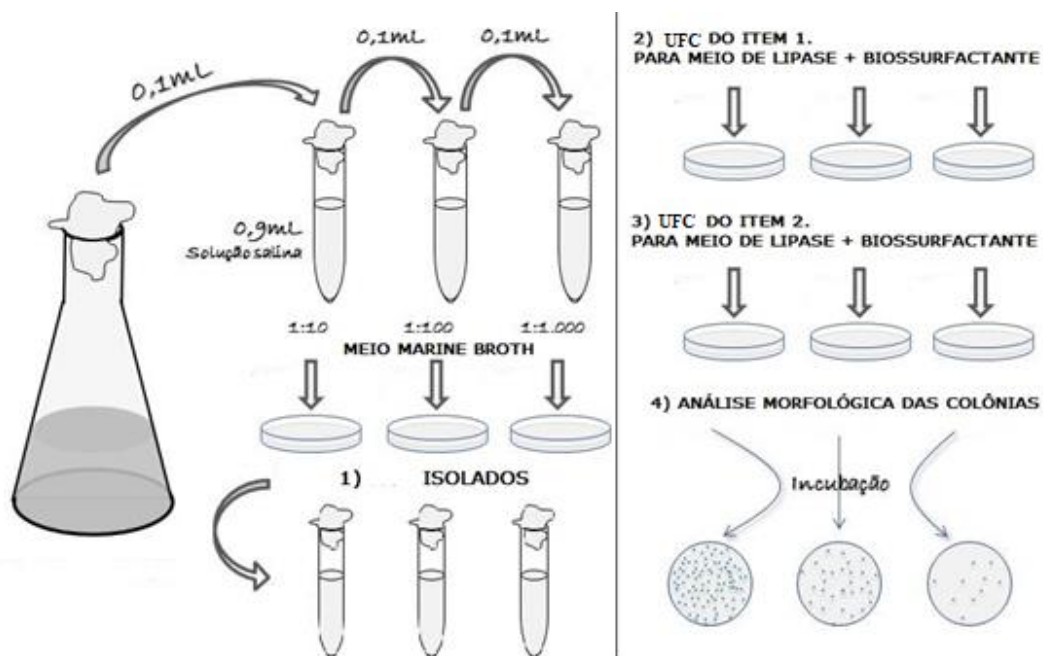


**Figura 7.** Amostra do sedimento e ativação dos microrganismos. A) Amostra do sedimento do manguezal pesado. B) Meios de enriquecimento líquido com 1 % de óleo de soja inoculado com 1 g de sedimento do manguezal (controle, moradia e porto) após 48 horas. Fonte: a autora

### 3.2.2 Isolamento dos microrganismos

As culturas obtidas no meio de enriquecimento conforme reportado no item 3.2.1 foram submetidas à diluição seriada (1:10; 1:100 e 1:1000) em solução salina 0,9% em tubos de ensaio de 10 mL (Figura 9), e posteriormente isoladas em placas de Petri contendo o meio de cultura *Marine Broth* (DIFCO) (item 3.2.1) acrescido de 20 g/L de ágar e 1 % de óleo de soja como fonte de carbono (Figura 9). As placas foram incubadas em estufa na temperatura de 30 °C, por 48 horas.

Para obtenção de colônias puras, os microrganismos foram selecionados por meio da morfologia (coloração e forma da colônia) e posteriormente os diferentes isolados foram transferidos para tubos de ensaio com 10 mL de meio líquido *Marine Broth* (DIFCO) (item 3.2.1) com 1 % de óleo de soja, incubados em estufa na temperatura de 30 °C por 48 horas para o crescimento.



**Figura 8.** Imagem ilustrativa da técnica de diluição seriada e seleção de colônias puras pela técnica de esgotamento. UFC: Unidade Formação de Colônias. Fonte: a autora

### **3.2.3 Isolamento de microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes**

Após o período de incubação foi realizado o estriamento do meio contendo as colônias bacterianas em placas com meio seletivos para lipases e biossurfactantes, objetivando uma pré-seleção dos microrganismos.

### **3.2.4 Meio seletivo para Lipase**

O teste qualitativo de atividade de lipases em meio contendo o corante Rodamina B foi realizado seguindo o método de Kouker; Jaeger, 1987 modificado. O teste baseia-se no fato de que os ácidos graxos liberados pela hidrólise dos triacilgliceróis contidos no óleo de soja pelas lipases formam um complexo com a Rodamina B que emite fluorescência. As placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultivo composto de Rodamina B 0,001 % (m/v), *Marine Broth* 40,25 g/L, NaCl (4g/L), óleo de soja 2,5% (m/v), Tween 20 (2 g/L) e ágar (20 g/L) foram inoculadas de acordo com a técnica do estriamento e incubadas em estufa na temperatura de 30 °C, por 48 horas.

Após este período, as placas foram observadas sob a luz ultravioleta (365 nm) e as colônias que apresentaram halos alaranjados fluorescentes ao seu redor foram consideradas positivas para a produção de lipases.

### **3.2.5 Meio seletivo para Biossurfactantes**

Para a avaliação da produção de biossurfactantes, placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultivo Ágar Sangue, composto de mistura de peptonas (23 g/L), amido (1 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), Ágar (20 g/L), 5 % de hemácia de carneiro desfibrinada estéril (50 mL/L) (SIEGMUND; WAGNER, 1991) foram estriadas com o caldo de cultivo contendo as células e incubadas em estufa na temperatura de 30 °C, por 48 horas.

A produção do biossurfactantes nas placas de ágar sangue foi identificada pela presença de atividade hemolítica. O surgimento do halo claro ao redor das colônias, devido ao consumo do ferro presente nas hemácias, indica a ocorrência de  $\beta$ - hemólise (beta-hemólise) (YOUSSEF *et al.*, 2004).

### **3.3 Identificação dos microrganismos isolados**

As diferentes colônias isoladas que apresentaram resultados positivos para a produção de lipases e biossurfactantes foram identificadas por meio de técnicas da coloração de Gram, identificação da morfologia e identificação taxonômica, por meio de técnicas de biologia molecular.

#### **3.3.1 Morfologia**

De forma a selecionar as diferentes colônias isoladas nos meios seletivos para lipases e biossurfactantes, realizou-se a identificação parcial por meio do teste da coloração de Gram e das características morfológicas das colônias (forma e arranjo celular) (TRABULSI, 2008).

#### **3.3.2 Identificação taxonômica**

A identificação dos microrganismos isolados dos três pontos (controle, porto e moradia) positivos para lipase e biossurfactantes foi realizada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies AS. O principal marcador utilizado nesta identificação é o gene rRNA 16S para identificação taxonômica de bactérias. Após a extração do DNA seguem-se dois passos de preparo molecular das amostras onde são introduzidos *tags* no material genético purificado. Estes *tags* têm a finalidade de prover posteriormente a separação das amostras dentro do fluxo de análise computacional. A etapa seguinte ao preparo molecular é a realização do sequenciamento de DNA utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração “MiSeq” da Illumina. Posteriormente os dados são processados por um software Epiome especializado e carregados em uma plataforma específica para análise e interpretação dos resultados (CHRISTOFF *et al.*, 2017).

### **3.4 Avaliação da produção de biomassa, lipases e biossurfactantes**

Os microrganismos isolados e identificados foram submetidos a testes de avaliação quantitativa da concentração celular e da produção de lipases e biossurfactantes.

Inicialmente, as culturas selecionadas foram ativadas pela passagem de uma alçada de cada microrganismo para dois tubos de ensaio contendo 10 mL do meio líquido Marine Broth acrescido de 1% de óleo de soja (item 2.3.1) previamente esterilizados (121 °C, 1 atm, 20 min). Os tubos foram incubados à 30 °C sem agitação, por 24 h. Para cada cepa, o conteúdo total dos dois tubos (20 mL) foi utilizado para inocular um frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio líquido Marine Broth acrescido de 1% de óleo de soja. O frasco foi incubado à 30 °C, por 24 h, sendo então utilizado como inóculo. Posteriormente, 15 frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do mesmo meio de cultivo foram esterilizados à 121 °C e 1 atm, por 20 min e, após resfriamento, foram inoculados com 10 mL do inóculo e incubados a 30 °C e 120 min<sup>-1</sup>. A cada amostragem de tempo (0, 24, 48, 72 e 96 h) o conteúdo total de cada um dos três frascos era retirado (triplicata), acondicionado em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados, por 10 min, a 4 °C com 1.169 g (adaptado de Bueno (2008)). O sobrenadante foi congelado para posterior determinação da atividade de lipase e avaliação da presença de biossurfactante e as células utilizadas para determinação da concentração celular

### **3.4.1 Determinação da concentração celular**

As células resultantes da centrifugação de 45 mL de caldo de cultivo foram lavadas por meio da suspensão em 20 mL de água do pellet e submetidas a nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com água deionizada até seu volume original (45 mL), com agitação máxima (3000 rpm) em vortex Vision até completa dissolução e a absorbância da suspensão devidamente diluída foi lida em espectrofotômetro SP 2000 UV BEL, em comprimento de onda de 560 nm e relacionada com a concentração celular por meio de uma curva de calibração.

Para a construção da curva de calibração, 30 mL das células lavadas e ressuspensas em 45 mL de água deionizada provenientes do caldo de 96 h de cultivo foram dispostos em cadinhos de porcelana previamente secos em estufa a 105°C por 24 h e tarados. A suspensão foi mantida em estufa a 105 °C por 24 h e a massa de células secas foi pesada e sua concentração determinada em g/L. Paralelamente, o restante da suspensão foi diluído de

forma a obter-se uma absorbância aproximadamente igual a 0,5, medida a 560 nm. A partir desta suspensão diluída, foram preparadas diluições de 1:2, 1:4, 1:6 e 1:8 e a absorbância de cada diluição foi medida. Com base nas absorbâncias das diluições e na concentração já conhecida da suspensão original, foi construída uma curva de calibração relacionando a absorbância com a concentração celular e definida uma equação matemática que a descrevia. A velocidade específica máxima de crescimento foi dada pelo coeficiente angular da reta obtida na fase linear da curva do gráfico do logaritmo neperiano da concentração celular em função do tempo. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.4.2 Determinação da atividade lipolítica

O sobrenadante livre de células obtido após centrifugação do caldo de cultivo conforme descrito no item 3.4 foi utilizado para estimar a atividade de lipase de acordo com o método modificado por Gupta, Rathi e Gupta (2002). A mistura reativa foi composta de 0,9 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 8), 0,1 mL do caldo enzimático (sobrenadante livre de células) e 0,9 mL de *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) 0,013 M em etanol. A mistura foi agitada em Thermomixer Eppendorf por 10 min, a 30 °C e a reação foi interrompida em banho de gelo.

De forma a solubilizar as possíveis substâncias apolares presentes na suspensão e clarificar o meio, facilitando a leitura da absorbância da mistura, foram adicionados 50 µL de Triton X-100 ao meio reativo. A absorbância da mistura foi medida a 410 nm e uma unidade (U) de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzimas necessária para hidrolisar 1 µmol/min de *p*-NPP sob as condições do teste, utilizando o coeficiente de extinção molar para o *p*-NPP ( $\epsilon_{410}$ ) de 15.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A atividade lipolítica foi calculada de acordo com a Equação 1. O “branco” utilizado como “zero” de absorbância foi formulado adicionando-se 0,1 mL de tampão fosfato ao meio reativo ao invés do caldo enzimático. Os demais procedimentos para o branco foram mantidos iguais aos adotados para as demais amostras. O experimento foi realizado em triplicata.

$$AE \text{ lipase } \left( \frac{U}{L} \right) = \frac{ABS * Vt}{\epsilon * Ve * t} * D * 1000 \quad \text{Equação 1}$$

Na qual:

**ABS** = absorvância da mistura reativa (410 nm)

**Vt** = volume total de amostra (1950  $\mu\text{L}$ )

$\epsilon$  = coeficiente de absorvidade molar para  
o pNPP em pH 8,0 e  $\lambda = 410 \text{ nm}$  ( $15.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

**Ve** = volume de enzima (100  $\mu\text{L}$ )

**t** = tempo de reação (10 min)

**D** = diluição da amostra

**1000** = transformação de mol para micromol

### 3.4.3 Avaliação da produção de biossurfactantes

O sobrenadante livre de células obtido após centrifugação do caldo de cultivo conforme descrito no item 3.4 foi utilizado para a medida da **tensão superficial** e do **índice de emulsificação** (BUENO, 2008; PINTO *et al.*, 2009; PIRÔLLO, 2006; DECESARO *et al.*, 2013; BUGAY, 2009). Os testes foram conduzidos em duplicata.

#### 3.4.3.1 Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada com 45 mL do sobrenadante livre de células e medida diretamente da superfície do emulsificante com um Tensiômetro Interfacial KRÜSS K8, por meio do sistema de medidas com anel de platina Du Nouy, em duplicata (BICCA; FLECK; AYUB, 1999) pelo laboratório de Alta Tensão da FURB – Universidade Regional de Blumenau.

#### 3.4.3.2 Índice de emulsificação

Foi adicionado 2,0 mL de óleo de soja em 3,5 mL do caldo de cultivo livre de células obtido após a centrifugação, submetidos a agitação máxima (3000 rpm) no vortex Vision por 2 min e a mistura foi mantida em repouso por 24 horas. Com a utilização de um paquímetro digital (150 mm MTX), aferiu-se a medida da altura da fase emulsionada, que foi comparada com a altura total da mistura. O índice de emulsificação (IE) foi calculado como porcentagem da

altura da camada emulsificada em mm (a) dividida pela altura total da coluna do líquido em mm (b), multiplicada por 100 conforme a Equação 2 (IQBAL *et al.*, 1995; PIRÔLLO, 2006).

$$IE(\%) = \frac{a}{b} * 100$$

Equação 2

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste Q de Dixon foi realizado para descartar os valores desviantes em relação à média (RORABACHER 1991). A análise de variância (ANOVA) foi realizado utilizando o teste F do Excel para verificar diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tempos.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes

O isolamento das bactérias dos três pontos selecionados do manguezal no primeiro estágio após o meio de enriquecimento, resultou em 12 UFC isoladas (4 por pontos: porto – moradia - controle) em meio *Marine Broth*. Ressalta-se que nesta etapa, o uso de óleo de soja como fonte de carbono teve como intuito realizar uma pré-seleção dos microrganismos capazes de utilizar o óleo de soja sugerindo a produção de lipases e biossurfactantes.

O re-isolamento destas 12 UFC em placas de Petri contendo meio seletivo para produção de lipases (*Marine Broth* adicionado do corante Rodamina B e óleo de soja como fonte de carbono) e biossurfactantes (ágar sangue) resultou em 23 novas colônias isoladas, conforme apresentado no Quadro 5. Dentre estas, foram selecionadas apenas as positivas para ambos os testes, totalizando 6 amostras (AC2, LC3, AM3, LM1, AP3.1 e LP1), tendo como propósito mostrar apenas os microrganismos capazes de produzir ambos os metabólitos.

**Quadro 5.** Microrganismos isolados nos meios seletivos para lipase e bio surfactantes nos diferentes pontos do manguezal (+: positivo; -: negativo;  $\alpha$ : alfa;  $\beta$ : beta).

