

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MARCELA NUNES ARGENTIN

Biossurfactante produzido por linhagem termo-halofílica de *Bacillus alveayuensis*: caracterização química e avaliação da atividade tensoativa em meio poroso com óleo e sobre microrganismos

São Carlos

2022

MARCELA NUNES ARGENTIN

Biossurfactante produzido por linhagem termo-halofílica de *Bacillus alveayuensis*: caracterização química e avaliação da atividade tensoativa em meio poroso com óleo e sobre microrganismos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular

Opção: Física Biomolecular

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Nelma Regina Segnini Bossolan

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Argentim, Marcela Nunes

Biossurfactante produzido por linhagem termo-halofílica de *Bacillus alveayuensis*: caracterização química e avaliação da atividade tensoativa em meio poroso com óleo e sobre microrganismos / Marcela Nunes Argentim; orientadora Nelma Regina Segnini Bossolan - versão corrigida -- São Carlos, 2022.

157 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Lipopeptídeo. 2. Petróleo. 3. Extremófilo. 4. Molhabilidade. 5. Ação antimicrobiana. I. Bossolan, Nelma Regina Segnini, orient. II. Título.

*À minha família,
Inês Nunes Argentin, Edson Argentin Focchi, Sarah Nunes Argentin e Tiago
César dos Santos*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Aos meus três amores, Tiago, Lisa e Bacalhau, vocês surgiram em minha vida para torná-la mais alegre e feliz, amo vocês!!

À minha orientadora, Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan por todo o suporte, paciência e incentivo durante esses nove anos juntas.

A todos os amigos que fiz no decorrer da graduação, na pós-graduação e no laboratório de Biofísica, muito obrigada pelos momentos de descontração que estarão sempre em minha memória.

Ao Laboratório de Biofísica e Biologia Estrutural “Sérgio Mascarenhas e ao Instituto de Física de São Carlos – USP” pela infra-estrutura fundamental ao desenvolvimento deste trabalho. Aos técnicos Andressa, Bel, Rafael e Fernando por toda ajuda durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Márcia Nitschke e ao Grupo de Biotecnologia Microbiana, especialmente à técnica Marília Milanetto pela ajuda nos momentos necessários.

Ao Prof. Dr. André Porto e a Dra. Rafaely Nascimento Lima pelas medidas de Cromatografia a Gás realizadas no Grupo de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

Ao Prof. Dr. Paulo Lacava e ao Departamento de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos pelas linhagens de fungos usadas neste estudo.

À Fundação de Apoio à Física e à Química, à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e à PETROBRAS S/A pelo apoio financeiro, e à PETROBRAS S/A pela disponibilização das amostras usadas no projeto.

Ao Centro de Pesquisas e Desenvolvimento da PETROBRAS (CENPES), em especial ao Luiz Fernando Martins, por todo auxílio e atenção dada durante este trabalho.

A todos os funcionários do Serviço de Pós-Graduação, Biblioteca, Gráfica, Limpeza e ao Setor de Informática-Sinfor do IFSC por serem sempre tão prestativos nos momentos de necessidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

A todos vocês que sempre terão um lugar cativo em meu coração meu
MUITO OBRIGADA!

"...A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: "Não há mais o que ver", saiba que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se viu no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles.

É preciso recomeçar a viagem. Sempre."

(José Saramago)

RESUMO

ARGENTIN, M. N. **Biossurfactante produzido por linhagem termo-halofílica de *Bacillus alveayuensis***: caracterização química e avaliação da atividade tensoativa em meio poroso com óleo e sobre microrganismos. 2022. 157 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas provenientes de metabolismo secundário microbiano capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre fases não miscíveis, possuindo assim, uma ampla gama de aplicações industriais e ambientais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização do biossurfactante produzido pela linhagem bacteriana Ar70C7-2, isolada de amostras rochosas de um reservatório de petróleo *offshore* profundo localizado na Bacia de Campos (RJ). A estrutura química, propriedades tensoativas e ação antimicrobiana do biossurfactante foram estudadas para fins de aplicação na indústria do petróleo e de biocontrole microbiano. Essa linhagem, que apresentou 100% de similaridade com *Bacillus alveayuensis*, foi cultivada em Meio Mineral com glicerol e NH_4NO_3 , contendo 70 g/L de NaCl, incubada a 55 °C e sem agitação para a produção de biossurfactante. O tensoativo produzido foi removido do meio através de precipitação ácida (HCl 6M), com rendimento de 0,27 g/L, seguido de extração com clorofórmio, semipurificação em coluna de sílica gel 60 e purificação no sistema *Äkta Purifier* acoplado a uma coluna C18. Suas propriedades tensoativas foram avaliadas indiretamente através de medidas do índice de emulsificação (E_{24}) e diretamente pela tensão superficial e interfacial em tensiômetro automático, usando o método do anel de Du Nouy. Sua composição de aminoácidos foi determinada por HPLC, a quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa e a estrutura química por espectroscopia de massas. O biossurfactante semipurificado (0,1%) apresentou E_{24} acima de 55%, tensão superficial de 31,8 mN/m, tensão interfacial (contra n-hexadecano) de 17,6 mN/m e concentração micelar crítica de 65 mg/L. Sua composição proteica foi de 7%, com cadeia de ácidos graxos variando de C_{14} a C_{18} e homólogo C_{16} como o mais abundante. A presença de cadeia de ácidos graxos juntamente a aminoácidos indica que o biossurfactante pertence à classe dos lipopeptídeos. Os espectros de massa indicam a presença de surfactina (m/z 1066,

1072, 1078 e 1081) e iturina (1066, 1072 e 1078), além de fengicinas (m/z 1331, 1354, 1410, 1424, 1434, 1452, 1495, 1553 e 1623). O biossurfactante semipurificado foi usado em testes de atividade antifúngica contra onze linhagens de fungos fitopatogênicos, onde foi observada completa inibição do crescimento das hifas em *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sojae* e *Lasidiplodia euphorbicola* e inibição parcial em *Ceratocystis paradoxa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus microsporus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. A atividade do tensoativo também foi testada contra as linhagens bacterianas *Bacillus subtilis* (ATTC 6633 e 21332), *Staphylococcus epidermidis* (ATTC 12228 e 35984), *Pseudomonas fluorescens* (ATTC 13525), *Escherichia coli* (ATTC 25922) e *Desulfovibrio marinus* BRS-1. Nos testes de microdiluição o biossurfactante causou uma inibição inicial pronunciada no crescimento de *B. subtilis* 6633, *S. epidermidis* (12228 e 35984), e moderada em *P. fluorescens* 13525. Sobre a bactéria redutora de sulfato *D. marinus* BRS-1 o biossurfactante mostrou ação bacteriostática e bactericida nas concentrações 2.250 e 2.500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O tensoativo semipurificado teve sua capacidade de recuperação de óleo em meio poroso avaliada pelo método de lavagem de areia, sendo capaz de remover, aproximadamente, 30% do óleo de motor (10W40) presente na amostra. O biossurfactante produzido pela linhagem estudada mostrou potencial aplicação em processos de MEOR e biorremediação de óleo, além de ser capaz de inibir o crescimento de fungos e bactérias, podendo ter utilidade com agente de biocontrole.

Palavras-chave: Lipopeptídeo. Petróleo. Extremófilo. Molhabilidade. Ação antimicrobiana.

ABSTRACT

ARGENTIN, M. N. **Biosurfactant from thermohalophilic strain of *Bacillus alveayuensis***: chemical characterization and evaluation of surface-activity in oily porous medium and on microorganisms. 2022. 157 p. Thesis (Doctor in Science) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Biosurfactants are amphiphilic microbial secondary metabolites capable of reducing the surface and interfacial tensions between two immiscible phases, characteristics that make them highly applicable in different industrial and environmental sectors. The goal of this work was to characterize the biosurfactant produced by bacterial strain Ar70C7-2, isolated from rock samples of a deep offshore oil reservoir located at Campos Basin (RJ). The chemical structure, surface-active properties and antimicrobial action of the biosurfactant were studied for application in the petroleum industry and microbial biocontrol. The strain showed 100% similarity with *Bacillus alveayuensis* and its biosurfactant was produced by growth in Mineral Medium with glycerol and NH_4NO_3 , 70 g/L of NaCl and statically incubated at 55 °C. Crude biosurfactant obtained by acid precipitation (0.27 g/L yield) was extracted with chloroform followed by semi-purification on a silica gel 60 column and purification on a C18 column attached to an *Äkta Purifier* system. Surface-active properties was evaluated by measuring the emulsification index (E_{24}) and surface/interfacial tension by a Du Nouy ring method on an automatic tensiometer. The amino acid profile was determined by HPLC, the quantification of fatty acids by gas chromatography and the chemical structure by mass spectroscopy. The semi-purified biosurfactant (0.1%) showed E_{24} above 55%, surface and interfacial tension of 31.8 and 17.6 mN/m with critical micellar concentration in 65 mg/L. The results indicated the presence of 7% of protein, fatty acid chains varying from C_{14} to C_{18} atoms, with C_{16} homolog being the most abundant. The presence of fatty acid chains and amino acids indicates that the biosurfactant belongs to the class of lipopeptide. Mass spectra showed the presence of surfactin (m/z 1066, 1072, 1078 e 1081), iturin (1066, 1072 e 1078) and fengycin (m/z 1331, 1354, 1410, 1424, 1434, 1452, 1495, 1553 e 1623). Antifungal activity was determined against eleven different phytopathogenic fungal strains using biosurfactant semi-purified. Complete inhibition of hyphal growth was observed in cultures of *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sojae* and *Lasidiplodia*

euphorbicola, and partial inhibition on *Ceratocystis paradoxa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus microsporus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Antimicrobial activity was performed against the bacterial strains *Bacillus subtilis* (6633 e 21332), *Staphylococcus epidermidis* (12228 e 35984), *Pseudomonas fluorescens* (13525), *Escherichia coli* (25922) and *Desulfovibrio marinus* BRS-1. In microdilution tests, biosurfactant caused a pronounced inhibition in the initial growth of *B. subtilis* 6633, *S. epidermidis* (12228 and 35984), and moderate in *P. fluorescens* 13525. On the sulfate-reducing bacteria *D. marinus* BRS-1, concentrations of 2,250 and 2,500 µg/mL were shown to be bacteriostatic and bactericidal respectively. The biosurfactant had the oil recovery capacity evaluated by sand-washing method being able to remove approximately 30% of oil present in the sample. Its surface-active properties associated with its good removal oil capacity suggest applicability in MEOR process and oil bioremediation, in addition to being able to inhibit the fungi and bacterial growth, and may have application as biocontrol agent.

Keywords: Lipopeptide. Petroleum. Extremophile. Wettability. Antimicrobial action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura bidimensional de uma molécula de surfactina com as regiões de seus domínios polar e apolar destacados na figura.	30
Figura 2 -	Representação da distribuição de moléculas de tensoativo em um sistema monofásico polar. (a) Moléculas estão adsorvidas nas interfaces presentes no sistema, (b) todas as interfaces passam a ser ocupadas, gerando um aumento na solubilidade dos tensoativos na fase aquosa e, (c) situação onde se inicia a formação de micelas, com destaque à estrutura da micela, ao lado.....	33
Figura 3 -	Representação da distribuição de moléculas de tensoativo em um sistema bifásico, contendo água e óleo. (a) Moléculas estão adsorvidas nas interfaces presentes no sistema, (b) todas as interfaces passam a ser ocupadas, gerando um aumento na solubilidade dos tensoativos em ambas as fases e, (c) situação onde se inicia a formação de micelas, com destaque à estrutura da micela, ao lado.	35
Figura 4 -	Estrutura esquemática, representando a família das surfactinas e suas possíveis isoformas.	40
Figura 5 -	Figura esquemática, representando a família das iturinas e suas possíveis isoformas.	41
Figura 6 -	Estrutura esquemática da família das fengicinas e suas possíveis isoformas.	43
Figura 7 -	Estrutura esquemática da família das kurstakinas e suas possíveis isoformas.....	44
Figura 8 -	Fluxograma representativo das etapas experimentais realizadas neste trabalho.	53
Figura 9 -	Curva modelo representando o método para determinação da concentração micelar crítica (CMC) através da medição da tensão superficial de uma solução de BS após sucessivas diluições em água destilada.....	60
Figura 10 -	Teste de inversão de molhabilidade da rocha carbonática pelo método de Washburn, onde (a) Imagem esquemática do procedimento e (b) foto ilustrativa para exemplificar o processo.	62
Figura 11 -	Figura esquemática representando as concentrações de BS utilizadas na microplaca de 96 poços.	69
Figura 12 -	Colônias de Ar70C7-2 (a) durante seu isolamento e (b) sob microscópio ótico com aumento de 4x.....	73
Figura 13 -	Árvore filogenética baseada pelo método de Neighbor Joining para o alinhamento entre Ar70C7-2 e os microrganismos que apresentaram maior semelhança, de acordo com os resultados apresentados pela DSMZ em 2017. Os valores de Bootstrap (%) com base em 1.000 conjuntos de dados reamostrados são mostrados nos nós de ramificação.	74
Figura 14 -	Resultado apresentado pela empresa DSMZ para a análise de ácidos graxos celulares.....	80
Figura 15 -	Fotos das etapas do processo de extração e semi-purificação do biosurfactante obtido a partir do cultivo de Ar70C7-2. (a) Frasco contendo o precipitado formado após 12 horas da adição de HCl concentrado ao sobrenadante do cultivo em Meio Mineral. (b) Precipitado BSBBr formado em (a) seco em liofilizador. (c) BSEx seco após extração com clorofórmio e (d) BSSP60 seco obtido por separação em coluna de sílica.	82
Figura 16 -	Cromatoplaça obtida na corrida da amostra BSEx com acetonitrila como tampão, (a) mancha revelada com ninhidrina indicando a presença de	

	aminoácidos, (b) mancha revelada em 254 nm, indicando que a amostra correu corretamente na cromatoplaca.	83
Figura 17 -	Gráfico de concentração vs tensão superficial para cálculo da CMC de BSSP60.	85
Figura 18 -	Teste de flotação feito com (a) água destilada, controle negativo; (b) BSSP60, 0,01% e (c) Tergitol 0,01%, controle positivo.	87
Figura 19 -	Curvas obtidas pelo método de Washburn no tensiômetro OneAttention 701.	89
Figura 20 -	Curva padrão com solução de albumina bovina obtida pelo método BCA para a quantificação de proteína do biossurfactante.	90
Figura 21 -	Aminoácidos presentes na amostra BSSP60 determinada por hidrólise ácida e análise enzimática.	91
Figura 22 -	Resultado obtido da cromatografia gasosa total da amostra de BSSP60 após etanólise.	93
Figura 23 -	Espectros de massas (MALDI/TOF) da surfactina comercial (Sigma-Aldrich) usada como padrão.	95
Figura 24 -	Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema <i>Akta Purifier</i> de BSPu produzida por Ar70C7-2. (a) Amostra selecionada m/z 1066 e (b) fragmentação deste íon.	96
Figura 25 -	Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema <i>Akta Purifier</i> de BSPu produzida por Ar70C7-2. (a) Amostra selecionada m/z 1081 e (b) fragmentação deste íon.	97
Figura 26 -	Representação do primeiro padrão de íons observados na fragmentação de m/z 1066 m/z 1066 da amostra BsPu, sugerindo ser uma surfactina C_{17}	98
Figura 27 -	Representação do segundo padrão de íons observados na fragmentação de m/z 1066 da amostra BsPu, sugerindo ser uma iturina A_2	99
Figura 28 -	Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema <i>Akta Purifier</i> de BSPu produzida por Ar70C7-2. (a) 1072 (b) 1078.	100
Figura 29 -	Representação do padrão de íons observados na fragmentação de m/z 1081 da amostra BsPu, sugerindo ser uma pumilacidina C_{16}	101
Figura 30 -	Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema <i>Akta Purifier</i> de BSPu que demonstra a possível presença de fengicina.	103
Figura 31 -	Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema <i>Akta Purifier</i> de BSPu que demonstra a possível presença de fengicina.	104
Figura 32 -	Resultado obtido durante a extração do óleo com as soluções inicialmente selecionadas; (a) biossurfactante 0,1%; (b) Tergitol 0,01% e (c) salmoura com 5% de NaCl. Na parte superior da imagem, observa-se os frascos vistos de cima.	108
Figura 33 -	Extração do óleo presente no meio poroso por diferentes concentrações de tergitol. A partir da concentração de 0,5%, observa-se a formação de uma película de óleo no topo da coluna líquida.	109
Figura 34 -	Ensaio de inibição de micélio expostos a diferentes concentrações de BSSP60 (placas com poços) em culturas de (a) <i>Moniliophthora perniciosa</i> , (b) <i>Phytophthora sojae</i> , (c) <i>Lasidiplodia euphorbicola</i> e (d) <i>Ceratocystis paradoxa</i> . Ao lado de cada placa-teste, está a placa controle (placa com ausência de poços) sem rifampicina (a, c, d) e com rifampicina (b).	114
Figura 35 -	Ensaio de inibição do crescimento de esporos após 5 dias de cultivo em (a) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , (b) <i>Moniliophthora perniciosa</i> , (c) <i>Ceratocystis paradoxa</i> e (d) <i>Rhizopus microsporus</i> . Ao lado de cada placa-teste, está a placa	

	controle (placa com ausência de poços) com rifampicina (a, b) e sem rifampicina (c, d).	115
Figura 36 -	Resultado do teste de disco-difusão para a confirmação da sensibilidade das bactérias testadas ao biossurfactante produzido por Ar70C7-2. (a) <i>S. epidermidis</i> 35984, (b) <i>P. fluorescens</i> 13525, (c) <i>B. subtilis</i> 6633 e (d) e <i>B. subtilis</i> 21332.	117
Figura 37 -	Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra <i>B. subtilis</i> 6633.....	120
Figura 38 -	Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra <i>B. subtilis</i> 21332.....	121
Figura 39 -	Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra <i>E. coli</i> 25922.....	122
Figura 40 -	Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra <i>P. fluorescens</i> 13525.	123
Figura 41 -	Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra <i>S. epidermidis</i> 12228.....	124
Figura 42 -	Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra <i>S. epidermidis</i> 35984.	125
Figura 43 -	Imagem representativa dos níveis de crescimento utilizado para a confecção da Tabela 9, onde (a) mostra ausência de crescimento (-) e (b), (c) e (d), níveis progressivos de crescimento, respectivamente (+), (++) (+++).	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de similaridade do gene 16S rRNA de Ar70C7-2 com os mesmos genes de microrganismos depositados na base de dados EMBL/RDP, indicados pela DSMZ. Busca realizada em 2017.	71
Tabela 2 -	Tabela comparativa dos testes bioquímicos entre Ar70C7-2 e os microrganismos de maior semelhança, de acordo com a DSMZ. (+) reação positiva, (-) reação negativo, (NI) dado não infirmado, (w) reação fraca e (d) ocorreram reações diferentes.	76
Tabela 3 -	Tabela comparativa dos testes API® entre Ar70C7-2 e os microrganismos de maior semelhança, de acordo com a DSMZ. (+) reação positiva, (-) reação negativo, (NI) dado não infirmado, (w) reação fraca e (d) ocorreram reações diferentes.	77
Tabela 4 -	Valores de tensão superficial das frações de BS obtidas durante o processo de purificação.	83
Tabela 5 -	Aminoácidos presentes em quantidades acima de 1g/100g na amostra BSSP60 e suas proporções relativas.	91
Tabela 6 -	Compostos preditos pela análise cromatográfica de BSSP60.	93
Tabela 7 -	Resumo dos aminoácidos presentes nos lipopeptídeos sugeridos para os picos observados em conjunto com o resultado obtido pelo aminograma.	106
Tabela 8 -	Medidas de tensão superficial e interfacial das soluções usadas no ensaio de remoção de óleo. As medidas de tensão interfacial foram realizadas com óleo de motor 10W40.	109
Tabela 9 -	Resultado obtido para antibiograma contra <i>D. marinus</i> . Onde: (-) indica ausência de crescimento e (+), (++) e (+++) indicam os níveis progressivos de crescimento, como demonstrado na Figura 42. T1, T2 e T3 indicam as réplicas.	127
Tabela 10 -	Resultado obtido para antibiograma contra <i>D. marinus</i> . Onde: (-) indica ausência de crescimento, (+), (++) e (+++) indicam os níveis progressivos de crescimento, como demonstrado na Figura 42 e (*) frascos utilizados como inóculo. T1, T2 e T3 indicam as réplicas.	128
Tabela 11 -	Resultado do crescimento dos frascos de antibiograma após 5 dias. Onde: (-) indica ausência de crescimento, (+), (++) e (+++) indicam os níveis progressivos de crescimento, como demonstrado na Figura 38 e (*) frascos utilizados como inóculo. T1, T2 e T3 indicam as réplicas.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ala	Alanina
API® 50 CH	Analytical Profile Index
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. alveayuensis</i>	<i>Bacillus alveayuensis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BDA	Ágar Batata Dextrose
BlastN	Basic Local Alignment Search Tool
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BS	Biossurfactante
BSBr	Biossurfactante bruto
BSEx	Biossurfactante extraído
BSPu	Biossurfactante Purificado
BSSP60	Biossurfactante semipurificado (60% acetoneitrila)
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
<i>C. paradoxa</i>	<i>Ceratocystis paradoxa</i>
CAQI	Central de Análises Químicas Instrumentais
CCQA	Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMC	Concentração Micelar Crítica
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
<i>D. marinus</i>	<i>Desulfovibrio marinus</i>
DO	Densidade óptica
DSMZ	Leibniz Institute – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E ₂₄	Índice de Emulsificação após 24h
ELSD	detector de dispersão de luz

EOR	Enhanced Oil Recovery
<i>F. solani</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>F. verticillioides</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografia gasosa
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho
IFSC-USP	Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo
Ile	Isoleucina
IQSC-USP	Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
<i>L. euphorbicola</i>	<i>Lasiodiplodia euphorbicola</i>
LB	Meio Luria-Bertani
LB*	Meio Luria-Bertani modificado
Leu	Leucina
Lys	Lisina
<i>M. perniciosa</i>	<i>Moniliophthora perniciosa</i>
m/v	Massa/volume
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MEGA7	software Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.7
MEOR	Microbial Enhanced Oil Recovery
MH	Meio Mueller Hinton
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MM	Meio Mineral
Orn	Ornitina
<i>P. sojae</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
Ppm	Partes por milhão

Pro	Prolina
<i>R. microsporus</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>
RLs	Ramnolipídeos
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SLs	Soforolipídeos
Thr	Treonina
TI	Tensão Interfacial
TLC	Thin Layer Chromatography
TOF	Time of Flight
TS	Tensão Superficial
Tyr	Tirosina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages
v/v	Volume/volume
Val	Valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	29
2.1	BIOSURFACTANTE	29
2.2	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE PELO GÊNERO <i>BACILLUS</i>	37
2.3	BIOSURFACTANTE NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO	45
3	OBJETIVOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	MICROORGANISMO	53
4.2	MANUTENÇÃO DAS CULTURAS-ESTOQUE DA LINHAGEM AR70C7-2.....	54
4.3	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM AR70C7-2	54
4.4	COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	56
4.5	PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE	57
4.6	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO	58
4.7	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES TENSOATIVAS	59
4.7.1	<i>Cálculo de Concentração Micelar Crítica</i>	59
4.7.2	<i>Índice de emulsificação E_{24}</i>	60
4.7.3	<i>Tensão superficial e interfacial</i>	60
4.7.4	<i>Ensaio de flotação</i>	61
4.7.5	<i>Inversão de molhabilidade</i>	62
4.8	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	63
4.8.1	<i>Quantificação total de proteína</i>	63
4.8.2	<i>Quantificação de aminoácidos</i>	63
4.8.3	<i>Análise de perfis de ácidos graxos</i>	63
4.8.4	<i>Espectrometria de massas</i>	64
4.9	EFICÁCIA DA REMOÇÃO DE ÓLEO DE MEIO POROSO PELO BIOSURFACTANTE	64
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO BIOSURFACTANTE	65
4.10.1	<i>Linhagens testadas e armazenamento</i>	65
4.10.2	<i>Avaliação da atividade antifúngica pelo teste de difusão em ágar</i>	66

4.10.3	<i>Avaliação da atividade do biossurfactante na germinação de conídios</i>	66
4.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO BIOSSURFACTANTE	67
4.11.1	<i>Linhagens testadas e padronização do inóculo</i>	67
4.11.2	<i>Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão</i>	68
4.11.3	<i>Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição</i>	68
4.11.4	<i>Avaliação da atividade contra bactéria anaeróbia pelo método de diluição em caldo</i>	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1	A CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA LINHAGEM AR70C7-2	71
5.2	BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO PELA LINHAGEM AR70C7-2.....	81
5.2.1	<i>Avaliação das propriedades tensoativas do biossurfactante</i>	83
5.2.2	<i>Caracterização química do biossurfactante</i>	89
5.3	EFICÁCIA DA REMOÇÃO DE ÓLEO DE MEIO POROSO PELO BIOSSURFACTANTE.....	107
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO BIOSSURFACTANTE	111
5.4.1	<i>Avaliação da atividade antifúngica</i>	111
5.4.2	<i>Avaliação da atividade antibacteriana</i>	116
6	CONCLUSÕES	131
	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICE - ENSAIO DE INIBIÇÃO DE MICÉLIO EXPOSTO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BSSP60	155

1 INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes, compostos de origem microbiana com propriedades tensoativas, têm sido alvo de muitas pesquisas devido à possibilidade de seu uso em várias áreas industriais, principalmente naquelas que visam uma alternativa ao uso de surfactantes sintéticos. Esse interesse reside nas características que os biossurfactantes apresentam, como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, atividade em condições extremas de temperatura, salinidade e pH. Se por um lado essas características são atrativas em termos de variedade de aplicações, eficácia de ação e impacto ambiental, por outro, o rendimento e custo de produção são fatores limitantes para o uso em escala comercial.¹

Os biossurfactantes são compostos anfífilos formados por um domínio hidrofóbico e um domínio hidrofílico produzidos por microrganismos eucariotos e procariotos. Nos procariotos, são metabolitos secundários, produzidos para aumentar a biodisponibilidade de compostos não miscíveis a água, podendo também atuar como composto antimicrobiano e de regulação das propriedades da superfície celular para adesão ou desprendimento de superfícies.² Devido a sua variedade estrutural, os biossurfactantes podem ser classificados em cinco classes: glicolipídeos; lipopeptídeos e lipoproteínas; ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos; biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados.³

Segundo Sałek e Euston,¹ três biossurfactantes – surfactina, ramnolipídeo e soforolipídeo - já apresentam uso comercial com aplicações bem definidas. Os gêneros bacterianos produtores destes compostos são *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Candida*. A surfactina, vendida como surfactina sódica, disponível através da empresa japonesa dermatológica Kaneka,⁴ pode ser usada em formulação de cosméticos. Esta empresa, em conjunto com a empresa italiana, Sabo, lançou seu primeiro produto à base de surfactina em 2015, o Sabo[®]Sol RF,⁵ um agente reengordurante para formulações de produtos de higiene pessoal. O ramnolipídeo pode ser encontrado a venda pela empresa Rhamnolipid Inc.,⁶ que oferece produtos à base de ramnolipídeos, para controle de pragas, por exemplo, além de empresas como Logos Technologies LLC que lançou um produto contendo este glicolipídeo, chamado NatSurFact^{®7} e AGAE Technologies.⁸ Ambos produtos são descritos como aplicáveis em diferentes ramos industriais, como cuidados pessoais, limpeza industrial e doméstica, medicina, agricultura, tratamento de águas residuais,

recuperação de óleo e biorremediação.⁷⁻⁸ Um sofrorolípídeo foi comercializado pela primeira vez pela empresa Alemã Evonik,⁹ Rewoferm®, já disponível comercialmente, para formulação de detergentes e produtos de limpeza para cuidados domésticos. Além disso, lipídeos de manosileritritol, representantes da família dos glicolípídeos, podem ser encontrados em cosméticos da empresa japonesa Toyobo Co., Ltd, com o nome de SurfMellow®.¹⁰

Na indústria do petróleo, os compostos com ação surfactante são usados na biorremediação e dispersão em derramamento de petróleo, limpeza de tanque estoque, dessorção de metais pesados, assim como nos processos de EOR.¹¹⁻¹² Particularmente em EOR, os surfactantes sintéticos são usados em processos químicos para a extração do óleo, alterando sua característica, na tentativa de reduzir as forças de capilaridade que retêm o óleo preso à rocha. Porém, em geral, estes compostos são derivados de produtos petroquímicos, o que torna esse processo caro e gera resíduos indesejáveis, os quais são de difícil descarte, ocasionando um impacto ambiental.¹² Assim, a indústria petrolífera tem investido na pesquisa de compostos alternativos aos surfactantes sintéticos, como os biosurfactantes. Devido às condições extremas de alguns reservatórios quanto à temperatura e salinidade, a busca de microrganismos produtores de biosurfactantes tem residido na microbiota dos reservatórios, os quais poderão ser utilizados para promover a remoção do óleo residual, em um conjunto de processos conhecido como *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR).²

Alvarez e colaboradores¹³ analisaram 217 espécies isoladas de amostras de ambientes contaminados com petróleo e/ou seus derivados. Destes, 19 linhagens se mostraram boas produtoras de BS e, dentre essas, uma foi selecionada para estudo. Identificada como *Bacillus amyloloquefaciens*, esse microrganismo produziu uma surfactina capaz de reduzir a tensão superficial da água para 28,5 mN/m e interfacial para 11,4 mN/m, permanecendo estável após ser autoclavado por 20 minutos. Hentati e colaboradores¹⁴ estudaram a produção de BS por uma linhagem de *Bacillus stratosphericus* isolada da água do mar contaminada com óleo no porto de Sfax, na Tunísia. Os pesquisadores mostraram a alta estabilidade do lipopeptídeo frente a extremos de temperatura, pH e salinidade, além de apresentar melhor remoção de poluentes de solo contaminado do que alguns surfactantes sintéticos, como Tween 20, Tween 80, Triton X-100 e SDS. Já *Bacillus tequilensis*,¹⁵ produtor de surfactina e isolado de um reservatório em Assam, foi capaz de reduzir a tensão

interfacial entre água e o petróleo de Assam para 0,32 mN/m, com eficiência de 80% na remoção de petróleo a partir de amostras de areia contaminada.

Microrganismos do gênero *Bacillus* têm sido isolados de reservatórios e também empregados em testes *in situ* de MEOR.¹⁶ O BS produzido por esse gênero é majoritariamente classificado como lipopeptídeo, cujas famílias mais comumente descritas são surfactina/liquisina, iturina, fengicina, kurstakina, daptomicina e viscosina.¹⁷ Sua cauda inclui uma cadeia de hidrocarbonetos, saturados ou insaturados e, sua cabeça polar é constituída por uma sequência peptídica, podendo estar disposta de forma cíclica. Essa disposição é descrita como aquela que apresenta um maior potencial industrial, no combate a pragas agrícolas e no campo da medicina, onde alguns lipopeptídeos são descritos como agentes antimicrobianos.¹⁷⁻¹⁸

O lipopeptídeo produzido por *Bacillus siamensis* exibiu maior atividade, se comparado com os antibióticos comerciais bacitracina e vancomicina, contra várias linhagens patogênicas como *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA B15, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*.¹⁹ A mistura de surfactina e iturina produzida por *Bacillus velezensis* demonstrou ser capaz de suprimir os sintomas causados por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, uma bactéria gram-positiva considerada uma das mais destrutivas doenças do tomateiro.²⁰ Já Daptomicina, um lipopeptídeo cíclico isolado de *Streptomyces roseosporus*, apresentou atividade contra diversas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, sendo aprovada pela FDA (U.S. Food and Drug Administration) para tratamento contra *S. aureus*. Este lipopeptídeo já é produzido pela indústria farmacêutica *Cubist Pharmaceuticals* e comercializado sob o nome de *Cubicin*®.²¹⁻²² Além disso, a fengicina produzida por *Bacillus* spp. se mostrou capaz de reduzir e, em alguns casos, até erradicar uma infecção causada pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum acutatum*.²³

O presente trabalho teve origem em um dos resultados alcançados por um projeto de desenvolvimento e pesquisa (P&D) celebrado entre a PETROBRAS S/A e o IFSC-USP (Processo 2012/00187-0), de nome “Prospecção de linhagens bacterianas termofílicas produtoras de surfactantes e de enzimas do grupo lipase/esterase em reservatórios de petróleo”, sob coordenação da Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan (IFSC-USP). Este projeto, que teve vigência entre

os anos de 2012 e 2017, resultou no isolamento linhagens bacterianas produtoras de biossurfactantes a partir de óleo e rocha de um reservatório de petróleo pós-sal, do tipo carbonático, localizado na Bacia de Campos (RJ) e explorado pela PETROBRAS S/A. A linhagem Ar70C7-2, isolada de cultivo de rocha reservatório e inicialmente identificada como *Bacillus* sp., foi uma das escolhidas para a continuidade dos estudos com relação à produção de biossurfactante, a partir de triagem prévia para tal dentre os isolados (testes de índice de emulsificação e do colapso da gota). Com essa linhagem foram conduzidos ensaios em diferentes condições de crescimento (temperatura, oxigênio, salinidade, pH, fonte de carbono, fonte de nitrogênio) para sua caracterização e avaliação da produção de biossurfactante. A produção do biossurfactante em meio mineral a partir de fonte de carbono de baixo custo, seu alto índice de emulsificação e a estabilidade do composto semipurificado frente a condições extremas de temperatura, salinidade e pH, com a manutenção da propriedade emulsificante, foram fatores indicativos do seu potencial uso em processos terciários de recuperação de petróleo (MEOR). Nesse contexto, para ampliar o conhecimento a respeito deste composto e validar tal uso, vimos como necessário caracterizar quimicamente o biossurfactante produzido, determinar as propriedades tensoativas (índice de emulsificação, tensão interfacial e superficial, concentração micelar crítica e inversão de molhabilidade) da sua forma purificada e conduzir teste em meio poroso para avaliar sua capacidade de recuperar óleo.

Testes complementares para avaliar a ação antimicrobiana do BS também foram realizados de modo a se verificar sua aplicação no controle microbiológico de poços de petróleo, bem como sua possível aplicação em outras áreas industriais / biotecnológicas (controle bacteriano e de fitopatógenos e, por exemplo).

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Esta revisão bibliográfica irá abordar os tópicos Biossurfactante, Produção de biossurfactante pelo gênero *Bacillus* e Biossurfactante na indústria do petróleo, para uma melhor compreensão dos objetivos pretendidos e dos resultados alcançados na presente pesquisa.

2.1 Biossurfactante

Os surfactantes são moléculas anfifílicas compostas por uma porção polar e outra apolar (Figura 1). O domínio hidrofóbico é formado por cadeias carbônicas (lineares ou ramificadas) ou cadeias fluorocarbônicas compostas por 8-18 átomos de carbono, enquanto que o domínio hidrofílico pode apresentar grupos iônicos, não iônicos ou anfóteros, que podem se comportar como ácido ou base de acordo com o pH da solução. A presença dos dois domínios na molécula faz com que essas sejam capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial ente líquidos, sólidos e gases, favorecendo sua mistura ou dispersão. Suas propriedades químicas fazem com que essas moléculas apresentem aplicações em diferentes setores, como a indústria química, de detergente, tintas, corantes, cosmética, farmacêutica, agroquímica, fibras, de plásticos, além do seu grande papel na indústria petroquímica.²⁴

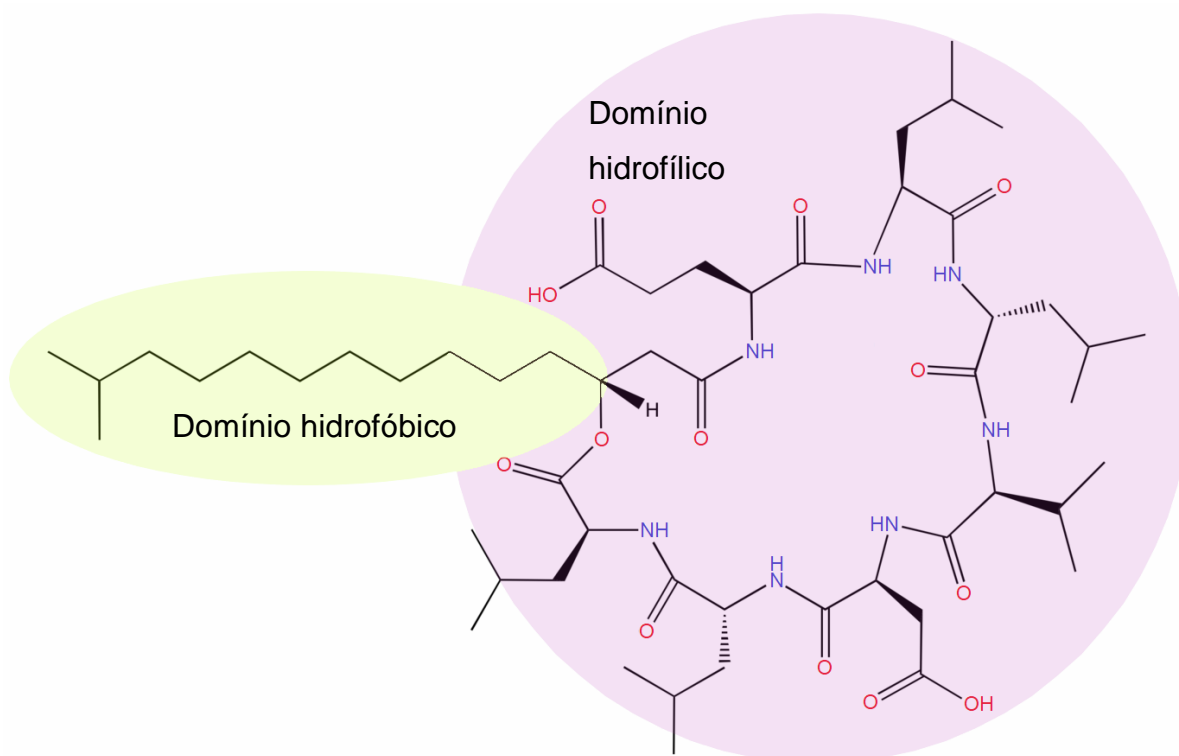


Figura 1 – Estrutura bidimensional de uma molécula de surfactina com as regiões de seus domínios polar e apolar destacados na figura.

Fonte: Estrutura bidimensional disponível em: ebl.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL508272/, acessado em 28/02/22.

Assim como os surfactantes, os biosurfactantes (BS) possuem uma composição anfifílica, diferindo em sua origem, que é biológica. Os primeiros estudos com BS datam de 1949²⁵ e 1968,²⁶ a partir da identificação de um glicolípido produzido por *P. aeruginosa* que apresentava atividade bacteriostática e hemolítica.²⁵ Posteriormente, Arima e colaboradores²⁶ caracterizaram um biosurfactante produzido por *B. subtilis* com alta capacidade tensoativa e potencial inibidor da coagulação, tendo recebido o nome de surfactina.

Os biosurfactantes são um grupo heterogêneo de moléculas orgânicas produzidas como subproduto metabólico de alguns grupos de microrganismos, podendo se encontrar na superfície celular microbiana, bem como ser excretado extracelularmente.²

A biossíntese de lipopeptídeos cíclicos ocorre através de peptídeos sintetases não ribossomais que são enzimas modulares capazes de sintetizar metabólitos complexos através de um sistema independente de ribossomos. Essas enzimas são

formadas por módulos, compostos por domínios distintos que atuam sequencialmente, sendo, cada um, responsável pela incorporação de um aminoácido específico no metabólito final.²⁷

Por conta de sua variedade estrutural, os biossurfactantes recebem algumas classificações, podendo ser divididos em cinco classes: (1) glicolipídeos; (2) lipopeptídeos e lipoproteínas; (3) ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos; (4) biossurfactantes poliméricos e (5) biossurfactantes particulados,³ onde essa divisão remete à parte hidrofílica presente na molécula. Entretanto, alguns autores optam por classificar os tensoativos em dois grandes grupos: os de baixo peso molecular, que reduzem a tensão superficial entre dois líquidos imiscíveis, dentre os quais, estão, os glicolipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipopeptídeos; e os bioemulsificantes de alto peso molecular, que são mais eficazes como agentes estabilizadores de emulsão, também denominados de surfactantes poliméricos, comumente compostos por exopolissacarídeos.^{2,16}

Os tensoativos desempenham papel essencial no aumento da biodisponibilidade de moléculas hidrofóbicas, poderem formar complexos com metais pesados, além de participarem em processos fisiológicos de sinalização e comunicação célula-célula, motilidade, diferenciação celular, adesão a substratos, proteção contra elementos tóxicos, formação de biofilmes, além de atuarem como moléculas de armazenamento de carbono e energia.²⁸

Os lipopeptídeos e lipoproteínas possuem um domínio hidrofílico formado por um peptídeo associado a um domínio lipídico e são moléculas amplamente produzidas pelo gênero *Bacillus*. As famílias ou subclasses mais comumente produzidas são surfactina/liquisina, iturina, fengicina, kurstakina, daptomicina e viscosina.¹⁷ Apresentam atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias, vírus e atividade contra células tumorais. Esse biossurfactante também possui aplicação na indústria alimentícia e de cosméticos, já sendo comercializado nesta última.^{1,17} Essa classe de biossurfactantes será melhor abordada no item 2.2.

Glicolipídeos são classificados de acordo com sua unidade de carboidrato e sua cauda de ácidos graxos, onde as principais subclasses, ou famílias, mais estudadas são: ramnolipídeos, soforolipídeos, trealolipídeos e manosileritrol lipídeos. Os ramnolipídeos (RLs), biossurfactantes mais amplamente estudados, foram originalmente extraídos de *P. aeruginosa*; porém, a natureza patogênica do principal microrganismo produtor, dificulta a aplicação dos RLs em alimentos e

cosméticos.¹ Os soforolipídeos (SLs) são produzidos principalmente por leveduras, com destaque para os gêneros *Candida*, *Starmerella* e *Pseudohyphozyma* e são compostos pelo dissacarídeo soforose ligado por ligação glicosídica com uma cadeia de ácido graxo hidroxila, podendo ocorrer na forma lactônica e ácida, com diferentes graus de acetilação, o que leva a diferentes propriedades estruturais.^{1,28} Dentre os biossurfactantes, os soforolipídeos apresentam maior participação no mercado global, sendo comercializados principalmente pela indústria de detergentes, com destaque para as empresas BASF Cognis (Alemanha) e Ecover (Bélgica).²⁹

A classe que engloba os fosfolipídeos, lipídeos neutros e ácidos graxos correspondem a lipídeos que apresentam um ou mais grupos fosfato e ácidos carboxílicos alifáticos de cadeia longa.²⁸ Os fosfolipídeos são um exemplo de biossurfactantes que podem ser usados pela indústria farmacêutica. Tanto os compostos sintéticos quanto os naturais podem fazer parte de medicamentos administrados na forma de emulsões, suspensões, complexos ou dispersões sólidas.³⁰

Os biossurfactantes poliméricos e os particulados fazem parte dos tensoativos de alto peso molecular. Os biossurfactantes poliméricos, mesmo em baixas concentrações, são capazes de modificar as propriedades reológicas de soluções aquosas e podem ser usados como espessantes, dispersantes e estabilizadores de emulsões, onde o emulsan (*Acinetobacter* sp.), liposan (*Candida lipolytica*) e biodispersan (*Acinetobacter* sp.) são os representantes mais estudados dessa classe. Já os biossurfactantes particulados são vesículas extracelulares que auxiliam na captação de hidrocarbonetos pelas células, sendo amplamente produzidos por *Acinetobacter* sp. e *Serratia marcescens*.^{28, 31-32}

Emulsões são sistemas formados por duas fases líquidas imiscíveis. Ocorre quando uma fase interna, chamada de fase dispersa, se encontra no interior da outra fase, em formato de gotículas. Os surfactantes e os emulsionantes desempenham papel importante na formação destas emulsões, onde os surfactantes atuam como redutores de tensão interfacial, permitindo a formação das pequenas gotas; por outro lado, os emulsionantes adsorvem a superfície das gotas, oferecendo maior estabilidade ao longo do tempo.¹

Ao ser adicionado em uma fase aquosa, os tensoativos tendem a ocupar as interfaces líquido-ar e líquido-sólido até que este espaço livre se esgote (Figura 2a). A partir deste momento, conforme sua concentração aumenta, mais moléculas

passam a se solubilizar no líquido (Figura 2b) até que suas partes hidrofóbicas passem a se agrupar (Figura 2c), gerando estruturas globulares mais estáveis onde o domínio hidrofílico se encontra exposto a fase aquosa e o domínio hidrofóbico passe a estar protegido em seu interior. Essas estruturas são denominadas de micelas (Figura 2c - destaque).³³

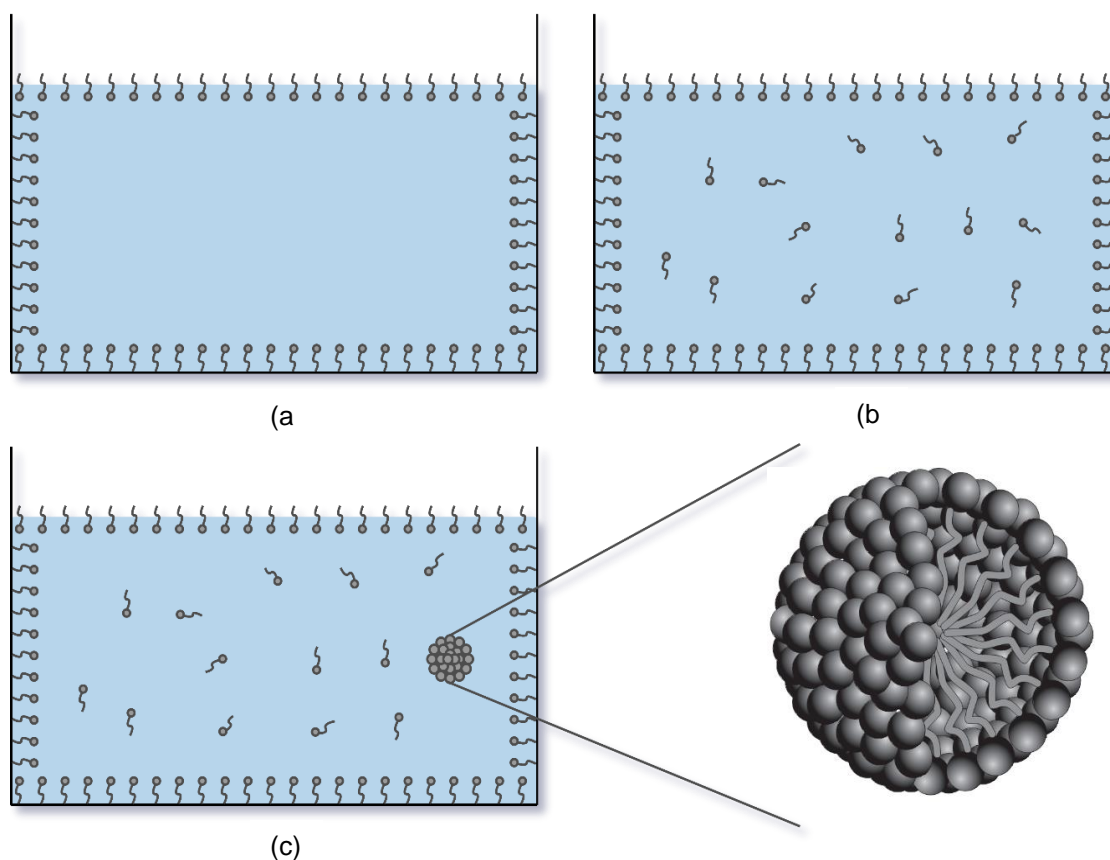


Figura 2 - Representação da distribuição de moléculas de tensoativo em um sistema monofásico polar. (a) Moléculas estão adsorvidas nas interfaces presentes no sistema, (b) todas as interfaces passam a ser ocupadas, gerando um aumento na solubilidade dos tensoativos na fase aquosa e, (c) situação onde se inicia a formação de micelas, com destaque à estrutura da micela, ao lado.

Fonte: Adaptada de DALVIN.³³

Em um sistema contendo líquidos imiscíveis, como água e óleo, a distribuição dos tensoativos tende a localizar-se próxima à superfície de separação entre os dois líquidos (Figura 3a), a molécula se posiciona de forma perpendicular à superfície, onde a parte apolar se encontra solubilizada na fase oleosa e a parte polar da molécula, na fase aquosa. Conforme sua concentração aumenta, as interfaces líquido-ar e líquido-sólido passam a ser totalmente “povoadas” e, os tensoativos passam a se solubilizar nas duas fases (Figura 3b). A partir deste momento, se mais tensoativo for adicionado ao sistema, ocorre novamente a formação de micelas. Entretanto, diferente das micelas formadas na água, as micelas formadas no óleo são orientadas de forma inversa, com sua parte hidrofóbica exposta ao solvente e, a parte hidrofílica, voltada para a parte interna da micela Figura 3c e destaque.³³ Durante a formação das micelas, ocorre o armazenamento de gotículas da fase imiscível, aumentando assim a miscibilidade entre ambas fases. A concentração onde ocorre o início da formação das micelas é definida como a concentração micelar crítica, ou CMC e é uma característica físico-química intrínseca de cada tensoativo.³³

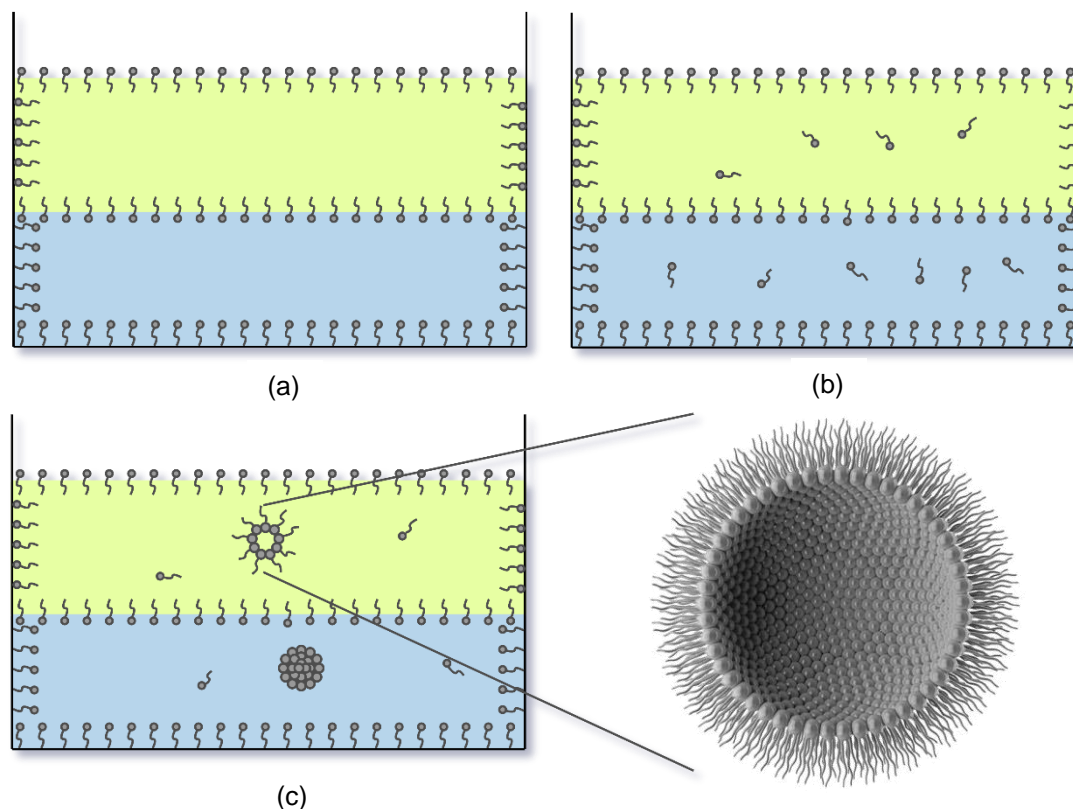


Figura 3 - Representação da distribuição de moléculas de tensoativo em um sistema bifásico, contendo água e óleo. (a) Moléculas estão adsorvidas nas interfaces presentes no sistema, (b) todas as interfaces passam a ser ocupadas, gerando um aumento na solubilidade dos tensoativos em ambas as fases e, (c) situação onde se inicia a formação de micelas, com destaque à estrutura da micela, ao lado.

Fonte: Adaptada de DALVIN.³³

Fonte: Micela reversa, em destaque, retirada de <https://pixels.com/featured/2-inverse-micelle-maurizio-de-angelisscience-photo-library.html>, acessado em 01/12/2021.

Os lipopeptídeos, muitas vezes, são produzidos como uma mistura de moléculas pertencentes a uma mesma família ou de famílias distintas,³⁴ como as linhagens *B. subtilis* K1,³⁵ *B. subtilis* THY-7,³⁶ *B. subtilis* CNPMS22,³⁷ *Bacillus amyloliquefaciens* SR1³⁸ e *Bacillus mojavensis*,³⁹ que podem produzir uma mistura de iturinas, surfactinas, fengicinas e kurstakinas, assim como, em alguns casos, séries homólogas de cada família. Essa homologia na produção pode estar relacionada à composição do meio de cultura. As fontes de carbono e nitrogênio são fatores primordiais durante a produção dos tensoativos,⁴⁰ assim como a presença de íons metálicos, como ferro,⁴¹⁻⁴² magnésio⁴² e manganês⁴³ podem impactar na produção de tensoativo por um microrganismo.

Em muitos casos, o uso do biossurfactante precisa ser feito em sua forma pura; entretanto, o custo da produção dessas moléculas e o rendimento do processo são fatores que impedem um maior desenvolvimento deste setor.²⁹ Devido a esse problema, muitas formas de produção, purificação e caracterização são estudadas. Diferentes métodos de separação entre o meio de cultivo e o biossurfactante são utilizados, entre eles estão a precipitação ácida, recuperação com solventes orgânicos, precipitação com sulfato de amônio, ultrafiltração, uso de resinas poliméricas e fracionamento de espuma.⁴⁴

O processo de recuperação de um biossurfactante deve levar em consideração alguns fatores, como: a carga iônica, a solubilidade e a localização (intracelular, extracelular ou ligada à parede celular).⁴⁵ A recuperação de material hidrossolúvel extracelular exige mais etapas, porém, os compostos intracelulares apresentam um maior custo de recuperação, pois há a necessidade da lise celular; assim, dentre as duas situações, os compostos extracelulares se mostram mais viáveis.⁴⁶

Para a separação de um lipopeptídeo extracelular do meio livre de células, a precipitação ácida é a metodologia mais utilizada. Ao reduzir o pH do meio, o BS se carrega positivamente, diminuindo a eficácia da sua região hidrofílica, havendo sua agregação e insolubilidade e, por consequência, o tensoativo precipita na forma sólida. Por outro lado, sua cauda de ácido graxo contribui na solubilidade em solventes orgânicos; assim, a precipitação ácida, em geral, é seguida da extração com solvente orgânico, como metanol, diclorometano, clorofórmio ou acetato etílico.^{36,46}

No processo de caracterização, vários métodos quantitativos e qualitativos de química analítica são empregados para elucidar a estrutura química de um tensoativo. Os métodos qualitativos são capazes de identificar os átomos e grupos funcionais presentes nas amostras, já os métodos quantitativos, fornecem a informação numérica dos compostos. Os principais métodos de caracterização empregados são espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), acoplado a um detector de dispersão de luz (ELSD), espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC-MS) e cromatografia gasosa (GC-MS).^{32,47}

A cromatografia líquida de alta eficiência (do termo *High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) é muito utilizada na separação entre as famílias de lipopeptídeos. Os aminoácidos das cadeias peptídicas com suas diferentes características hidrofílicas interagem de forma variável com a fase móvel; por outro lado, a coluna cromatográfica, geralmente o tipo C18, liga-se às cadeias de ácidos graxos. Em uma purificação, as famílias de Iturinas, fengicinas e surfactinas podem ser separadas, respectivamente, com diferentes gradientes de acetonitrila em água.³⁶ A HPLC não é só um método efetivo para a purificação, mas também é uma ferramenta de análise útil para sua caracterização, se associada à espectrometria de massas; entretanto, este não é um método viável em escala industrial.⁴⁶

Existem outros métodos utilizados para a separação de um lipopeptídeo do meio de cultivo. Na ultrafiltração, uma solução contendo o BS flui através de uma membrana de alto peso molecular que irá reter o biossurfactante que estiver em formato de micela. Esta técnica apresenta alta porcentagem de recuperação, entretanto, é necessária a adição de agentes de limpeza para evitar entupimento, além de ter alto custo e baixa resistência a extremos de pH e temperatura. Já a separação por fracionamento de espuma baseia-se na alta capacidade de formar emulsões estáveis de alguns tensoativos. Neste processo, o ar é injetado no cultivo, retendo o BS na interface água/ar. Esta espuma é escoada por um cilindro, gerando uma solução de BS mais concentrada do que a original. Esta técnica possui desvantagens: o sistema é aberto, podendo haver contaminações do cultivo, células podem ser carregadas dentro das bolhas, juntamente com o meio de cultivo, além da necessidade do uso de compostos químicos para o colapso das bolhas, sendo necessária sua remoção durante o processo de purificação, acrescentando, assim, mais uma etapa a este processo.^{46,48}

Embora existam diferentes métodos de extração e purificação, o custo agregado a este processo precisa ser reduzido para que o biossurfactante possa ser economicamente competitivo.^{1,29}

2.2 Produção de biossurfactante pelo gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* é amplamente estudado como produtor de lipopeptídeos; entretanto, algumas exceções são relatadas, como *Bacillus subtilis* TU2,⁴⁹ *Bacillus*

licheniformis SV1,⁵⁰ *Bacillus amyloliquefaciens* Ar10⁵¹ e *Bacillus megaterium* SPSW1001,⁵² que produzem glicolipídeos.

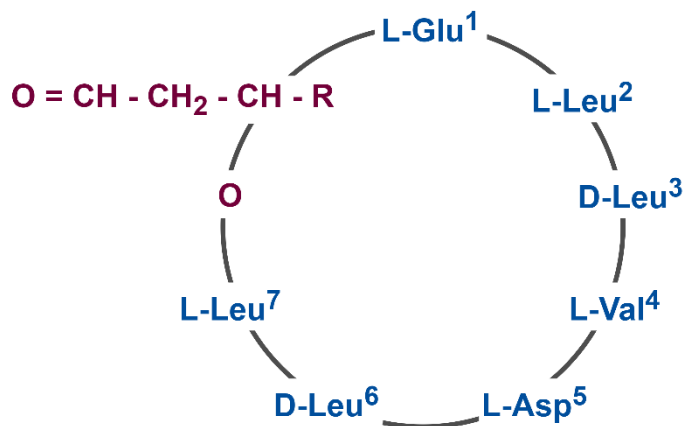
A biossíntese dos lipopetídeos, em geral, ocorre pela condensação de porções peptídicas e lipídicas sintetizadas de forma independente. A parte peptídica é gerada de forma independente de ribossomo, através de enzimas chamadas de peptídeo sintetases não ribossomais. Essas enzimas geram uma ampla heterogeneidade entre as sequências de aminoácidos, além da natureza da ciclização do peptídeo e da composição e ramificação da cadeia de ácidos graxos, gerando assim uma alta variação entre esses compostos. Os lipopeptídeos podem ser divididos em diferentes famílias, a depender de sua composição, dentre as quais as principais famílias produzidas por *Bacillus* são surfactinas, iturinas, fengicinas e kurstakinas.^{17,34,53}

A família das surfactinas (Figura 4) é formada por compostos contendo uma cadeia de ácido graxo β -hidroxil com 13 a 16 átomos de carbono conectado, por ligação lactônica, a um heptapeptídeo cíclico,⁵⁴ onde há a presença dos aminoácidos asparagina, leucina, isoleucina, ácido glutâmico, ácido aspártico e valina, em diferentes proporções.^{17,34} É um grupo que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas, dentre elas as atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica e antimicoplasma.¹⁷ Já foram descritos mais de 30 tipos diferentes de surfactinas,¹⁷ sendo considerada um dos tensoativos mais potentes já descritos.⁵⁵ As liquenisinas, tensoativos produzidos por *B. licheniformis*, são tensoativos aniônicos classificados na família das surfactinas. Embora haja similaridade estrutural, ocorre a presença de uma glutamina na primeira posição, em substituição ao ácido glutâmico observado nas surfactinas (Figura 4). Essa substituição ocasiona uma melhora na estabilidade da molécula em situações extremas (pH, temperatura e salinidade), além de aumentar suas atividades superficial e quelante, ampliando ainda mais o potencial do uso industrial deste tensoativo.⁵⁶ Coronel e colaboradores,⁵⁶ estudaram o efeito da liquenisina em um modelo de bicamada lipídica. Os autores indicaram que o tensoativo penetra na bicamada e induz alterações na mesma, como a desidratação e seu espessamento, além de aumentar a permeabilidade da membrana, fornecendo suporte para a hipótese de formação de poros e perturbação da membrana, para justificar a atividade antimicrobiana da liquenisina. Já a surfactina, apresenta atividade antimicrobiana através da ruptura e solubilização da membrana externa e citoplasmática.⁵⁶ A surfactina também apresenta funções anti-

envelhecimento, anti-fotoenvelhecimento, anti-rugas e anti-oxidante, além de induzir a produção de colágeno na pele.^{1,57-59}

Sharma e colaboradores⁶⁰ testaram a atividade antifúngica e antimicrobiana da surfactina produzida pela linhagem A52 de *B. subtilis*, isolada de amostras de sedimento marinho. Essa cepa conseguiu inibir o crescimento de dez linhagens bacterianas testadas, com MIC variando entre 1-6 µg/mL. Além disso, apresentou atividade contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria brassicicola* MTCC 2102, *Colletotrichum acutatum* MTCC 1037 e *Fusarium moniliforme* MTCC 158. Também inibiu o crescimento de 16 linhagens de *Candida* sp., dentre as quais nove eram isolados clínicos. A surfactina isolada por Meena, Sharma e Kanwar⁶¹ e produzida por *B. subtilis* KLP2015 apresentou atividade antitumoral, contra cinco linhagens testadas, atividade antifúngica contra *Mucor* sp., atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* e *E. coli*, e atividade de redução de biofilme em cultivos com *S. aureus*, *Pseudomonas* sp., *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhi* e *S. typhimurium*.

Além da atividade antimicrobiana, a surfactina também é estudada por possuir atividade antitumoral. Routhu *et al.*,⁶² isolaram uma linhagem de *Bacillus atrophaeus* da alga marinha *Padina tetrastromatica*. A citotoxicidade da mistura de surfactinas produzida foi estudada contra diferentes linhagens de células cancerígenas, como neuroblastoma, adenocarcinoma do pulmão, HeLa e uma linhagem de fibroblasto pulmonar não tumoral, usada como controle. A mistura de lipopeptídeos apresentou toxicidade em todas as linhagens tumorais estudadas quando em sua maior concentração testada (25 µg/mL), não mostrando toxicidade para a célula não tumoral, mesmo em concentrações mais altas, como 100 µg/mL, indicando sua biocompatibilidade. Os resultados obtidos também mostraram uma possível mudança na dinâmica da membrana celular nas linhagens de células cancerosas. Wojtowicz e colaboradores⁶³ estudaram a estrutura e composição da membrana plasmática das células de ovário de hamster chinês CHO-K1. Os resultados obtidos indicaram que a surfactina foi capaz de causar mudanças significativas na fluidez da membrana e na dinâmica da organização molecular através da interferência da concentração de colesterol presente na membrana. Foi observado uma redução de quase 50% no nível do colesterol total presente em células tratadas com 80 µg/mL de surfactina.



Esperina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu
Liquenisina	L-L ₁ -L-L ₂ -D-Leu-L-L ₄ -L-Asp-D-Leu-L-L ₇
Pumilacidina	L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Asp-D-Leu-L-P ₇
Surfactina	L-Glu-L-S ₂ -D-Leu-L-S ₄ -L-Asp-D-Leu-L-S ₇

Onde: L₁ = Gln/Glu; L₂ = Leu/Ile; L₄ e L₇ = Val/Ile; P₇ = Val/Ile;
S₂ = Val/Leu/Ile; S₄ = Ala/Leu/Ile; S₇ = Val/Leu/Ile

Figura 4 - Estrutura esquemática, representando a família das surfactinas e suas possíveis isoformas.