<b>CONTROLE</b>		
ISOLADO	LIPASE	BIOSSURFACTANTES
AC1	-	$\alpha$ -hemólise
AC2	+	$\beta$ - hemólise
AC3.1	+	$\alpha$ -hemólise
AC3.2	-	$\alpha$ -hemólise
LC3	+	$\beta$ - hemólise
LC4	+	$\alpha$ -hemólise
LC4.1	-	$\alpha$ -hemólise
<b>MORADIA</b>		
ISOLADO	LIPASE	BIOSSURFACTANTES
AM3	+	$\beta$ - hemólise
AM3.1	-	$\alpha$ -hemólise
AM4	+	$\alpha$ -hemólise
AM4.1	-	$\alpha$ -hemólise
LM1	+	$\beta$ - hemólise
LM3	+	$\alpha$ -hemólise
LM4	-	$\alpha$ -hemólise
<b>PORTO</b>		
ISOLADO	LIPASE	BIOSSURFACTANTES
AP1	-	$\alpha$ -hemólise
AP2	+	$\alpha$ -hemólise
AP2.1	-	$\alpha$ -hemólise
AP3.1	+	$\beta$ - hemólise
AP3.2	-	$\alpha$ -hemólise
LP1	+	$\beta$ - hemólise
LP2	-	$\alpha$ -hemólise
LP2.1	+	$\alpha$ -hemólise
LP3	+	$\alpha$ -hemólise

Fonte: A autora

A produção do bio surfactante nas placas de ágar sangue foi identificada visualmente de acordo com a presença de atividade hemolítica. Parte-se do princípio que a presença do bio surfactante causa a degradação das hemácias, resultando no consumo do ferro presente no meio de cultivo pelo microrganismo, levando à perda de intensidade da coloração avermelhada do meio, resultando na formação de um halo transparente ao redor da colônia, denominado de  $\beta$ - hemólise (beta-hemólise) (YOUSSEF *et al.*, 2004).

Segundo SATPUTE *et al.* (2008), a  $\alpha$ -hemólise (alfa-hemólise) leva a uma coloração esverdeada escura em volta da colônia, e sugere também a presença de biossurfactantes, porém com baixa produção. O grau da lise dos glóbulos vermelhos está relacionado com o nível de produção de surfactina, pois seu caráter anfifílico, induz hemólise em determinada concentração (VINARDELL; INFANTE, 1999; YOUSSEF *et al.*, 2004).

De acordo com Youssef *et al.* (2004), a detecção da produção de biossurfactantes em placas contendo ágar sangue é um método preliminar de triagem, amplamente utilizado. No entanto, nem todos os biossurfactantes têm uma atividade hemolítica. A lise produzida tem sido usada para quantificar surfactina e ramnolípidos. Outro fator importante é a temperatura utilizada para o cultivo do microrganismo que pode influenciar na formação da hemólise (MORAN *et al.*, 2002). Estas variações podem explicar a diferença entre a  $\alpha$ -hemólise e  $\beta$ -hemólise encontrada nas amostras. Satpute e colaboradores (2008) sugerem uma combinação de métodos diferentes (método de propagação de óleo, colapso de queda e deslizamento de vidro inclinado) para se ter uma triagem efetiva de seleção para bactérias marinhas produtoras de biossurfactantes.

Para as lipases, o indicativo de atividade lipolítica é a fluorescência laranja ao redor das colônias, ocorrendo interação dos ácidos graxos liberados pela hidrólise do óleo presente no meio de cultivo com a Rodamina B (KOUKER; JAEGER, 1987; RABBANI *et al.*, 2013). É preciso atentar para a ocorrência de um falso positivo, no qual algumas bactérias apresentam coloração rosada *pink*, como as estirpes que não produzem lipase, tais como *Escherichia coli*, que acumulam Rodamina B. Ressalta-se, ainda, que o teste é insensível às mudanças de pH, permitindo que não haja inibição de crescimento ou mudança de propriedades fisiológicas (KOUKER; JAEGER, 1987; RABBANI *et al.*, 2013).

Além disso, os resultados negativos apresentados para lipase, com característica de colônias rosadas ou até mesmo sem nenhuma coloração e fluorescência, podem estar relacionados a baixas quantidades de moléculas de lipase liberadas por uma única colônia, necessitando de mais fonte de carbono no decorrer do crescimento celular, que pode até mesmo ser aplicada

diretamente no meio sólido em placa no decorrer do teste (KOUKER; JAEGER, 1987; LIMA, 2003).

Dentre os microrganismos produtores de biossurfactantes detectados com metodologia similar (lise do ágar sangue) e em ambiente marinho (sedimento, água do mar, mexilhões, esponjas e algas) os mais estudados são os do gênero *Bacillus*, conhecidos por produzir surfactina (PERFUMO *et al.*, 2010). Como exemplos, podemos citar *Bacillus pumilus* (BUENO, 2008; RABBANI *et al.*, 2013; SATPUTE *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2014), *Bacillus subtilis* (SATPUTE *et al.*, 2008; MOR; MART, 2002; CAI *et al.*, 2014) e *Bacillus circulans* (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; BUENO *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2014). Além destes, *Nocardiosis* sp. (KHOPADE *et al.*, 2012), *Rhodococcus equi* (KHOSROWABADI; HUYOP, 2014), *Nesterenkonia* sp. (KIRAN *et al.*, 2017), *Halomonas* sp. (PEPI *et al.*, 2005) também são reportados como produtores de biossurfactantes.

Todavia, os gêneros apresentados acima não são exclusivos para a produção de biossurfactantes. Rabbani e colaboradores (2013) encontraram, por meio do teste preliminar da Rodamina B, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus safenis* como produtores também de lipases. Além disso, são encontrados outros gêneros marinhos em ambientes extremos (mar Antártico) como *Moraxella* (FELLER *et al.*, 1990), *Pseudomonas* sp. (ALQUATI *et al.*, 2002) e *Psychrobacter* sp. (ZHANG *et al.*, 2007).

Embora a produção de biossurfactante e lipase ocorram individualmente, ambos atuam de forma a permitir o uso de compostos que são insolúveis em água pelo microrganismo (DESAI; BANAT, 1997). Ainda, biossurfactantes podem ser produzidos por síntese orgânica usando lipases (PAULA; BARBOZA; CASTRO, 2005) e, por meio dos surfactantes as reações catalíticas das lipases se tornam mais eficientes, uma vez que facilitam o acesso do substrato até a enzima (WANG *et al.*, 2008).

Martins, Kalil e Costa (2008) reportaram a produção conjunta de biossurfactante e lipase pelos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Phialemonium* sp, concluindo que a quantidade de lipase produzida no meio fermentativo não interferiu na produção de biossurfactante. Gasparin e colaboradores (2012), ressaltam que nem sempre o mesmo substrato é ideal para os dois processos,

porém demonstraram que a produção bacteriana de lipase e biossurfactante foi concomitante quando substratos oleosos a 1 % foram utilizados.

#### **4.2 Identificação morfológica e taxinômica das colônias**

A morfologia das colônias, os padrões de crescimento e as análises microscópicas indicaram que, embora existissem muitas colônias isoladas das amostras, havia muitas semelhanças e associações entre elas. Quando os isolados foram agrupados de acordo com essas semelhanças, as colônias selecionadas foram escolhidas para representar cada um desses grupos: Grupo I - coloração amarelada escura, com pouco agrupamento celular, formando colônias redondas e pequenas; Grupo II - colônias transparentes, não pigmentadas, presente em baixo e/ou ao redor das demais colônias de forma espalhada; Grupo III - coloração amarronzada, extremamente gosmenta com formação de colônias arredondadas. Dos três grupos, seis colônias foram selecionadas e identificadas por técnicas de biologia molecular em nível de espécie como, *Psychrobacter marincola*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacillus pumilus* e um, em nível de família, *Enterobacteriaceae*, conforme apresentado no Quadro 6. Nas Figuras 10, 11 e 12 são apresentadas as características morfo-fisiológicas dos isolados identificados em nível de espécie, desconsiderando o gênero *Enterobacteriaceae* que tornaria a discussão muito ampla.

**Quadro 6.** Relação dos microrganismos isolados nos diferentes pontos do manguezal (controle, moradia e porto) das seis amostras e sua morfologia.

<b>Amostra Controle</b>	
<b>Microrganismo</b>	<b>Morfologia</b>
<i>Bacillus pumilus</i>	BACILOS GRAM +
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DIPLOCOCOS GRAM +
<b>Amostra Porto</b>	
<b>Microrganismo</b>	<b>Morfologia</b>
<i>Bacillus pumilus</i>	BACILOS GRAM +
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DIPLOCOCOS GRAM +
<i>Psychrobacter marincola</i>	COCO GRAM -
<b>Amostra Moradia</b>	
<b>Microrganismo</b>	<b>Morfologia</b>
<i>Bacillus pumilus</i>	BACILOS GRAM +
<i>Enterobacteriaceae</i> sp	---
<i>Psychrobacter marincola</i>	COCO GRAM -

Fonte: a autora

Membros do gênero *Enterococcus*, são cocos Gram-positivos que geralmente ocorrem em pares e cadeias, são difíceis de distinguir dos estreptococos apenas nas características físicas, são organismos anaeróbicos facultativos (RAYKOVA; PEYKOV; DIMOV, 2008). As espécies de *Enterococcus* foram limitadas às duas espécies durante a década dos anos noventa, *E. faecalis* e *E. faecium*, e são reconhecidas como patógeno emergente, devido ao potencial de infecção. O surgimento crescente de espécies de *Enterococcus* como causa de epidemias e sua resistência alarmante a vancomicina atraiu um grande interesse pela fisiopatologia e os padrões de resistência biológica exibida pelos vários subtipos, revelando outras espécies como *E. durans*, *E. avium* e *E. casseliflavus* (PAPPAS *et al.*, 2004).

Microrganismos da espécie *Enterococcus casseliflavus* são Gram-positivos, anaeróbios facultativos, em formato de cocos de forma ovoide. Conhecidos como patógenos oportunistas, causam importantes infecções hospitalares por serem resistentes a antibióticos (tetracilina, vancomicina) em humanos e animais. Seu principal nicho é o trato digestivo de animais de sangue quente, podendo ser encontrado também na água e solo. Devido a característica do seu material genético diferenciado, que através da

transferência horizontal de genes desempenha um papel de disseminação de DNA extra cromossômico, possui características virulentas (ZAHID *et al.*, 2017).

Ao ser encontrada no solo do mangue, corrobora com o reportado por Zahid e colaboradores (2017) em relação a *E. casseliflavus*, que afirma que o solo é um reservatório natural de microbiota e que o uso extensivo de antibióticos na agricultura, torna o solo um reservatório natural de bactérias resistentes. No entanto, são necessários mais estudos bioquímicos e ecológicos para compreender esta bactéria no meio ambiente, não somente na saúde.

As espécies de *Psychrobacter* são sempre estritamente aeróbicas não mostrando crescimento anaeróbico sob qualquer condição. A água do mar é um excelente habitat para este gênero (BOWMAN *et al.*, 1996, 1997) e conseqüentemente estão presentes na alimentação a base de frutos do mar (BOWMAN, 2006). Geralmente são psicrófilas e não são exigentes nutricionalmente. Pertencem a família Moraxellaceae, que inclui também, *Acinetobacter* e *Moraxella*. Estes gêneros não ocorrem em habitats marinhos, são mesofílicos, incapazes de crescer a 4 °C e não são halotolerantes ou halofílicos (BOWMAN, 2006).

*Psychrobacter maricola* é uma espécie de bactéria com ampla distribuição no ambiente marinho, nos sedimentos, incluindo água do mar, brânquias e pele de peixes e aves marinhas. São microrganismos aeróbicos, não móveis, psicrófilos e halotolerantes, que podem ser encontrados em ambientes antárticos e oceânicos profundos (ROMANENKO *et al.*, 2002). As pesquisas com esta espécie estão direcionadas aos estudos genômicos, taxonômicos e bioquímicos, por serem Gammaproteobacteria cultiváveis, predominantes no sedimento marinho (ETTOUMI *et al.*, 2010), muito semelhantes na sequência de genes 16S rRNA com *P. submarinus* (BOWMAN, 2006).

De acordo com Romanenko *et al.* (2002), *P. maricola* cresce em ambientes com altas concentrações de sódio, frutose, maltose e galactose. É sensível a antibióticos (ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina) e produtora de lipase, fator indicado pela degradação do Tween 80. Sua temperatura ideal de

crescimento varia de 25 °C a 30 °C, com crescimento excelente em ágar marinho e ágar sangue (BOWMAN, 2006).

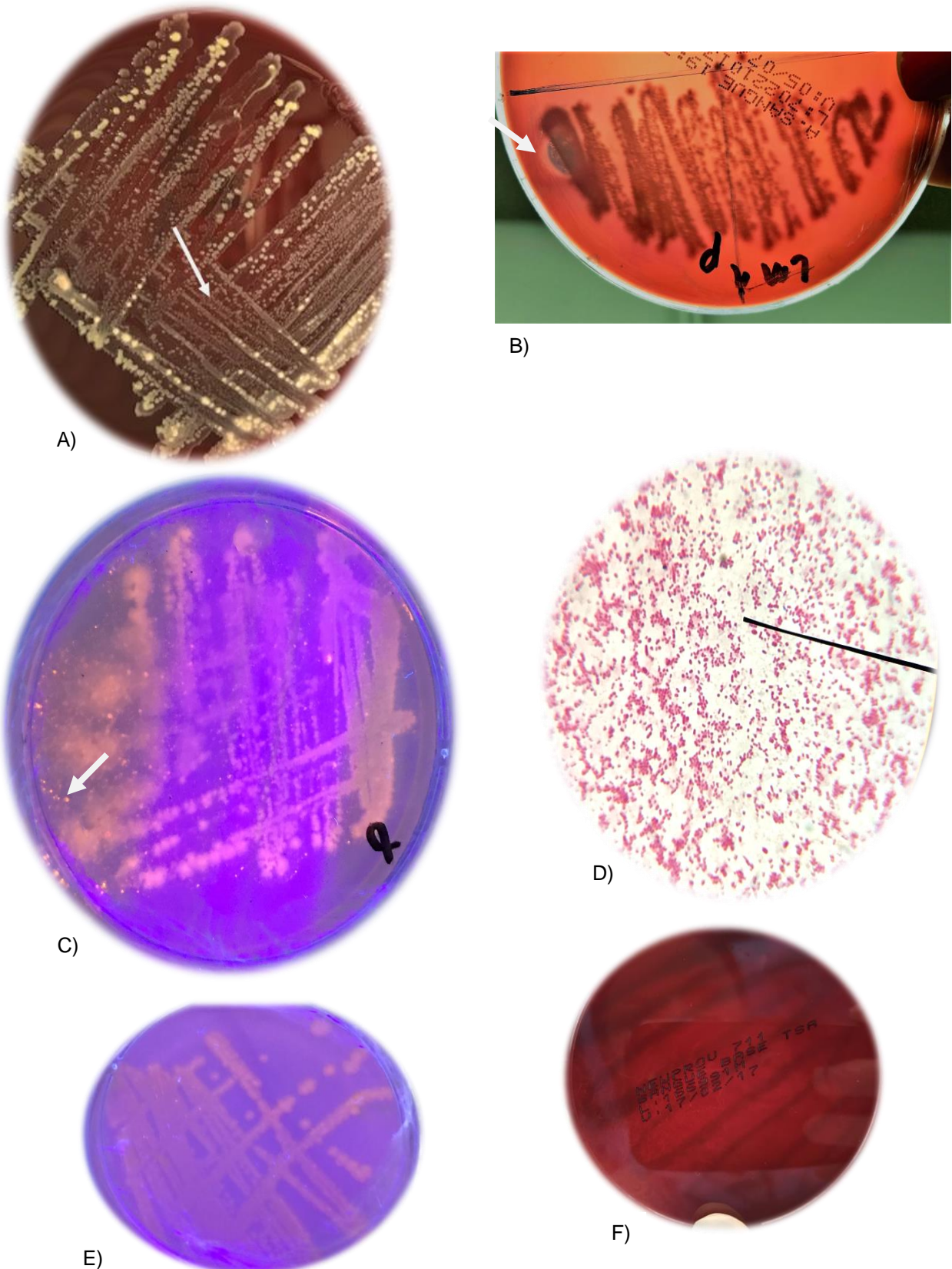
A família *Bacillaceae* é constituída por bactérias em forma de haste que formam endósporos, aeróbias ou facultativamente anaeróbias, formadoras de esporos do gênero *Bacillus*, conhecidas como ASB (aeróbicos portadores de esporos). As células bacterianas das culturas de *Bacillus* são Gram positivas quando jovens, mas em algumas espécies tornam-se Gram negativas à medida que envelhecem. O gênero inclui representantes termófilos, psicrófilos, acidófilos, alcalinófilos, halotolerantes e halofílicos. As espécies encontradas estão localizadas em várias áreas. *Bacillus anthracis*, é agente do antraz, o único patógeno obrigatório em vertebrados; *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. popilliae*, *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* são agentes patogênicos de grupos específicos de insetos; *B. cereus* é patógeno ocasional de humanos e gado, mas a grande maioria das espécies de *Bacillus* são saprófitos inofensivos (TURNBULL, 1996).