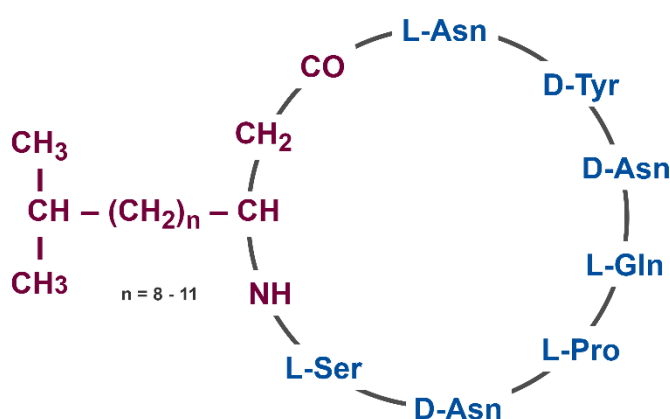
Fonte: Adaptada de CAROLIN¹⁷ e INÈS.³⁴

A

família das iturinas, (Figura 5), é composta pela

as moléculas micosubtilisina, a bacilomicina D, F, L e as iturinas A e C. Estes tensoativos apresentam uma cadeia de ácido graxo β-amino, contendo de 14 a 17 átomos de carbono ligados a uma cadeia cíclica de heptapeptídeos do qual fazem parte os aminoácidos tirosina, asparagina, serina, glutamina, prolina, ácido glutâmico, ácido aspártico e treonina.¹⁷ Foi inicialmente elucidada por Peypoux *et al.*,⁶⁴ em 1978, a partir de um cultivo de *B. subtilis* isolado de amostras de solo de Ituri, no Congo. São moléculas que se destacam por apresentar alta atividade antifúngica, podendo ser usados como biocidas verdes, além de prevenir a formação de biofilmes e ter atividade antitumoral.³ A atividade antifúngica das Iturinas é atribuída pela sua interação com a membrana, onde ocorre uma perturbação osmótica pela formação de poros condutores de íons.⁵⁶ Células de câncer de mama apresentaram uma significativa inibição e indução à apoptose, promovida pela

presença de iturina A, produzida por *Bacillus megaterium* isolado de amostras de água marinha.⁶⁵ *Fusarium oxysporum* um fungo fitopatogênico que infecta as raízes de alfaces no solo apresentou inibição na presença de 0,94 mg/L de iturina A purificada.⁶⁶ Jiang e colaboradores⁶⁷ mostraram que a iturina produzida por *B. subtilis* apresentou MIC (concentração inibitória mínima) de 10 µg/mL contra *Aspergillus carbonarius*. Os autores observaram que a presença deste tensoativo inibiu a extensão do micélio, em qualquer concentração utilizada, e a germinação dos conídios em concentrações acima de 5 µg/mL. Além disso, houveram mudanças morfológicas nas células fúngicas, tais como inchaço e afinamento da parede celular, inchaço celular, além de causar mudanças na estrutura celular provocando perturbações no metabolismo, transporte e pressão osmótica no fungo.



Bacilomicina D	L-Asn–D-Tyr–D-Asn–L-Pro–L-Glu–D-Ser–L-Thr
Bacilomicina F	L-Asn–D-Tyr–D-Asn–L-Gln–L-Pro–D-Asn–L-Thr
Bacilomicina L	L-Asp–D-Tyr–D-Asn–L-Ser–L-Gln–D-Ser–L-Thr
Iturina A	L-Asn–D-Tyr–D-Asn–L-Gln–L-Pro–D-Asn–L-Ser
Iturina C	L-Asp–D-Tyr–D-Asn–L-Gln–L-Pro–D-Asn–L-Ser
Micosubtilisina	L-Asn–D-Tyr–D-Asn–L-Gln–L-Pro–D-Ser–L-Asn

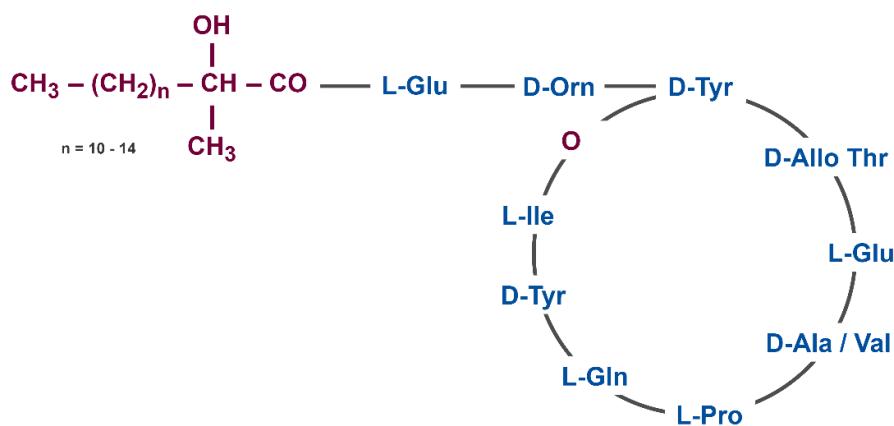
Figura 5 - Figura esquemática, representando a família das iturinas e suas possíveis isoformas.

Fonte: Adaptada de CAROLIN¹⁷ e INÊS.³⁴

Descoberta em 1986 a partir da linhagem F29-3 de *B. subtilis*,⁶⁸ a família das fengicinas apresenta quatro isoformas (Figura 6), as quais são formadas por um

decapeptídeo ligado, por uma ligação lactona, a uma cadeia linear de ácido graxo β -hidroxil com 14 a 18 átomos de carbono.¹⁷ Dentre os aminoácidos presentes na cadeia, estão ácido glutâmico, tirosina, treonina, alanina, valina, prolina, glutamina, isoleucina e ornitina. Sua estrutura cíclica ocorre na ligação entre o grupo C-terminal do resíduo presente na posição 3 com o grupo -COOH do aminoácido presente na décima posição.³⁹ Este grupo apresenta alta atividade antifúngica, limitada atividade antibacteriana e baixa atividade antiviral.^{56,69-70} Um estudo sobre o mecanismo de ação deste tensoativo foi realizado por Sur, Romo e Grossfield,⁷¹ usando simulações de dinâmica molecular. A fengicina perturbou a região hidrofóbica da membrana ao se ligar a ela, causando vazamento e lise. Além disso, a fengicina C estudada por González-Jaramillo e colaboradores,⁷² causou extensa desidratação da região polar da membrana modelo; os autores também mostraram a incorporação do tensoativo à membrana, o que ocasionou em modificações de sua permeabilidade e, por consequência, o extravasamento de material celular.

Os relatos mais recorrentes na literatura sobre a atividade da família das fengicinas são relacionados a sua atividade antifúngica. Fan *et al.*⁷³ testaram a atividade da fengicina produzida por *B. subtilis* 9407 e observaram a inibição de 54,2% no crescimento de *Botryosphaeria dothidea*, um fungo que ataca a raiz de macieiras. O BS também foi capaz de inibir mais 18 linhagens de fungos fitopatogênicos no estudo. Estudo feito por Cozzolino *et al.*,⁷⁴ com a linhagem *Bacillus* sp. SL-6 registrou que uma mistura de quatro homólogos de fengicina A e dois homólogos de fengicina B, dentre os tipos produzidos pela bactéria, foi responsável pela inibição dos fungos *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *A. alternata*, com taxa de inibição de 46,30, 72,67 e 52,01 %, respectivamente. Lin e colaboradores⁷⁵ estudaram a linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 capaz de produzir uma mistura de surfactina, iturina e fengicina. Desta mistura, a fengicina também foi indicada como a molécula que apresentou atividade antifúngica. Nesse estudo, o tensoativo apresentou MIC contra *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, e *Colletotrichum gloeosporioides* no intervalo de 25–50 ug/mL.



Fengicina A	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile
Fengicina B	L-Glu-D-Orn-D-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-L-Tyr-L-Ile
Plipastatina A	L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Ala-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile
Plipastatina B	L-Glu-D-Orn-L-Tyr-D-aThr-L-Glu-D-Val-L-Pro-L-Gln-D-Tyr-L-Ile

Figura 6 - Estrutura esquemática da família das fengicinas e suas possíveis isoformas.

Fonte: Adaptada de CAROLIN¹⁷ e INÈS.³⁴

Os primeiros lipopeptídeos da família das kurstakinas foram descritos no ano 2.000, por Hathout *et al.*,⁷⁶ a partir de um cultivo de *Bacillus thuringiensis*. Os pesquisadores relataram a produção de quatro lipopeptídeos com mesma sequência contendo sete aminoácidos, entre eles, treonina, glicina, alanina, serina, histidina e glutamina, diferindo somente na cadeia de hidrocarbonetos Figura 7. Sua cadeia de hidrocarbonetos está ligada ao resíduo de aminoácidos por meio de uma ligação amida e ocorre uma ligação lactona entre o aminoácido carboxila terminal e o grupo hidroxila da cadeia lateral do resíduo de serina.⁷⁶ Embora esse biossurfactante seja secretado, ele normalmente se associa à membrana celular do microrganismo produtor, o que faz que ele geralmente não seja recuperado no sobrenadante livre de células de seu cultivo. Essa ligação ocorre devido à alta afinidade entre a carga catiônica da histidina com a membrana fosfolipídica do microrganismo.^{39,77} De acordo com Hathout *et al.*, estas quatro isoformas apresentaram atividade antifúngica contra *Stachybotrys charatum*.

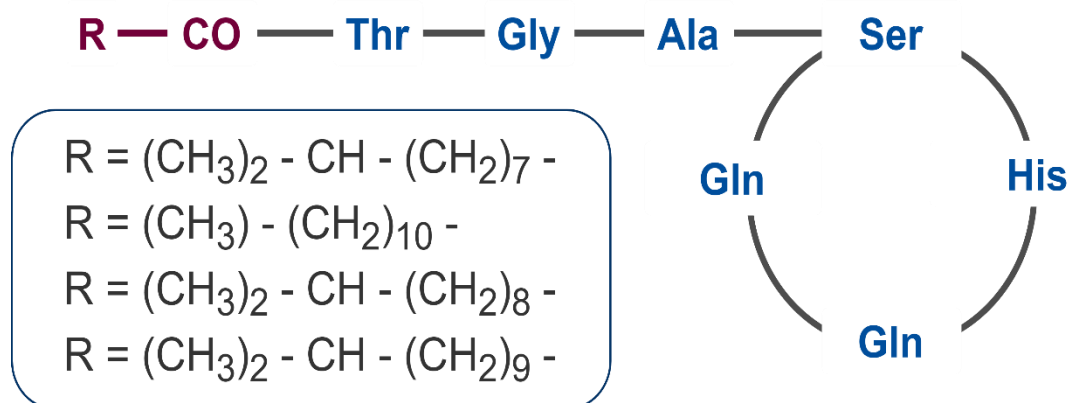


Figura 7 - Estrutura esquemática da família das kurstakinas e suas possíveis isoformas.

Fonte: Adaptada de HATHOUT *et al.*⁷⁶

É importante destacar que alguns microrganismos podem produzir simultaneamente diferentes famílias de lipopeptídeos, cuja composição depende da cepa utilizada, das condições de cultivo e da idade da cultura. Esses fatores resultam na produção de misturas complexas de produtos lipoprotéicos, contendo isoformas de iturinas, kurstakina, fengicinas e surfactinas.^{20,35-36} Por exemplo, Fanaei, Jurcic e Emtiazi³⁹ mostraram que a linhagem HF de *B. mojavensis* produzia uma mistura de surfactina, fengicina e kurstakina. Os autores identificaram 14 moléculas diferentes, distribuídas entre fengicina A (com 15-17 átomos de carbono), fengicina B (com 16 e 17 átomos de carbono), surfactina (13 a 16 átomos de carbono) e kurstakina (9 a 12 átomos de carbono).

Dimkic *et al.*⁷⁸ estudaram a mistura de lipopeptídeos produzida por cinco linhagens de *Bacillus* sp. e o seu potencial antimicrobiano contra as bactérias fitopatogênicas *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (P16) e *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (301, 311 e 320), e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), uma bactéria patogênica responsável por surtos de listeriose em humanos e animais. A partir dos dados de espectrometria de massas, os autores puderam observar as quatro famílias de lipopeptídeos, kurstakina, iturina, fengicina e surfactina. Os resultados indicaram que o extrato produzido por três linhagens de *Bacillus* mostraram alta inibição contra todas as linhagens testadas, apresentando diferentes zonas de inibição, onde os autores indicaram que os análogos de iturina eram os maiores responsáveis pela atividade contra os patógenos agrícolas.

Labiadh e colaboradores⁷⁹ analisaram capacidade de produzir surfactina, iturina/ bacilomicina, fengicina e kurstakina de 16 linhagens de *Bacillus* e sua potencial atividade antifúngica. Neste estudo, os autores indicaram que 5 linhagens de *B. subtilis* foram ativas contra *F. solani*, *Arthrobotrys conoides* e *Dactylellina gephyropaga*. Além disso, a maioria dos microrganismos identificados com *B. subtilis* apresentou alta inibição (40-60%) contra um fungo nematófago, também isolado pelos pesquisadores. Duas linhagens de *B. cereus* e uma linhagem de *B. thuringiensis* inibiram o crescimento do fungo nematófago. Uma cepa de *B. amyloliquefaciens* mostrou alta atividade antifúngica contra todos os fungos testados, com taxa de inibição do crescimento micelial de mais de 40, 60 e 70% para *F. solani*, *D. gephyropaga* e *A. conoides*, respectivamente. De forma similar, uma linhagem de *Bacillus mojavensis* foi efetiva contra todas as linhagens de fungos testadas, com inibição de mais de 60% no crescimento do micélio de *D. gephyropaga* e *A. conoides*.

2.3 Biosurfactante na indústria do petróleo

A extração do petróleo de um reservatório pode ser feita em três etapas. A etapa de recuperação primária ocorre quando há uma diferença de pressão entre o reservatório e o meio externo; assim, no momento da perfuração, ocorre o extravasamento livre do óleo e do gás através de mecanismos naturais, e esse escoamento segue até que haja uma igualdade entre essas pressões. A partir desse momento, se inicia a recuperação secundária, através do fornecimento de energia ao sistema. Esta nova etapa consiste na injeção de fluidos, geralmente água, no reservatório para que a pressão interna volte a ser superior e o óleo volte a escoar novamente.⁸⁰ Até esse estágio, somente cerca de 20 a 40% do óleo bruto é extraído do reservatório e esse baixo rendimento se dá em decorrência da alta tensão interfacial entre o óleo/água e óleo/rocha, além da alta viscosidade e baixa permeabilidade do óleo bruto.⁸¹

A terceira etapa do processo é conhecida como *Enhanced Oil Recovery* (EOR). Ela permite a extração desse óleo residual que ainda permanece no reservatório e engloba métodos térmicos através da injeção de vapores, água quente ou combustão interna; injeção de gás miscível; adição de produtos químicos, como, polímeros, surfactantes ou agentes alcalinos; e a injeção de células

microbianas e/ou de seus produtos metabólicos, neste caso recebendo o nome de MEOR.⁸² O uso de microrganismos para extrair o óleo residual dos reservatórios foi primeiramente proposto por Beckman em 1926; entretanto, as pesquisas neste campo se iniciaram somente a partir de 1947.⁸³

MEOR é uma técnica alternativa aos métodos químicos que são utilizados durante o processo de recuperação do petróleo. É menos agressiva ao meio ambiente, podendo fazer uso da microbiota presente no reservatório, além de ser possível o uso de resíduos industriais para a promoção do crescimento microbiano.⁸² O uso do BS em MEOR pode ser feito através de técnicas *in situ* ou *ex situ*. Técnicas *in situ* ocorrem através da injeção do microrganismo produtor de BS em um reservatório, podendo se adicionar ou não nutrientes que facilitariam seu crescimento. Já o processo *ex situ* ocorre pela produção do BS externamente ao poço, ou seja, a molécula é injetada diretamente no reservatório.⁸⁴ O isolamento de microrganismos de fluidos e de rochas de reservatório de petróleo tem sido realizado para o conhecimento e manejo deste ambiente, bem como fonte de organismos e/ou seus compostos para aplicações biotecnológicas, considerando que muitos são extremófilos e, por isso, com características desejáveis em diferentes processos industriais.^{31,84} Em MEOR, prevê-se que o biossurfactante utilizado, assim como o microrganismo a ser injetado no reservatório, deve apresentar alta estabilidade nas condições extremas presentes neste ambiente, relativas à temperatura, salinidade e pH, por exemplo. Muitas espécies produtoras de biossurfactantes são descritas na literatura com alto potencial de aplicação no processo de MEOR *in situ*.³¹

Testes-pilotos *in situ* que utilizaram microrganismos e/ou biossurfactante para verificação da recuperação de petróleo foram realizados no decorrer dos anos. O primeiro teste em campo foi relatado em 1954 no Arkansas, Estados Unidos, usando *Clostridium acetobutylicum* e melaço para se aumentar a recuperação do óleo em uma zona inundada com água.⁸⁴ Hitzman, em 1962, patenteou o processo de injeção de endósporos bacterianos e nutrientes em um reservatório de petróleo. O autor testou sua hipótese em laboratório, usando uma coluna empacotada com areia saturada de óleo. Uma solução aquosa de esporos de *Clostridium roseum* e melaço foi passada através da coluna, aumentando a liberação do óleo em 30%.⁸⁵ Durante o período de 1977-1981, aproximadamente 150 poços de baixa produção, aqueles que estão no final de sua vida produtiva, foram inoculados com uma cultura mista de *Bacillus-Clostridium*. Os poços foram mantidos fechados por 10-14 dias antes de

passarem por um novo processo de extração de óleo, onde foi observado um aumento de 20-30% na produção naqueles poços de salinidade e viscosidade mais baixos. Em 1983, a empresa Petrogen, Inc. repetiu este método em 24 poços. Em quatro deles, a produção do óleo dobrou, por um período de 6 meses e, em outros 12 poços, houve um aumento de 50% na produção durante os 3 meses seguintes.⁸⁶

Jinfeng e colaboradores⁸⁷ relataram um teste-piloto feito em um reservatório na China, em 2001, usando células de uma linhagem de *Bacillus* em suspensão com nutrientes. Foram programadas dez injeções no decorrer de alguns meses, onde se realizaram medidas de tensão superficial da água de produção e o volume de petróleo extraído. Os pesquisadores observaram uma redução da tensão superficial da água de produção e o aumento do volume de óleo produzido, fator que poderia estar relacionado com a produção do BS produzido pelo microrganismo introduzido ou nativos. Youssef et al.⁸⁸ realizaram um estudo semelhante em um reservatório, nos Estados Unidos, na década de 2010. Uma suspensão de células de duas linhagens de *Bacillus* foi injetada juntamente com glicose e uma solução salina. Os autores não só verificaram um aumento na recuperação de petróleo, mas também, indicaram que este processo era economicamente viável. Em outro estudo similar, realizado na China em 2011, ar e nutrientes foram injetados em um reservatório de baixa temperatura para estimular o crescimento e produção dos microrganismos nativos. O estudo revelou uma resposta positiva da comunidade microbiana para o crescimento e produção de BS, apresentando um aumento na recuperação de petróleo em reservatório contendo óleo pesado.⁸⁹

Além do seu uso no processo de recuperação do petróleo, alguns autores também estudam a capacidade de remoção do óleo de areia contaminada, uma forma de simular o tratamento possível para um ambiente contaminado por hidrocarbonetos, além da limpeza de tanques de armazenamento e auxiliar no transporte do óleo através de oleodutos.²

O petróleo, em geral, é transportado dos poços produtores até as refinarias através de oleodutos. Esse transporte possui um desafio operacional devido ao alto grau de viscosidade do óleo bruto, ocasionado pelo alto teor de parafinas e asfaltenos. A presença desse tipo de composto reduz o fluxo do óleo, o que, por sua vez, leva a deposição de material nas paredes internas dos dutos, que pode causar entupimento nas tubulações.⁹⁰ Este problema, em geral, é minimizado pelo uso de aquecimento ou diluições com solventes (xileno e tolueno), tudo isso no intuito de

reduzir a viscosidade do óleo, além de se tentar dissolver os possíveis precipitados; porém, este é um tratamento que aumenta o custo da produção e gera resíduos tóxicos.⁹¹ Entretanto, Mulligan *et al.*⁹¹ também indicam o uso do biossurfactante como uma alternativa a este tratamento. Após ser transportado para as refinarias, o petróleo é estocado em tanques por longos períodos. Isso acarreta a formação de borras de óleo altamente viscosas/semi-sólidas, que se acumulam nas paredes e no fundo destes tanques e não podem ser removidos de forma convencional.⁸⁰ Essa limpeza é feita de forma manual, envolvendo vapores de água quente ou solventes químicos, resultando em grande quantidade de resíduo produzido.⁹² O uso de biossurfactante como método alternativo de limpeza de tanques de armazenamento foi realizado pela *Kuwait Oil Company*. Um volume de duas toneladas de meio de cultura livre de células, contendo ramnolípídeo, foi esterilizado e adicionado ao tanque sujo; o sistema foi mantido em agitação por 5 dias a uma temperatura de 40-50 °C. Este tratamento foi capaz de recuperar 91% dos hidrocarbonetos presentes na borra e o valor do petróleo recuperado foi o suficiente para cobrir os custos da limpeza.⁹¹

Um outro problema recorrente em reservatórios é a presença de bactérias redutoras de sulfato (BRS). Esses microrganismos pertencem a um grupo de bactérias anaeróbicas que utilizam o sulfato, SO_4^- , comoceptor final de elétrons no processo de respiração anaeróbica.⁸⁰ São descritos na literatura como causadores de diversos problemas relacionados à indústria petrolífera, tais como: corrosão de dutos, estruturas metálicas e equipamentos,³ contaminação de poços de injeção, acumulação de resíduos metálicos,⁹³ acidificação ocasionada pela produção de sulfetos de hidrogênio,⁹⁴ que, por ser um gás tóxico, também apresenta risco humano para os trabalhadores no local.⁹⁵ Portanto, uma estratégia para o controle destas bactérias redutoras de sulfato é altamente vantajosa para a indústria de petróleo e gás.

Em geral, a presença destas bactérias ocorre em biofilmes, podendo haver consórcios entre microrganismos através de metabolismo cooperativo.³ As estratégias de controle de BRS, em geral, envolvem o uso de biocidas em altas concentrações, o que pode induzir a resistência bacteriana, além de ser nocivo ao meio ambiente e à saúde pública.³ Além disso, diversos estudos com biofilmes indicam que a maioria destes biocidas apresentam capacidade de penetração limitada, sendo mais eficientes sobre células planctônicas, tendo, assim, sua

atividade limitada às células superficiais do biofilme.⁹⁶ Além disso, um fator importante para se evitar o processo de corrosão é a adsorção de grupos funcionais presentes nos biossurfactantes na superfície metálica. Essa capacidade de adsorção está relacionada à formação de micelas. Essas formariam uma camada de proteção na superfície que evitaria a corrosão deste material.³ As limitações pelo uso de biocidas químicos, em conjunto com a capacidade de adsorção e a ação antimicrobiana, faz com que os biossurfactantes sejam ótimos candidatos para o combate às BRS. Wood *et al.*,⁹⁷ em um estudo com *Desulfovibrio vulgaris*, mostraram que o ramnolípido produzido por *P. aeruginosa* foi capaz de dispersar mais de 98% do biofilme produzido pela linhagem.

Astuti, Purwasena e Putri⁹⁸ estudaram oito linhagens produtoras de BS como biocidas alternativos à formação de biofilmes associados a biocorrosão. O biossurfactante isolado de F3, F7, N2 e D1 erradicaram, respectivamente, 68,3, 69,7, 62,3 e 61,4% do biofilme, em comparação com o controle, glutaraldeído, que erradicou 44,6%. As linhagens F3, F7 e N2 foram identificadas como *Pseudoxanthomonas* sp., *Brevibacillus* sp. e *Bacillus* sp., respectivamente. Em outro estudo, Purwasena e colaboradores⁹⁹ analisaram o biossurfactante produzido por *Bacillus* sp. e sua capacidade de erradicar um biofilme, em superfície de aço carbono ST37. O biofilme foi produzido pelo consórcio microbiano formado por *Pseudomonas* sp.1, *Pseudomonas* sp.2 e *Pannonibacter phragmitetus*, todas isoladas de água de injeção de um reservatório de petróleo da Indonésia. O biossurfactante inibiu a ligação das células planctônicas das duas linhagens de pseudomonas na placa de aço, e também foi capaz de erradicar o biofilme já pré-formado na placa pelo consórcio microbiano.

O processo de exploração, produção, transporte e refino de petróleo libera resíduos, dentre os quais, resíduos de perfuração, produção, derramamento de óleo, lodo de reservatórios, emissão de gases, borra de óleo e resíduos produzidos durante todo o processo de manutenção que são liberados em diferentes ecossistemas. Esses poluentes apresentam preocupação global devido ao seu efeito tóxico em microrganismos, plantas, animais e seres humanos. Portanto, a pesquisa em ações de remediação de ambientes contaminados se faz cada vez mais necessária. O método de biorremediação é apresentado como o mais ecologicamente correto e economicamente mais simples. A remediação do solo

inclui métodos físicos, mecânicos, químicos e biológicos, onde sua biorremediação está relacionada com a solubilização e dessorção dos poluentes.¹¹

Felix e colaboradores,¹⁰⁰ trabalhando com amostras de solo contaminado com diesel, analisaram o potencial uso da surfactina produzida por *Bacillus subtilis* no processo de biorremediação. Os autores verificaram que as concentrações de 1×CMC (12,5 mg/L), 3×CMC (37,5 mg/L) e controle (água destilada) removeram respectivamente 78,5%, 81,8% e 37,9% do diesel presente na areia. Um estudo feito por Durval *et al.*¹⁰¹ mostrou que o BS produzido por *Bacillus cereus* foi capaz de remover, da areia, 84% do óleo de motor, em teste com agitação. Ibrahim *et al.*¹⁰² indicou que o lipopeptídeo estudado removeu 76% de óleo de uma coluna empacotada com areia durante 2h de experimento. O controle usado promoveu 30% de recuperação, no mesmo período. Mahmoud *et al.*¹⁰³ mostrou que os biossurfactantes produzidos por *Bacillus licheniformis* AnBa7 e *Rhodococcus erythropolis*, surfactina e trealose, foram capazes de remover, respectivamente, um total de 59,21 e 51,83% de óleo de arenito empacotado em coluna. De forma similar, Bezza e Chirwa¹⁰⁴ realizaram um estudo para avaliar a extração promovida pelo lipopeptídeo produzido por *Paenibacillus dendritiformis* utilizado na lavagem de solo contaminado com óleo de motor. Os pesquisadores mostraram que o BS conseguiu remover 78-81% do óleo, em 24h, onde o controle, água destilada, foi capaz de remover 11%.

3 OBJETIVOS

Gerais:

- Caracterizar o biossurfactante produzido pela linhagem termo-halofílica Ar70C7-2 isolada de reservatório de petróleo quanto à sua estrutura química e às propriedades tensoativas e avaliar sua aplicação na indústria do petróleo.

- Avaliar a ação antimicrobiana do referido biossurfactante para ampliar o conhecimento a seu respeito e inferir sobre seu potencial biotecnológico.

Específicos:

- Caracterizar bioquímica e geneticamente a linhagem Ar70C7-2 para fim de identificação.

- Avaliar as propriedades tensoativas do biossurfactante purificado, tais como: índice de emulsificação, tensão superficial e interfacial, concentração micelar crítica, inversão de molhabilidade.

- Caracterizar a composição e estrutura química do biossurfactante purificado por meio da análise de proteína total, aminoácidos e ácidos graxos, usando técnicas colorimétricas, cromatográficas e espectroscópicas.

- Avaliar a ação antibacteriana do biossurfactante purificado sobre bactérias aeróbias e uma espécie anaeróbia, por meios de testes padronizados de microdiluição e de diluição em caldo.

- Avaliar a ação antifúngica do biossurfactante purificado sobre espécies de fungos fitopatogênicos (bolores), por meio de testes padronizados de difusão em ágar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 8 representa as etapas experimentais abordadas neste trabalho, havendo a indicação do tópico correspondente em que a referida etapa se encontra descrita.

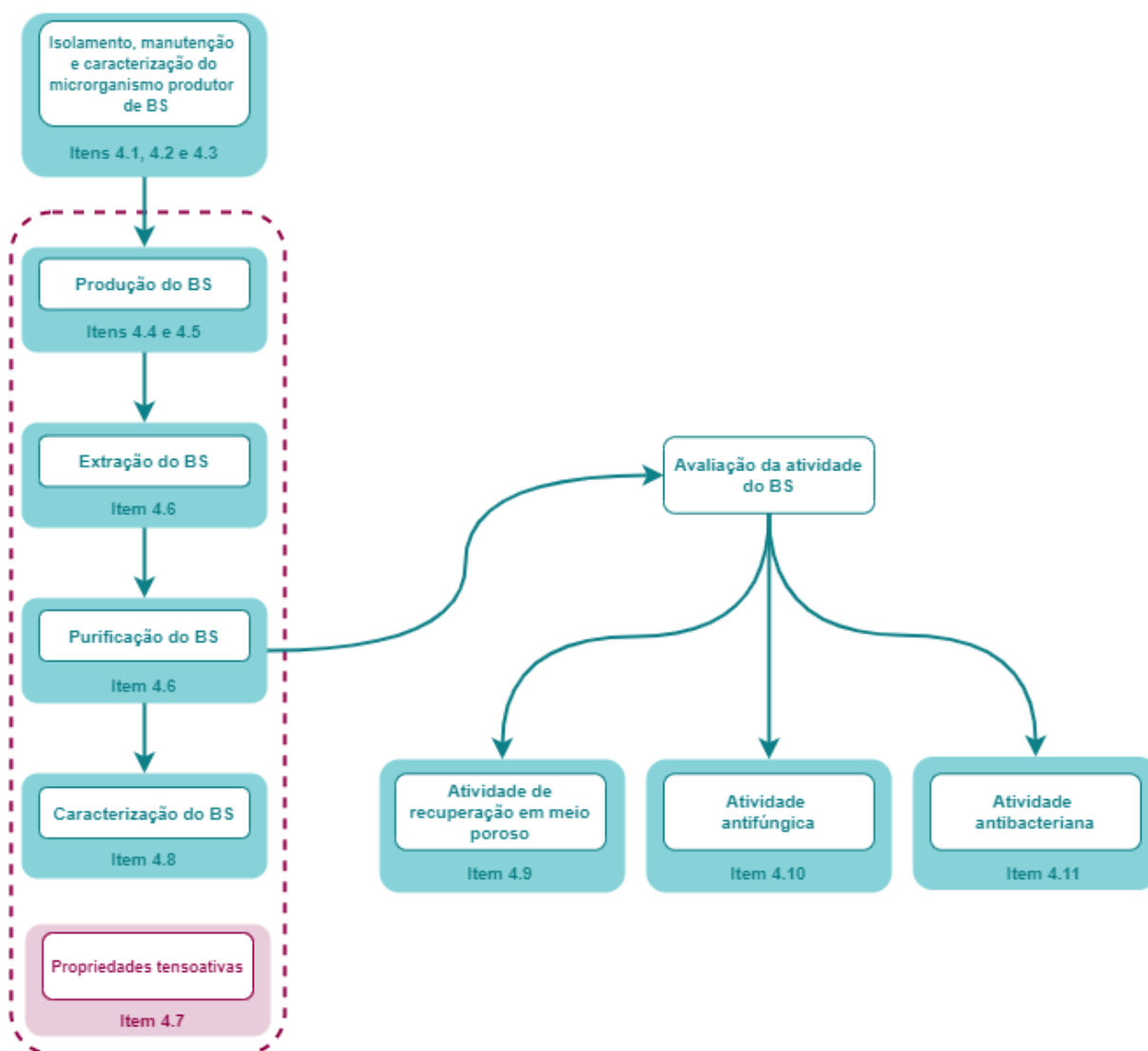


Figura 8 - Fluxograma representativo das etapas experimentais realizadas neste trabalho.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1 Microrganismo

A linhagem termo-halofílica estudada, inicialmente nomeada como Ar70C7-2, foi identificada como *Bacillus alveayuensis* TM1 AY605232 (RDP database).¹⁰⁵ Essa bactéria foi isolada a partir de um cultivo líquido inoculado com amostra de rocha

pulverizada de um reservatório profundo de petróleo *offshore* pós-sal, do tipo carbonático, localizado na Bacia de Campos, a cerca de 130 km da costa do Rio de Janeiro. Este material foi cedido pela PETROBRAS S/A, no âmbito de um Termo de Cooperação entre a empresa e o Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) (Nº Jurídico 0050.0079046.12.9). A amostra rochosa usada como inóculo foi obtida durante a perfuração exploratória do referido reservatório, de uma profundidade de cerca de 3.000 metros abaixo do nível do mar (com coluna d'água de 946 metros), cuja temperatura *in situ* pode alcançar 80 °C, pressão de até 4.560 psi e água de formação hipersalina.

4.2 Manutenção das culturas-estoque da linhagem Ar70C7-2

A linhagem Ar70C7-2 foi preservada em culturas-estoque, conforme procedimento descrito a seguir. Uma alíquota de 700 µL de cultivo em meio LB* (descrito no item 4.4) na fase logarítmica foi acondicionada em tubo criogênico contendo 300 µL de glicerol 50% (v/v) estéril; os tubos foram mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados em *ultra-freezer* (-80 °C). Para o estudo, as alíquotas criopreservadas foram ressuspendidas em 4 mL de meio LB* e incubadas a 55 °C, sem agitação, por 12h. Após este período, 200 µL do cultivo foi espalhado em placa de Petri contendo meio LB* sólido e incubado a 55 °C por 48h. Cada placa foi utilizada pelo período de no máximo uma semana.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

4.3 Identificação e caracterização da linhagem Ar70C7-2

A identificação da linhagem estudada foi feita através do sequenciamento parcial do gene rRNA 16S e de testes bioquímicos, realizados pelo Serviço de Identificação do Instituto Leibniz DSMZ (*Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*). Uma placa de Petri com crescimento da linhagem em meio LB* sólido foi enviado à empresa, a partir do qual foram realizados os procedimentos para a identificação da linhagem, descritos a seguir.

O DNA genômico foi extraído com o auxílio do kit *MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit* (Epicentre® Biotechnologies Germany), de acordo com as orientações do fabricante. A amplificação do rDNA 16S foi realizada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), onde seus produtos foram purificados como

descrito em Rainey e colaboradores.¹⁰⁸ Os produtos purificados do PCR foram sequenciados utilizando-se o kit *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram submetidas a eletroforese utilizando o Analisador Genético 3500xL da Applied Biosystems.

Os resultados obtidos no sequenciamento foram analisados com o auxílio do software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis v.7* (MEGA7)¹⁰⁹ no servidor EzTaxon¹¹⁰⁻¹¹² e no BlastN,¹¹³ sendo comparados com sequências representativas de genes de rRNA 16S de organismos pertencentes ao filo *Firmicutes*. Para comparação, as sequências de rRNA 16S foram obtidas a partir da base de dados EMBL ou RDP.¹⁰⁵

Com os resultados obtidos pela DSMZ, foi confeccionada uma árvore filogenética do microrganismo Ar70C7-2 e das 12 linhagens de maior similaridade com o mesmo. O software MEGA, versão 11, foi usado para a elaboração da árvore, com alinhamento múltiplo das sequências feito por ClustalW. O método para a construção da árvore foi o de *Neighbor Joining Tree*, o teste de filogenia usado foi pelo método *Bootstrap* com 1000 replicações no intuito de avaliar a confiabilidade da árvore.

O perfil bioquímico foi realizado utilizando-se o kit API® 50 CH (*Analytical Profile Index*) para identificação específica do gênero *Bacillus*, que testa o crescimento do isolado na presença de 49 diferentes carboidratos e seus derivados. O teste se baseia na acidificação do meio que ocorre pela fermentação dos carboidratos, que ocasiona em uma mudança na cor do indicador presente no meio. Os resultados compõem um perfil bioquímico que é identificado através do software *BacDive*, disponível no website <https://bacdive.dsmz.de/api-test-finder>.¹¹⁴

A análise de ésteres metílicos de ácidos graxos celulares (*FAME - Fatty Acid Methyl Ester*) se baseou nos métodos de saponificação, metilação e extração, propostos por Miller (1982)¹¹⁵ e Kuykendall *et al.* (1988).¹¹⁶ A separação da mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada usando-se o sistema de identificação microbiana *Sherlock MIS (Sherlock Microbial Identification System)*, que é composto de um cromatógrafo a gás Agilent (modelo 6890N), equipado com uma coluna capilar fenilmetilsilicone (5%) (0,2 mm x 25 m) e acoplado a um detector por ionização de chamas, amostrador automático Agilent, modelo 7683A conectado a uma base de dados MIDI (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, California, U.S.A.). Os

picos foram integrados automaticamente através do *software* Microbial ID. Os parâmetros de cromatografia foram: hidrogênio como gás de arraste, pressão de coluna 60 kPa, com volume injetado de 2 µl e purga de 5 ml/min, com temperatura de coluna variando entre 170 e 270 °C (5 °C/min), temperatura de injeção de 240 °C e temperatura do detector de 300 °C.

4.4 Composição dos meios de cultura utilizados

- Água do Mar Sintética: Usada como base na preparação dos meios de manutenção, preservação e preparo de pré-inóculos de *Bacillus alveayuensis*. Composição (em g/L): NaF (0,003), SrCl₂.6H₂O (0,02), H₃BO₃(0,03), KBr (0,1), KCl (0,7), CaCl₂.2H₂O (1,113), Na₂SO₄ (4,0), MgCl₂.6H₂O (10,78), NaCl (23,5), Na₂SiO₃.9H₂O (0,02), Na₄EDTA (0,001), NaHCO₃ (0,2), com pH ajustado para 8,0±(0,5) (Luiz Fernando Martins-CENPES/PETROBRAS, comunicação pessoal).

- Solução de elementos-traço (g/L): H₃BO₃ (0,6), CoCl₂ (1,2), CuCl₂ (0,15), MnCl₂ (1), ZnCl₂ (0,7), NiCl₂ (0,2), Na₂MoO₄ (0,25) e Na₂SeO₃ (0,03). Solução preparada separadamente, esterilizada por filtração com membrana de celulose regenerada 0,22 µm (Millipore®), acondicionada em frasco estéril a 4 °C. (Luiz Fernando Martins-CENPES/PETROBRAS, comunicação pessoal).

- Caldo Luria-Bertani (Sigma-Aldrich) (LB): usado para manutenção, preservação e preparo de pré-inóculo das linhagens bacterianas utilizadas no teste de avaliação de ação antimicrobiana do BS. Composição (g/L): triptona (10), NaCl (5) e extrato de levedura (5).

- Caldo Luria-Bertani (Sigma-Aldrich) modificado (LB*): usado para manutenção, preservação e preparo de pré-inóculo de *Bacillus alveayuensis*. Composição (g/L): Caldo Luria-Bertani preparado com água do mar sintética, com salinidade ajustada para 70 g/L de NaCl e suplementado com solução de elementos-traço (1 mL/L). O meio Luria-Bertani sólido modificado (LB* sólido) foi preparado com o acréscimo de 2% de agarose ao caldo Luria-Bertani modificado. Meio utilizado para manutenção da cultura de *Bacillus alveayuensis*.

- Meio Mineral (MM):¹¹⁷ Utilizado no cultivo de *B. alveayuensis* para a produção de biossurfactante. Composição (g/L): Na₂HPO₄ (2,2), H₂PO₄ (1,4), MgSO₄.7H₂O (0,6), FeSO₄.7H₂O (0,01), NaCl (70), CaCl₂ (0,02), NH₄NO₃ (1), Glicerina 70% (3,25 mL). Suplementado com solução de elementos-traço (1 mL/L).

- Meio Basal:¹¹⁸ Utilizado no cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332, linhagem controle dos ensaios de produção de BS. Composição (g/L): glicose (30), NaCl (50), NH_4SO_4 (1), MgSO_4 (0,25), extrato de levedura (0,5), suplementado com solução de elementos traços (1 mL/L).

- Agar Batata Dextrose (Kasvi) (BDA): Usado no cultivo das linhagens de fungos filamentosos testados no antifungograma. Composição (g/L): Infusão de batata (200), dextrose (20) e ágar (17).

- Caldo Mueller Hinton (Himedia) (MH): Usado no cultivo das linhagens bacterianas usadas no teste de avaliação da ação antimicrobiana do BS. Composição (g/L): infusão de carne (300), hidrolisado ácido de caseína (17,50) e amido (1,5).

- Ágar Mueller Hinton (Ágar MH): Usado no cultivo das linhagens bacterianas usadas no teste de avaliação da ação antimicrobiana do BS. Composição: Caldo Mueller Hinton acrescido de 17 g/L de ágar.

- Meio Postgate B de Atlas¹¹⁹ modificado: Usado no cultivo da linhagem anaeróbia *Desulfovibrio marinus*, usada no teste de avaliação da ação antimicrobiana do BS. Composição (g/L): K_2HPO_4 (0,5), NH_4Cl (1), CaSO_4 (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), NaCl (40), lactato de sódio-50% (4,9 mL), extrato de levedura (1), solução de tioglicolato de sódio (11,11 mL), ácido ascórbico (0,1) e resazurina 0,1% p/v (1 mL). O meio foi purgado com N_2 por 20 minutos, antes e depois de ser autoclavado. A solução de tioglicolato de sódio foi preparada separadamente (12,4 g/L), sob purga de N_2 , esterilizada através de filtração com membrana de celulose regenerada 0,22 μm (Millipore®) e acondicionada em frasco estéril a 4 °C. Este meio teve sua composição alterada para o preparo do pré-inóculo de *D. marinus*, com a substituição do $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g). Esta substituição foi feita em virtude da presença do ferro precipitado dificultar a contagem de células no inóculo, bem como havia a necessidade do teste se iniciar sem a presença de qualquer precipitado que pudesse acarretar um falso sinal de crescimento celular durante o mesmo.

4.5 Produção de biossurfactante

Uma porção de crescimento da linhagem Ar70C7-2 em meio sólido (preparado como descrito em 4.2) foi removida da placa de Petri com o auxílio de uma alça de inoculação padrão (com diâmetro para 1 μL) e transferida para um tubo

de ensaio contendo 5 mL de meio LB*. Este foi incubado a 55 °C sem agitação, por 12 horas (pré-inóculo I). Passado este período, todo o volume contido no pré-inóculo I foi adicionado a um frasco do tipo Schott-Duran contendo 95 mL do mesmo meio, mantido a 55 °C, 200 rpm, por 2h (pré-inóculo II). A preparação do pré-inóculo foi realizada desta forma para se garantir que a concentração inicial do cultivo principal seria de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL. Todo o volume do frasco foi inoculado em 900 mL de Meio Mineral, incubado a 55 °C, sem agitação, por 144h. Após este período de incubação, realizou-se o procedimento de extração do biossurfactante produzido pela bactéria do meio de cultura, conforme descrito a seguir no item 4.6.

4.6 Extração e purificação

A extração do BS do meio de cultivo foi feita pelo método da precipitação ácida, conforme descrito por Das e colaboradores.¹²⁰⁻¹²¹ Um volume de 10 L de Meio Mineral contendo crescimento celular (preparado como descrito no item 4.5) foi centrifugado a 10.000 rpm (6.000 g) por 40 min para a remoção das células. O sobrenadante teve seu pH reduzido para 2 (HCl 6M) e armazenado a 4 °C por 12h, seguida de nova centrifugação a 10.000 rpm (6.000 g) por 40 minutos. O precipitado obtido foi lavado duas vezes em água ultrapurificada com pH 2, ressuscitado em 20 mL de água ultrapurificada e seu pH ajustado para $7,0 \pm (0,2)$. Esta amostra, denominada BSBr (BS bruto), foi seca em liofilizador por 12 horas.

A amostra de BSBr passou por um processo de extração com clorofórmio¹²¹⁻¹²² em funil de separação e submetida à secagem em capela de exaustão. Este produto extraído, denominado BSEx, foi purificado parcialmente em coluna de vidro contendo sílica gel 60. Para isso, amostras de 0,20 g de BSEx foram dissolvidas em 100 mL de água ultrapurificada e adicionadas em coluna empacotada (23 x 3,0 cm) com sílica gel 60. Os solventes utilizados foram água ultrapurificada, acetonitrila 40%, acetonitrila 60% e acetonitrila 100%, aplicando-se 350 mL de cada. A fração de interesse obtida, denominada BSSP60, foi seca em liofilizador (Liobras L101) e utilizada para a caracterização química (conforme procedimentos descritos nos itens 4.8.1 a 4.8.3).

Para a análise química por espectrometria de massas, uma amostra de BSSP60 passou por mais etapa de purificação, usando-se coluna C18 acoplada ao sistema *Äkta Purifier* (GE Healthcare). Uma alíquota de 0,15 g de BSSP60 foi

dissolvida em 20 mL de água ultrapurificada sob agitação e aquecimento. Volumes de 2 mL da solução de BS foram aplicados na coluna *YMC-Pack purifier* (GE Healthcare), sob fluxo de 1,5 mL/min com tampão A (água ultrapurificada, 0,1% ácido trifluoroacético) e tampão B (acetonitrila, 0,1% ácido trifluoroacético) em gradiente de 0-100% e monitorado a 220, 240 e 280 nm. A análise em espectrometria de massas foi feita como descrito no item 4.8.4.

4.7 Avaliação das propriedades tensoativas

4.7.1 Cálculo de Concentração Micelar Crítica

A técnica utilizada para a medição da Concentração Micelar Crítica (CMC) foi descrita por Sheppard e Mulligan (1987).¹²³⁻¹²⁴ Uma alíquota de 0,05 gramas do biossurfactante foi dissolvida em 25 mL de água destilada (2.000 mg/L). Esta solução foi diluída sucessivamente com água destilada, e as suas medidas de tensão superficial foram feitas até que seu valor se aproximasse ao valor da água. Um gráfico de concentração do BS (mg/L) vs tensão superficial (mN/m) foi gerado, onde a CMC é o valor da concentração correspondente ao ponto central de inflexão da curva modelo apresentada na Figura 9.

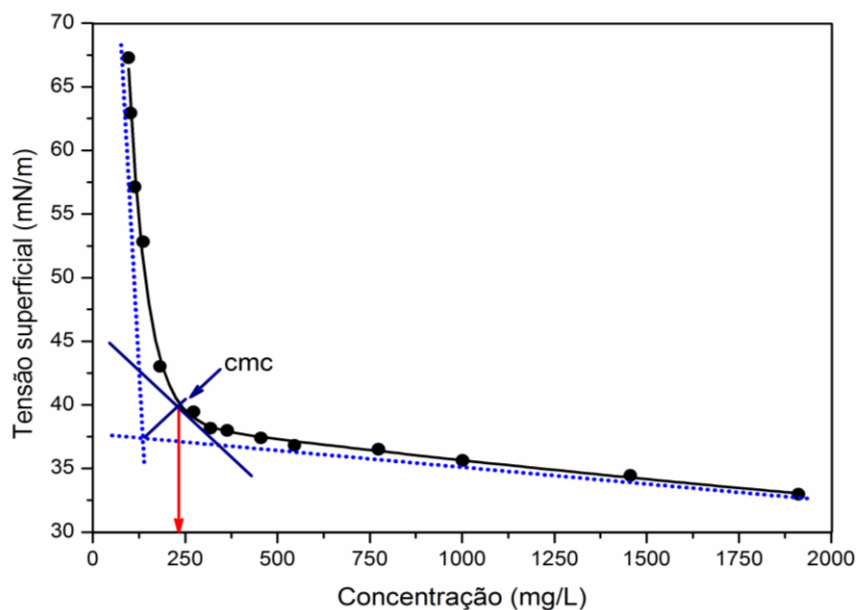


Figura 9 - Curva modelo representando o método para determinação da concentração micelar crítica (CMC) através da medição da tensão superficial de uma solução de BS após sucessivas diluições em água destilada.

Fonte: Adaptada de SHEPPARD; MULLIGAN.¹²³

4.7.2 Índice de emulsificação E_{24}

As amostras de meios de cultura sem células e das frações do biossurfactante produzido em suas diferentes etapas de purificação foram avaliadas quanto à capacidade de emulsificação. Para tal, o método escolhido foi o proposto por Cooper & Goldenberg (1987),¹¹⁸ denominado de E_{24} , ou índice de emulsificação após 24 horas.

O método consistiu em adicionar 2 mL de amostra a um tubo de ensaio contendo o mesmo volume de querosene. O tubo foi submetido à agitação vigorosa por 2 minutos, seguida de repouso à temperatura ambiente por 24 horas. O índice E_{24} foi calculado dividindo a altura da camada de emulsificação pela altura da camada total de líquido, multiplicando-se por 100, para que o resultado fosse expresso em porcentagem.

4.7.3 Tensão superficial e interfacial

A medição direta da tensão superficial (TS) e interfacial (TI) das amostras foi determinada usando-se o tensiômetro automático (modelo Sigma 701 – OneAttention). Para TS foi usado o método do anel de Du Nouy, descrito por

Bodour e colaboradores.¹²⁵ Este método envolve a elevação de um anel de platina até a superfície do líquido, onde a força (mN/m) necessária para o desprendimento entre o anel e a amostra está relacionada com a tensão superficial do líquido. Uma alíquota de 20 mL da solução de interesse foi dispensada em um béquer e este, posicionado na base do tensiômetro. Após ser esterilizado em chama, um anel de platina foi submerso na amostra, sendo, em seguida, suspenso até a interface líquido-ar, até seu total desprendimento da amostra.

Na medida de TI, um volume de 15 mL de uma solução de 0,1% (p/v) de BSSP60 foi adicionado a um béquer, o anel foi submerso na amostra, seguido da adição 15 mL de *n*-hexadecano (Neon) ao mesmo frasco; a medida foi realizada na interface entre os líquidos.

Entre cada medição, o anel foi limpo com *n*-hexano 60% e acetona, seguido de esterilização em chama. Como padrão foram feitas medições com água destilada (TS) e água destilada/*n*-hexadecano (TI).

O BS produzido pela linhagem de *Bacillus subtilis* (ATCC 21332) foi usado como referência nas medidas de TS e TI. O processo para a produção, extração e purificação do BS produzido esta bactéria foi similar ao realizado com a linhagem Ar70C7-2, conforme descrito nos itens 4.5 e 4.6, com as alterações: o cultivo foi feito em Meio Basal, por 72 h a 30 °C; a extração do BS foi feita usando-se clorofórmio/metanol, na proporção de 1:1.

4.7.4 Ensaio de flotação

O ensaio de flotação foi realizado conforme Goddard e colaboradores (2005).¹²⁶ Primeiramente, o carbonato de cálcio (CaCO₃) foi tratado para se tornar molhável a óleo. Para isso, foi realizada uma pré-secagem de 10 g de CaCO₃ (em placa de Petri de vidro) em estufa a 80 °C por 16h. A temperatura da estufa foi, então, alterada para 120 °C e a ativação do carbonato se deu por 2h. Em seguida, o material foi transferido para um béquer de vidro juntamente com 200 mL de uma solução 1,5% (m/m) de ácido ciclo-hexanopentanóico (Sigma) em *n*-decano. A mistura foi mantida em agitação de 200 rpm por 24h a temperatura ambiente. Após este período, a rocha foi decantada por algumas horas e o sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta. O carbonato foi seco em capela de exaustão a temperatura ambiente, por 3 dias, para total remoção do *n*-decano (até atingir

massa constante). A eficácia do tratamento foi avaliada adicionando-se 0,5 g de rocha molhável a óleo em 10 mL de água destilada em um tubo de ensaio de vidro. O tubo foi fechado e agitado vigorosamente por 2 minutos, seguido de repouso por 24h. Se a rocha tiver se tornado mais hidrofóbica, espera-se que a rocha molhável a óleo permaneça na superfície da água. Este procedimento foi repetido testando-se soluções de BSSP60 produzido pela linhagem Ar70C7-2 nas concentrações de 0,0025, 0,005 e 0,01% (m/v). O surfactante químico Tergitol 15S-5 (Sigma) foi utilizado como controle positivo.

4.7.5 Inversão de molhabilidade

Uma solução contendo amostra de BSSP60, nas concentrações de 0,01 e 0,1% (m/v), foi submetida ao teste de inversão de molhabilidade da rocha carbonática pelo método de Washburn¹²⁷ em um tensiômetro Sigma 701 – OneAttention (Figura 10). Em um cilindro de vidro com fundo poroso foram adicionados 0,2 g de rocha carbonática molhável a óleo e este foi mergulhado nas soluções contendo os agentes testados; o equipamento mediu a quantidade de massa da solução que entrou no cilindro por capilaridade durante 30 min. O surfactante químico Tergitol (Sigma), nas concentrações de 0,01 e 2% foram utilizados como controles positivos; já o controle negativo foi realizado com o carbonato de cálcio em água destilada.

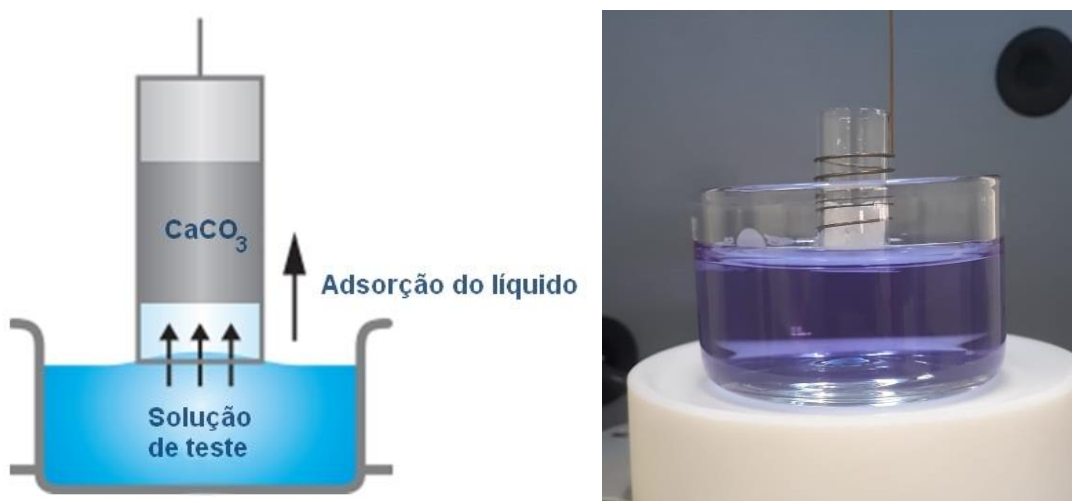


Figura 10 - Teste de inversão de molhabilidade da rocha carbonática pelo método de Washburn, onde (a) imagem esquemática do procedimento e (b) foto ilustrativa para exemplificar o processo.

Fonte: Imagem esquemática disponível em: <https://www.bioline-science.com/hubfs/Content%20Offer/Attension/EN/OV%20Powder%20wettability.pdf?hsLang=en>. Acesso em: 02 dez. 2021.

Foto Ilustrativa elaborada pela autora.

4.8 Caracterização química

4.8.1 Quantificação total de proteína

A análise do conteúdo protéico foi realizada usando-se o kit comercial Pierce® *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante. O kit é composto por dois reagentes de trabalho, A e B (50:1), além do padrão, albumina bovina (2 mg/mL). Em uma microplaca de 96 poços, uma alíquota de 25 µL de uma solução de BSSP60 ou do padrão albumina foi adicionada em cada um dos poços, seguida de 200 µL de reagente de trabalho. As concentrações do padrão e do BS variaram entre 0,005 a 2 mg/mL. A placa foi agitada por 30 segundos e incubada por 30 minutos a 37 °C; em seguida, foi resfriada à temperatura ambiente e sua absorvância foi medida em 562 nm. As medidas foram feitas em sextuplicatas.

4.8.2 Quantificação de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi realizada pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP), a partir de hidrólise ácida de amostra, corrida em cromatografia líquida de alto desempenho com coluna de fase reversa (HPLC), baseado no procedimento adaptado de White *et al.*¹²⁸ e Hagens *et al.*¹²⁹ O triptofano foi determinado usando-se o método enzimático – espectrofotométrico de Spies.¹³⁰

4.8.3 Análise de perfis de ácidos graxos

Uma amostra de 15 mg do BSSP60 foi tratada com 2 mL de clorofórmio, seguida de adição de 1 mL de etanol absoluto e 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O frasco foi mantido sob agitação a 60 °C por 1h (etanólise). Após este período, a amostra foi esfriada e a ela foram adicionados 2 mL de cloreto de sódio (10%) e 1 mL de *n*-hexano; a solução foi agitada e mantida em repouso até separação de fases. A fase orgânica foi coletada para análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas: cromatógrafo a gás GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), acoplado a espectrômetro de massas QP3010 Plus equipado com auto-injetor Shimadzu AOC-20i+s. Esta análise foi feita

com o auxílio da pesquisadora Dra. Rafaely Nascimento Lima no laboratório do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

4.8.4 Espectrometria de massas

Amostras de BSPu e do padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo Ionização por Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), seguida por detecção em analisador do tipo tempo de voo (TOF – *time of flight*), modelo AutoFlex Max (Bruker Daltonics®), na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). O aparelho foi operado em modo de reflexão positiva, no intervalo de m/z de 700-3.500 Da e a deposição das amostras foi realizada pelo método *dried droplet* que consiste em se adicionar uma pequena quantidade da amostra misturada com uma solução matriz sobre uma placa de aço, e deixá-la secar a temperatura ambiente. A solução matriz usada foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), na concentração de 10mg/mL, dissolvido em solvente contendo 50% de acetonitrila + 0,1% de ácido trifluoroacético.

4.9 Eficácia da remoção de óleo de meio poroso pelo biossurfactante

A capacidade de remoção de óleo de meio poroso pelo BS produzido pela linhagem Ar70C7-2 foi avaliada pelo método da lavagem de areia contaminada, descrito por Urum, 2004.¹³¹⁻¹³² Em uma amostra de 360 g de areia previamente peneirada (0,6 a 0,3 mm), foi adicionado um volume de 72 mL de óleo de motor (10W40); o conjunto foi homogeneizado e mantido a temperatura ambiente por 90 dias. Porções de 15 g desta areia encharcada com óleo foram transferidas para frascos de vidro do tipo béquer juntamente com 30 mL da solução a ser avaliada. As soluções avaliadas foram BSSP60 na concentração de 0,1%, salmoura (NaCl) a 5% e tergitol, nas concentrações 100 ppm, 0,1%, 0,5%, 1% e 2%. Após a mistura da areia com a solução através de agitação manual, os frascos foram mantidos a temperatura ambiente por 24h. Em seguida, a fase aquosa foi removida e os frascos foram mantidos em estufa a 55 °C por 12h para secagem da areia. Após este período, o óleo residual foi extraído da areia, fazendo-se cinco lavagens com

clorofórmio, onde a massa seca do óleo residual foi aferida após a evaporação do solvente. A porcentagem de remoção do óleo se dá através da relação descrita abaixo:

$$\%remoção = \left(\frac{m_{inicial} - m_{\text{óleo residual}}}{m_{inicial}} \right) \times 100$$

Onde:

$m_{inicial}$ = massa inicial de areia contaminada,

$m_{\text{óleo residual}}$ = massa seca de óleo residual.

4.10 Avaliação da atividade antifúngica do biossurfactante

4.10.1 Linhagens testadas e armazenamento

Foram utilizadas as linhagens dos fungos filamentosos fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* (ATCC 16883), *Aspergillus niger* (ATCC 10535), *Ceratocystis paradoxa*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Lasidiplodia euphorbicola* (BOT 93), *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sojae*, *Rhizopus microsporus* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Todas as cepas foram fornecidas pelo Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas, Departamento de Morfologia e Patologia, da Universidade Federal de São Carlos. Tais fungos foram selecionados devido aos efeitos danosos que causam na agricultura.

Os fungos foram cultivados em placas contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) por 7 a 15 dias, a depender da linhagem, até o desenvolvimento de esporos. A preservação das linhagens foi feita pelo método de Castellani.¹³³⁻¹³⁴ Com um auxílio de uma ponteira estéril de 1000 µL, foram feitos cortes circulares de aproximadamente 7 mm contendo BDA e uma camada de micélio. Estes cortes circulares, denominados de plugs, foram então transferidos para um tubo criogênico contendo 1,8 mL de água ultrapurificada estéril (3 plugs por tubo) e armazenados a 4 °C.

4.10.2 Avaliação da atividade antifúngica pelo teste de difusão em ágar

A atividade antifúngica foi determinada pelo teste de difusão em ágar.¹³⁵ Cinco poços de 7mm de diâmetro foram feitos, com o auxílio de uma ponteira estéril de 1000 µL, em placas contendo BDA. Alíquotas de 150 µL de uma solução de BSSP60 (500, 1000, 2000 e 2500 mg/L) em acetonitrila, foram adicionadas em cada poço, também foi adicionado 150 µL de acetonitrila pura em um dos poços, como controle. Após a adição das soluções, as placas foram expostas a luz ultravioleta em fluxo laminar, por 20 min, até total secagem das soluções adicionadas, em seguida, um *plug* contendo crescimento fúngico foi adicionado no centro da placa. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por 7 a 15 dias, a depender da linhagem. Como controle, foi feita uma placa sem poço para que o crescimento natural dos filamentos fosse observado. Também foram preparadas placas contendo BDA na presença de rifampicina (2,5 µg/mL), agente antibacteriano usado para evitar proliferação de bactérias na placa e conseqüentemente interferir no crescimento fúngico. Os testes foram feitos em triplicata.

4.10.3 Avaliação da atividade do biossurfactante na germinação de conídios

Uma suspensão aquosa, de cada um dos fungos estudados, foi preparada a partir de alguns dias de cultivo em placas de BDA (o tempo de cultivo depende da linhagem pois a placa precisava apresentar esporulação). Após a esporulação, um volume de 5 mL de solução salina (0,85%) foi adicionado cuidadosamente à placa, em seguida, com o auxílio de uma alça de inoculação, a placa foi raspada cuidadosamente para que os esporos se soltassem. Este líquido foi vertido em um tubo do tipo Falcon estéril e submetido a agitação vigorosa por 1 min. A suspensão foi então filtrada através de 4 camadas de gaze esterilizada apoiada em um filtro estéril para a remoção das hifas. Uma alíquota dos esporos foi adicionada a uma câmara de Neubauer para a contagem de esporos (a contagem foi feita seguindo a recomendação do fabricante). A concentração dos esporos foi ajustada para 10⁶ esporos/mL e esta solução foi estocada a 4 °C até seu uso.¹³⁶

Uma alíquota de 200 µL da suspensão de esporos foi espalhada na superfície de uma placa contendo BDA, em seguida, após sua secagem, foram feitos quatro poços de 7mm de diâmetro com o auxílio de uma ponteira (1000 µL) estéril. Frações

de 150 µL de uma solução de BSSP60 (500, 1000, 2000 e 2500 mg/L) foram depositadas nos poços e, após secagem, as placas foram incubadas a 28 °C por 7-15 dias. Foram feitas placas contendo somente acetonitrila como solução depositada nos poços, além de um controle sem a confecção dos poços. Também foram preparadas placas contendo BDA na presença de rifampicina (2,5 µg/mL). Os testes foram feitos em triplicata.²³

4.11 Avaliação da atividade antibacteriana do biosurfactante

4.11.1 Linhagens testadas e padronização do inóculo

As linhagens utilizadas neste teste foram *Bacillus subtilis* (ATCC 6633 e 21332), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228 e 35984). A padronização do inóculo foi feita a partir da contagem de células viáveis presentes nas diluições seriadas de um cultivo de 12 horas. Uma cultura-estoque da linhagem testada, armazenada em temperatura -80 °C (em ultrafreezer), foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo LB. Este tubo foi incubado em aerobiose por 12h, à 37 °C (*P. fluorescens* foi incubada à 26 °C) e 250 rpm. Após este período, 100 µL do crescimento foi espalhado em uma placa de petri contendo ágar LB, a placa foi incubada por 24h à 37 °C (*P. fluorescens*, 26 °C). Com o auxílio de uma alça de inoculação padrão de 1 µL, uma massa celular foi transferida da placa para um tubo contendo 10 mL de solução salina 0,85% (tubo sem diluição). Após homogeneização sob agitação vigorosa, 1 mL deste primeiro tubo foi transferido para um segundo tubo, contendo 9 mL de solução salina 0,85% (diluição 10⁻¹). Foram feitas diluições seriadas sucessivas, até 10⁻⁷, onde todas as diluições tiveram sua densidade óptica medida a 625 nm.¹³⁷ A contagem de células viáveis de cada diluição foi feita pelo método de microgotas.¹³⁸ Uma placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton foi dividida em quatro quadrantes e, em cada um deles, foram aplicadas seis microgotas contendo 15 µL de cada uma das diluições acima (10⁰, 10⁻¹...10⁻⁷) para a contagem de células. As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C (*P. fluorescens*, 26 °C) por 12h horas. A diluição com concentração de 1-2 x 10⁸ UFC/mL teve sua DO registrada e foi escolhida como a concentração do inóculo.