As bactérias da espécie *Bacillus pumilus*, presentes nas amostras coletadas nos três pontos do manguezal da Baía Babitonga, são Gram-positivas, aeróbias e formadoras de esporos. A ocorrência desse microrganismo se dá em solo, água, ar e em decomposição de tecidos vegetais, e em simbiose no desenvolvimento radicular de plantas. Estas bactérias são reportadas como produtoras de várias moléculas, como biossurfactantes, proteases, lignocelulases e uma variedade de toxinas e antibióticos. Considerada uma espécie com grande potencial para produção de biossurfactantes, reduz significativamente a tensão superficial, aumenta a emulsificação em 59 %, são produtoras de surfactina e apresentam um bom índice de emulsificação estável (BUENO, 2008; DECESARO *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2010; SATPUTE *et al.*, 2008; BUGAY, 2009).

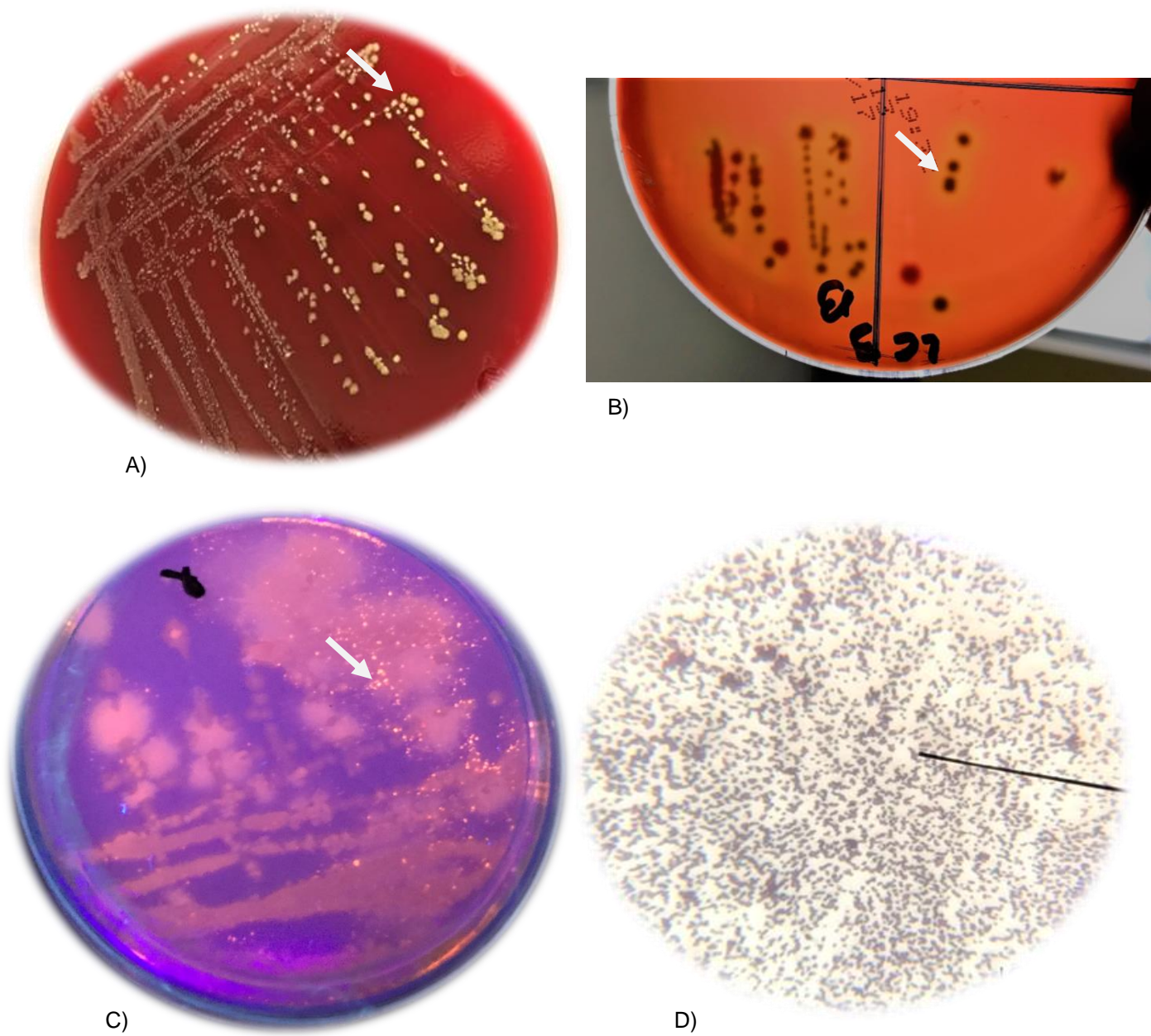
Em relação à lipase de *Bacillus pumilus*, estudos promissores relatam termotolerância, alcalofilicidade e atividade enzimática (RABBANI *et al.*, 2013). Arild *et al.* (2013) demonstrou algumas características de três diferentes lipases encontrada na Antártida produzidas por *B. pumilus*, em relação à temperatura, pH e substrato. As três lipases hidrolizaram muitos substratos de óleo natural (óleo de rícino, azeite, óleo de semente de girassol, óleo de peixe e óleo de



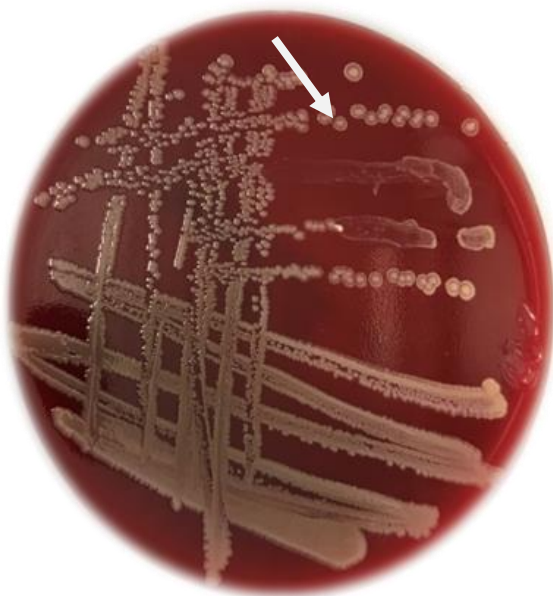
soja), duas apresentaram maior especificidade em relação aos substratos de cadeia longa e mesmo originárias do frio, foram estáveis de 20 °C a 30 °C.



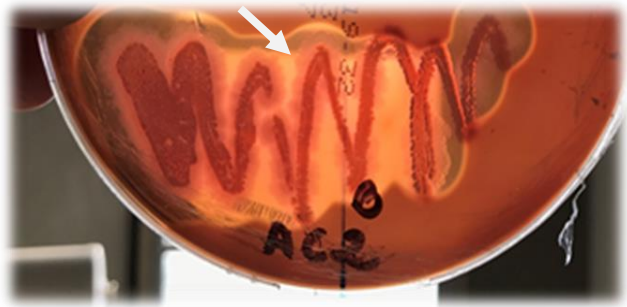
**Figura 9.** *Psychrobacter marincola* A) Seta apontando para colônia da bactéria *Psychrobacter marincola*; B) Seta indicando o resultado positivo para biossurfactantes pela presença do halo característico da  $\beta$  – hemólise; C) Característica positiva para lipase: fluorescência; D) Coloração de Gram apresentando cocos GRAM -; E) Resultado negativo para lipase; F) Resultado negativo para biossurfactantes; Grupo morfológico II. Fonte: a autora



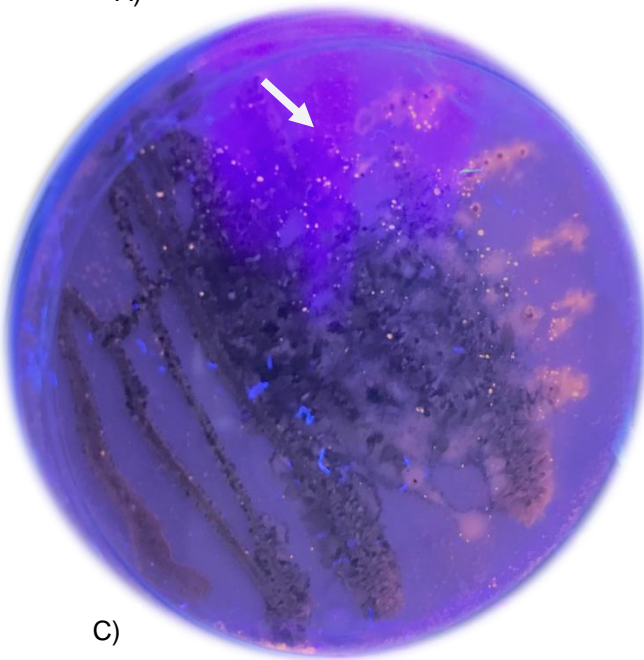
**Figura 10.** *Enterococcus casseliflavus* A) Seta apontando para colônia da bactéria *Enterococcus casseliflavus*; B) Seta indicando o resultado positivo para biossurfactantes pela presença do halo característico da  $\beta$  – hemólise; C) Característica positiva para lipase: fluorescência; D) Coloração de Gram apresentando diplococos GRAM +; Grupo morfológico I; Fonte: a autora



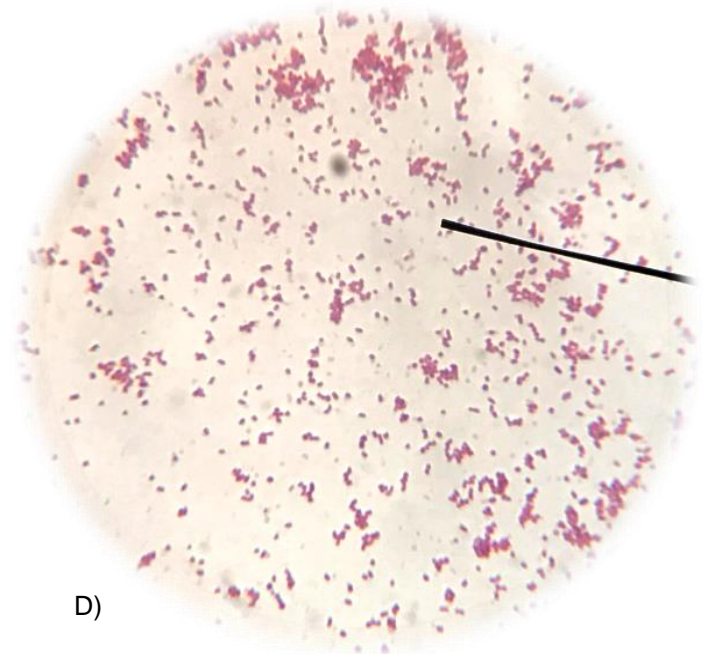
A)



B)



C)



D)

**Figura 11.** *Bacillus pumilus* A) Seta apontando para colônia da bactéria *Bacillus pumilus*; B) Seta indicando o resultado positivo para biossurfactantes pela presença do halo característico da  $\beta$  - hemólise; C) Característica positiva para lipase: fluorescência; D) Coloração de Gram apresentando bacilos GRAM +; Grupo morfológico III. Fonte: a autora

Os microrganismos encontrados nas amostras provenientes do manguezal da Baía Babitonga corroboram com o já reportado na literatura. Segundo Romanenko e colaboradores, (2002), *P. maricola* é uma bactéria com ampla distribuição no ambiente marinho, encontrada também nos sedimentos com temperatura ideal de 25 °C a 30 °C, e segundo os testes preliminares, é capaz de produzir lipase utilizando Tween 80. Perfil semelhante o encontrado neste trabalho.

Pelas características virulentas e de resistência a antibióticos a maioria dos estudos com a espécie *E. casseliflavus* são voltados para a área da saúde. Pode ser encontrado também em água e solo (ZAHID *et al.*, 2017), sendo plausível ser encontrada no solo do manguezal. No entanto, impossível descrever a sua origem.

Decesaro *et al.* (2013), Oliveira (2010) e Bugay (2009) afirmaram que *B. pumilus* é um organismo capaz de produzir lipases, capazes de hidrolizar muitos substratos de óleo natural, o que explica o fato de ter se desenvolvido em meio contendo óleo de soja. É também considerada a espécie com o melhor desempenho na produção de biossurfactantes. A espécie é comumente encontrada no solo, água, ar e em decomposição de tecidos vegetais, e em simbiose no desenvolvimento radicular de plantas, explicando sua presença em sedimento de manguezal.

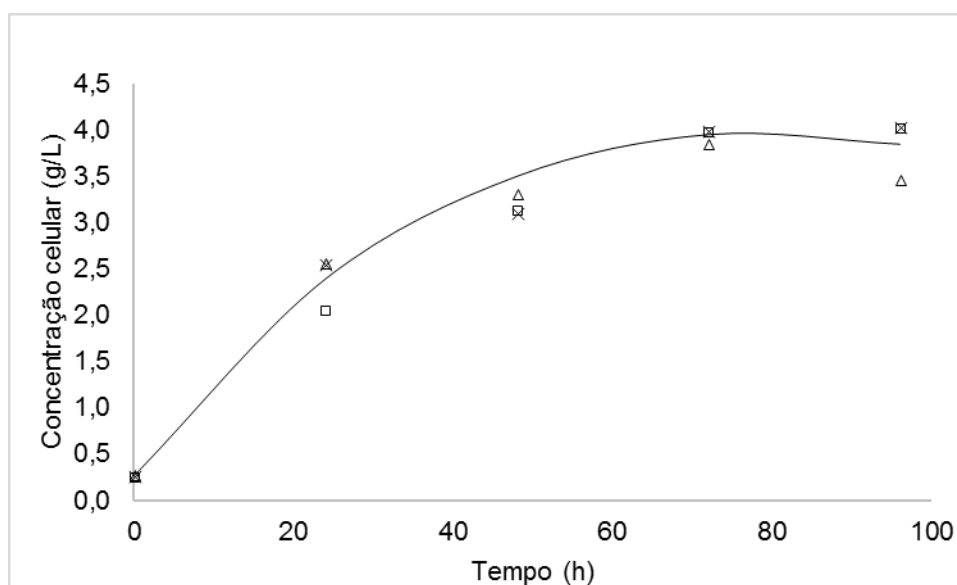
### **4.3 Cinética de crescimento celular e de produção de lipases e biossurfactantes pelos isolados**

#### **4.3.1 *Psychrobacter maricola***

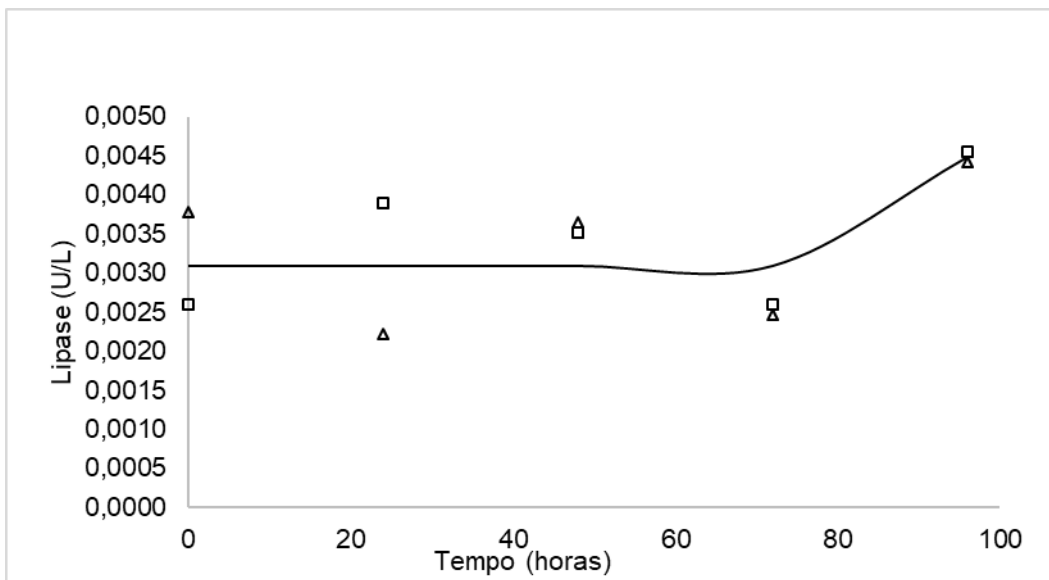
A Figura 13 apresenta a curva de crescimento de *P. maricola* cultivado em *Marine Broth* adicionado de óleo de soja como fonte de carbono. A concentração celular foi obtida conforme descrito no item 3.4.1 e a curva de calibração está apresentada no Apêndice A (Figura A1). Não foi possível observar a fase de latência (*lag*) de crescimento, provavelmente por esta ter ocorrido nas primeiras horas de cultivo, ou seja, antes de 24 horas, período no qual a bactéria apresenta velocidade específica máxima de crescimento de  $0,093 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$  (Apêndice B – Figura B1). A concentração celular atinge seu valor máximo ( $3,95 \pm 0,08 \text{ g/L}$ ) em 72h. A enzima lipase é detectada com atividade incipiente já no início do cultivo ( $0,0032 \pm 0,0008 \text{ U/L}$ ), provavelmente

como componente do inóculo utilizado, mantendo-se sem alteração até 72 h, quando atinge  $0,0045 \pm 0,0001$  U/L em 96h de cultivo, representando um aumento estatisticamente significativo na atividade enzimática de 33 %. Vale ressaltar que este aumento na atividade acontece quando a bactéria já está em fase estacionária de crescimento como apresenta a Figura 14.