4.11.2 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão

O método de disco-difusão foi escolhido inicialmente para a verificação da atividade do BSSP60 contra as bactérias selecionadas, e foi realizado seguindo o protocolo estabelecido no documento M07-A9 desenvolvido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI* (2012).¹³⁷ A preparação dos discos de papel contendo biossurfactante foi feita como descrito a seguir. Um volume de 50 µL de uma solução de BSSP60, na concentração de 2.500 µg/mL, foi adicionado em um disco de papel-filtro branco estéril de 6 mm de diâmetro (Laborclin). Os discos impregnados foram mantidos em fluxo laminar, expostos a luz ultravioleta, por 20 min, até total secagem, quando foram então armazenados a 4 °C até sua utilização. Após a preparo do inóculo e dos discos, um volume de 100 µL do inóculo contendo $1-2 \times 10^8$ UFC/mL foi espalhado em uma placa de Petri contendo Ágar MH, já dividida em quatro quadrantes. Em três setores da placa foram adicionados os seguintes discos: disco contendo solução de BS, disco sem adição de solução e disco contendo um antibiótico selecionado para cada um dos microrganismos. Antibióticos com ação inibidora conhecida sobre as bactérias testadas foram selecionados, seguindo o indicado pelos documentos suplementares M45 e M100S:¹³⁹⁻¹⁴⁰ vancomicina para *S. epidermidis* (ATCC 12228 e 35984) e *B. subtilis* (ATCC 21332), ampicilina para *E. coli* (ATCC 25922) e *B. subtilis* (ATCC 6633) e canamicina para *P. fluorescens* (ATCC 13525). Os testes foram feitos em triplicata.

4.11.3 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição

O teste de microdiluição em caldo foi realizado seguindo as recomendações do *CLSI* (2012).¹³⁷ Em uma placa de 96 poços foi adicionado um volume de 200 µL de caldo MH contendo diferentes concentrações de solução de BS, seguindo o esquema da Figura 11. Em seguida, foi adicionado 10 µL do inóculo padronizado, seguindo a descrição do item 4.11.1. A coluna 1, denominada de controle negativo, continha somente o caldo MH, não tendo adição de biossurfactante e nem de inóculo, já a coluna 12, recebeu o caldo MH sem biossurfactante e a adição de pré-inóculo, sendo denominada de controle positivo. Como o biossurfactante adicionado estava em alta concentração, houve um aumento da turbidez do meio, e por isso foi realizada uma medição de absorbância da placa toda antes de se adicionar o

inóculo; estes valores foram definidos como o “branco” de cada poço. A placa foi incubada em leitor de microplacas i3 SpectraMax (*Molecular Devices*), por 24h, na temperatura indicada para o crescimento de cada microrganismo usado (item 4.11.1). Uma leitura foi feita a cada 15 minutos no comprimento de onda de 610 nm, com agitação orbital durante 5 segundos antes de cada leitura.

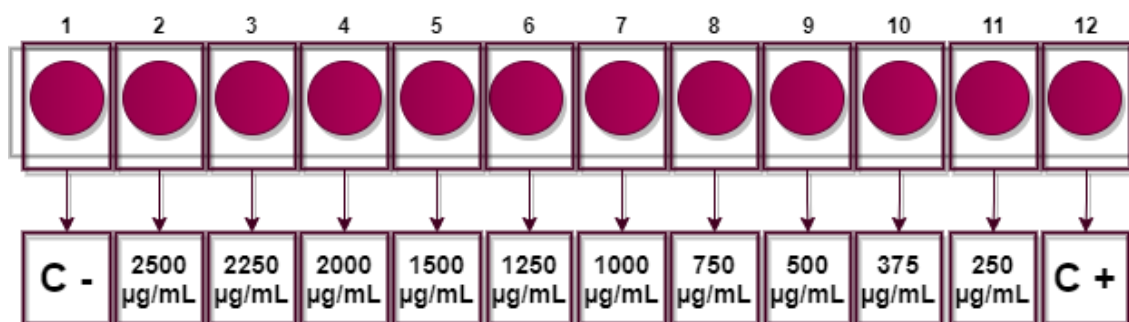


Figura 11 - Figura esquemática representando as concentrações de BS utilizadas na microplaca de 96 poços.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.11.4 Avaliação da atividade contra bactéria anaeróbia pelo método de diluição em caldo

A bactéria anaeróbia redutora de sulfato, *Desulfovibrio marinus* BRS-1, previamente isolada no laboratório a partir de amostra de água de produção de reservatório de petróleo, foi selecionada para avaliar a ação inibitória do BS produzido por *B. alveayuensis*. O teste de diluição em caldo foi realizado como descrito a seguir. Uma alíquota de 1 mL de uma cultura de *D. marinus* BRS-1 armazenada em estufa a 40 °C foi transferida para um frasco contendo 9 mL de meio Postgate B* estéril, previamente purgado com gás N₂ estéril por 20 minutos para a troca gasosa (do O₂ pelo N₂) do espaço interno. Uma nova purga com N₂ estéril por 20 minutos foi feita após a adição do microrganismo. Em seguida, este frasco, denominado de pré-inóculo, foi mantido em estufa a 40 °C por 3 dias.

Após este período, em um frasco contendo 9 mL de meio Postgate B estéril foi adicionado um volume de 0,5 mL do pré-inóculo contendo cerca de 10⁵ células/mL. Essa padronização do inóculo se deu por meio da contagem de células em câmara de Neubauer (contagem feita segundo a recomendação do fabricante). A adição do BS no meio se deu antes da esterilização do meio em autoclave, nas

concentrações de 2.500, 2.250, 2.000, 1.500, 1.000, 500 µg/mL. Os testes foram feitos em triplicata, tendo como controle frasco com meio e inóculo sem a adição de BS. Os frascos foram mantidos em estufa a 40 °C por 5 dias. Sabendo que o sulfeto de hidrogênio, produto metabólico de bactérias redutoras de sulfato (BRS), na presença ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), é capaz de formar sulfeto de ferro, ocasionando o escurecimento do meio,¹⁴¹ o resultado deste ensaio foi feito somente de forma visual, onde a presença de precipitado preto indicou o crescimento celular.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A Caracterização e identificação da linhagem Ar70C7-2

A caracterização genética da linhagem Ar70C7-2 foi feita pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, cujo resultado mostrou 100% de similaridade com a sequência depositada para *Bacillus alveayuensis* TM1, o que indica que pode representar uma linhagem dessa espécie. O resultado do sequenciamento da linhagem realizado pela DSMZ mostrando os microrganismos de maior semelhança são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de similaridade do gene 16S rRNA de Ar70C7-2 com os mesmos genes de microrganismos depositados na base de dados EMBL/RDP, indicados pela DSMZ. Busca realizada em 2017.

Microrganismos	% de similaridade com Ar70C7-2
<i>Bacillus alveayuensis</i> TM1 (AY605232)	100,0
<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 (LBMN01000156)	96,3
<i>Bacillus aeolius</i> 4-1 (AJ504797)	96,3
<i>Bacillus wuyishanensis</i> FJAT-17212 (KF040589)	96,3
<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670 (Z26930)	97,9
<i>Bacillus methanolicus</i> PB1 (AFEU01000002)	96,5
<i>Bacillus panacisoli</i> CJ32 (JQ806742)	95,6
<i>Bacillus pakistanensis</i> NCCP-168 (AB618147)	95,8
<i>Anoxybacillus bogrovensis</i> BT13 (AM409184)	96,1
<i>Bacillus crescens</i> JC247 (LN625239)	96,0
<i>Bacillus fengqiensis</i> NPK15 (KC291653)	96,7
<i>Bacillus songklensis</i> CAU1033 (JN036548)	96,7

Fonte: Elaborada pela autora.

Bae e colaboradores¹⁴² isolaram a linhagem de *Bacillus alveayuensis* TM1 a partir de sedimentos marinhos de mais de 4.000 m abaixo do nível do mar na região do Oceano Pacífico Ocidental. Essa cepa é descrita como sendo termofílica, Gram-positiva, aeróbica, em formato de bastonete e formadora de endósporos. É capaz de crescer em temperaturas entre 40 e 65°C (não apresentando crescimento abaixo de 40°C ou acima de 65°C), pH entre 6,5 e 9, na presença de 0 - 4% de NaCl, tendo crescimento ótimo a 55°C, pH 7 e 3% de NaCl. Suas colônias são circulares, convexas, opacas e de coloração creme.

As outras linhagens, apontadas pela DSMZ como de maior similaridade, compreendem microrganismos gram-positivos, produtores de endósporos e com formato de bastonete. Duas linhagens, *B. aeolius* 4-1¹⁴³ e *A. bogrovensis* BT13,¹⁴⁴ foram isoladas de fontes termais com temperaturas *in situ* de 45 °C e 56 °C, e tiveram seu ótimo de crescimento em 55 e 65 °C, respectivamente. Já *B. pakistanensis* CJ-32,¹⁴⁵ foi isolada de minas de sal no Paquistão e apresentou crescimento em meios com salinidade de até 17%, porém, seu ótimo foi em torno de 2-3%. *B. paralicheniformis* KJ-16¹⁴⁶ e *A. pallidus* DSM3670¹⁴⁷ apresentaram crescimento na presença de até 10% de NaCl e em temperaturas entre 15-60 °C e 30-70°C, respectivamente. As demais linhagens foram isoladas de amostras de solo com temperaturas ótimas de crescimento em torno de 30 a 37 °C e salinidade entre 2 e 4%.

A linhagem desse estudo, Ar70C7-2 apresentou características similares à linhagem de *B. alveayuensis*. Ar70C7-2 possui o mesmo padrão de crescimento em temperatura: não há crescimento a 40 °C e acima de 65 °C, porém, possui tolerância a maiores valores de salinidade, apresentando crescimento em 3,5 e 7% de NaCl, com seu ótimo em 7%. Suas colônias, mostradas na Figura 12, são circulares e convexas, opacas e da coloração creme (Argentin, 2016),¹⁴⁸ assim como descrito para *B. alveayuensis* TM1.¹⁴²

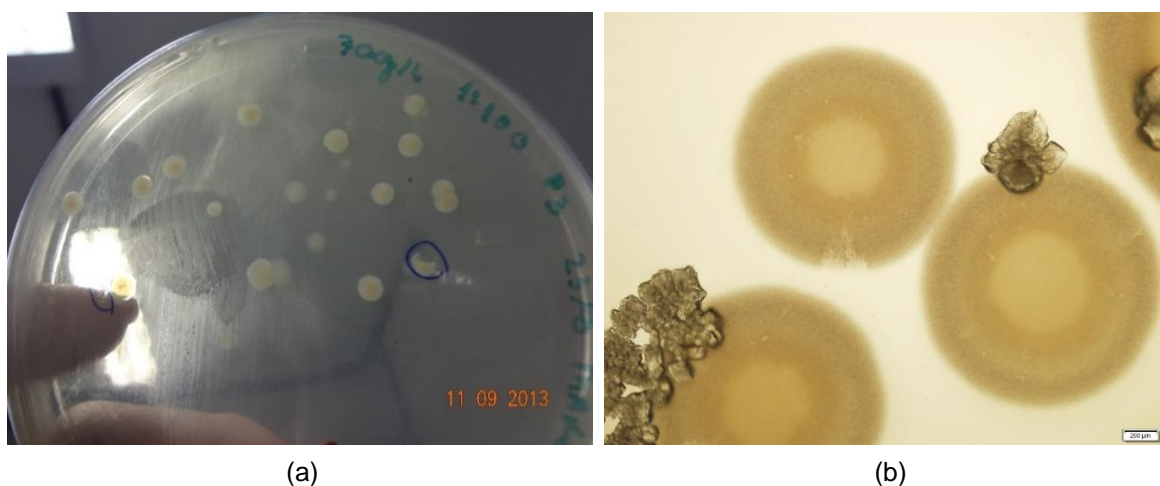


Figura 12 - Colônias de Ar70C7-2 (a) durante seu isolamento e (b) sob microscópio ótico com aumento de 4x.
Fonte: Elaborada pela autora.

A árvore filogenética resultante do alinhamento entre os doze microrganismos indicados pela DSMZ como de maior similaridade está representada na Figura 13. Tanto o isolado Ar70C7-2 quanto *B. alveayuensis* TM1 encontram-se no mesmo *cluster*, o que indica proximidade genética entre ambos.

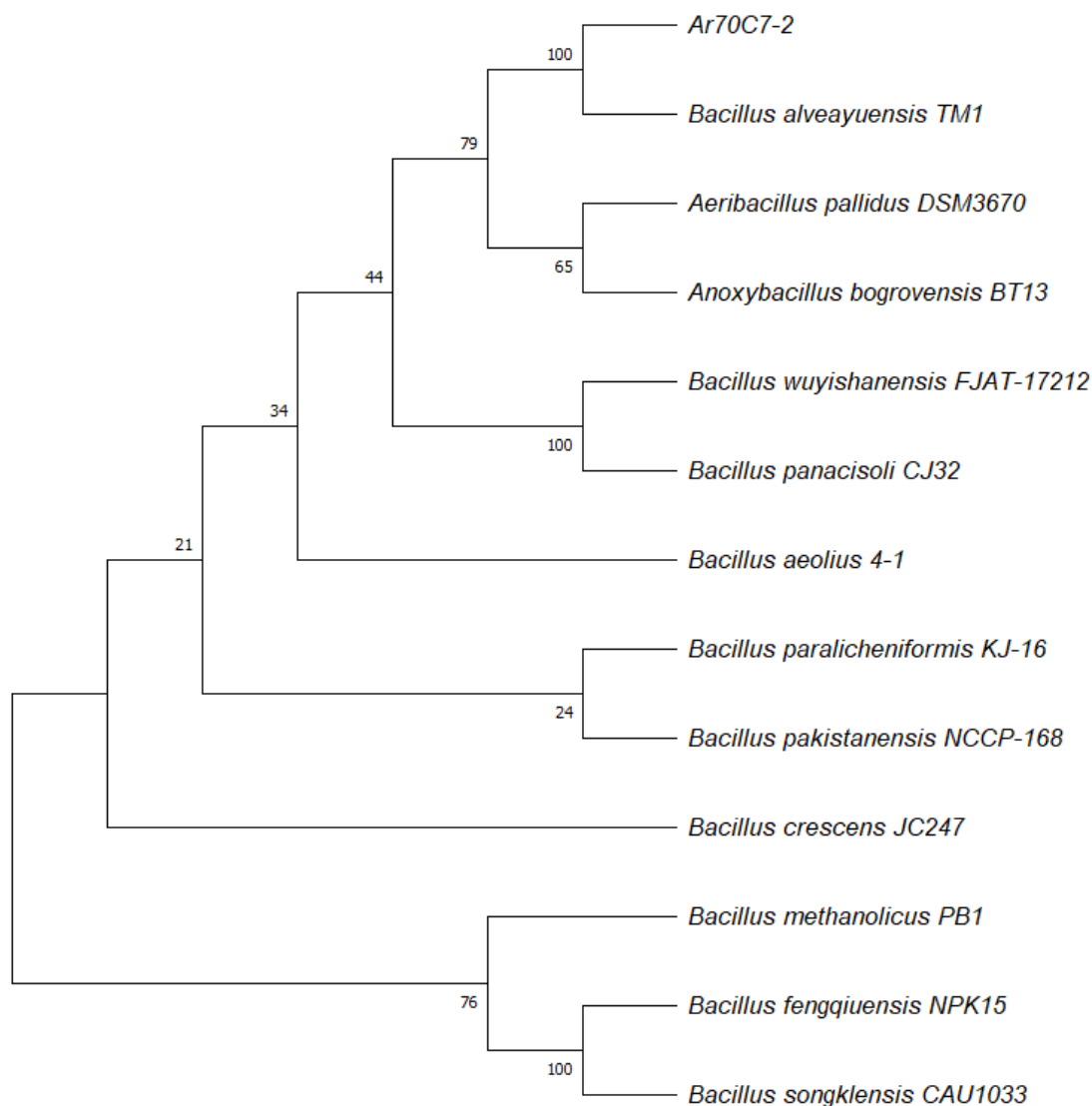


Figura 13: - Árvore filogenética baseada pelo método de Neighbor Joining para o alinhamento entre Ar70C7-2 e os microrganismos que apresentaram maior semelhança, de acordo com os resultados apresentados pela DSMZ em 2017. Os valores de Bootstrap (%) com base em 1.000 conjuntos de dados reamostrados são mostrados nos nós de ramificação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além do sequenciamento genético, para a caracterização da linhagem Ar70C7-2 foram realizados testes bioquímicos utilizando-se o kit API® 50CH e de análise de ésteres metílicos de ácido graxo celular. Os resultados obtidos para o perfil bioquímico estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Nessas tabelas também se encontram os resultados, para os mesmos testes, dos microrganismos de mais alta similaridade à linhagem estudada, obtidos na literatura.

Embora as linhagens Ar70C7-2 e *B. alveayuensis* possuam 100% de similaridade genotípica, conforme indicado pela DSMZ, observa-se uma diferença fenotípica entre ambas (Tabelas 2 e 3). Em comum, as linhagens são catalase positivas e não possuem crescimento anaeróbio, hidrolisam esculina, foram negativas para reação indol e não foram capazes de reduzir nitrato (Tabela 2).

O teste API® 50CH, é usado para detectar o crescimento microbiano em 49 diferentes carboidratos e seus derivados. Uma suspensão microbiana é inoculada em cada um dos tubos, onde a presença da fermentação é detectada através da mudança de coloração do meio. Dos 49 resultados gerados, as linhagens Ar70C7-2 e *B. alveayuensis* obtiveram 41 resultados semelhantes, sejam eles positivos ou negativos (Tabela 3). Em comum, ambas linhagens foram capazes de crescer, por exemplo, nas seguintes fontes: glicerol, glicose, frutose, manose, maltose, sacarose e trealose.

A diferença em certos resultados dos testes pode ser devido ao ambiente em que os microrganismos foram isolados. Ambas cepas foram isoladas de amostras marinhas de mais de 3.000 m de profundidade abaixo do nível do mar, porém, de locais diferentes. A pressão ambiental sobre as linhagens pode ter sido o fator essencial para que ambas se adaptassem de forma diferente a condições ambientais distintas.¹⁴⁹

Tabela 2- Tabela comparativa dos testes bioquímicos entre Ar70C7-2 e os microrganismos de maior semelhança, de acordo com a DSMZ. (+) reação positiva, (-) reação negativo, (NI) dado não infirmado, (w) reação fraca e (d) ocorreram reações diferentes.

PROPRIEDADE	Ar70C7-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> TM1 ¹⁴²	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KI-16 ¹⁴⁶	<i>Bacillus aeolius</i> 4-1 ¹⁴³	<i>Bacillus wuyishanensis</i> FJAT-17212 ¹⁵⁰	<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670 ^{147,151-153}	<i>Bacillus methanolicus</i> PB1 ¹⁵⁴	<i>Bacillus panacisoli</i> CJ32 ¹⁵⁵	<i>Bacillus pakistanensis</i> NCCP-168 ¹⁴⁵	<i>Anoxybacillus bogrovensis</i> BT13 ¹⁴⁴	<i>Bacillus crescens</i> JC247 ¹⁵⁶	<i>Bacillus fengjiuensis</i> NPK15 ¹⁵⁷	<i>Bacillus songklensis</i> CAU1033 ¹⁵⁸
Temperatura ótima (°C)	55	55	37	55	30	60	55	30	35	65	37	37	30
Salinidade ótima - %NaCl	7	3		2	2			2		0,5			
Oxidase	+	-	-	+	-	+	+	-	-	NI	-	-	+
Catalase	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento anaeróbio	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Reação Voges-Proskauer	-	NI	NI	+	-	-	NI	-	-	-	NI	+	-
Uso de													
Citrato	+	-	-	-	-	-	NI	NI	-	NI	+	+	+
Succinato	+	NI	+	NI	NI	NI	-	-	NI	NI	NI	NI	NI
Acetato	+	-	+	NI	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI
L-Malato	+	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Produção de gás a partir de glicose	-	NI	+	NI	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
Hidrólise de													
Caseína	-	+	+	+	+	-	-	-	NI	-	-	NI	-
Gelatina	w	-	+	+	-	-	NI	w	+	+	-	+	-
Amido	+	-	+	+	-	w	-	-	NI	+	+	-	-
Tweed 80	-	NI	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	+	-	NI
Esculina	+	+	+	-	+	d	NI	w	+	NI	NI	-	-

(continua)

(continuação)

Reação Indol	-	-	NI	-	-	-	NI	-	-	-	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	-	NI	-	NI
Arginina dihidrolase	+	-	+	-	-	NI	NI	NI	-	-	NI	-	-
Produção de NO ₂ a partir de NO ₃	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Produção de H ₂ S	+	NI	NI	-	-	NI	NI	NI	-	-	-	-	-
Urease	+	-	+	-	-	-	NI	-	-	-	-	-	-
Motilidade	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

Fonte: Adaptada dos resultados enviados pela DSMZ e dos autores citados na própria tabela.

Tabela 3 - Tabela comparativa dos testes API® entre Ar70C7-2 e os microrganismos de maior semelhança, de acordo com a DSMZ. (+) reação positiva, (-) reação negativo, (NI) dado não infirmado, (w) reação fraca e (d) ocorreram reações diferentes.

	Ar70C7-2	<i>Bacillus alveayuensis</i> TM1 ¹⁴²	<i>Bacillus paralicheniformis</i> KJ-16 ¹⁴⁶	<i>Bacillus aeolius</i> 4-1 ¹⁴³	<i>Bacillus wuyishanensis</i> FJAT-17212 ¹⁵⁰	<i>Aeribacillus pallidus</i> DSM3670 ^{147,151-153}	<i>Bacillus methanolicus</i> PB1 ¹⁵⁴	<i>Bacillus panacisoli</i> CJ32 ¹⁵⁵	<i>Bacillus pakistanensis</i> NCCP-168 ¹⁴⁵	<i>Anoxybacillus bogrovensis</i> BT13 ¹⁴⁴	<i>Bacillus crescens</i> JC247 ¹⁵⁶	<i>Bacillus fengqiuenensis</i> NPK15 ¹⁵⁷	<i>Bacillus songklensis</i> CAU1033 ¹⁵⁸
Glicerol	+	+	+	+	-	NI	-	+	-	NI	NI	+	+
Eritrol	-	-	-	-	-	NI	-	-	-	NI	NI	+	-
D-Arabinose	-	-	-	+	+	-	NI	-	-	NI	NI	+	NI
L-Arabinose	-	-	+	+	-	-	NI	+	-	+	-	+	-
Ribose	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	NI	+	-
D-Xilose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	NI	+	-
L-Xilose	NI	-	-	+	-	-	-	-	-	NI	NI	-	NI

(continua)

(continuação)

Adonitol	-	-	-	-	-	NI	-	-	-	NI	NI	-	+
β -Me-D-xilosídeo	-	-	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	+	NI
Galactose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	w	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+	-	+	NI	+	+	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+	w	-	NI	+	+	-	+	-	-
Sorbose	-	-	-	-	-	NI	NI	-	-	NI	NI	-	NI
Ramnose	-	-	+	+	-	-	NI	-	-	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	-	NI
Inositol	-	-	+	+	-	NI	-	-	-	-	NI	+	-
Manitol	+	-	+	+	-	NI	+	+	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	+	-	NI	-	-	-	-	+	-	+
α -Metil-D-Manosídeo	-	-	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	NI	NI
α -Metil-D-Glicosídeo	-	-	+	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	NI	NI
N-Acetil-Glicosamina	w	-	+	+	+	NI	NI	-	+	NI	NI	+	-
Amidalina	-	-	-	-	+	NI	NI	+	+	+	NI	w	-
Arbutina	-	-	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	w	-
Esculina	-	+	-	-	+	d	NI	+	+	NI	NI	-	-
Salicilina	-	-	+	+	+	NI	-	+	+	+	NI	w	-
Celobiose	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Maltose	+	+	+	+	-	d	+	+	+	+	NI	+	+
Lactose	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	w	NI
Melibiose	-	-	+	+	-	NI	NI	+	-	+	NI	-	+
Sacarose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	d	+	+	+	NI	NI	+	+
Inulina	-	-	-	+	-	NI	-	+	-	-	NI	+	NI
Melezitose	-	-	-	+	+	NI	NI	+	-	NI	NI	+	NI
Rafinose	-	-	-	+	+	NI	+	+	-	-	NI	+	-

(continua)

(continuação)

Amido	-	-	-	+	-	NI	-	-	-	+	+	-	NI
Glicogênio	-	-	+	+	-	NI	-	-	+	+	NI	-	-
Xilitol	-	-	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	-	NI
Gentiobiose	-	-	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	-	-
D-Turanose	-	-	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	w	NI
D-Lixose	-	-	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	w	NI
D-Tagatose	-	-	-	-	-	NI	NI	-	+	NI	NI	-	-
D-Fucose	-	+	-	+	-	NI	NI	+	-	NI	NI	w	NI
L-Fucose	-	-	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	-	w	NI
D-Arabitól	+	-	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	-	NI
L-Arabitól	-	-	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	w	NI
Gluconato	-	-	+	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	-	NI
2-Cetogluconato	-	-	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	w	NI
5-Cetogluconato	-	+	-	+	-	NI	NI	-	-	NI	NI	w	-

Fonte: Adaptada dos resultados enviados pela DSMZ e dos autores citados na própria tabela.

Além dos testes apresentados acima, Ar70C7-2 apresentou reação negativa para crescimento em caldo de lisozima, lectinase e tirosina, e reação positiva para hemólise e uso de propionato e fumarato; nenhum destes testes foram relatados nos artigos de descrição das linhagens comparadas.

O isolado Ar70C7-2 apresentou composição de ácidos graxos celulares que variaram de C₁₄ a C₁₈, com C_{16:0} (30,73%), iso-C_{15:0} (22,41%) e iso-C_{17:0} (21,84%), como componentes de maior ocorrência e, em menor frequência, anteiso-C_{17:0} (8,71%), iso-C_{16:0} (6,52%), C_{14:0} (4,01%), C_{18:0} (2,99%) e anteiso-C_{15:0} (2,78%), como mostrado na Figura 14. A linhagem de *B. alveayuensis* apresentou composição principal de iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0} e C_{16:0} com composição variando de C₁₂ a C₁₈,¹⁴² tem-se, assim, semelhança na composição dos ácidos graxos celulares entre ambas linhagens. Já para as outras linhagens apresentadas na Tabela 1, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0} e C_{16:0} foram os ácidos graxos predominantes. Uma análise de 313 linhagens de *Bacillus* feita por Kämpfer¹⁵⁹ indicou a razão iso-C_{15:0} / Anteiso-C_{15:0} como divisor do grupo *Bacillus* em dois grandes subgrupos. Aquelas que

apresentaram valor de razão menor do que 2 se agrupariam nos *clusters* I, II e VII pelo método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*). Já aquelas linhagens que apresentaram valor de razão maior do que 2, estariam agrupadas nos *clusters* III a VI. Para a linhagem Ar70C7-2, a razão iso-C_{15:0} / Anteiso-C_{15:0} (22,41% / 2,78%) é igual a 8,06, o que a colocando no subgrupo de *B. stearothermophilus*,¹⁵⁹ no *cluster* V, igualdade confirmada no resultado da análise de composição de ácidos graxos mostrado na Figura 14 (*Matches: Bacillus-stearothermophilus*).

RT	Response	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percent	Comment1	Comment2
1.632	3.88E+8	0.025	----	7.007	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1.893	185	0.022	----	7.524		----	< min rt	
2.012	609	0.026	----	7.761		----	< min rt	
2.248	228	0.023	----	8.230		----	< min rt	
2.808	431	0.026	----	9.341		----		
3.200	167	0.025	----	10.086		----		
7.272	2044	0.038	0.988	14.000	14:0	4.01	ECL deviates 0.000	Reference-0.002
8.232	11598	0.037	0.973	14.623	15:0 ISO	22.41	ECL deviates 0.000	Reference-0.001
8.371	1444	0.038	0.971	14.713	15:0 ANTEISO	2.78	ECL deviates 0.000	Reference-0.002
9.858	3445	0.042	0.953	15.627	16:0 ISO	6.52	ECL deviates 0.000	Reference-0.002
10.478	16350	0.042	0.947	15.999	16:0	30.73	ECL deviates -0.001	Reference-0.003
11.571	11730	0.044	0.938	16.631	17:0 ISO	21.84	ECL deviates 0.001	Reference-0.001
11.730	4684	0.043	0.937	16.723	17:0 ANTEISO	8.71	ECL deviates 0.000	Reference-0.002
13.972	1632	0.042	0.924	18.000	18:0	2.99	ECL deviates 0.000	Reference-0.003

ECL Deviation: 0.001
Total Response: 53527
Percent Named: 98.88%

Reference ECL Shift: 0.002
Total Named: 52928
Total Amount: 50364
Number Reference Peaks: 8

Matches:

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA40 4.10	0.261	Bacillus-stearothermophilus (55C)

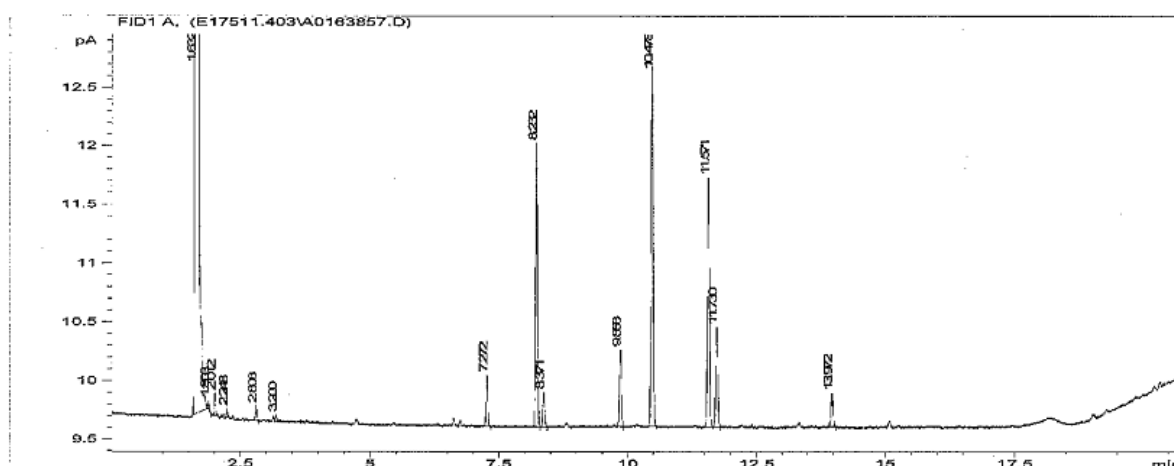


Figura 14 - Resultado apresentado pela empresa DSMZ para a análise de ácidos graxos celulares.

Fonte: Resultado fornecido pela empresa DSMZ.