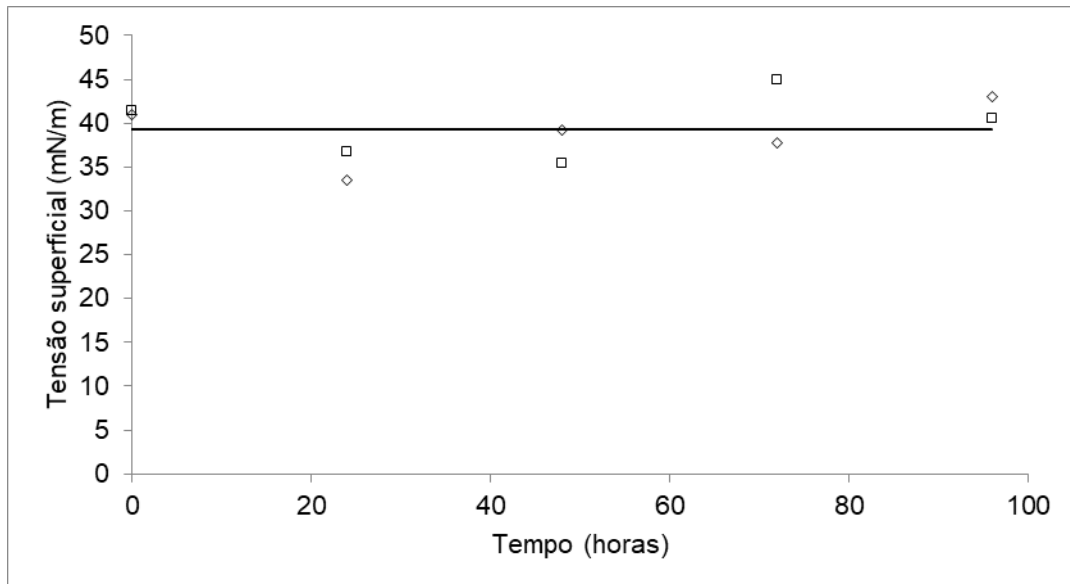
A tensão superficial inicial ( $T_0$ ) do meio de cultivo (média de  $39,35 \pm 3,53$  mN/m – Figura 15) e o índice de emulsificação (média de  $42,69 \pm 2,75$  % - Figura 16) mantiveram-se constantes ao longo do cultivo, indicando que não houve produção de biosurfactante. No entanto, observa-se que a tensão superficial inicial do meio de cultivo possui um valor 45 % menor do que o da água destilada a 25 °C (72,25 mN/m) sugerindo a presença de surfactantes na composição do meio, provavelmente associados ao óleo de soja.



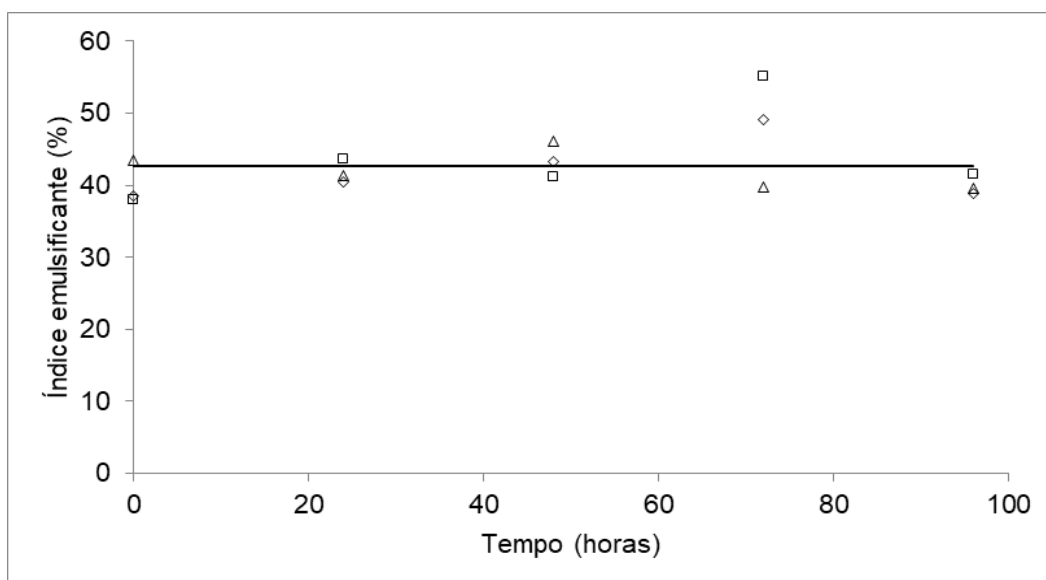
**Figura 12.** Concentração celular (g/L) em função do tempo de cultivo de *Psychrobacter marincola* em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada com o melhor ajuste entre os pontos.



**Figura 13.** Atividade enzimática da lipase (U/L) em função do tempo de cultivo de *Psychrobacter marincola* em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, à 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.



**Figura 14.** Tensão superficial (mN/m) em função do tempo do caldo de cultivo de *Psychrobacter marincola* em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.



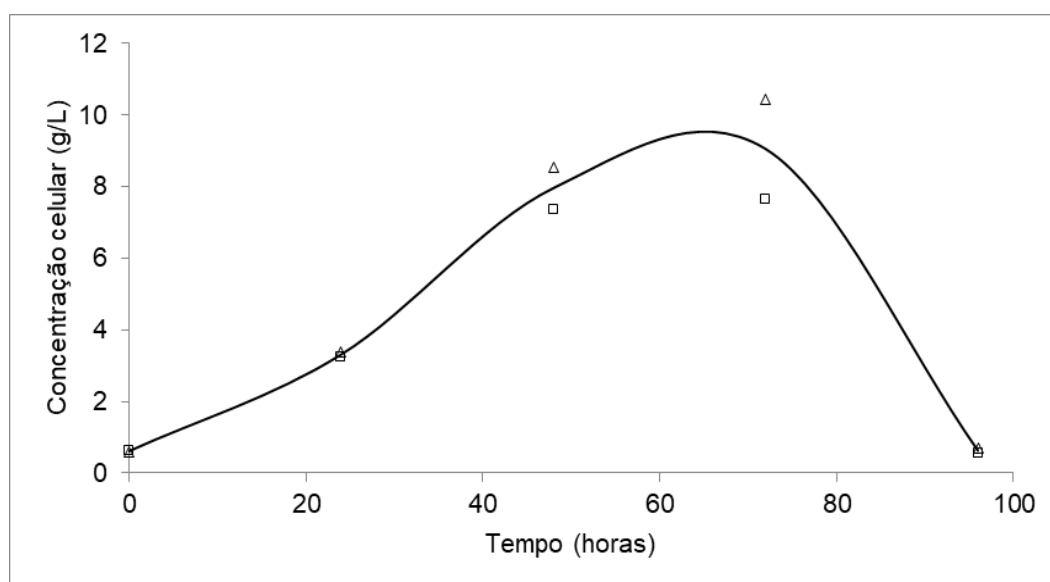
**Figura 15.** Índice emulsificante (%) em função do tempo do caldo de cultivo de *Psychrobacter marincola* em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.

As pesquisas encontradas sobre *P. marincola* (ROMANENKO *et al.*, 2002; BOZAL *et al.*, 2003; ETTOUMI *et al.*, 2010) envolvem estudos taxonômicos e características fenotípicas da espécie, permitindo conferir as condições ideais de crescimento deste microrganismo. Romanenko e colaboradores (2002) descrevem a temperatura ideal de crescimento, que ocorre entre 25 °C e 28 °C. Como meio de cultivo, é necessário água do mar com, obrigatoriamente, 1 % a 15 % de cloreto de sódio (NaCl) para o desenvolvimento. Segundo Bozal e colaboradores (2003), *Psychrobacter marincola* não foi capaz de produzir lipase utilizando substratos de cadeias longas (C14). Em relação ao gênero, Zhang; Lin; Zeng (2007), descrevem a atividade lipolítica extracelular de uma espécie de *Psychrobacter* isolada de sedimento da Antártica. A produção de lipase alcançou 2,33 U/mg utilizando azeite de oliva como substrato e 3,826 U/mg utilizando Trimyristina (C14), representando a preferência do microrganismo por ácidos graxos de cadeia média a longa como substrato. A adição de  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  aumentou 17 e 23 % respectivamente a atividade enzimática, e o uso de Triton X-100, Tween 80 e Tween 40 foram positivo para a produção de lipase.

Não foi possível comparar os dados cinéticos obtidos neste trabalho com outros trabalhos reportados na literatura, pela completa ausência de dados para este gênero. Deve-se ressaltar que a baixa atividade de lipase encontrada não necessariamente está relacionada com a incapacidade de produção de lipase pelo microrganismo. O resultado positivo no teste qualitativo é um indicativo da produção de lipase. Além disto, Romanenko *et al.* (2002) relatam a capacidade deste microrganismo em crescer utilizando Tween 80, o que pode estar associado à produção desta enzima.

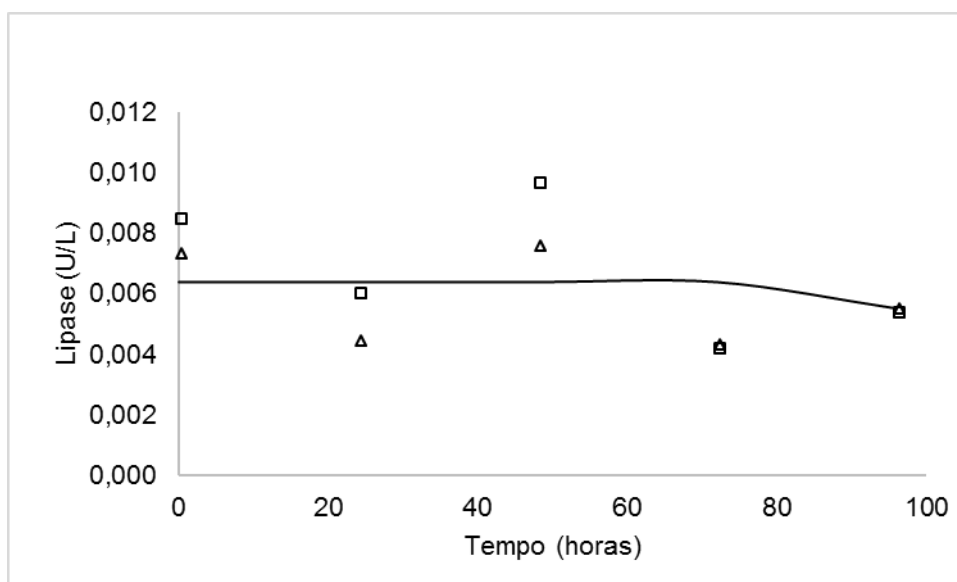
#### 4.3.2. *Enterococcus casseliflavus*

Nas Figuras 17, 18, 19 e 20 estão apresentados o crescimento celular, a atividade de lipase, a tensão superficial e o índice de emulsificação obtido para *E. casseliflavus*.

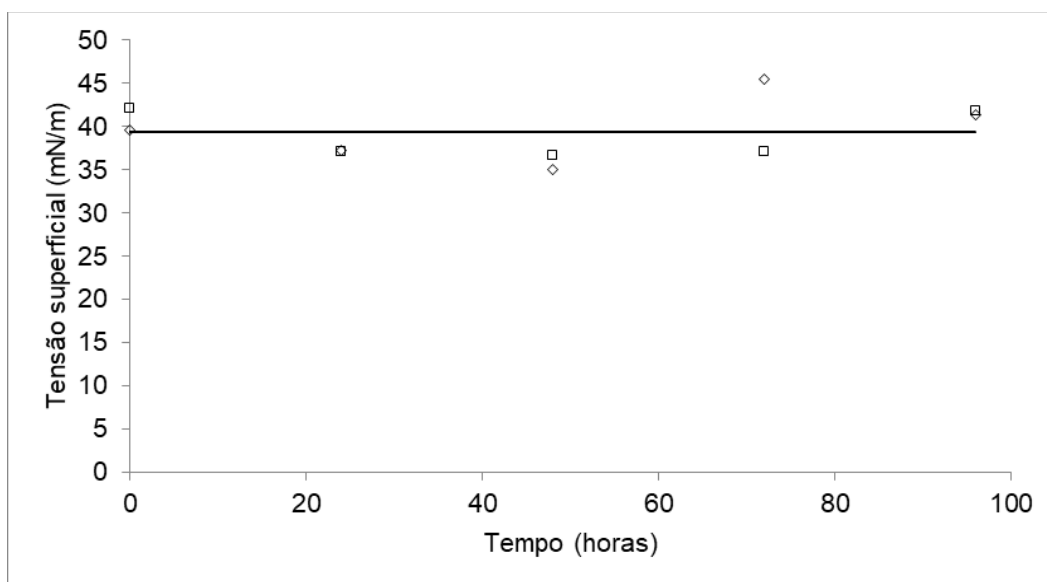


**Figura 16.** Concentração celular (g/L) em função do tempo de cultivo de *Enterococcus casseliflavus* em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos.

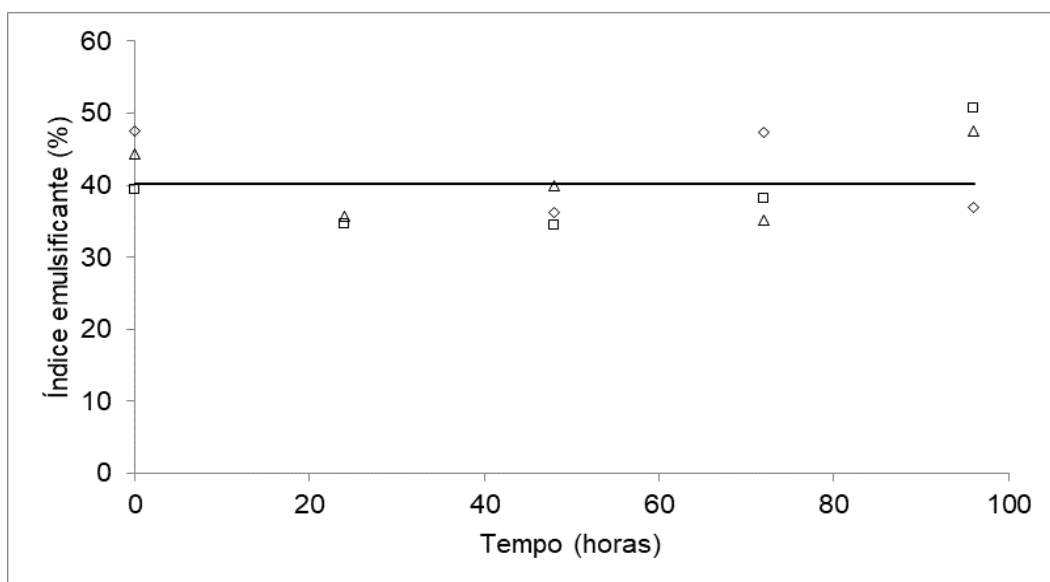




**Figura 18.** Atividade enzimática da lipase (U/L) em função do tempo de cultivo de *Enterococcus casseliflavus* em meio Marine Broth adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos.



**Figura 19.** Tensão superficial (mN/m) em função do tempo do caldo de cultivo de *Enterococcus casseliflavus* em meio *Marine Broth* adicionado de 1% de óleo de soja como fonte de carbono, a 30°C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.



**Figura 20.** Índice emulsificante (%) em função do tempo do caldo de cultivo de *Enterococcus casseliflavus* em meio *Marine Broth* adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.

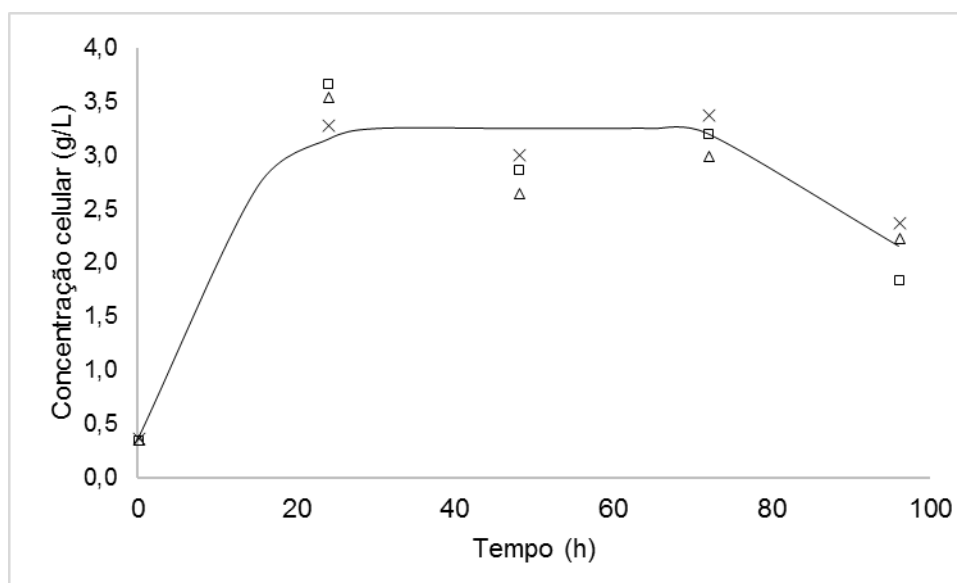
Observando a Figura 17, percebe-se uma curva de crescimento celular com todas as fases de crescimento (adaptação, exponencial, estacionária e morte), exibindo concentração celular máxima de  $9,06 \pm 0,99$  g/L em 72 horas de cultivo. A concentração celular foi obtida conforme descrito no item 3.4.1 e a curva de calibração está apresentada no Apêndice A (Figura A2). A velocidade específica máxima de crescimento foi de  $0,070 \pm 0,004$  h<sup>-1</sup> (Apêndice B – Figura B2). A partir deste tempo, inicia-se a fase de declínio, levando à degradação celular, que reduz a concentração de células para  $0,64 \pm 0,10$  g/L, em 96h. A concentração celular máxima obtida foi aproximadamente 130 % superior à alcançada com *P. marincola* cultivado nas mesmas condições. Ainda, da mesma forma que *P. marincola*, no tempo inicial do cultivo ( $T_0$ ) foi possível detectar atividade de lipase (Figura 18), ainda que incipiente ( $0,006 \pm 0,02$  U/L) que pode ter sido adicionada ao meio como componente do inóculo. Esta atividade decaiu para  $0,005 \pm 0,0001$  U/mL em 24 h, mantendo-se constante ao longo de cultivo. A tensão superficial do meio de cultivo (Figura 19) e o índice emulsificante (Figuras 20), mantiveram-se constantes ao longo do cultivo, com valores de  $39,36 \pm 2,64$  mN/m e  $40,23 \pm 4,27$  %, respectivamente, não sendo possível detectar a produção de biossurfactantes, como o ocorrido com *P. marincola*.

Como descrito no item 4.2, a bactéria *E. casseliflavus* está associada à saúde dos seres humanos e animais, sendo encontrada em uma ampla variedade de processos infecciosos, principalmente as hospitalares. Os estudos com esta espécie são voltados para o sequenciamento genômico (LOZANO *et al.*, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2010), características clínicas (REID *et al.*, 2001), e estudo de resistência a antibióticos (ZAHID *et al.*, 2017; SAFARI *et al.*, 2016). Não existem na literatura consultada (Portal de Periódicos da CAPES) estudos cinéticos de crescimento e de produção de lipase e biossurfactantes. Ainda, com base nesta literatura, podemos afirmar que este é o primeiro registro da presença da espécie em manguezais.

Dworniczek e colaboradores (2012) avaliaram o comportamento de *E. casseliflavus* após seu isolamento de feridas infectadas e observaram que a espécie é resistente à ampicilina, não sendo produtora de lipase através da metodologia ágar *Spirit Blue*.

#### 4.3.3. *Bacillus pumilus*

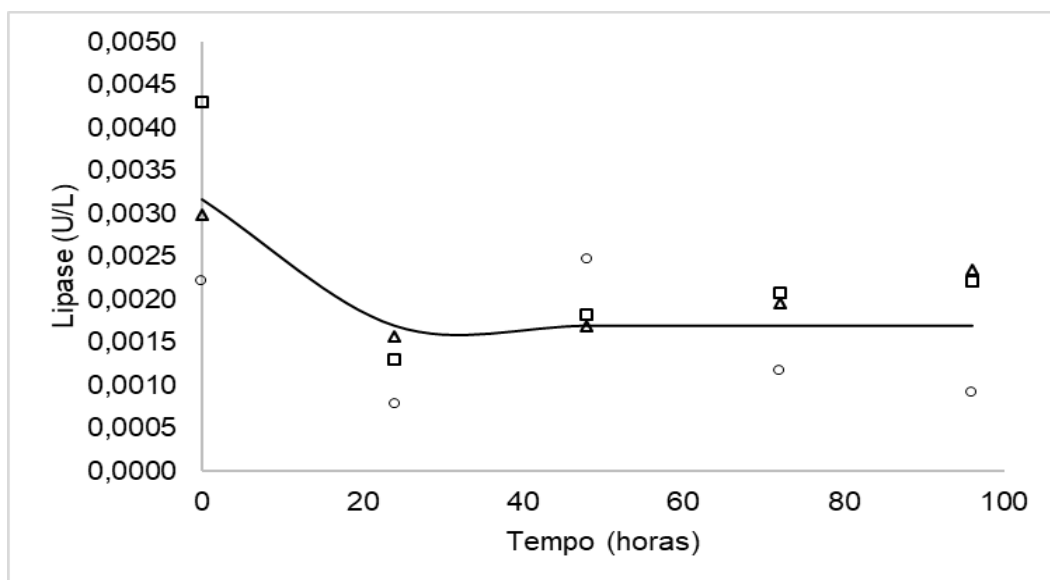
Na Figura 21 é apresentada a cinética de crescimento celular de *B. pumilus*. A concentração celular foi obtida conforme descrito no item 3.4.1 e a curva de calibração está apresentada no Apêndice A (Figura A3).



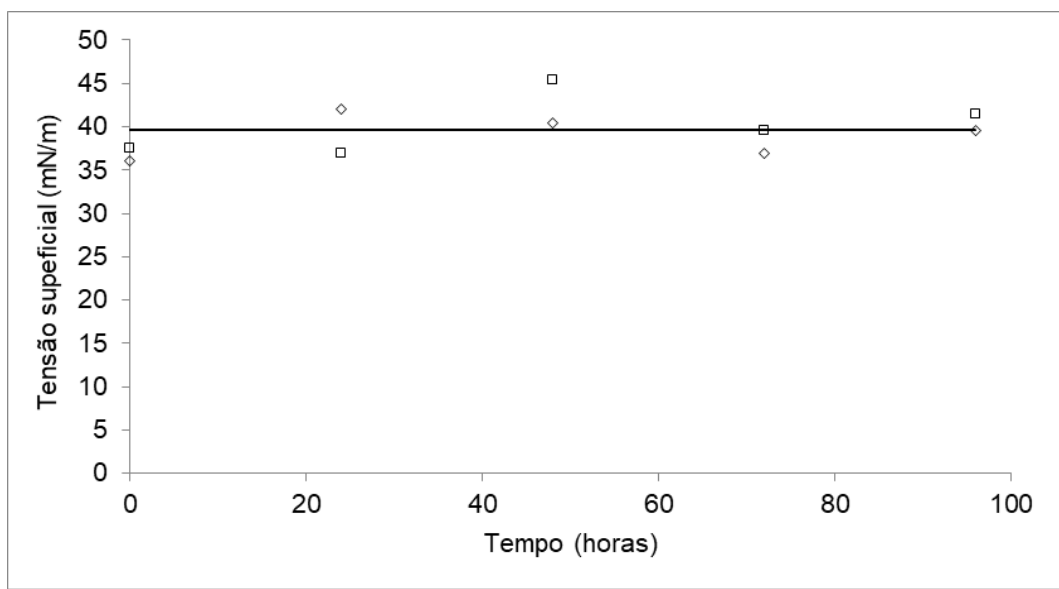
**Figura 21.** Concentração celular (g/L) em função do tempo de cultivo de *Bacillus pumilus* em meio Marine *Broth* adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos.

Não foi possível detectar a fase *lag* de crescimento, provavelmente pelo fato desta ter ocorrido antes do período de 24 horas. *B. pumilus* alcança sua concentração celular máxima de  $3,44 \pm 0,20$  g/L em 24 h de cultivo e, após este período, ocorre o declínio da concentração celular, que atinge  $2,15 \pm 0,28$  g/L. A velocidade específica máxima de crescimento foi de  $0,145 \pm 0,035$  h<sup>-1</sup> (Apêndice B – Figura B3).

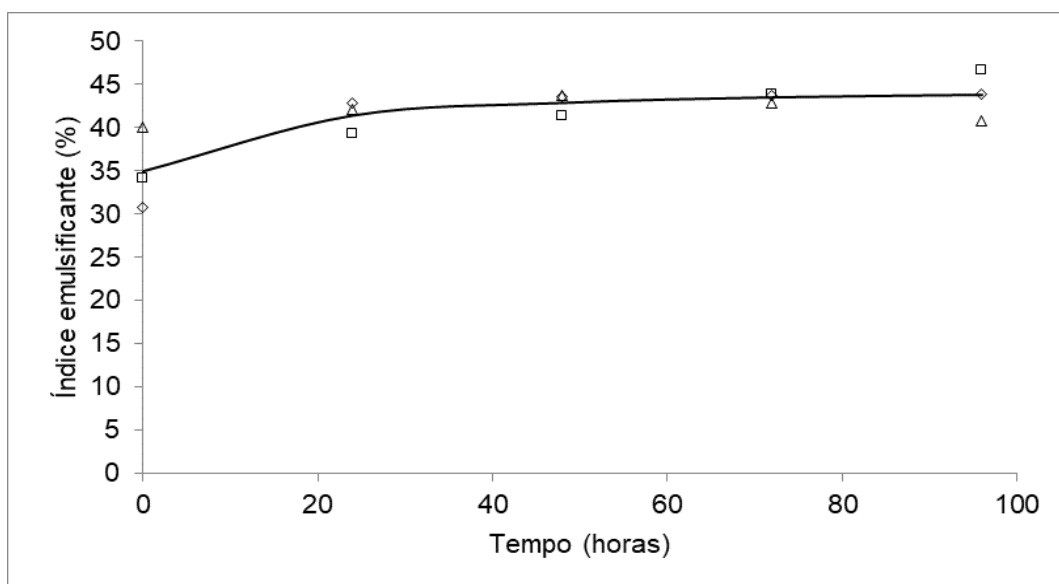
Da mesma forma que *P. marincola* e *E. casseliflavus*, foi possível detectar atividade de lipase ( $0,003 \pm 0,001$  U/L), ainda que incipiente, já no início do cultivo ( $T_0$ ), provavelmente associada ao inóculo. Porém, a atividade decresce em 24 h para  $0,002 \pm 0,001$  U/L, mantendo-se constante até o final do cultivo (96h) (Figura 22).



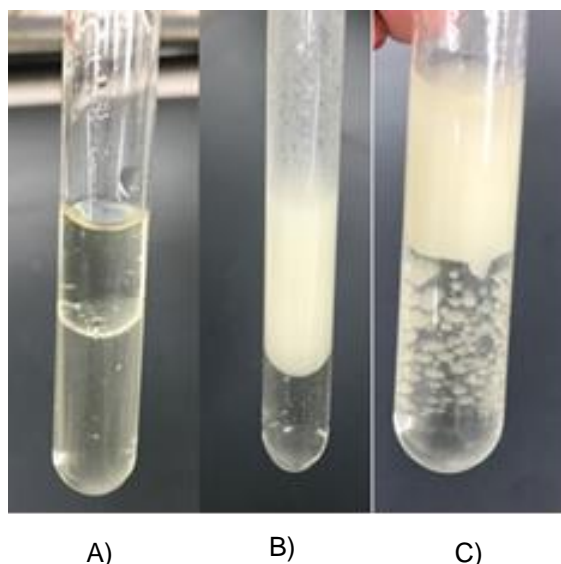
**Figura 22.** Atividade enzimática da lipase (U/L) em função do tempo de cultivo de *Bacillus pumilus* em meio *Marine Broth* adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos.



**Figura 23.** Tensão superficial (mN/m) em função do tempo do caldo de cultivo de *Bacillus pumilus* em meio *Marine Broth* adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.



**Figura 24.** Índice emulsificante (%) em função do tempo do caldo de cultivo de *Bacillus pumilus* em meio *Marine Broth* adicionado de 1 % de óleo de soja como fonte de carbono, a 30 °C, e 120 rpm. Os símbolos representam as replicatas dos valores experimentais e a curva foi traçada como o melhor ajuste entre os pontos, considerando a existência ou não de diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para cada tempo.



**Figura 25.** Determinação do índice de emulsificação. A) Tubo de ensaio contendo 3,5 mL do caldo de 72 horas de cultivo, livre de células de *B. pumilus* adicionado de 2,0 mL de óleo de soja. B) Mistura submetida à agitação máxima no vortex Vision por 2 min. C) Mistura após ter sido mantida em repouso por 24 horas.

Como já observado para os demais microrganismos avaliados, não foi detectada a variação da tensão superficial do meio ao longo do cultivo de *B. pumilus* (Figura 23). A tensão superficial do meio de cultivo inicial foi de  $39,59 \pm 2,89$  mN/m, mantendo-se constante ao longo do cultivo. No entanto, o caldo de cultivo de 72 h ( $T_{72}$ ) proporcionou um maior índice de emulsificação ( $43,49 \pm 0,47$  %) do que o meio de cultivo no tempo inicial ( $T_0$ ) ( $35,00 \pm 3,80$  %), conforme demonstrado nas Figuras 24 e 25. Na Figura 25, o índice de emulsificação é dado pela relação percentual entre a altura da camada emulsificada dividida pela altura total da coluna do líquido.