Em resumo, a linhagem Ar70C7-2 pode ser descrita como sendo uma linhagem da espécie *Bacillus alveayuensis*, cujas células são Gram-positivas, em forma de bastonete (0,4 μm de largura e 2,0-4,0 μm de comprimento), ocorrendo individualmente, em pares ou em filamento, sem motilidade aparente, formadora de endósporos. Exibe colônias convexas de coloração creme, possuindo bordas lisas e circulares, quando crescida em meio sólido LB modificado, 55°C. Não apresentou crescimento anaeróbio. Em caldo LB modificado apresentou crescimento ótimo a 55°C, pH 6-7,5 e 7% NaCl. Não apresentou crescimento em temperatura inferior a 40°C ou acima de 65°C e em salinidade acima de 12 % NaCl. Em cultivo líquido em Meio Mineral, a 55°C, cresceu na presença das fontes de carbono glicose, sacarose, glicerol, e das fontes de nitrogênio NH_4NO_3 , NH_4Cl e NaNO_3 . Os principais ácidos graxos são o C16:0 (ácido palmítico), iso-C15:0 (ácido iso-pentanodecanóico) e iso-C17:0 (ácido iso-heptanodecanóico).

5.2 Biossurfactante produzido pela linhagem Ar70C7-2

A escolha da composição do Meio Mineral para produção de BS foi realizada em um trabalho anterior (Argentin, 2016),¹⁴⁸ baseada em ensaios nos quais foram testadas diferentes fontes de carbono (C), nitrogênio (N) e a relação C/N, fatores esses que podem influenciar a produção de BS por um microrganismo.⁴⁰ A combinação dos compostos nitrato de amônio e glicerol, na proporção C/N=2 foi a que proporcionou melhor desempenho na produção de BS. Nesse meio, a linhagem Ar70C7-2 foi capaz de produzir 2,7 gramas (peso seco) de BSBr por 10 litros de meio. O processo de extração com clorofórmio apresentou um rendimento de 58,1%, ou seja, a partir de 2,7 g de BSBr, foram obtidas 1,57 g de BSEx. A semi-purificação em coluna de sílica gel 60 demonstrou rendimento de 20 a 25% e, por fim, a purificação no sistema *Äkta Purifier* apresentou um rendimento de 5%. A Figura 15 apresenta fotos do processo de precipitação ácida (Figura 15a e Figura 15b) seguida de extração com clorofórmio (Figura 15c) e semi-purificação do biossurfactante em coluna de sílica gel 60 (Figura 15d).

Na cromatografia de camada delgada, o tampão que apresentou melhor resultado nas eluições por TLC foi acetonitrila (Figura 16), sendo este solvente selecionado para o processo de purificação do BS. Foi possível confirmar a

presença de aminoácidos na amostra ao se observar uma mancha com coloração roxa na revelação com solução de ninhidrina (Figura 16b).

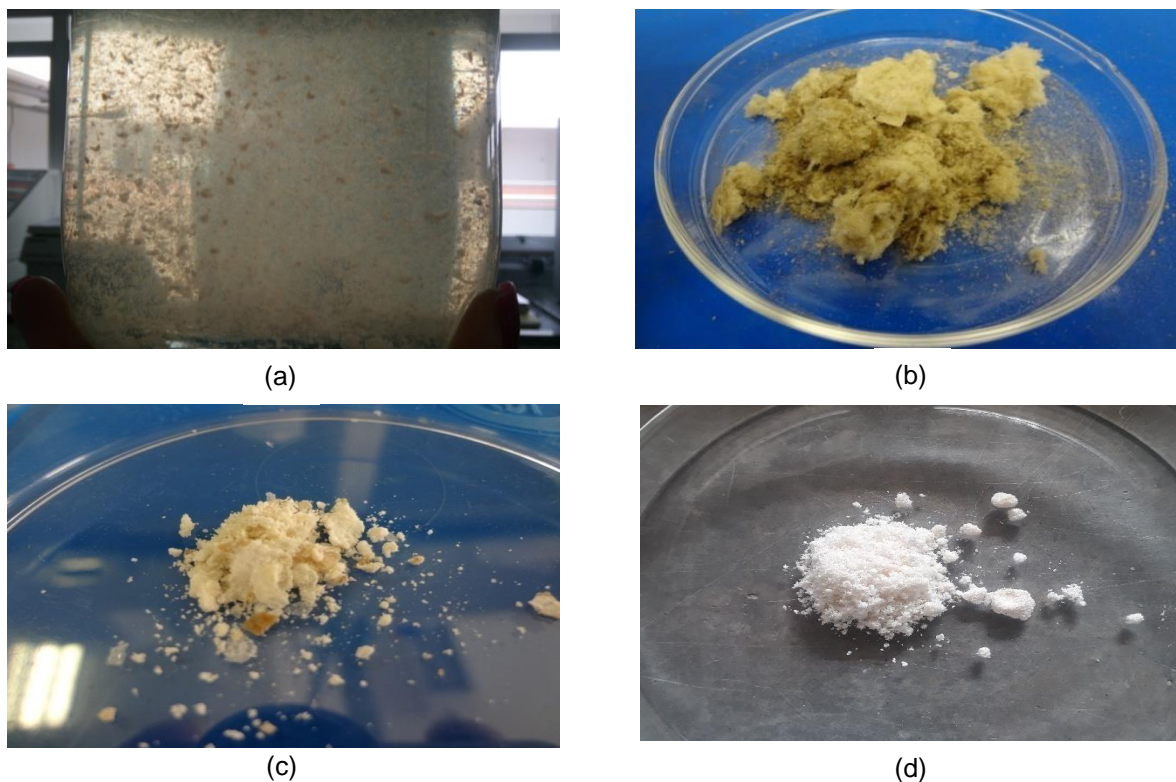


Figura 15 - Fotos das etapas do processo de extração e semi-purificação do biossurfactante obtido a partir do cultivo de Ar70C7-2. (a) Frasco contendo o precipitado formado após 12 horas da adição de HCl concentrado ao sobrenadante do cultivo em Meio Mineral. (b) Precipitado BSB_r formado em (a) seco em liofilizador. (c) BSE_x seco após extração com clorofórmio e (d) BSSP60 seco obtido por separação em coluna de sílica.

Fonte: Elaborada pela autora.

O uso de cromatografia em camada delgada para a identificação e até mesmo para a purificação de biossurfactantes é recorrente na literatura.^{23,160-164} Resultados similares foram reportados por Nalini *et al.*,¹⁶¹ Zhu *et al.*,¹⁶² Yáñez-Mendizábal & Falconi,²³ e Nayak *et al.*¹⁶⁴ onde os autores relataram a produção de biossurfactante por linhagens de *Bacillus* e utilizaram a técnica de TLC para confirmar a presença de lipopeptídeos. Para este trabalho, assim como para os trabalhos indicados acima, o resultado obtido a partir da revelação com ninhidrina da cromatoplaça, foi positivo para a presença de aminoácidos, o que pode indicar a presença de lipopeptídeo na amostra testada.

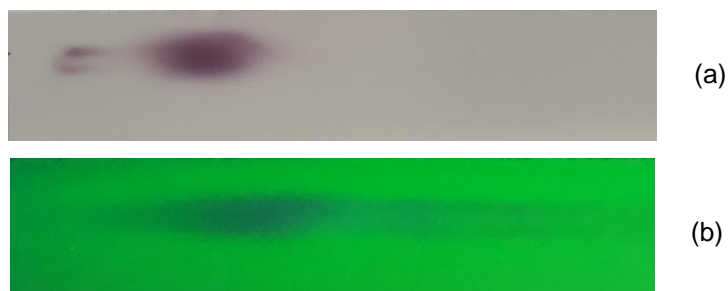


Figura 16 - Cromatoplaça obtida na corrida da amostra BSEx com acetoneitrila como tampão, (a) mancha revelada com ninhidrina indicando a presença de aminoácidos, (b) mancha revelada em 254 nm, indicando que a amostra correu corretamente na cromatoplaça.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.1 Avaliação das propriedades tensoativas do biossurfactante

Durante o processo de purificação do BS, soluções de 0,1% de amostras todas as etapas (BSBr, BSEx, BSSP60 e BSPu) tiveram seus valores de E_{24} e de tensões superficiais aferidas. Todos os valores obtidos para E_{24} permaneceram entre o intervalo de 55 a 70% e os dados de tensão superficial são mostrados na Tabela 4. A tensão interfacial da solução de 0,1% de BSSP60 contra *n*-hexadecano foi de 17,63(\pm 0,17) mN/m.

Tabela 4 - Valores de tensão superficial das frações de BS obtidas durante o processo de purificação.

Amostra	Tensão superficial (mN/m)
BSBr	44,5 \pm 0,4
BSEx	35,4 \pm 0,8
BSSP60	31,8 \pm 0,1
BSPu *	38,3 \pm 0,1
Água destilada	71,817 \pm 0,003

* Devido a pequena quantidade de amostra, a medida de TS de BSPu foi feita na concentração de 0,05%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em geral, um biossurfactante é considerado um bom agente tensoativo quando ele é capaz de reduzir a tensão superficial da água de, aproximadamente 72 mN/m, para 35-40 mN/m, e a tensão interfacial entre água e hexadecano, de 40 mN/m para valores abaixo de 1 mN/m.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ A surfactina, um lipopeptídeo cíclico, é descrito como o BS mais efetivo encontrado até hoje, suas isoformas iso-C13, iso-C14 e iso-C15 podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 29,3; 27,8 e 27,1 mN/m, e apresentar CMC de 25,2; 18,8 e 14,8 mg/L, respectivamente.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

A linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332 é muito utilizada na literatura para o estudo da produção de BS^{26,171-174} e, no presente trabalho, será referida como linhagem-controle. Soluções de 0,1% (m/v) de biossurfactante bruto e extraído produzidos pela linhagem-controle tiveram suas tensões superficiais medidas e apresentaram como resultado 26,36 (\pm 0,16) mN/m e 32,93 (\pm 0,08) mN/m e interfaciais (água/hexadecano), 3,02 (\pm 0,07) mN/m e, por fim, seu maior E₂₄ obtido foi de 44,5(\pm 7,6)%. Os valores estão ligeiramente acima do que é relatado na literatura,¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ porém, estão condizentes com o esperado, já que as medidas foram realizadas sem que o BS estivesse totalmente purificado, portanto, espera-se que quanto maior a pureza, menor seriam as tensões medidas. O BS produzido pela linhagem-controle mostrou ser mais eficaz na redução de tensão superficial e interfacial do que o tensoativo produzido pela linhagem estudada (Ar70C7-2). Entretanto, os índices de emulsificação apresentados pela linhagem Ar70C7-2 sempre se mantiveram acima de 55%, sendo, portanto, superiores aos do controle. Essa superioridade na emulsificação deve-se ao tamanho da cadeia de ácidos graxos, onde biossurfactantes com maiores cadeias de ácidos graxos são descritos como melhores emulsificantes,¹⁶⁹ e o resultado apresentado no item 1.2.2 pode indicar que o BS produzido por Ar70C7-2 apresenta cadeias lipídicas maiores do que as cadeias apresentadas por *B. subtilis* 21332.

A CMC é um parâmetro importante na determinação da eficácia de um biossurfactante que, em sua maioria, apresenta CMC menor do que os surfactantes químicos utilizados, por exemplo, nos processos de MEOR. Sua baixa CMC indica que eles são eficazes em menores concentrações; assim, apenas pequenas quantidades de BS são suficientes para ocasionar a redução nas tensões interfaciais e superficiais.^{17,166} A surfactina possui baixo valor de CMC (15 – 40 mg/L),^{17,175-176} podendo chegar a 10 mg/L em condições de alta pureza (liquenisina B, um

lipopeptídeo do tipo surfactina),¹⁶⁰ e isso a torna potencialmente aplicável em diversos processos industriais.

A amostra BSSP60 apresentou CMC de aproximadamente 65 mg/L (Figura 17), valor mais alto se comparado com os valores apresentados pela surfactina. Entretanto, ao observarmos a Figura 17, vemos uma leve inclinação no perfil da curva (a tensão superficial da solução ainda reduz após a CMC), isso pode ser ocasionado por impurezas ainda presentes na amostra.^{17,123,177} Entretanto, mesmo havendo impurezas, a CMC de BSSP60 está no intervalo esperado dentre as CMCs relatadas por lipopeptídeos (1-507 mg/L)¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ e também está abaixo dos valores relatados por alguns dos surfactantes químicos utilizados, como o CTAB (335 mg/L) e SDS (2350 mg/L).¹⁵

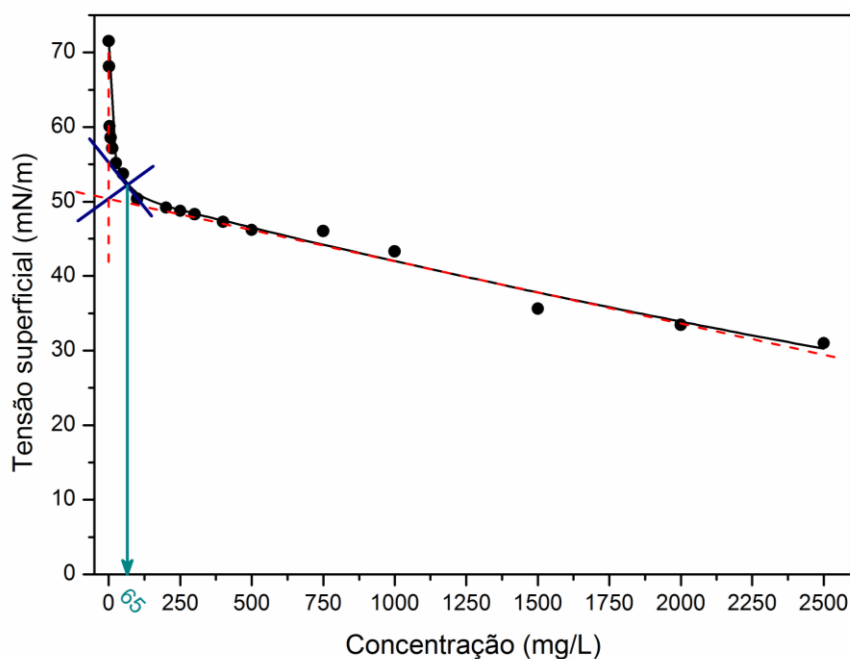


Figura 17 - Gráfico de concentração vs tensão superficial para cálculo da CMC de BSSP60.

Fonte: Elaborada pela autora.

Surthar e Nerurkar (2016)¹⁸⁰ relataram a produção de lipopeptídeo pela linhagem TT42 de *B. licheniformis*, onde o biossurfactante foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m e apresentou CMC de 22 mg/L. O lipopeptídeo foi identificado como um heptapeptídeo cíclico contendo glutamina, leucina/isleucina, valina, ácido aspártico, nas proporções de 1:4:1:1, com cadeia de ácido graxo principal, contendo 19 átomos de carbono, a maior cadeia de ácido graxos relatada para um lipopeptídeo. O BS relatado apresentou capacidade de redução da tensão interfacial entre água/óleo de 12 para 0,05 mN/m e manteve-se estável em altas temperaturas, o que indicou a possibilidade de seu uso em processos de MEOR.

Datta *et al.*,¹⁵ em um estudo com *Bacillus tequilensis* MK 729017, isolado de solo de reservatório de petróleo de Assam (Índia), mostrou que o isolado produziu um biossurfactante do tipo surfactina. O lipopeptídeo foi capaz de reduzir a tensão superficial para 30 (± 2) mN/m, com índice de emulsificação de 66 (± 2) % e CMC de 90 mg/L. Já em um trabalho anterior,¹⁷⁶ os mesmos autores otimizaram a produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* MG495086 isolado de água de formação do mesmo reservatório. O tensoativo, caracterizado como uma surfactina, foi capaz de consumir 91,3 (± 5) % da parafina usada como fonte de carbono, sua CMC foi de 40 mg/L, com E_{24} de 72,45 ($\pm 0,85$) %.

Oliveira e colaboradores¹⁸¹ estudaram a produção de tensoativo por *B. subtilis* (LAMI005) em meio contendo suco de caju clarificado como fonte de glicose, frutose, sais minerais e aminoácidos livres. Os autores indicaram que o lipopeptídeo produzido pertencia à família das surfactinas, com CMC de 63 mg/L e E_{24} máximo de 67%, em querosene, valores estes muito similares aos obtidos para Ar70C7-2 por este estudo. Os estudos de Singh *et al.*,¹⁸² Mesbaiah *et al.*¹⁸³ e Zhu *et al.*,¹⁶² relataram CMC de 80-110 mg/L, 500 mg/L e 507 mg/L, respectivamente, sendo que todos os valores apresentados estão acima do valor obtido para o BSSP60 de Ar70C7-2, sendo lipopeptídeos nos dois primeiros trabalhos e uma mistura de lipopeptídeo e glicolipídeo no último.

O teste de flotação e de inversão de molhabilidade foram realizados com amostras de BSSP60 em solução a 0,01% (flotação) e 0,01% e 0,1% (molhabilidade), respectivamente. Na Figura 18 temos o resultado apresentado para o teste de flotação: nota-se que a amostra de biossurfactante ocasionou uma inversão de molhabilidade mediana, ou seja, a quantidade de carbonato depositada

no fundo do tubo de ensaio (Figura 18b) foi maior do que a quantidade apresentada no controle negativo - água destilada (Figura 18a), porém, foi menor do que nos tubos contendo Tergitol 100 ppm (controle positivo) (Figura 18c).

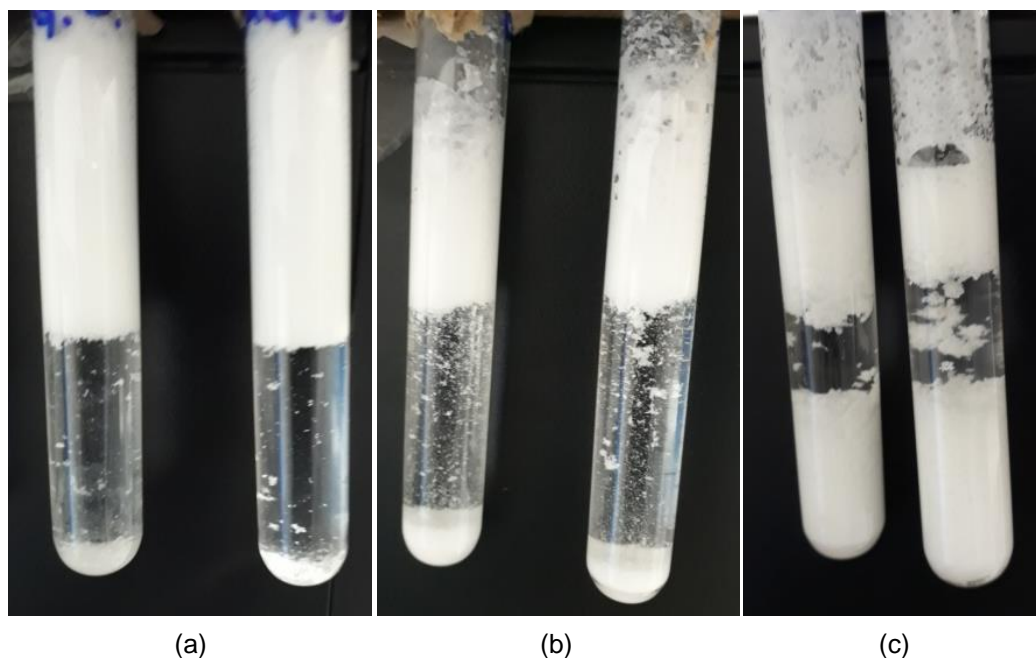


Figura 18 - Teste de flotação feito com (a) água destilada, controle negativo; (b) BSSP60, 0,01% e (c) Tergitol 0,01%, controle positivo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Guimarães e colaboradores,¹⁸⁴ realizaram um teste de inversão de molhabilidade com a surfactina produzida por *Bacillus velezensis* H2O-1 isolada de um campo petrolífero no Brasil. O lipopeptídeo foi testado nas concentrações de 25, 50 e 100 ppm, onde seu desempenho máximo de inversão foi de 80% na sua maior concentração testada. Resultado inferior ao do controle positivo, o surfactante químico Ultrasperse II que, por sua vez, apresentou 100% de inversão de molhabilidade do carbonato. Guimarães *et al.*¹⁸⁵ realizou um novo estudo com este lipopeptídeo em 2021, quando avaliou a inversão da molhabilidade nas condições de salinidade do pré (70 g/L NaCl) e pós sal (35 g/L NaCl), com o carbonato impregnado com óleos de baixa e média densidade. A surfactina produzida pelo *B. velezensis* H2O-1, nas concentrações de 25, 50 e 100 ppm, foi capaz de inverter 100% a molhabilidade do carbonato testado, exceto na condição de 25 ppm, para óleos leves, onde a inversão ocasionada pela amostra foi de 97,6%. Valor muito

superior ao obtido pelo controle Ultrasperse II, que na condição do pós sal, inverteu de 30 a 34,8% tanto para óleos leves quanto para aqueles de média densidade. Já para a condição do pré sal, a máxima inversão ocasionada pelo Ustrasperse II, 79,3%, ocorreu na concentração de 100 ppm, em óleos de média densidade.

O teste de flotação para o BS produzido por Ar70C7-2 apresentou um resultado qualitativo, pois não é possível realizar a medição exata do carbonato depositado no fundo dos tubos sem que haja interferência na medida (foi observada uma alta instabilidade do carbonato na fase superior). Em razão desse fato, o método de Washburn foi utilizado¹⁸⁶ em conjunto de um tensiômetro de força (Sigma 701 – OneAttension) para avaliar quantitativamente a inversão da molhabilidade. Este teste consistiu na imersão da parte inferior e porosa de um cilindro de vidro em uma solução que continha o agente tensoativo, enquanto dentro do cilindro havia uma alíquota de carbonato de cálcio molhável a óleo. A modificação na molhabilidade resulta na absorção espontânea da água em um ambiente inicialmente tomado por óleo;¹⁸⁷ assim, por capilaridade, ocorre a absorção de uma massa do líquido para dentro do cilindro, massa essa que é medida através do tensiômetro.

As curvas obtidas no tensiômetro estão representadas na Figura 19. Para uma solução contendo 100 ppm de BSSP60 houve uma maior massa de solução absorvida pela amostra de carbonato, se comparado ao controle negativo (água destilada), porém, este valor é inferior ao observado nos controles positivos: Tergitol 0,01 e 2%. Observou-se que, quanto maior a concentração do BS, maior é a massa absorvida pelo cilindro; assim, no teste com 0,1% de BSSP60, o resultado do aumento da massa foi um valor intermediário entre os valores observados nos controles positivos, onde o tergitol a 2% ainda apresentou um melhor resultado. Por apresentar valores acima do controle negativo, podemos indicar que a amostra de biossurfactante testada possibilitou a ascensão do líquido por um ambiente hidrofóbico.

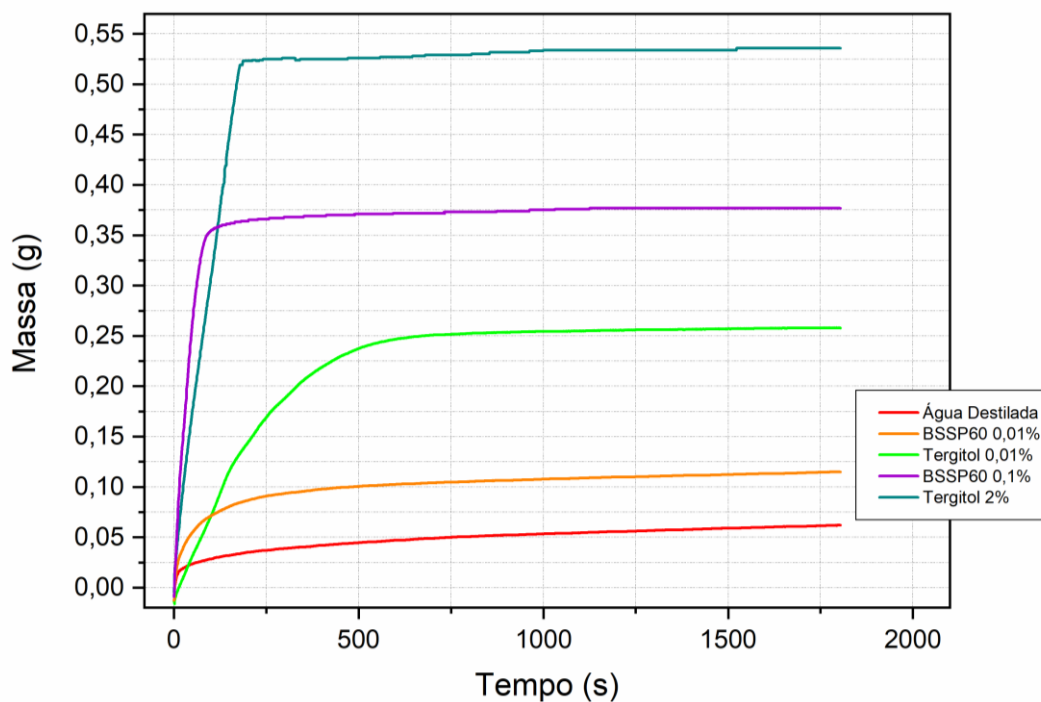


Figura 19 - Curvas obtidas pelo método de Washburn no tensiômetro OneAttention 701.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.2.2 Caracterização química do biossurfactante

A curva padrão obtida com solução de albumina (Figura 20) apresentou alto valor para o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,99784$). A absorvância da amostra BSSP60 foi de $0,285(\pm 0,023)$, o que indica que a porcentagem de proteínas totais da amostra foi de 7%.

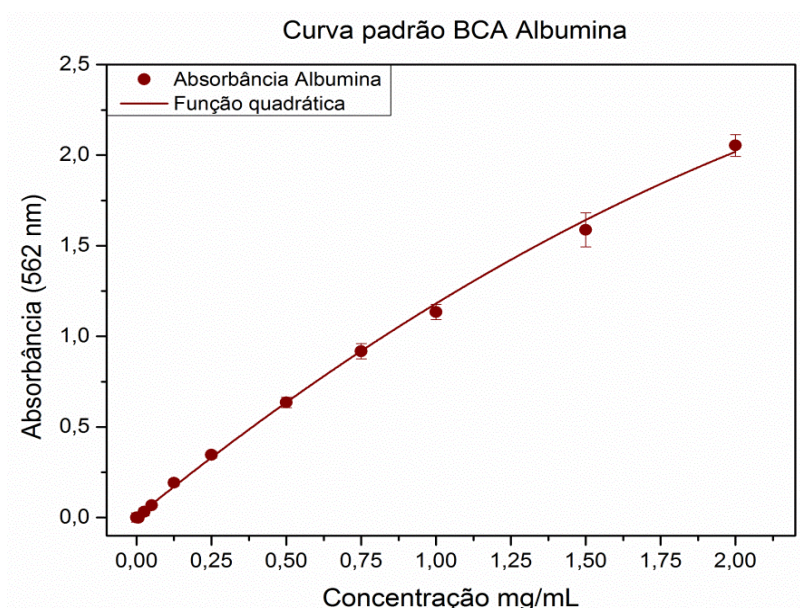


Figura 20 - Curva padrão com solução de albumina bovina obtida pelo método BCA para a quantificação de proteína do biossurfactante.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da composição de aminoácidos indica a presença majoritária de ácido glutâmico (3.21 g/100g), ácido aspártico (2.33 g/100g), leucina (1.55 g/100g), lisina (1.53 g/100g), valina (1.25 g/100g), isoleucina (1.08 g/100g) e alanina (1.05 g/100g) (Figura 21).

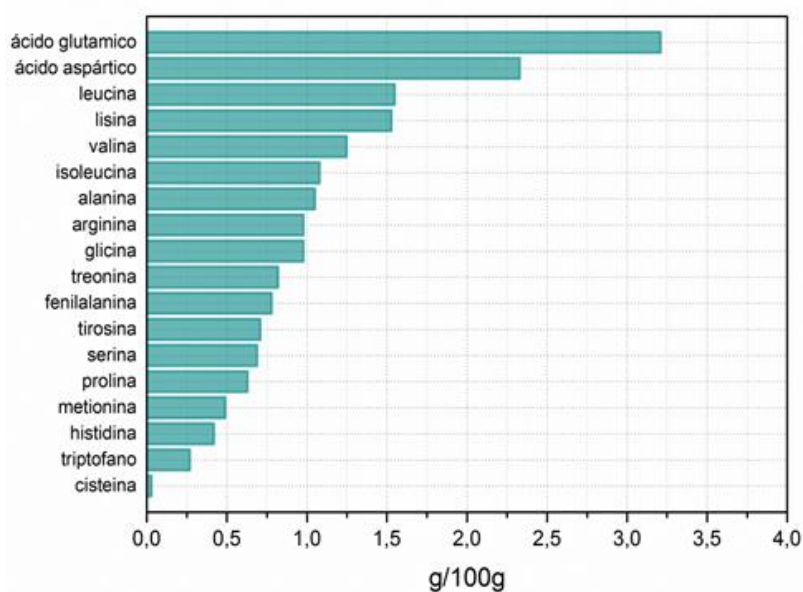


Figura 21 - Aminoácidos presentes na amostra BSSP60 determinada por hidrólise ácida e análise enzimática.

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados apresentados pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA)

Para calcular a proporção dos aminoácidos predominantes na amostra (fração BSSP60), é necessário dividir a massa (g/100g) pela massa molar do aminoácido, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Aminoácidos presentes em quantidades acima de 1g/100g na amostra BSSP60 e suas proporções relativas.

Amostra BS60	g/100g	Massa Molar	Proporção	Correspondência
Ácido glutâmico	3,21	129,116	0,024861	5
Ácido aspártico	2,33	115,089	0,020245	4
Leucina	1,55	113,16	0,013697	3
Lisina	1,53	128,17	0,011937	2
Valina	1,25	99,133	0,012609	2
Isoleucina	1,08	113,16	0,009544	2
Alanina	1,05	71,079	0,014772	3

Fonte: Elaborada pela autora a partir dos dados apresentados pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA).

Assim, a amostra BSSP60 possui a proporção de 5 Glu: 4 Asp: 3 Leu : 2 Lys : 2 Val : 2 Ile : 3 Ala. Porém, como BSSP60 apresentou grande variedade de aminoácidos em pequenas proporções, podemos indicar a baixa pureza dessa amostra. Essa proporção encontrada entre os aminoácidos também pode indicar que Ar70C7-2 pode produzir diferentes moléculas com diferentes cadeias peptídicas.

De acordo com Cochrane e Vederas,¹⁸⁸ já foram descritos na literatura mais de trinta tipos de surfactinas com diferentes resíduos de aminoácidos, associados a diferentes cadeias de ácidos graxos. Embora muitos compostos já tenham sido descritos, os aminoácidos presentes nas surfactinas são ácido glutâmico, leucina, isoleucina, valina, alanina e ácido aspártico. Para iturinas, os autores indicam a presença de asparagina, ácido aspártico, glutamina, prolina, serina, ácido glutâmico e treonina e, para as fengicinas, tirosina, treonina, serina, alanina, valina, leucina e isoleucina. Pode-se observar na Tabela 5 que os aminoácidos de maior recorrência na amostra analisada de BSSP60 são ácido glutâmico, ácido aspártico, leucina, lisina, valina, isoleucina e alanina composição muito semelhante à apresentada por surfactinas; também há a presença dos aminoácidos mais recorrentes em fengicinas, em menores ocorrências, porém, somente este resultado não é suficiente para se afirmar o tipo de lipopeptídeo presente na amostra testada.

A análise da esterificação de ácidos graxos da amostra BSSP60 apresentou um total de nove picos (Figura 22), correspondentes a cadeia de ácidos graxos que variaram de C₁₄ a C₁₇, com predominância de C₁₆ (Tabela 6). Este resultado sugere que a linhagem Ar70C7-2 é capaz de produzir uma mistura de lipopeptídeos com predominância de cadeia de ácido graxo simples. Porém, a presença dessas quatro cadeias de ácidos graxos não indica necessariamente 4 tipos diferentes de lipopeptídeos. Como a amostra não estava totalmente purificada, é possível que alguma das impurezas presentes na amostra contenha ácidos graxos em sua composição. Observa-se também que os picos 6-7 e 8-9 correspondem a hexadecanoato (palmitato) de etila e heptadecanoato de etila, respectivamente. Essa igualdade entre os picos (6 e 7 e 8 e 9) indica a possível presença de isômeros de cadeia, sendo um saturado e o outro ramificado, por isso aparecem como mesmo composto.