Por ser encontrado em vários ambientes marinhos, em sedimentos, em animais como estrelas do mar, peixes, ostra e lagostas (PARVATHI *et al.*, 2009) as bactérias do gênero *Bacillus* são muito estudadas. Arild e colaboradores (2013) descrevem três tipos de lipases provindas de *B. pumilus* da Antártida, com atividades de lipase de 1,19 a 1,56 U/mL, usando azeite como fonte de carbono. Isolada do efluente de indústrias por Sangeetha, Geetha e Arulpandi (2010), *B. pumilus*, apresentou uma produção lipídica de 18 U/mg quando cultivada por 26h, a 180 rpm e 37 °C, em meio contendo 1% de glucose, 0,3% de extracto de levedura e 1 % de tributilina (em tampão fosfato de sódio, pH 9,0) pelo método fotométrico. Para *B. cereus*, a produção máxima de lipase (0,987 U/mL) foi observada em 24h, quando foi utilizado meio de

cultivo com 2 % de amido. Rabbani e colaboradores (2013) reportaram atividade lipolítica de 2,33 U/mL por *B. pumilus* isolada de solo contaminado com óleo e de 4,55 U/mL em meio Luria-Bertani (LB) com 2 % de azeite, com concentração celular máxima obtida após 30 horas de incubação, processo este considerado lento para crescimento bacteriano.

Oliveira (2010) analisou a redução da tensão superficial no meio de cultivo de *B. pumilus* adicionado de diferentes substratos, em diferentes concentrações. Os melhores resultados foram obtidos utilizando sacarose 4 % (32 mN/m) em 72 h de cultivo e 2 % de óleo residual de fritura, no tempo de 24 h (45 mN/m). Bento *et al.* (2005) reportaram uma tensão superficial de 49,5 mN/m e um índice de emulsificação de 59 % promovidos por *B. pumilus* em meio de cultivo contendo óleo diesel como única fonte de carbono.

Segundo Cooper e colaboradores (1981) o desempenho da surfactina de *Bacillus subtilis* é dependente do pH. Em pH 2, a tensão superficial do meio contendo surfactina foi de 62 mN/m, mas em pH 6, a tensão foi reduzida para 27 mN/m.

Alguns autores relatam a dependência do índice de emulsificação com a substância a ser emulsificada. Barros *et al.* (2008) avaliaram o índice de emulsificação do caldo de 48 h de cultivo de *B. subtilis* utilizando óleo de milho, azeite de oliva, óleo de gergelim e óleo de soja encontrando 26 %, 15,8 %, 6,2 % e 62,54 %, respectivamente. Oliveira (2010) encontraram um índice de emulsificação de 42,5 % promovido pelo caldo de cultivo de 72 horas de *B. pumilus* cultivado em melaço, sobre tolueno. Segundo Bueno; Da Silva; Garcia (2010), o índice de emulsificação do tolueno promovido pelo caldo de cultivo de *B. pumilus* é influenciado pelo pH, apresentando o melhor IE (48,8 %) utilizando caldo de cultivo de 72 horas e pH 5 e o mais baixo (35,5 %) com o caldo de 96 horas de cultivo e pH 8. O melhor índice de emulsificação (54,5 %) foi obtido quando o sobrenadante do cultivo de 48 horas de *B. pumilus* com gasolina foi utilizado (BUGAY, 2009).

Pinto, Martins e Costa (2009) compararam a produção de biossurfactantes por culturas mistas e puras de *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides* e *Corynebacterium aquaticum*. A cultura pura de *Corynebacterium aquaticum* apresentou a menor tensão superficial (28,8 mN/m), com uma concentração celular de 1,98 g/L demonstrando que a produção de

biossurfactante por este microrganismo não foi aumentada pela presença do gênero *Bacillus*.

A Tabela 1 apresenta um compilado dos resultados encontrados neste trabalho com relação às cinéticas de crescimento celular, produção de lipases e biossurfactantes.

**Tabela 1.** Dados de crescimento celular, atividade de lipase, redução da tensão superficial, e aumento do índice de emulsificação obtidos para *Psychrobacter maricola*, *Enterococcus casseliflavus* e *Bacillus pumilus*.

<b>Microrganismo</b>	<b>Concentração celular máxima (g/L)</b>	<b>Atividade máxima de lipase (U/L)</b>	<b>Redução da Tensão superficial (%)</b>	<b>Aumento do índice de emulsificação (%)</b>
<i>P. maricola</i>	3,95 ±0,08 (72 h)	0,0045±0,0001 (96 h)	0	0
<i>E. casseliflavus</i>	9,06±0,99 (72 h)	0,006±0,02 (0 h)	0	0
<i>B. pumilus</i>	3,44±0,20 (24 h)	0,002±0,001 (24 h)	0	24,26 (72 h)

Fonte: a autora

Os microrganismos avaliados foram cultivados a 30°C e utilizando óleo de soja como fonte de carbono em 120 rpm. Esta condição pode não ser a condição ótima para a produção de lipase, levando a concluir que novos estudos são necessários, utilizando novas fontes de carbono e indutores de lipase. Outro fator que pode estar associado à baixa atividade enzimática é o substrato utilizado para a realização da quantificação da enzima. Neste trabalho, utilizou-se pNPP como substrato. No entanto, Lailaja; Chandrasekaran (2013) observaram redução na atividade de lipase de aproximadamente 190 U/mL para 40 U/mL quando pNPB e pNPP foram utilizados, respectivamente, sugerindo melhor especificidade da enzima por substratos de cadeia curta.

A otimização do meio de cultura geralmente depende do organismo e da composição do meio (TREICHEL *et al.*, 2010) e, como fator mais significativo, o tipo de fonte de carbono e nitrogênio utilizado (RABBANI *et al.*, 2013). A diferença oscilatória entre o tempo e produção de lipase pode ser explicada pela produção de outras enzimas, como as proteases que degradam as lipases no tempo de 48 horas, ou outros fatores relativos ao metabolismo bacteriano, tais como estresse nutricional (BALDO *et al.*, 2013).



Nos testes como indicativo para biossurfactantes (lise do ágar sangue, tensão superficial e índice emulsificante), o método de lise de ágar sangue foi incluído neste estudo uma vez que é amplamente utilizado como método preliminar de triagem na detecção da produção (BANAT, 1993; YONEBAYASHI, *et al.*, 2000, MULLIGAN, *et al.*, 1984). No entanto, nenhum dos estudos menciona a possibilidade de produção de biossurfactante sem atividade hemolítica. Carrillo *et al.* (1996) encontraram associação entre a atividade hemolítica e a produção de surfactantes, e recomendaram o teste da lise de agar de sangue, porém apenas 13,5 % das cepas estudadas reduziram a tensão superficial abaixo de 40 mN/m. No trabalho apresentado, não ocorreu nenhuma, mesmo com atividade hemolítica presente.

De acordo com a literatura, os microrganismos para serem considerados bons produtores de biossurfactantes devem reduzir a tensão superficial do sobrenadante em relação da água, abaixo de 40 mN/m e em torno de 35 mN/m (DESAI; BANAT, 1997; BATISTA *et al.*, 2006). O resultado negativo pode estar associado à baixa tensão superficial inicial do meio de cultivo utilizado. Este dado sugere a presença do surfactante na composição do meio. Sendo assim, mesmo que tenha ocorrido a produção deste metabólito pelo microrganismo, este não afetaria a tensão superficial do meio. Oliveira (2010) observou, utilizando diferentes substratos de cultivo para *Bacillus pumilus*, que a relação entre o aumento da concentração de biossurfactante e a redução da tensão superficial não é linear, mantendo-se constante a partir de determinada concentração.

Quanto ao índice de emulsificação, este também depende da substância a ser emulsificada. Segundo a literatura, para que a emulsão seja considerada satisfatória, deve apresentar valor superior a 40 % (YOUSSEF *et al.*, 2004), e nem todos os biossurfactantes são bioemulsificantes (ROSENBERG; RON 2001; NITSCHKE; PASTORE, 2002) e nem sempre está associada à atividade de redução da tensão superficial (VAN DYKE *et al.*, 1993; WILLUMSEN; KARLSON, 1997; BOSCH *et al.*, 1988; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997).

Oliveira *et al.* (2014) avaliaram a capacidade emulsificante do caldo de cultivo de *Bacillus subtilis* Jag248 cultivado por 30 horas em Meio Mineral e em suco de caju clarificado sobre diferentes fontes hidrofóbicas (óleo de soja, querosene e N-hexadecano). Os autores observaram que, quando o caldo de

cultivo de suco de caju clarificado foi utilizado, os índices de emulsificação foram de 0, 56,86 e 36,28 % para óleo de soja, querosene e N-hexadecano, respectivamente. No entanto, quando o caldo de cultivo do Meio Mineral foi utilizado, os índices de emulsificação obtidos foram de 57,0; 7,2 e 9,64 %, respectivamente. Os resultados mostram que o índice de emulsificação depende tanto do substrato utilizado no cultivo como da fonte hidrofóbica utilizada.

Neste trabalho, o óleo de soja utilizado como fonte hidrofóbica e substrato de cultivo pode não ter sido adequado para obtenção de lipase e biossurfactantes em valores considerados próprios.

## 5. INTERDISCIPLINARIDADE

A interdisciplinaridade na ciência surge como uma proposta agregadora do conhecimento, oferecendo subsídios para interpretação de fenômenos não compreensíveis a partir do conhecimento obtido em uma única área do saber.

Este trabalho teve por objetivo bioprospectar microrganismos produtores de lipases e biossurfactantes fazendo uso da biotecnologia, interdisciplinar na sua essência, pois necessita de um conjunto multidisciplinar de conhecimentos para ser aplicada.

Na área ambiental, os biossurfactantes são utilizados em processos de biorremediação, dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem e na recuperação de petróleo. Na agricultura, podem ser utilizados para obter uma distribuição uniforme de fertilizantes e na formulação de herbicidas e pesticidas. Na área da saúde, possuem várias aplicações farmacêuticas como a inibição da formação de coágulos, a formação de canais iônicos em membranas, atividade antibacteriana, antiviral, antitumoral e antifúngica e inibição da adesão de bactérias entéricas patogênicas. Ainda, na indústria de alimentos, possuem aplicação em panificação e produtos derivados de carne, influenciando nas características da farinha e na emulsificação de gorduras, para formulações de sorvetes e cremes.

Em relação às lipases, podem ser aplicadas na área ambiental na produção e remoção da polpa produzida para a fabricação de papel. Também é considerada um indicador da biodegradação de óleo diesel em solos recém-contaminados, por degradar os resíduos de óleo no ecossistema costeiro. Na área da saúde, a produção de lactonas sintéticas por lipases constitui uma importante aplicação destas enzimas na indústria farmacêutica. Lipases também podem ser utilizadas como agentes terapêuticos no tratamento de insuficiência pancreática exócrina.

Sendo assim, além de contribuir para o conhecimento da microbiota existente em uma área de extrema importância ambiental, este trabalho também permitiu conhecer a potencialidade de produção de lipases e biossurfactantes, compostos com vasta aplicação tanto na área da saúde como na área ambiental.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho de bioprospecção foi possível isolar três microrganismos do manguezal da Baía Babitonga que, por meio de testes qualitativos, apresentaram indicativo de produção de lipases e biossurfactantes: *Psychrobacter maricola*, encontrado em amostras coletadas próximo ao Porto (Porto) e próximo a moradias (Moradia); *Entereccocus casseliflavus*, encontrado nas amostras coletadas próximo ao Porto e no local considerado mais preservado (Controle) e *Bacillus pumilus*, encontrado nos três pontos amostrados.

O cultivo submerso dos isolados permitiu avaliar a cinética de crescimento celular e de produção de lipases e biossurfactantes. Somente *Psychrobacter maricola*, em 96 h de cultivo, foi capaz de produzir lipase, ainda que de forma bastante incipiente  $0,0045 \pm 0,0001$  U/mL. Não foi possível detectar a redução da tensão superficial do meio de cultivo como indicativo da produção de biossurfactantes por nenhum dos microrganismos testados, e somente *B. pumilus* foi capaz de proporcionar um aumento de 24,26 % no índice emulsificante, em 72 h de cultivo. Os baixos valores encontrados podem tanto ser atribuídos à baixa capacidade de produção de lipases e biossurfactantes pelos microrganismos isolados, bem como podem ser resultantes das condições de cultivo utilizadas (meio de cultivo – óleo de soja como fonte de carbono, temperatura, pH etc.).

Este trabalho traz como perspectiva o estudo do meio e das condições de cultivo na tentativa de otimizar a produção de lipases e biossurfactantes pelos microrganismos isolados. Ainda, a presença de *Entereccocus casseliflavus*, um conhecido patógeno oportunista, em sedimentos do manguezal da Baía Babitonga requer estudos mais aprofundados sobre a possível origem e resistência a antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

- AKIN, N. *et al.* Changes of free fatty acid contents and sensory properties of white pickled cheese during ripening. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 77–83, 2003.
- ALQUATI, C.; DE GIOIA, L.; SANTAROSSA, G.; ALBERGHINA, L.; FANTUCCI, P.; LOTTI, M. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. **European Journal of Biochemistry**, v.8, p. 269:3321, 2002.
- ALONGI, D. M. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. **Microbial Ecology**1, v. 15, p. 59–79, 1988.
- ARILD *et al.* Isolation and biochemical characterization of *Bacillus pumilus* lipases from the Antarctic. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 661–667, 2013.
- ARTUSO, A. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. **World Development**, v. 30, n. 8, p. 1355–1368, 2002.
- BALDO, C. *et al.* Estudo da produção de lipase por bactérias isoladas de efluente de abatedouro avícola. Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. **Biochemistry and Biotechnology Report**, v. 2, n. 3, p. 347-350, 2013.
- BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 6, p. 591–594, 1993.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495–508, 2000.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, 2007.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. DE; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979–985, 2008.
- BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F.R; TÓTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 187–194, 2006.
- BENASSI, V. M. *et al.* Production and action of an *Aspergillus phoenicis* enzymatic pool using different carbon sources. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 3, p. 253–260, 2012.

- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the carbon source. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.54, p.283-288, 2002.
- BENINCASA, M.; MARQUÉS, A.; PINAZO, A.; MANRESA, A. *Rhamnolipid* Surfactants: Alternative Substrates, New Strategies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v 672, p. 170-184, 2010.
- BENTO, F. M. *et al.* Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p.65-68, 2003.
- BENTO, K.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B; FRANKENBERGER, W.T. Jr. Diversity of biosurfactant production by microorganisms isolated from soil contaminated with diesel oil. **Microbiological Research**, v. 160, n. 3, p. 249-255, 2005.
- BERGLUND, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. **Biomolecular Engineering**, v. 18, n. 1, p. 13–22, 2001.
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by Hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231–236, 1999.
- BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. **Fermentação em estado sólido**. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W (Org.). *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, p. 264, 2001.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.
- BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Biosurfactants: Types, screening methods and applications. In: **Encyclopedia of Environmental Microbiology**, p.750-770, 2002.
- BOGNOLO, G. Biosurfactant as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. Amsterdam, v.152, p.41-52, 1999.
- BOWMAN, J.P.; CAVANAGH, J.; AUSTIN, J.J.; SANDERSON, K. Novel *Psychrobacter* species from antarctic ornithogenic soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.46, p. 841-848, 1996.
- BOWMAN, J.P., NICHOLS, D.S., MCMEEKIN, T.A. *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 209-215, 1997.
- BOWMAN, J. P.; MCCAMMON, S. A.; DANN, A. L. Biogeographic and quantitative analyses of abundant uncultivated *gamma-proteobacterial* clades from marine sediment. **Microbial Ecology**, v. 49, n. 3, p. 451–460, 2005.