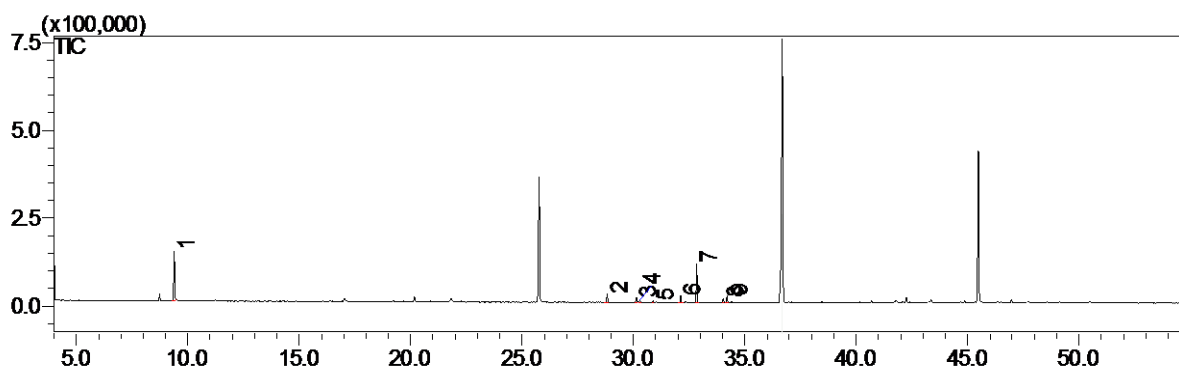


Figura 22 - Resultado obtido da cromatografia gasosa total da amostra de BSSP60 após etanólise.

Fonte: Elaborada pelo grupo de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos.

Tabela 6 - Compostos preditos pela análise cromatográfica de BSSP60.

Pico	(%) Relativa	(%) Similaridade	Composto
1	37,58	98	1-hexanol
2	7,84	90	Tetradecanoato de etila
3	3,78	93	Pentadecanoato de etila
4	1,92	-	Não Informado
5	1,34	-	Não Informado
6	6,91	94	Hexadecanoato de etila
7	31,28	93	Hexadecanoato de etila
8	3,08	93	Heptadecanoato de etila
9	0,96	89	Heptadecanoato de etila

Fonte: Adaptada a partir do resultado entregue pelo grupo de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos.

Uma amostra de BSSP60 foi purificada no sistema de cromatografia em fase líquida *Akta Purifier*; esse processo gerou diferentes alíquotas, denominadas BSPu, que foram, por sua vez, analisadas por espectrometria de massas. A surfactina foi escolhida como amostra-padrão para comparação dos picos espectrométricos (Figura 23), tendo em vista análise prévia da amostra BsPu realizada em equipamento MicroTof, que indicou padrão muito similar à surfactina (dado não

mostrado). A análise espectrométrica das alíquotas de BsPu mostrou que a linhagem Ar70C7-2 pode produzir diferentes isoformas pertencentes as três famílias: surfactina, iturina e fengicina. Para a identificação das isoformas, os íons m/z 1066, 1072, 1078, 1081, 1331, 1354, 1410, 1424, 1434, 1452, 1495, 1553 e 1623 foram observados e, dentre eles, 1066 (Figura 24) e 1081 (Figura 25) foram selecionados para serem fragmentados para uma possível identificação.

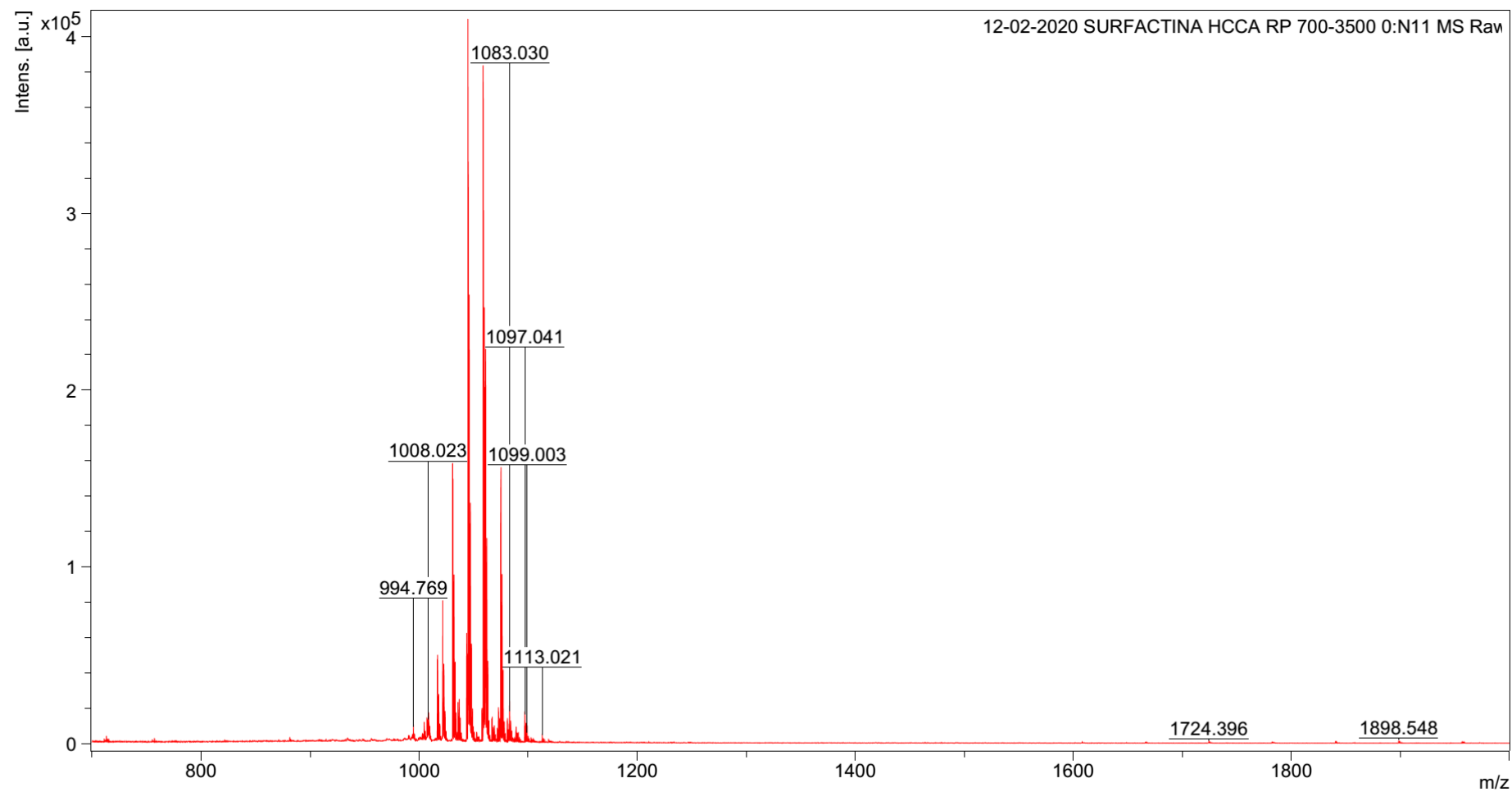


Figura 23 - Espectros de massas (MALDI/TOF) da surfactina comercial (Sigma-Aldrich) usada como padrão.

Fonte: Elaborada pela Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP)

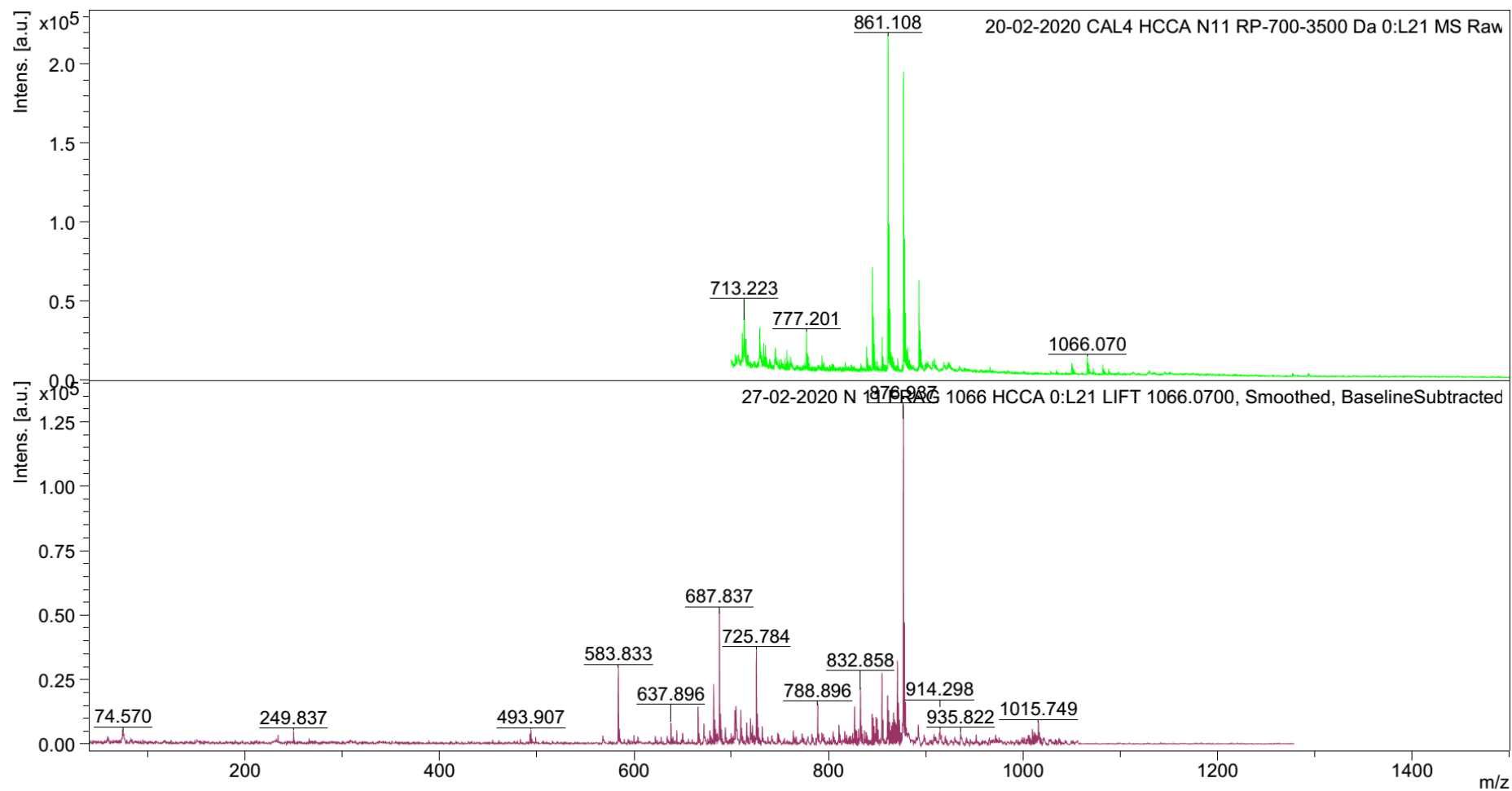


Figura 24 - Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema *Akta Purifier* de BSPu produzida por Ar70C7-2. (a) Amostra selecionada m/z 1066 e (b) fragmentação deste íon.

Fonte: Elaborada pela Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

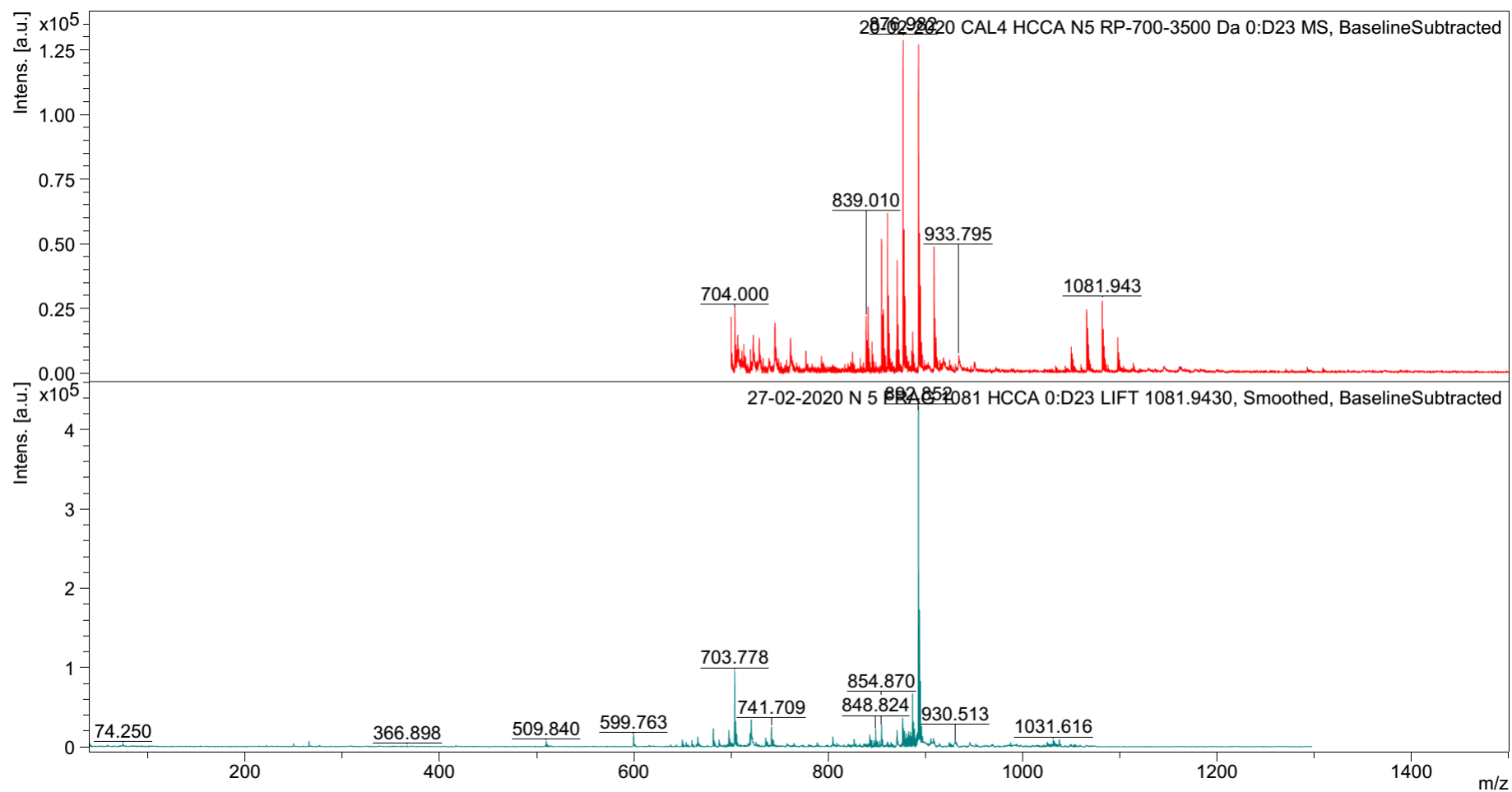


Figura 25 - Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema *Akta Purifier* de BSPu produzida por Ar70C7-2. (a) Amostra selecionada m/z 1081 e (b) fragmentação deste íon.

Fonte: Elaborada pela Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

O intervalo m/z 1065-1067 é identificado na literatura como um representante de possíveis adutos dos lipopeptídeos bacilomicina D,¹⁸⁹⁻¹⁹³ iturina A,^{36,78,190,194-196} micosubtilisina¹⁹⁶⁻¹⁹⁷ ou surfactina.^{36,197-199} No presente trabalho foram identificados dois padrões para a fragmentação do pico m/z 1066; no primeiro padrão de fragmentação, foram considerados os fragmentos 250, 493, 687, 725 e 935. Tomando como base a análise feita por Jemil e colaboradores,¹⁹⁷ para o fragmento m/z 337 por eles obtido, este representaria a cadeia de ácido graxo C₁₄-β hidroxila mais um ácido glutâmico (Glu); conseqüentemente, o homólogo C₁₇-β hidroxila (C₁₄-β hidroxila acrescida de três grupamentos -CH₂) corresponderia a m/z 250, valor equivalente ao fragmento 249,8, presente neste trabalho. Segundo os mesmos autores, o fragmento 493 corresponderia à cadeia C₁₇-β hidroxila-Glu-Leu; o fragmento 935 corresponderia à perda de uma Leu-H₂O; o fragmento 687 corresponderia à perda de C₁₇-β hidroxila-Glu e o 725, corresponderia à C₁₇-β hidroxil-Glu-Leu-Leu(H₂O)-Val. Assim, propomos uma representação estrutural linear possível para os fragmentos observados no presente trabalho, conforme mostrado na Figura 26. A partir deste perfil de fragmentação tem-se uma provável surfactina, contendo 17 átomos de carbono em sua cauda hidrofóbica e a sequência de aminoácidos Glu-Leu/Ile-Leu/Ile-Val-Asp-Leu/Ile-Val, mesma sequência observada por Jemil e colaboradores.¹⁹⁷

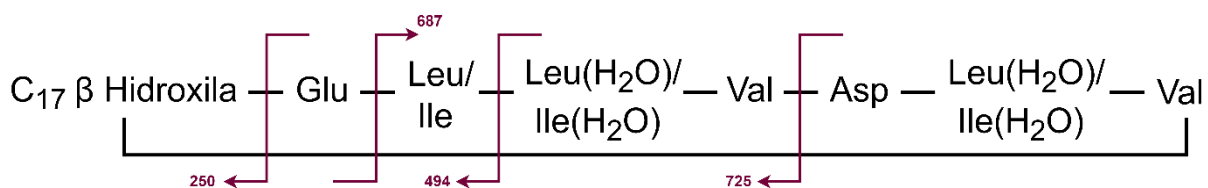


Figura 26 - Representação do primeiro padrão de íons observados na fragmentação de m/z 1066 da amostra BsPu, sugerindo ser uma surfactina C₁₇.

Fonte: Adaptada de JEMIL *et al.*¹⁹⁷.

O outro padrão de fragmentação do pico m/z 1066 identificado foi o com os íons 638, 832, 915 e 1015, esquematizado na Figura 27, onde m/z 1066 poderia ser considerado um aduto de sódio $[M+Na]^+$, com $[M]$ igual a 1043. Segundo Yu *et al.*²⁰⁰ e Yun-Fen *et al.*,¹⁹⁴ a iturina A₂, representada pelo íon 1043, é resultado da quebra da ligação peptídica entre Pro e Gln e possui a sequência Pro-Asn-Ser-βAA-Asn-

Tyr-Asn-Gln, com β AA sendo a cadeia hidrofílica. O fragmento 1015 representaria a perda do grupo -CO de Gln; 915 indicaria a perda desta Gln; 832, a perda de -Asn-Pro e 638, a perda de -Tyr-Asn-Gln. Assim, o íon m/z 1066 pode indicar a presença tanto de Iturina A₂, quanto surfactina-C₁₇.

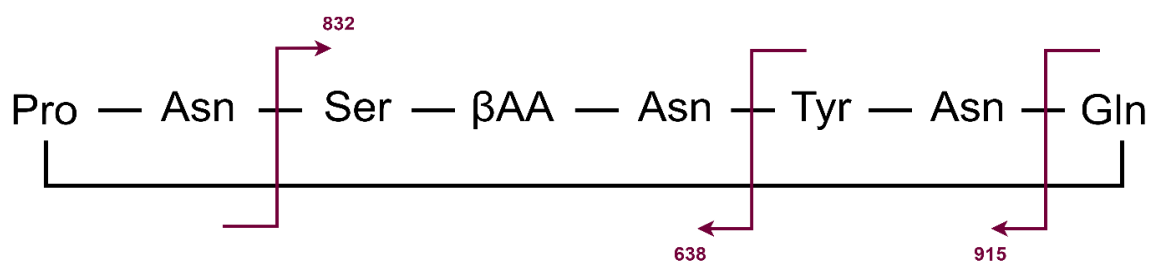
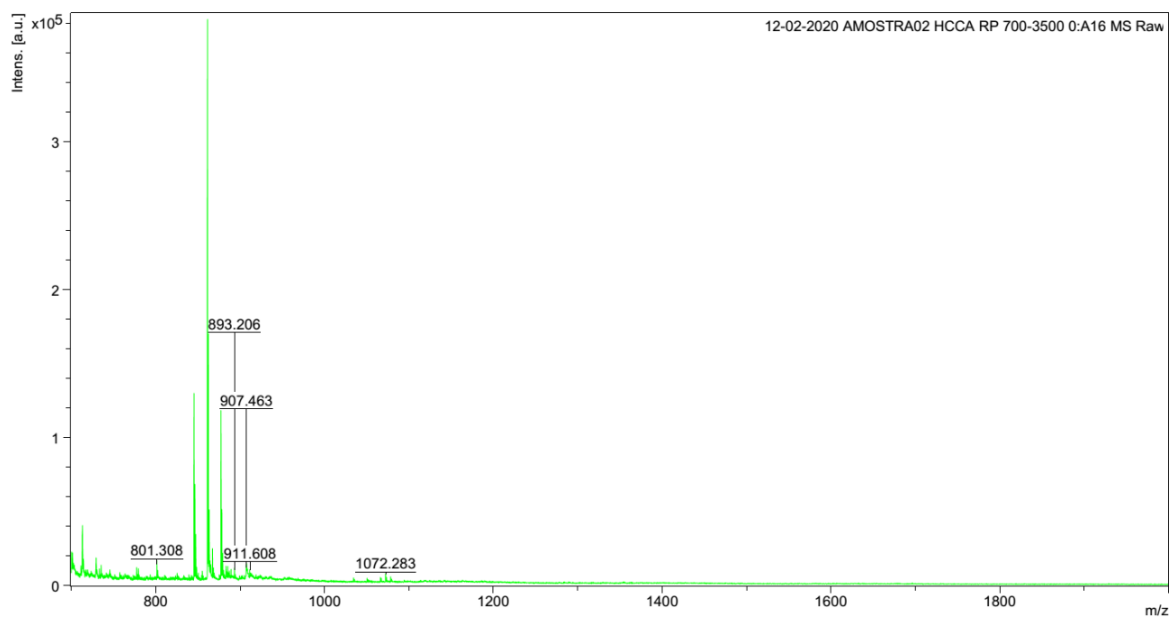


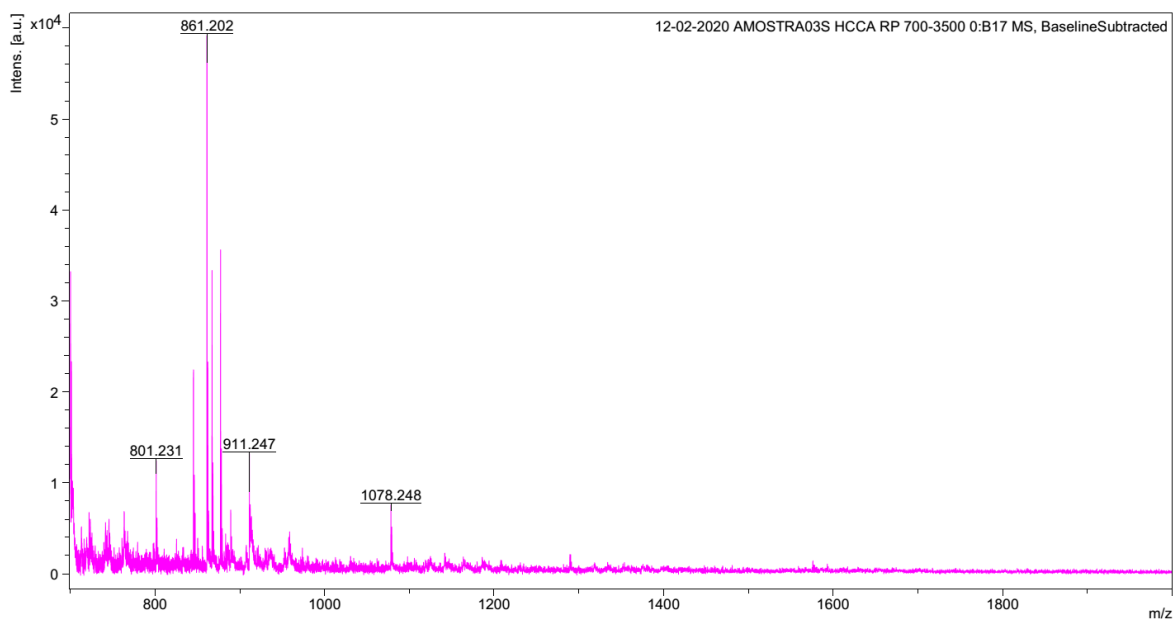
Figura 27 - Representação do segundo padrão de íons observados na fragmentação de m/z 1066 da amostra BsPu, sugerindo ser uma iturina A₂.

Fonte: Adaptada de YU *et al.*²⁰⁰ e YUN-FEN *et al.*¹⁹⁴

O íon 1072, observado na Figura 28a, é descrito na literatura como C₁₅₋₁₆-pumilacidina, C₁₆-surfactina, Iturina A, C₁₇-bacilomicina D^{36,189,192-193,195,199, 201-202} ou seus adutos de sódio. Paraszkievicz e colaboradores²⁰³ investigaram a produção de lipopeptídeo por seis linhagens de *B. subtilis*. A análise realizada por MALDI/TOF/TOF mostrou a produção de adutos de sódio para o cluster C₁₃₋₁₆-surfactina (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu), onde o íon 1072 foi identificado como [M+Na]⁺ de C₁₆-surfactina; já Jemil *et al.*,²⁰² identificaram 1072 como [M+Na]⁺ C_{15/16}-pumilacidina (Glu-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Leu/Val). A diferença entre ambas identificações está no quarto e no sétimo aminoácidos, além da composição da região hidrofóbica.



(a)



(b)

Figura 28 - Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema Akta Purifier de BSPu produzida por Ar70C7-2. (a) 1072 (b) 1078.

Fonte: Elaborada pela Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

Paraszkievicz e colaboradores²⁰³ também estudaram o íon 1078 (Figura 28b) que foi identificado como $[M+Na+H]^+$ de C₁₅-iturina A (Pro-Asn-Ser-βAA-Asn-Tyr-

Asn-Gln-CO⁺), assim como indicado também por Lin *et al.*⁷⁵ Pathak, Bose e Keharia²⁰⁴ caracterizaram a mistura de lipopeptídeos produzida por *Bacillus tequilensis* P15 e propuseram que o íon 1078 poderia representar seis novas surfactinas [M+H]⁺. Os autores sugeriram que estas surfactinas podem apresentar de 16 a 19 carbonos na cadeia hidrofóbica, com a sequência de aminoácidos -Glu-Leu/Ile-Leu/Ile-Leu/Ile/Val-Leu/Ile/Asp/OmetAsp-Asp/Leu/Ile-Val/Leu/Ile. Ainda nesse estudo, os pesquisadores indicaram que *B. tequilensis* P15 foi capaz de produzir um grande número de surfactinas, dentre elas, 30 novos tipos. Já Jemil e colaboradores¹⁹⁷ descreveram *m/z* 1078 como [M + H]⁺ de C₁₇-pumilacidina com Leu/Ile como sétimo aminoácido da sequência.

O íon 1081 é descrito na literatura como sendo possíveis adutos de sódio ou potássio de C₁₄-iturina A,^{36,78,195} C₁₆-surfactina^{192,205} e C₁₆-bacilomicina^{191,193,196-197} e também [M+2Na]⁺ de C₁₅-surfactina 1035.¹⁹⁹ No presente estudo, a fragmentação do íon 1081, mostrada na Figura 25, apresentou o padrão, 366, 703, 848, 930 e 1031, e, a partir dela, teve sua estrutura sugerida conforme esquematizado na Figura 29. Se considerarmos 1081 como um aduto de sódio, temos [M] 1058, onde o íon 1031 pode representar a perda do grupamento -CO por [M] e o fragmento 930,5 pode representar a perda de uma Val, em seguida. Seguindo o mesmo princípio adotado para 1066, temos que o fragmento 366 representa uma cadeia C₁₆-β hidroxila em conjunto a Glu (C₁₆-β hidroxila-Glu), o fragmento 848 representaria a perda da cadeia hidrofóbica por [M+Na]⁺ e, por fim, o fragmento 703 indicaria a perda de -Asp-Leu/Ile-Val pelo fragmento 1031.

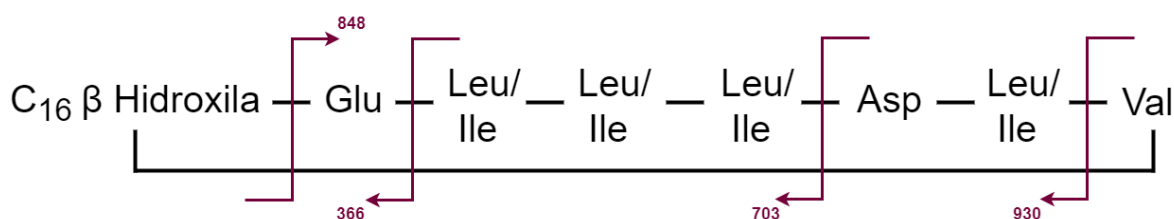


Figura 29 - Representação do padrão de íons observados na fragmentação de *m/z* 1081 da amostra BsPu, sugerindo ser uma pumilacidina C₁₆.

Fonte: Adaptada de JEMIL *et al.*¹⁹⁷

Também foram observados m/z na região de 1300-1630, Figura 30 e Figura 31, intervalos descritos por apresentar fengicinas.^{37,75,197,199,204-205} O íon 1080, valor muito próximo de 1081 (H^+), também está presente em espectros de fengicina A, identificado como um *fingerprint* de m/z 1435, 1449 e 1463 de $[M+H]^+$ para fengicina A,^{37,199,206-207} o mesmo ocorre com 1066.²⁰⁶ Bie e colaboradores,²⁰⁷ identificaram o íon 1434, produzido por *B. subtilis*, juntamente com diferentes homólogos de fengicina. Os picos 1435, 1449, 1463, 1477, 1491 e 1505 foram caracterizados pelos autores como os homólogos C_{14} a C_{19} de fengicina A, de sequência (Glu-Orn-Tyr-Tyr-Glu⁵-Ala⁶-Pro-Gln-Tyr-Ile), enquanto 1463, 1478, 1491 e 1505, homólogos C_{14} a C_{17} de fengicina B, que diferem da fengicina A em Gln⁵ e Val⁶. Entretanto, nenhum dos outros picos presentes nesta região, obtidos neste trabalho, foram encontrados na literatura. Os íons 1043(1066 -Na) e 1058(1081 -Na) e, em menores intensidades, 1066, 1072 e 1081, também estavam presentes no padrão surfactina (Sigma-Aldrich), o que reforça os resultados obtidos para 1066 e 1081.