- BOWMAN, J.P. **The Genus Psychrobacter**. In: The Prokaryotes. Eds. DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. Heidelberg: Springer. p. 920-930, 2006.
- BOSCH, M.P.; ROBERT, M.; MERCADE, M.E.; ESPUNY, M.J.; PARRA, J.L.; GUINEA, J. Surface-active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 25, p. 208–211, 1988.
- BOZAL, N.; MONTES, M.J.; TUDELA, E.; GUINEA, J. Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p.1093-1100, 2003.
- BRAUD, A.; JÉZÉQUEL, K.; LÉGER, M.; LEBEAU, T. Siderophore production by using free and immobilized cells of two pseudomonads cultivated in a medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p.1080-1088, 2006.
- BRITO, E.M.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M.A.C. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 157, p. 752–762, 2006.
- BRITO, E.M.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; GARCIA DE OTEYZA, T.; CRAPEZ, M.A. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 58, p. 418–423, 2009.
- BRZOZOWSKI, A. M.; et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, p. 491-4, 1991.
- BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. 89 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2008.
- BUENO, S. M.; DA SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1572–1577, 2010.
- BUGAY, C. **Estudos de produção e caracterização biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.** 2009, 82 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Setor de Ciências Exatas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- BURKERT, J.F.M; MAUGERI, F; RODRIGUES, M. Optimization of extracellular lipase production by *Penicillium chrysogenum* using factorial design. **Bioresource Technology**, n. 91, p. 77–84, 2004.

- CAI, Q., *et al.* Screening of biosurfactant producers from petroleum hydrocarbon contaminated sources in cold marine environments. **Marine Pollution Bulletin**, n.86, p. 402-410, 2014.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 520–529, 1998.
- CAMPBELL, B. J. *et al.* Growth and phylogenetic properties of two novel thermophilic epsilon *Proteobacteria* from *Alvinella pompejana* and deep-sea hydrothermal vents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4566–4572, 2001.
- CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.J.; GIULIETTI, A.M. Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.12, p. 82–84, 1996.
- CASTRO, P; HUBER, M.E. **Biologia Marinha**. 8 ed: Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **Biopharm Journal**, v.1, n. 2, p. 41-47, 2015.
- CHRISTOFF, A. P. *et al.* Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. **White Paper: Bacterial NGS Sequencing**, May 2017, 2017.
- CINTRON, G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Características y desarrollo estructural de los manglares de Norte y Sur America. **Ciencia Interamericana**, v. 25, n.1-4, p. 4-15, 1985.
- COELHO, J. *et al.* Biosurfactants production by the quinoïne degrading marine bacterium *Pseudomonas* sp. strain GU 104, and its effect on the metabolism of green mussel *Perna perna* L. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 32, n. 3, p. 202–207, 2003.
- CONSEMA/002. **Lista Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de extinção no Estado de Santa Catarina**. 2011.
- COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**. n. 42, v. 3, p. 408–412, 1981.
- COSTA, C.C.; GOMES, A.K.M. OLIVEIRA, S.A.S.; COSTA, J.G.C.; MACEDO, G.R. Seleção e isolamento de microrganismos de manguezais com potencial para degradação de petróleo. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal (RN) Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. 2009.



COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863–873, 1999.

CREMER, M. J.; MORALES, P. R. D.; OLIVEIRA, T. M. N. DE. **Diagnóstico Ambiental da Baía da Babitonga**. 1ª Edição. Ed. Universidade da Região de Joinville, 2006.

CURY, J. D. E. C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com Petróleo**. p.84. 2002  
Dissertação (Mestrado em Agronomia – Solos e nutrição de plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, 2002.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEM, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104 1675–1684, 2008.

DECESARO, A. *et al.* Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947–954, 2013.

DESAI, A. J.; PATEL, R. M.; DESAI, J. D. Advances in the production of biosurfactants and their commercial applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, n. 53, p. 619-629, 1994.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties, applications**. KOSARIC, N. ed. Marcel Decker: New York, cap. 3. 1993.

DÉZIEL, E., LÉPINE, F., MILOT, S., VILLEMUR, R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanooyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. **Microbiology**, v.149, p. 2005-2013. 2003.

DHEEMAN, D.S.; FRIAS, J.M.; HENEHAN, G.T.M. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 1, n. 37, p. 1–17, 2010.

DHILLON, S. S. *et al.* Bioprospecting: effects on environment and development. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 31, n. 6, p. 491–493, 2002.

DIAS, C. C.; COSTA, M. C. DA. International cooperation and bioprospecting in Brazil and Peru. **Reciis**, v. 1, n. 1, p. 121–125, 2007.

DIAS, A. C. F. *et al.* Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1305–1311, 2009.

DOS SANTOS, H. F. *et al.* Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: Bacterial proxies for oil pollution. **Plos One**, v. 6, n. 3, p. 1–8, 2011.

DWORNICZEK, E. *et al.* *Enterococcus* in wound infections: virulence and antimicrobial resistance. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. n.59, v. 2, p. 263–269,2012.

EGGERT, T.; VAN POUDEROYEN, G.; DIJKSTRA, B. W.; JAEGER, K. E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. **FEBS Letters**, v. 502, p. 89-92, 2001.

ETTOUMI, B. *et al.* *Gammaproteobacteria* occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea sediments as revealed by cultivation-dependent and -independent approaches. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 222–231, 2010.

FASANELLA, C. C. **Diversidade da comunidade de fungos em solos de manguezais do Estado de São Paulo**. 2012. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

FELLER, G. *et al.* Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 239–243, 1990.

GAMERO, R.M.P. **Mineralogia, físico –química e classificação dos solos de mangue do Rio Iriri no Canal de Bertioiga (SANTOS-SP)**. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado na área de Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GASPARIN, F. G. M. *et al.* Produção de lipase e biossurfactante por isolado de efluente de laticínio. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 28–31, 2012.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface - Active Compounds from Microorganisms. **Biotechnology**, v. 10, p. 60-65, 1992.

GERHARDINGER, L. C. *et al.* Conhecimento ecológico local de pescadores da Baía Babitonga, Santa Catarina, Brasil: Peixes da família Serranidae e alterações no ambiente marinho. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 253–261, 2006.

GHIZELINI, M. A.; MENDONÇA-HAGLER, C. S. L.; MACRAE, A. Microbial diversity in brazilian mangrove sediments - A mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1242–1254, 2012.

GONZALEZ, J. M.; MORAN, M. A. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4237–4242, 1997.

GRUPO FREEDONIA. World enzyme demand: Disponível em < <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html> > Acesso em: 10 nov.2016.

GUDIÑA, E.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, R. L. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. **Marine Drugs**, v.14, p. 1-15, 2016.

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, v.311(1), p. 98-99, 2002.

HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235- 251, 2006.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 4, p. 265–278, 2001.

HOLLIGER, C. *et al.* Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: Organic contaminants. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 517–523, 1997.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.

IBAMA. **Proteção e controle de ecossistemas costeiros: Manguezal da Baía Babitonga. Brasília: IBAMA. Coleção Meio Ambiente, Série Estudos de Pesca**, p. 146 ,1998.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sc/sao-francisco-do-sul/panorama> > Acessado em: 14 de novembro de 2017.

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

JACQUES, R. J. S. *et al.* Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192–1201, 2007.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Letters**, v. 332, p. 143-149, 1993.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

JENNINGS, E. M.; TANNER, R. S. Biosurfactant - Producing Bacteria Found in Contaminated and Uncontaminated Soils. **Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research**, p. 299–306, 2000.

KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 307-313, 2003.

KAZLAUSKAS, R. J. *et al.* A rule to predict which enantiomer of a secondary Alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 8, p. 2656–2665, 1991.

KIRAN, G. S. *et al.* A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms. **Bioengineered Bugs**, v. 5, n. 5, p. 305–318, 2014.

KIRAN, G. S. *et al.* Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1- 11, 2017.

KNIE, J. L. W. **Atlas ambiental da região de Joinville – Complexo hídrico da Baía da Babilonga**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2002.

KOCH, A.K.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington v. 173, p.4212-4219, 1991.

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

KHOSROWABADI, E.; HUYOP, F. Screening and characterization of several 2,2-dichloropropionic acid-degrading bacteria isolated from Marine Sediment of Danga Bay and East Coast of Singapore Island. **Bioremediation Journal**, v. 18, n. 1, p. 20–27, 2014

KOSARIC, N. **Biosurfactants and their application for soil bioremediation**. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.4, p.295-304, 2001.

KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 211–213, 1987.

- LANG, S.; PHILP, J. Surface-active Lipids in Rhodococci. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 59-70, 1998.
- LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.7, p. 12-20, 2002.
- LAILAJA, V. P.; CHANDRASEKARAN, M. Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1349- 1360, 2013.
- LAWRANCE, A., *et al.* Functional and molecular characterization of a lipopeptide surfactant from the marine sponge-associated eubacteria *Bacillus licheniformis* NIOT-AMKV06 of Andaman and Nicobar Islands, India. **Marine Pollution Bulletin**, v.82, p. 76- 85, 2014.
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, DA.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41 p. 105-110, 2003.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 31, p. 53-61, 2004.
- LIMA, T. M. S. *et al.* Biodegradability of bacterial surfactants. **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 585–592, 2011.
- LONGO JUNIOR L. S; BOMBONATO I. F.; FERRAZ, H. M. C. Métodos de preparação de lactonas de anel médio. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 415 – 424, 2007.
- LOZANO, L. Crossm Draft Genome Sequence of *Enterococcus casseliflavus* PAVET15 Obtained from the Oviduct Infection of the Cattle Tick (*Rhipicephalus microplus*) in Jiutepec, Morelos, Mexico. **Genome Announcements**. v. 5, n. 16, p. 16–17, 2017.
- MACHADO, A. C. D. O. **Obtenção de intermediários quirais utilizando Lipases em reatores assistidos por membranas**. 2011. 165p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2011.
- MACIEL-SOUZA, M. D. C. *et al.* Chemical and microbiological characterization of mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara Bay - RJ - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262–266, 2006.
- MAIER, R.M.; SOBERON, C.G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 54, p.625-633, 2000.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus strains* at thermophilic conditions. **Journal of the**

**American Oil Chemists Society**, v. 74, n. 7, p. 887–889, 1997.

MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. Understanding structural features of microbial lipases – An overview. **Analytical Chemistry Insights**, v. 3, p. 9-19, 2008.

**MARKETS E MARKETS**. Plataforma de inteligência competitiva e de pesquisa de mercado. Disponível em < <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lipase-market-205981206.html> > Acesso em: 05 fev. 2018

MARTINEZ-TOLEDO, A., *et al.* Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *Pseudomonas putida* in different media. **Environ Technologies**, v. 27, p. 137– 42. 2006.

MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Lipases and biosurfactant production by solid state fermentation for utilization in bioremediation of vegetable oils and hydrocarbons. **Química Nova**. n. 31, v. 8 ,p.1942–1947, 2008.

MEDEIROS, A. W. *et al.* PCR-RFLP of 16S ribosomal DNA to confirm the identification of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* isolated from clinical and food samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 100–101, 2010.

MENEZES, C. B. A. *et al.* Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 2010.

MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MORAN, A.C.; MARTINEZ, A. M.; SINERIZ, F. Quantification of surfactin in culture supernatant by hemolytic activity. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 3, p. 177–180, 2002.

MORAIS, J. F. *et al.* Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, p. 27–34, 2014.

MULLIGAN, C.N.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. **Journal of Fermentation Technology**, v.62, n. 4, p. 311–314, 1984.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, 2005.

MUNIZ, E. DA R.; CUNHA CHAVES, P. DE T. DA. Condição reprodutiva da betara preta, *Menticirrhus americanus* (Teleostei, sciaenidae), na pesca realizada no litoral norte de Santa Catarina, Brasil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 339–344, 2008.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 252 - 259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

NOBLE, M. E.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L. N.; EGMOND, M. R.; FRENKEN, L. G. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS Letters**, v. 331, p. 123-128, 1993.

OLIVEIRA, D.W.F. **Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* LAMI005 utilizando suco de caju clarificado**. 2010. p. 86. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OLIVEIRA, D. W. F. *et al.* Avaliação da produção de biosurfactantes por diferentes linhagens de *Bacillus* sp. isoladas de solos de manguezal. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, p. 1–8, 2014.

OSORIO, N M; GUSMÃO, J.H; DA FONSECA, M. M. Response surface modelling of the production of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 677–686, 2001.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p.119–31,1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANITZ, M. N. **Manguezais de Santa Catarina (Limite Austral): Estrutura, função e manejo**. Trabalho apresentado ao Departamento de Biologia da UFSC no Concurso. Público na classe de Prof. Titular da UFSC. Florianópolis, p. 175, 1993.

PAPPAS, G. *et al.* *Enterococcus casseliflavus* bacteremia. Case report and literature review. **Journal of Infection**, v. 48, n. 2, p. 206–208, 2004.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

PATNALA, H. S.; KABILAN,U.; Gopalakrishnan, L.; Rao, R.M.D; Kumar, D.S. Marine Fungal and Bacterial Isolates for Lipase Production: A Comparative Study. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 71- 94. 2016.

PAULA, A.V.; BARBOZA, J.C.S.; CASTRO, H.F. Study of the influence of solvent, carbohydrate and fatty acid in the enzymatic synthesis of sugar esters by lipases. **Química Nova**. n. 28, v. 5, p. 792–796, 2005.

PEIXOTO, R. *et al.* Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**,

**International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 341–354, 2011.

PARVATHI, A. *et al.* Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 269–75, 2009.

PEPI, M.; CESÀRO, A.; LIUT, G.; BALDI, F. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p.157–166, 2005.

PETCON. **Atualização do plano de desenvolvimento e zoneamento do Porto de São Francisco do Sul**. Brasília, DF. 2003.

PERFUMO, A.; SMYTH, T. J. P.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. **Production and roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in accessing hydrophobic Substrates**. K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, p. 1502-1510, 2010.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553 - 563, 1999.

PINTO, M. H. *et al.* Avaliação Cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2104–2108, 2009.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006, 61 P. Dissertação ( Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro – São Paulo, 2006.

PRADA-GAMERO, R. M.; VIDAL-TORRADO, P.; FERREIRA, T. O. Mineralogia e físico-química dos solos de mangue do Rio Iriri no canal de bertioaga (Santos, SP). **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 28, n. 2, p. 233–243, 2004.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of Paraffins Biodegradation and Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* in the Presence of Crude Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 321-324, 2003.

RABBANI, M. *et al.* Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1113–1119, 2013.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strain *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Program**, v. 18, p. 1277-1281, 2002a.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, p. 284-291, 2002b.



RAPPE, M. S.; KEMP, P. F.; GIOVANNONI, S. J. Phylogenetic diversity of marine coastal picoplankton 16S rRNA genes cloned from the continental shelf off Cape Hatteras, North Carolina. **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 5, p. 811–826, 1997.

RAVENSCHLAG, K. *et al.* High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3982–3989, 1999.

RAVENSCHLAG, K. *et al.* Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in Marine Arctic Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3592–3602, 2000.

RAVENSCHLAG, K.; SAHM, K.; AMANN, R. Quantitative molecular analysis of the microbial community in Marine Arctic Sediments ( Svalbard ). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 387–395, 2001.

RAYKOVA, D.; PEYKOV, S.; DIMOV, S. Growth kinetics and bacteriocin production by three *Enterococcus* strains under low-temperature stress. **Trakia Journal of sciences**, v. 6, p. 49–53, 2008

REID, W.V. *et al.* **Biodiversity Prospecting: Using genetic resources for sustainable development**. Washington, DC. Copyright. P. 1- 345. 1993.

REID, K. C.; COCKERILL, F. R.; PATEL, R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, 1540–1546, 2001.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review P. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 237- 250, 2009.

ROBERT, J. M. **Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*: avaliação de meio de cultivo e aumento de escala**. 2015. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Instituto de Química .Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

ROMANENKO, L. A. *et al.* *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 2002, p. 1291–1297, 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low molecular mass antimicrobial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 154 - 162, 1999.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values : critical values of Dixon' s “ Q ” parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. **Analytical Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 139–146, 1991.

- ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126–131, 2010.
- SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Concomitant Production , Partial Purification and Characterization of a Serine Protease and a Proteolysis-Resistant Metallolipase from *Bacillus pumilus* SG2. **Zeitschrift für Naturforschung**. n. 65, p. 61 – 65, 2010.
- SAFARI, R. *et al.* Host-derived probiotics *Enterococcus casseliflavus* improves resistance against *Streptococcus iniae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via immunomodulation **Fish and Shellfish Immunology**, v. 52, p. 198–205, 2016.
- SARADA, R.; JOSEPH, R. Purification and properties of lipase from the anaerobe Propionibacterium acidipropionici. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 69, p. 974-977, 1992.
- SARAFIN, Y. *et al.* *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511–519, 2014.
- SARETHY, I. P., *et al.* Alkaliphilic bacteria: Applications in industrial biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 769 – 790, 2011.
- SATPUTE, S. K.; BHAWSAR, B. D.; DHAKEPHALKAR, P. K.; CHOPADE, B. A. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 37, p. 243-250, 2008.
- SATPUTE, S. K.; PLAZA, G. A.; BANPURKAR, A. G. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. **Management Systems in Production Engineering**, v. 1, n. 25, p. 46-54, 2017.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo, Ed. Scielo Books., p. 64, 1995.
- SHARMA R., CRISTY Y., BANERJEE U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.
- 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, M. C. M. DA. **Diagnóstico ambiental do manguezal da Baía da Babitonga, Santa Catarina, através do uso de indicadores ecológicos (Parâmetros foliares e produtividade de serapilheira)**. 2001. 112 p.

Dissertação ( Mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOARES, D. **Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de Bacillus sp. isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará-Brasil)**. 2014, 162 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Setor de Graduação em Engenharia Química da Universidade de Granada (UGR – Espanha) para obtenção do Grau de Doutor em Química – Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Ceará, 2014.

SOUZA, A. Q. L. DE *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.

SOUZA-CONCEIÇÃO, J. M. *et al.* O papel de praias estuarinas como habitats para peixes em um ambiente subtropical Brasileiro. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 121–131, 2013.

TAKETANI, R. G. *et al.* Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 7–15, 2010.

TAN, T. *et al.* Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 459–465, 2003.

TONINI, R. M. C. W.; DE REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 4, p. 1025–1035, 2010.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2008.

TREICHEL, H. *et al.* A review on microbial lipases production. **Food and Bioprocess Technology**. v. 3, p.182–196, 2010.

TURNBULL, P. C. B. **Medical Microbiology**. 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996.

UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T. A. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, p. 790-792, 1994.

VAN DYKI, M. I.; LEE, H.; TREVORS, J. T. **Biotechnology and Advance**. Editor in Chief: E.A. Bayer v. 9, p. 241- 245, 1991.

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. São Paulo: Edusp, p. 233.1999.

VATER, J. Lipopeptides, an Attractive Class of Microbial Surfactants. **Progress in Colloid & Polymer Science**, v. 72, p. 12–18, 1986.

VELIKONJA, J.; KOSARIC, N. **Biosurfactant in food applications**. In: Kosaric N, ed. *Biosurfactants: Production, Properties, Applications*. New York: Marcel Dekker, p. 419-446, 1993

VERGER, R. Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. *et al.* Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

VINARDELL, M.P.; INFANTE, M.R. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 117–120, 1999.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application on cell cultures of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 44-49, 1997.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related sub- strates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fer- mentation media. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v.41, p. 30-37, 2008.

WANG, S.L. *et al.* Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, p. 65–73, 2009.

WASSERMAN, J. C. *et al.* Hydrocarbons and bacterial activity in mangrove sediments from Guanabara Bay, Brazil. **Geochemica Brasiliensis**, v. 20, n. 1, p. 14–25, 2006.

WEI, Y.; CHOU, C.; CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

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

WHITAKER, J.R. **Principals of enzymology for the food sciences**. In: **Food science**. New York, p. 481-501. 1972.

YONEBAYASHI, H. *et al.* Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery processes. **Sekiyu Gakkaishi**, v. 43, n. 1, p. 59–69, 2000.

YOUSSEF, N. 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.

ZAHID, S. *et al.* Prevalence and genetic profiling of tetracycline resistance ( Tet-R ) genes and transposable element ( Tn916 ) in environmental Enterococcus species. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 252-261, 2017.

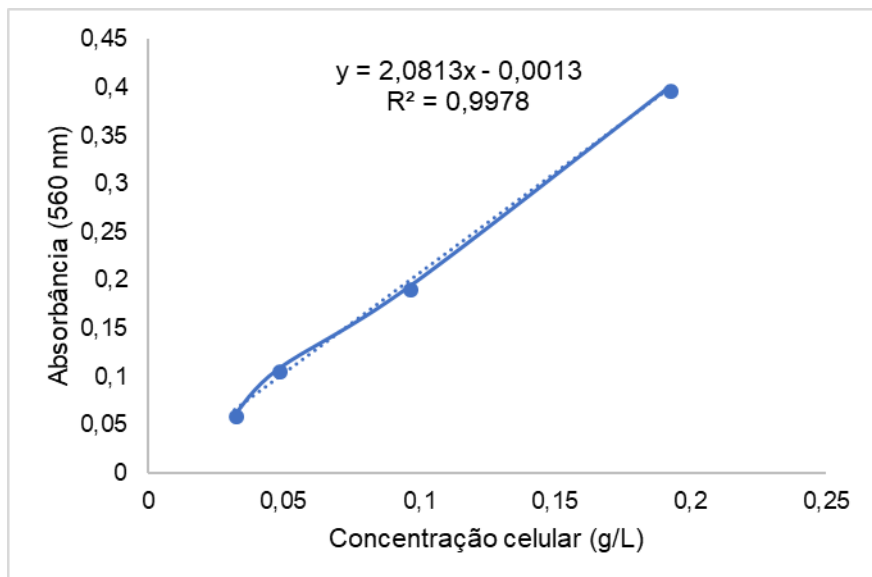
ZAHRAN, H. H. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 211-223, 1997.

ZHANG, J.; LIN, S.; AND ZENG, R. Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep-sea psychrotrophic bacterium, *Psychrobacter* sp. 7195. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 604 -610, 2007.

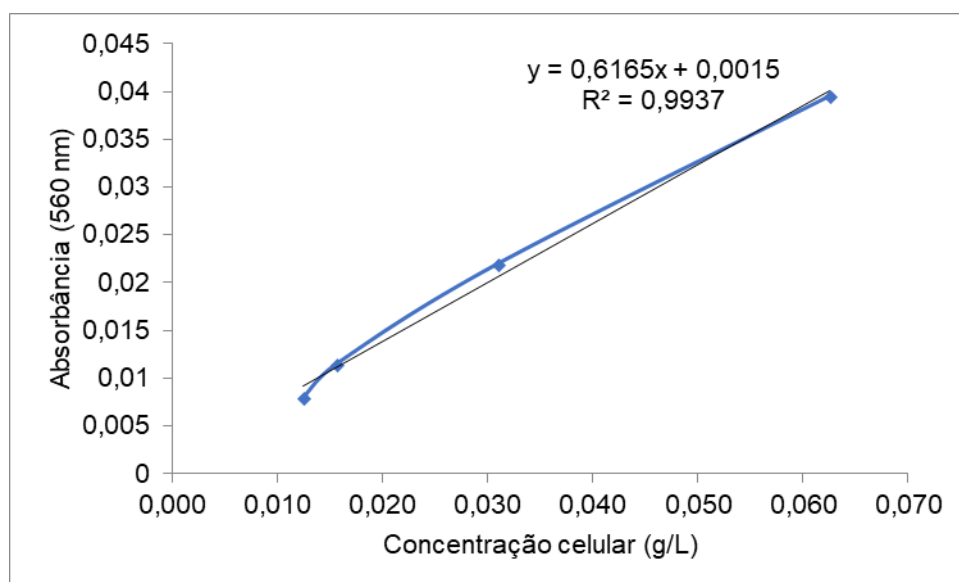
ZENG, X.; XIAO, X.; WANG, P.; WANG, F. Screening and characterization of psychrotrophic, lipolytic bacteria from deep-sea sediments. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 952-958, 2004.

## APÊNDICE A

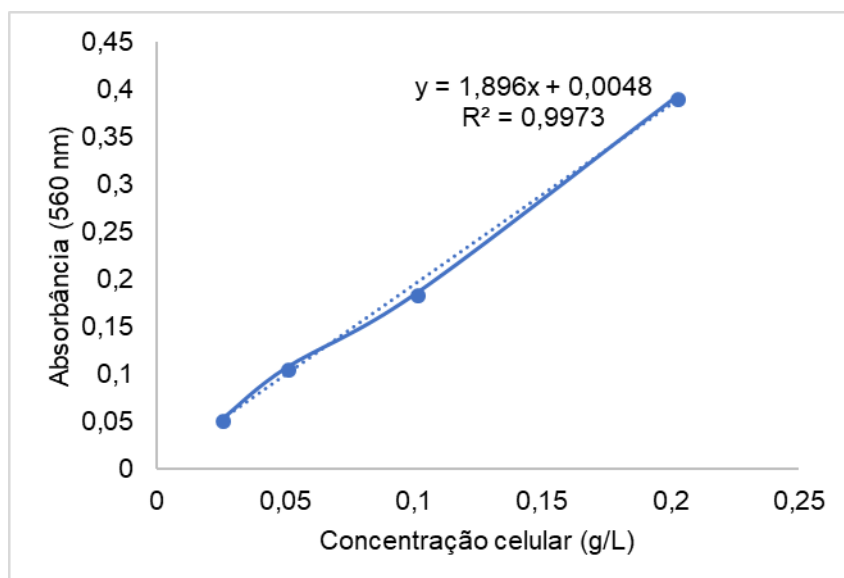
### Curvas de calibração da concentração celular



**Figura A1-** Curva de calibração resultante do plote da concentração celular de *Psychrobacter marincola* em função da absorbância (560 nm).



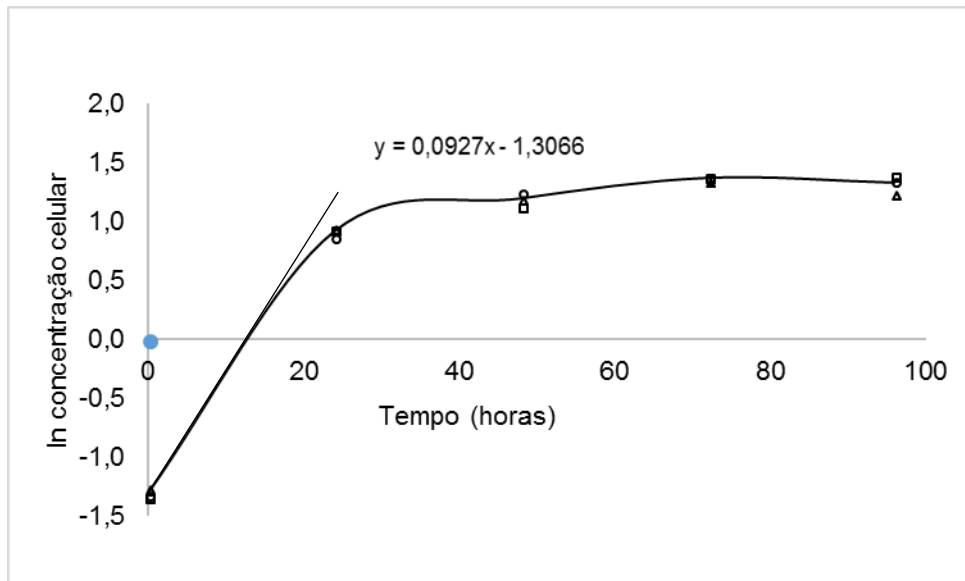
**Figura A2-** Curva de calibração resultante do plote da concentração celular de *Enterococcus casseliflavus* em função da absorbância (560 nm).



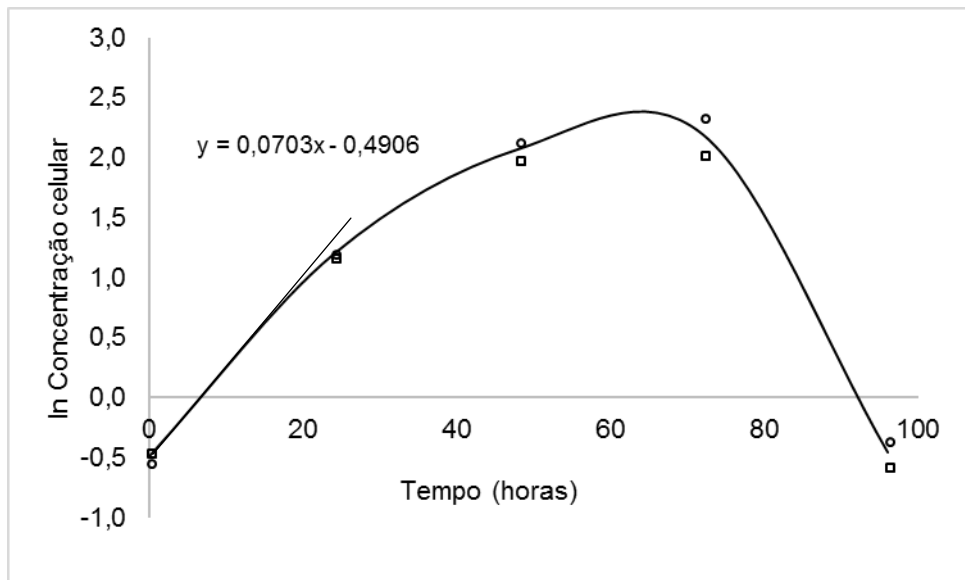
**Figura A3-** Curva de calibração resultante do plote da concentração celular de *Bacillus pumilus* em função da absorbância (560 nm).

## APÊNDICE B

Determinação da velocidade específica máxima de crescimento

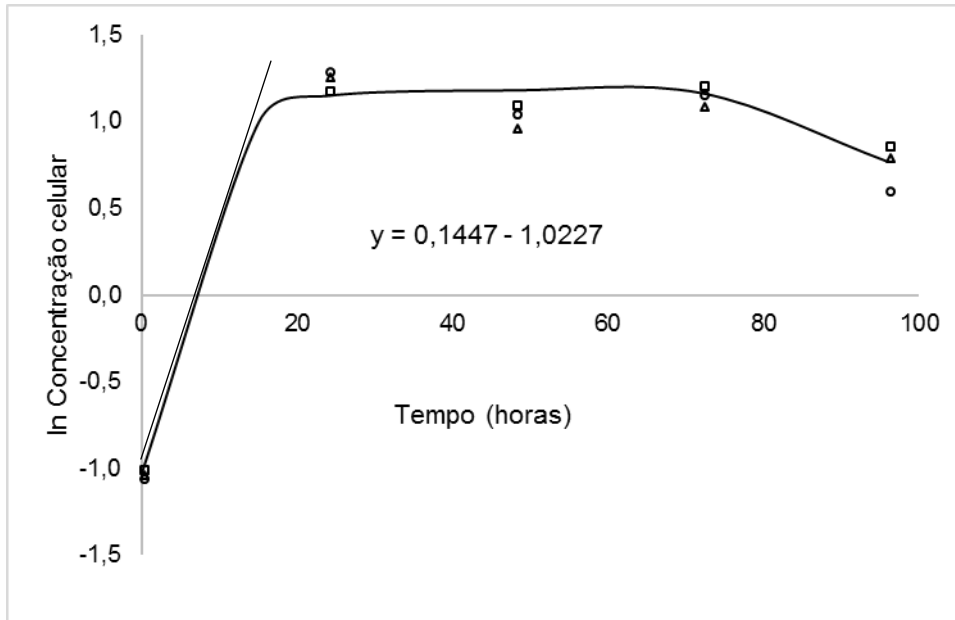


**Figura B1-** Logaritmo neperiano (ln) da concentração celular de *Psychrobacter maricola* em função do tempo de cultivo.



**Figura B2-** Logaritmo neperiano (ln) da concentração celular de *Enterococcus casseliflavus* em função do tempo de cultivo.





**Figura B3-** Logaritmo neperiano (ln) da concentração celular de *Bacillus pumilus* em função do tempo de cultivo.

## AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: *Mamela Loureiro Protes Affranda*

RG: *5856672*

Título da Dissertação: *Bioprospeção de microrganismos produtores de lipase e biosurfactantes isolados do manguezal da Baía Babitonga - SC*

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, *18* de *julho* de 2018.



Assinatura do aluno