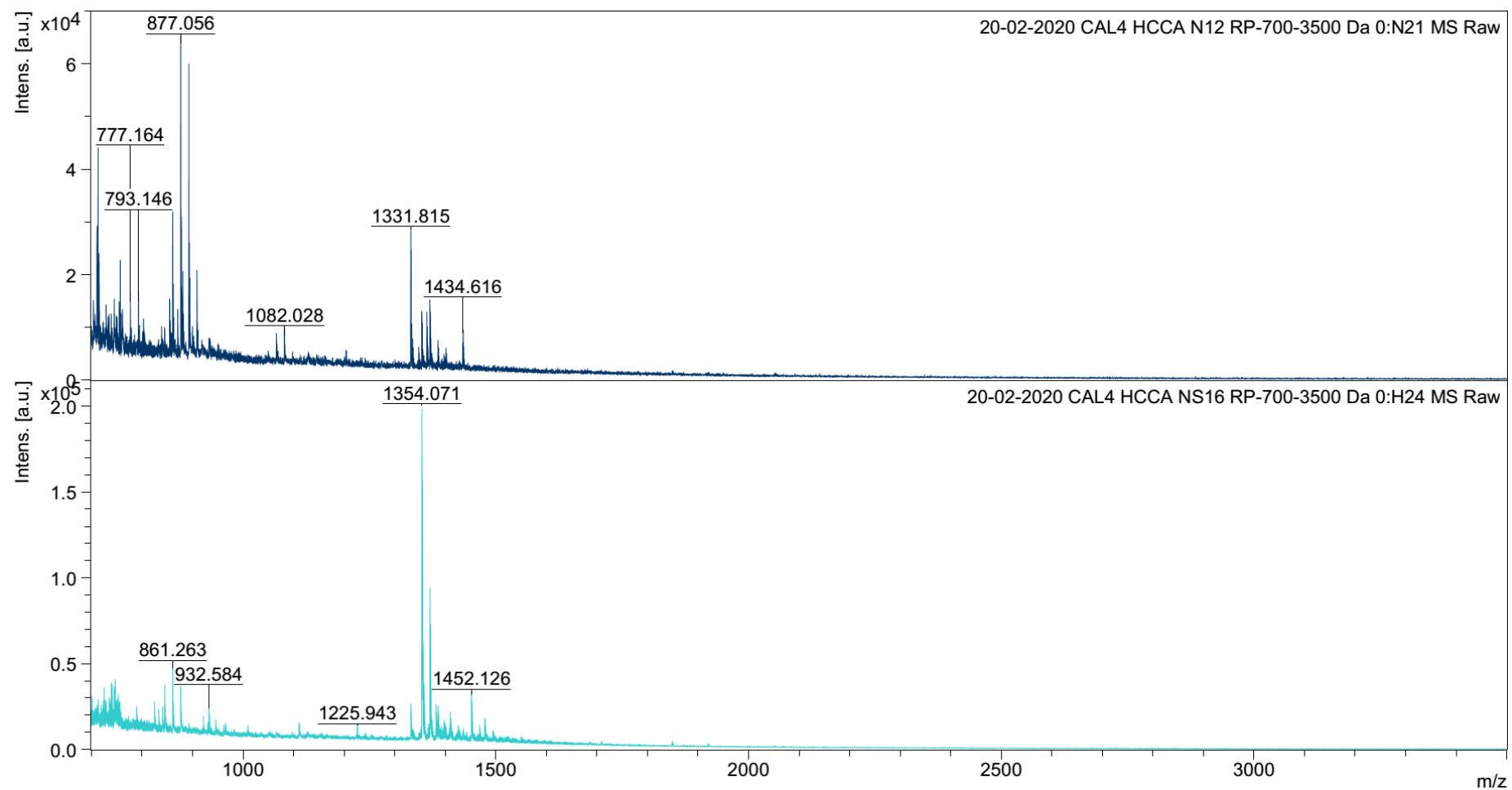


Figura 30 - Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema *Akta Purifier* de BSPu que demonstra a possível presença de fengicina.

Fonte: Elaborada pela Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

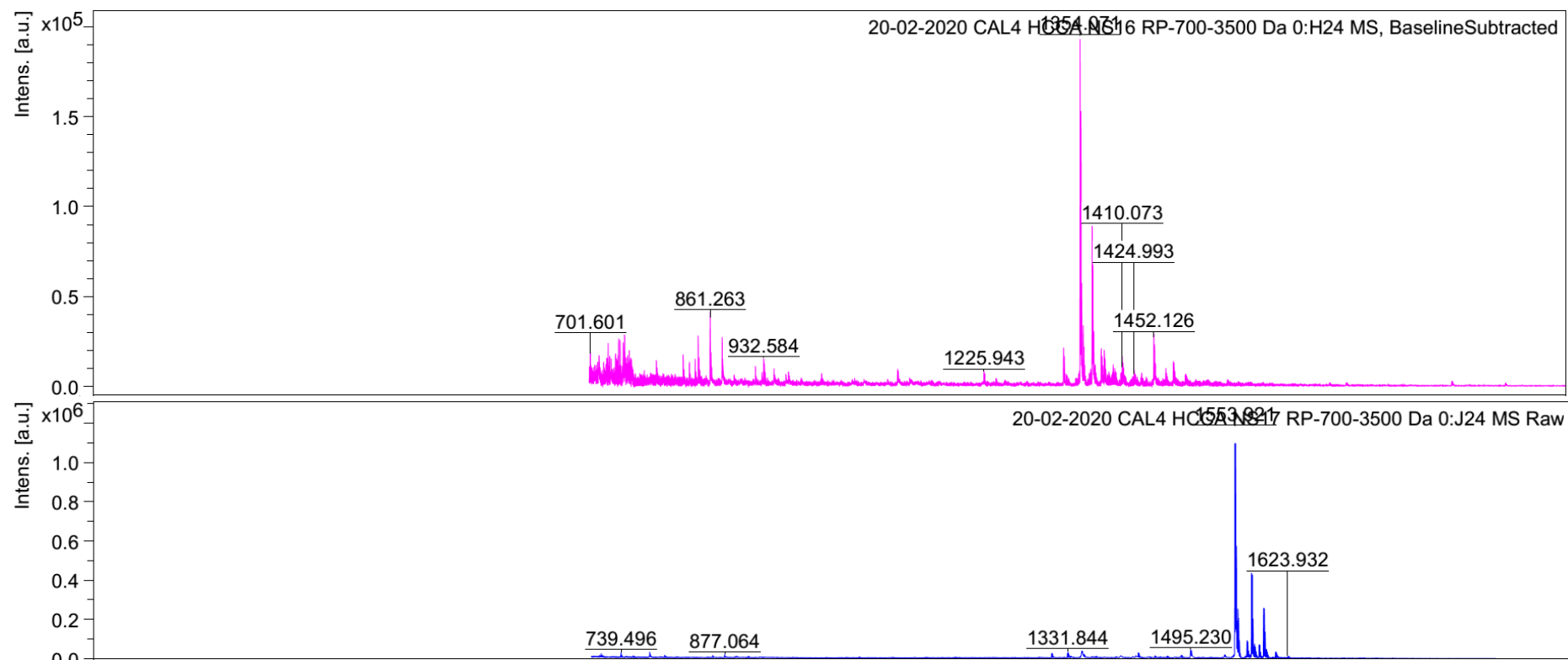


Figura 31 - Espectros de massas (MALDI/TOF) de uma das alíquotas retiradas do sistema *Akta Purifier* de BSPu que demonstra a possível presença de fengicina.

Fonte: Elaborada pela Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

Os aminoácidos de maior proporção obtidos pelo aminograma (ver Tabela 5) bem como o tamanho das cadeias de ácidos graxos (ver Tabela 6 encontrados na caracterização química realizada no presente trabalho foram condizentes com os resultados obtidos para os prováveis lipopeptídeos presentes nos picos observados nos espectros, se comparados com a literatura.^{17,34,188,208-209} Na Tabela 7, é apresentado um resumo dos lipopeptídeos correspondentes aos picos observados em conjunto com os compostos propostos para os picos 1066 e 1081. Além disso, deve-se levar em conta que os valores obtidos para ácido glutâmico e ácido aspártico devem ser analisados com ressalvas, já que, pela técnica da hidrólise, há conversão de glutamina (Gln) e asparagina (Asn) em ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp), respectivamente; assim, os valores obtidos para Glu e Asp, representam o conjunto Gln/Glu e Asn/Asp.²⁰² A partir da Tabela 7, observa-se que os aminoácidos Glu/Gln e Asp/Asn estão presentes em todos os lipopeptídeos, sendo os aminoácidos predominantes observados no resultado do aminograma, seguido de leucina, valina, isoleucina e alanina em menores quantidade, também presentes nos lipopeptídeos indicados na Tabela 7. A detecção de lisina (Lys) no aminograma pode ser indicativo da presença de impureza na amostra, já que este aminoácido não foi observado nos lipopeptídeos listados. Os aminoácidos glicina, alanina, serina, tirosina e histidina, indicados no gráfico da Figura 21, em conjunto com a presença do pico 877 em diversos espectros, podem ser indicativo da família das kurstakinas.^{76,202}

Ma *et al.*,²⁰⁹ caracterizaram os lipopeptídeos extraídos com metanol, produzidos por *B. megaterium* marinho. Através de espectrometria de massas os pesquisadores elucidaram as estruturas dos homólogos, onde dois tipos de fengicinas A e B lineares insaturadas foram caracterizadas pela primeira vez. Além disso, duas isoformas lineares e sete cíclicas de surfactina, dois tipos cíclicos de esperina e um análogo de iturina (bacilomicina D) também foram identificados. Vale ressaltar que os autores indicaram que este é o primeiro relato da identificação de mais de 40 variantes de lipopeptídeos produzidos por uma única cepa de *Bacillus*.

Sa e colaboradores²¹⁰ purificaram e caracterizaram homólogos de fengicina produzidos por *B. subtilis* (N6-34). A linhagem foi capaz de produzir treze homólogos de fengicina (A e B), sendo o primeiro relato de produção massiva de fengicina por *B. subtilis*. A análise por HPLC indicou a presença dos aminoácidos ácido glutâmico, ornitina, tirosina, treonina, valina, alanina, prolina e isoleucina com cadeias de ácido

graxo contendo C₁₄ a C₁₈ (fengicina A) e C₁₄ a C₁₇ (fengicina B), onde todos os treze homólogos apresentaram alta atividade antifúngica.

Já Guimarães e colaboradores,¹⁸⁵ estudaram a aplicabilidade da mistura de surfactinas produzidas por uma linhagem de *B. velezensis* nos processos de recuperação melhorada do petróleo. Os autores descrevem a mistura como sendo formada predominantemente por cinco homólogos de surfactina com ácidos graxos variando de C₁₁ a C₁₅, com C₁₄ sendo o mais abundante. Embora a cadeia de ácidos graxos fosse variável, a sequência de aminoácidos provou ser a mesma da encontrada na surfactina comercial (Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu).

Em resumo, no presente trabalho, o biosurfactante produzido pela linhagem Ar70C7-2 pode ser classificado como um lipopeptídeo, considerando os resultados do aminograma, da análise de ácidos graxos e dos espectros de massas realizados com as alíquotas de BSPu. Os espectros de massas indicam a presença de isoformas das famílias surfactina (*m/z* 1066, 1072, 1078 e 1081) e iturina (1066, 1072 e 1078), além de fengicinas (*m/z* 1331, 1354, 1410, 1424, 1434, 1452, 1495, 1553 e 1623).

Tabela 7 - Resumo dos aminoácidos presentes nos lipopeptídeos sugeridos para os picos observados em conjunto com o resultado obtido pelo aminograma.

Lipopeptídeo	Aminoácidos descritos e sua posição na sequência									
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A ₇	A ₈	A ₉	A ₁₀
Bacilomicina D ¹⁸⁹⁻ 193	Asn	Tyr	Asn	Pro	Glu	Ser	Tyr	-	-	-
Iturina A ^{36,78,194-} 196,200	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	-	-	-
Pumilacidina ^{34,197,202}	Glu	Leu Ile	Leu Ile	Leu Ile	Asp	Leu Ile	Leu Ile Val	-	-	-

(continua)

(continuação)

Surfactina ^{36,197-199,203}				Ala			Val			
	Glu	Val Leu	Leu	Val Leu Ile	Asp	Leu Ile	Leu Ile	-	-	-
Fengicina A ^{37,199,206-207}	Glu	Orn	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Pro	Gln	Tyr	Ile
Fengicina B ^{37,199,206-207}	Glu	Orn	Tyr	Tyr	Gln	Val	Pro	Gln	Tyr	Ile
Pico 1066	Glu	Leu Ile	Leu Ile	Val	Asp	Leu Ile	Val	-	-	-
	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	-	-	-
Pico 1081	Glu	Leu Ile	Leu Ile	Leu Ile	Asp	Leu Ile	Val	-	-	-
Aminoácidos de maior presença baseado nos resultados obtidos no aminograma	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	Ala			

Fonte: Elaborada pela autora com base nas referências indicadas na tabela, bem como nos resultados obtidos pelo aminograma e MALDI/TOF.

5.3 Eficácia da remoção de óleo de meio poroso pelo biossurfactante

A indisponibilidade dos hidrocarbonetos devido à sua baixa solubilidade e alta fixação em matrizes sólidas é um fator limitante na biorremediação de solos contaminados. O uso de surfactantes é uma forma de se aumentar a disponibilidade dos hidrocarbonetos para sua possível remoção através de biorremediação natural por microrganismos.²¹¹ Para se verificar a capacidade da aplicação do BS produzido por Ar70C7-2 em processos de biorremediação, foram realizados ensaios utilizando

meio poroso não consolidado, saturado com óleo de motor, cujos resultados podem ser observados na Figura 32. O biossurfactante (em solução a 0,1%) adicionado à areia encharcada de óleo, foi capaz de remover 29,6(\pm 3,04)% do óleo presente. A remoção obtida com o tergitol a 2% foi de 40,5(\pm 0,7)% e com a salmoura (NaCl a 5%), 2,4(\pm 0,3)%. A eficácia do tergitol foi cerca de 10% maior que a do biossurfactante, considerando que a concentração do primeiro foi 20 vezes maior que a do biossurfactante. Inicialmente, havia se optado pela utilização de uma solução de tergitol (0,01%) como controle positivo nesta análise, entretanto, a quantidade removida por esse surfactante químico, nesta condição, foi similar à remoção obtida pela salmoura. Assim, foram testadas outras concentrações de tergitol até que se obtivesse um valor de recuperação comparável ao valor obtido pela solução contendo BSSP60 (Figura 33).

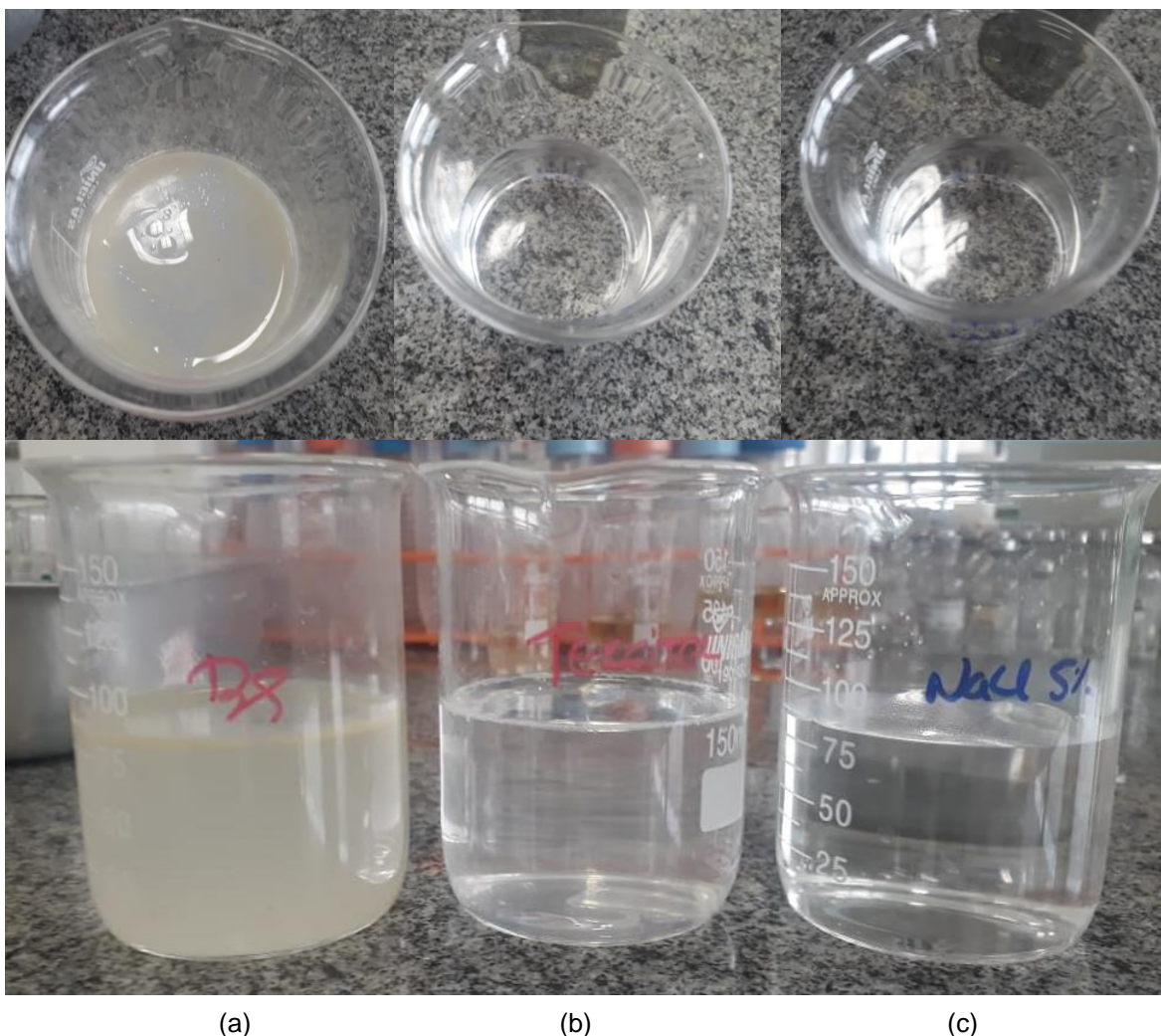


Figura 32 - Resultado obtido durante a extração do óleo com as soluções inicialmente selecionadas; (a) biossurfactante 0,1%; (b) Tergitol 0,01% e (c) salmoura com 5% de NaCl. Na parte superior da imagem, observa-se os frascos vistos de cima.

Fonte: Elaborada pela autora.

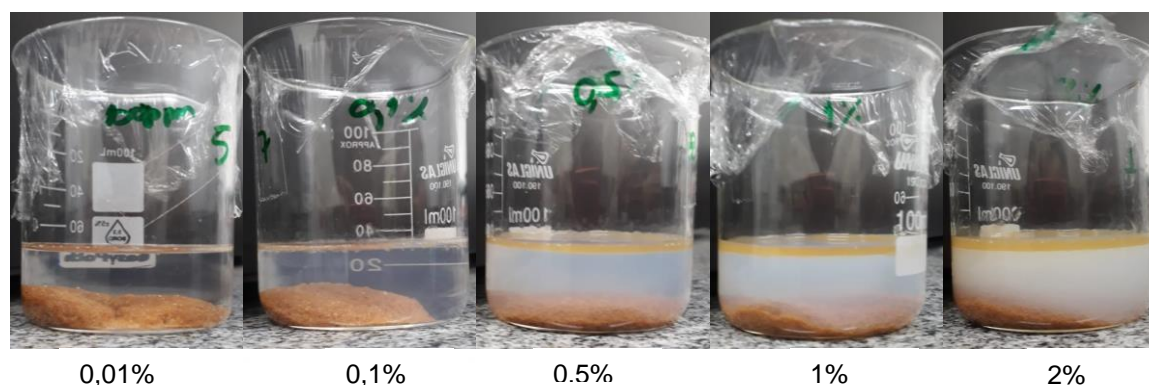


Figura 33 - Extração do óleo presente no meio poroso por diferentes concentrações de tergitol. A partir da concentração de 0,5%, observa-se a formação de uma película de óleo no topo da coluna líquida.

Fonte: Elaborado pela autora.

Antes da realização desse ensaio, determinou-se as tensões superficiais das soluções utilizadas, bem como as tensões interfaciais das mesmas em relação ao óleo usado na preparação do meio poroso. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 - Medidas de tensão superficial e interfacial das soluções usadas no ensaio de remoção de óleo. As medidas de tensão interfacial foram realizadas com óleo de motor 10W40.

Solução	Tensão superficial (mN/m)	Tensão interfacial (10W40) (mN/m)
Salmoura – NaCl 5%	72,615 ± 0,004	22,4 ± 0,2
BSSP60 0,1%	37,594 ± 0,105	5,7 ± 0,4
Tergitol 100 ppm	27,046 ± 0,014	13,5 ± 0,2

Fonte: Elaborada pela autora.

Hentati e colaboradores¹⁴ estudaram o uso da mistura de surfactina e pumilacidina produzida por *B. stratosphericus* FLU5 na limpeza de solo contaminado com óleo de motor. Foram testados tanto o sobrenadante livre de células quanto o BS bruto na sua CMC (0,025%) e, para comparação, foram usados os surfactantes

químicos Tween 20, Tween 80, Triton X-100 e SDS, todos em suas CMCs. De acordo com a análise estatística feita pelos autores, o efeito da solubilização do óleo foi mais acentuado ao se usar o sobrenadante livre de células se comparado com a solução contendo o BS bruto e os surfactantes sintéticos testados. Não houve diferença significativa na remoção do óleo de motor usando a solução de BS bruto, Triton x-100 e Tween 20, porém, a solução de BS bruto foi mais eficaz na remoção do óleo, se comparado com Tween 80 e SDS.

Ashish e Debnath,²¹² usaram uma surfactina produzida por *Candida tropicalis* para verificar sua capacidade de remoção de óleo de motor de solo contaminado. A remoção do óleo pelo BS foi medida após a incubação do lipopeptídeo com o solo contaminado por 24h a 37°C e 100 rpm. O resultado positivo para a extração do óleo se deu pela descoloração da areia, registrando-se um valor de AOR (remoção adicional de óleo após encharque com BS) de cerca de 40%. Silva *et al.*,²¹³ no estudo de remoção de óleo de motor da areia empregando o biossurfactante produzido por *P. aeruginosa*, obteve o melhor resultado em frascos contendo o sobrenadante livre de células, com 80-100% de remoção do óleo. Para concentrações de metade da CMC do BS bruto, a eficácia de remoção ficou entre 45-65%. Já Durval, Rufino e Sarubbo,¹⁰¹ analisaram a remoção do óleo de motor de amostra de areia a partir de diferentes soluções do BS produzido por *B. cereus*. As concentrações testadas foram: BS bruto, $\frac{1}{2}$ CMC, CMC e $2 \times$ CMC. Nas soluções em que o BS estava abaixo da CMC, BS bruto e $\frac{1}{2}$ CMC, o aumento da remoção, se comparado com o controle, foi de, aproximadamente, 25 e 35%. Já para CMC e $2 \times$ CMC, os resultados ficaram acima de 70%, comparado ao controle.

Dois mecanismos de remoção de contaminantes hidrofóbicos de solo a partir do uso de tensoativos são descritos na literatura.²¹³⁻²¹⁴ O primeiro ocorre em concentrações abaixo da CMC no qual os surfactantes aumentam o ângulo de contato entre o solo e os contaminantes hidrofóbicos, ocorrendo a separação entre ambos. O segundo mecanismo, conhecido como solubilização, ocorre acima da CMC, onde o contaminante é alocado no centro das micelas dos surfactantes, o que facilitaria sua remoção. No presente este estudo, o biossurfactante produzido por Ar70C7-2 mostrou-se capaz de remover uma quantidade significativa do óleo de motor que estava impregnado na areia. Embora os resultados obtidos tenham ficado abaixo do controle testado, foi necessária uma quantidade 20 vezes maior de surfactante químico para haver uma remoção 10% maior. A amostra semi-purificada

do BS foi testada somente acima de sua CMC, assim, a remoção poderá se beneficiar do uso de uma amostra mais pura e da combinação de soluções com diferentes concentrações de BS, uma abaixo da CMC para facilitar no desprendimento do óleo da areia contaminada e, em seguida, uma solução acima da CMC para se englobar o óleo desprendido.

5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do biossurfactante

5.4.1 Avaliação da atividade antifúngica

O biossurfactante semipurificado apresentou atividade de inibição sobre o crescimento de hifas contra oito linhagens dos fungos fitopatogênicos testados; alguns dos resultados podem ser vistos na Figura 34. Não houve diferença entre o padrão de crescimento do micélio na presença ou ausência de rifampicina em nenhum dos ensaios realizados. Uma completa inibição do crescimento de hifas promovida pelo BS foi observada nas culturas de *Moniliophthora perniciosa* (Figura 34a), *Phytophthora sojae* (Figura 34b) e *Lasiodiplodia eufhorbicola* (Figura 34c), e uma inibição parcial em *Ceratocystis paradoxa* (Figura 34d), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus microsporus*, *Aspegillus flavus* (ATCC 16883) e *Aspegillus niger* (ATCC 10535) (dados apresentados no apêndice).

Nos ensaios para avaliação do efeito do BS sobre a germinação de esporos foram observadas algumas pequenas zonas de inibição nos cultivos em meio sólido inoculados com esporos em solução. Essas zonas de inibição foram constatadas após 5 dias de incubação, nas linhagens *Sclerotinia sclerotiorum* (Figura 35a), *Moniliophthora perniciosa* (Figura 35b), *Ceratocystis paradoxa* (Figura 35c) e *Rhizopus microsporus* (Figura 35d). A adição de rifampicina não modificou o padrão de crescimento das linhagens testadas.

Alguns lipopeptídeos produzidos pelo gênero *Bacillus* apresentam atividade antifúngica, em especial, aqueles pertencentes às famílias das fengicinas, iturinas e surfactinas, tornando os biossurfactantes uma alternativa ambientalmente mais amigável aos fungicidas sintético.²¹⁵⁻²¹⁷ Diferentes estudos demonstraram o alto potencial do gênero *Bacillus* como biocontrole de fungos fitopatogênicos.^{23,135,218-220} Zhou e colaboradores²²⁰ isolaram diferentes linhagens de bactérias a partir de amostras de sedimento do fundo do mar. Uma das linhagens de alta identidade com

B. velezensis e *B. amyloliquefaciens*, ambas com 99,78% de similaridade, demonstrou capacidade inibitória contra diversos fungos fitopatogênicos, incluindo *Magnaporthe grisea*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum fioriniae* e *Alternaria alternata*. Os biossurfactantes que mostraram atividade foram identificados como dois homólogos pertencentes à família das iturinas.

Wang *et al.*²¹⁷ estudaram a atividade antifúngica dos lipopeptídeos produzidos por *B. megaterium* WL-3 contra *Phytophthora infestans*, oomiceto causador da requeima da batata. Os lipopeptídeos que apresentaram atividade foram caracterizados como pertencentes às famílias iturina A e Fengicina A. O experimento foi realizado em estufa e em campo, com soluções de iturina (I), fengicina (F), a mistura I+F, células livres de *B. megaterium* e o sobrenadante livre de células bacterianas. Os controles positivos e negativos foram Metalaxil e água estéril, respectivamente. Os autores notaram que os iturina A e fengicina A, se usados em conjunto, foram mais eficazes do que se usados de forma individual e que o uso do próprio bacilo já era suficiente para promover a inibição do crescimento de *P. infestans*, *in vitro*. Os autores indicaram que *B. megaterium* WL-3 e seus lipopeptídeos são candidatos potenciais para o controle da requeima e promoção do crescimento da batata.

Serrano *et al.*²²¹ isolaram 251 linhagens de bactérias endofíticas a partir de árvores de cacau saudáveis, que foram testadas quanto ao potencial de inibir o crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* e *Moniliophthora roreri*. Sete linhagens pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentaram atividade antifúngica importante, sendo uma delas selecionadas para estudos da atividade antagonista de seu biossurfactante, que mostrou efeito pronunciado na inibição do crescimento das duas espécies fúngicas, com deformação aparente em suas hifas. Já Li *et al.*²⁰ realizaram um estudo com os biossurfactantes produzidos *B. velezensis*, que se mostraram capazes de inibir o crescimento de 10 linhagens de fungos, dentre elas *Candida albicans*, *Cochliobolus carbonum*, *Cryptococcus neoformans*, *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Monilinia fructicola*, e *Rhizoctonia solani*.

A linhagem Ar70C7-2 apresentou maior atividade na inibição do crescimento das hifas, se comparada com o efeito inibitório na propagação dos esporos. Todas as linhagens que apresentaram sensibilidade no teste com os esporos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Ceratocystis paradoxa* e *Rhizopus*

microsporus), também mostraram ser suscetíveis a propagação das hifas. O resultado sugere a capacidade de biocontrole de Ar70C7-2, em condições *in vitro*, e indica que o tensoativo produzido por essa linhagem pode ser utilizado como alternativa ecológica para se prevenir a infecção causada por fungos fitopatogênicos.

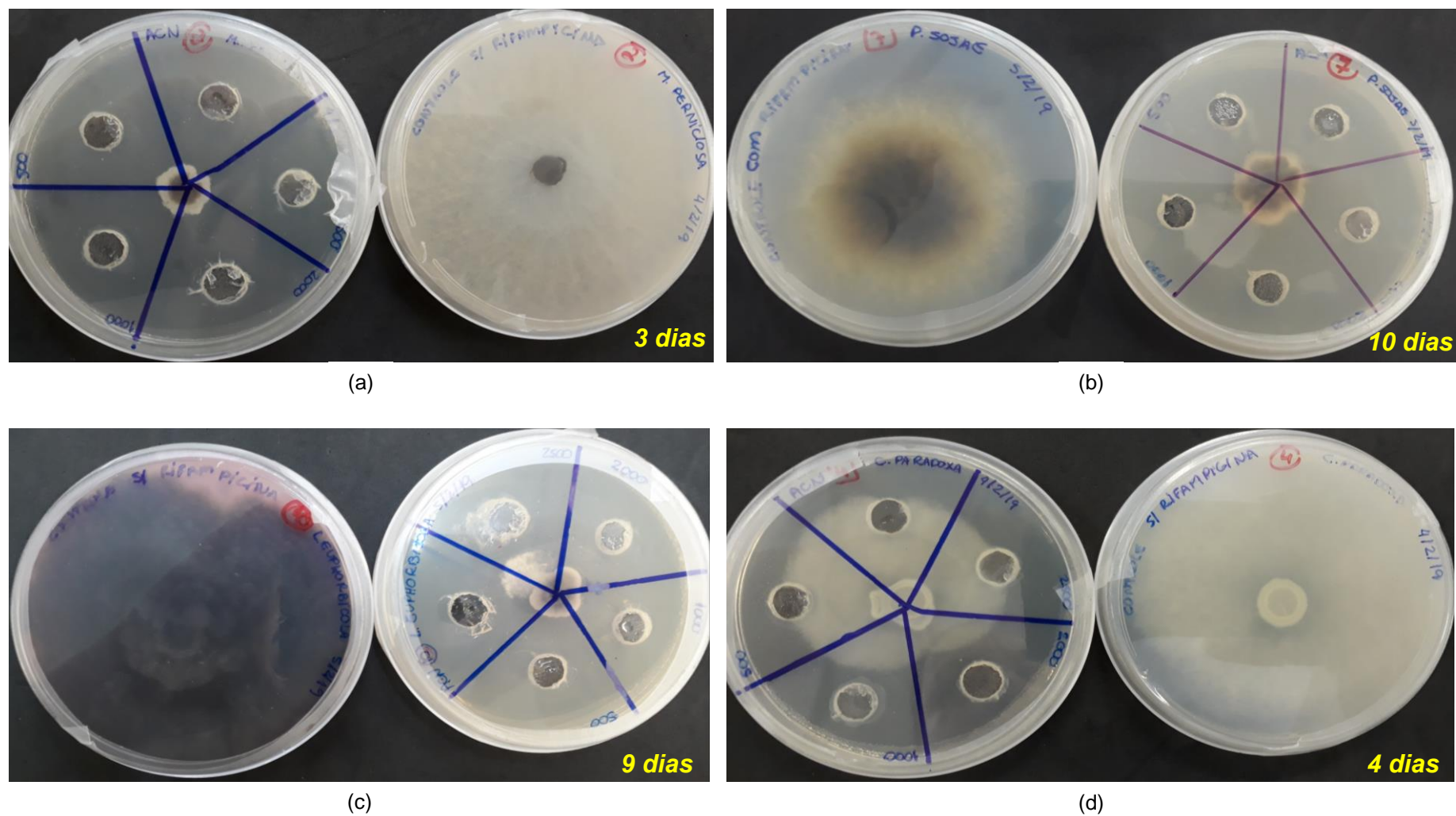


Figura 34 - Ensaio de inibição de micélio expostos a diferentes concentrações de BSSP60 (placas com poços) em culturas de (a) *Moniliophthora perniciosa*, (b) *Phytophthora sojae*, (c) *Lasidiplodia euphorbicola* e (d) *Ceratocystis paradoxa*. Ao lado de cada placa-teste, está a placa controle (placa com ausência de poços) sem rifampicina (a, c, d) e com rifampicina (b).

Fonte: Elaborada pela autora.

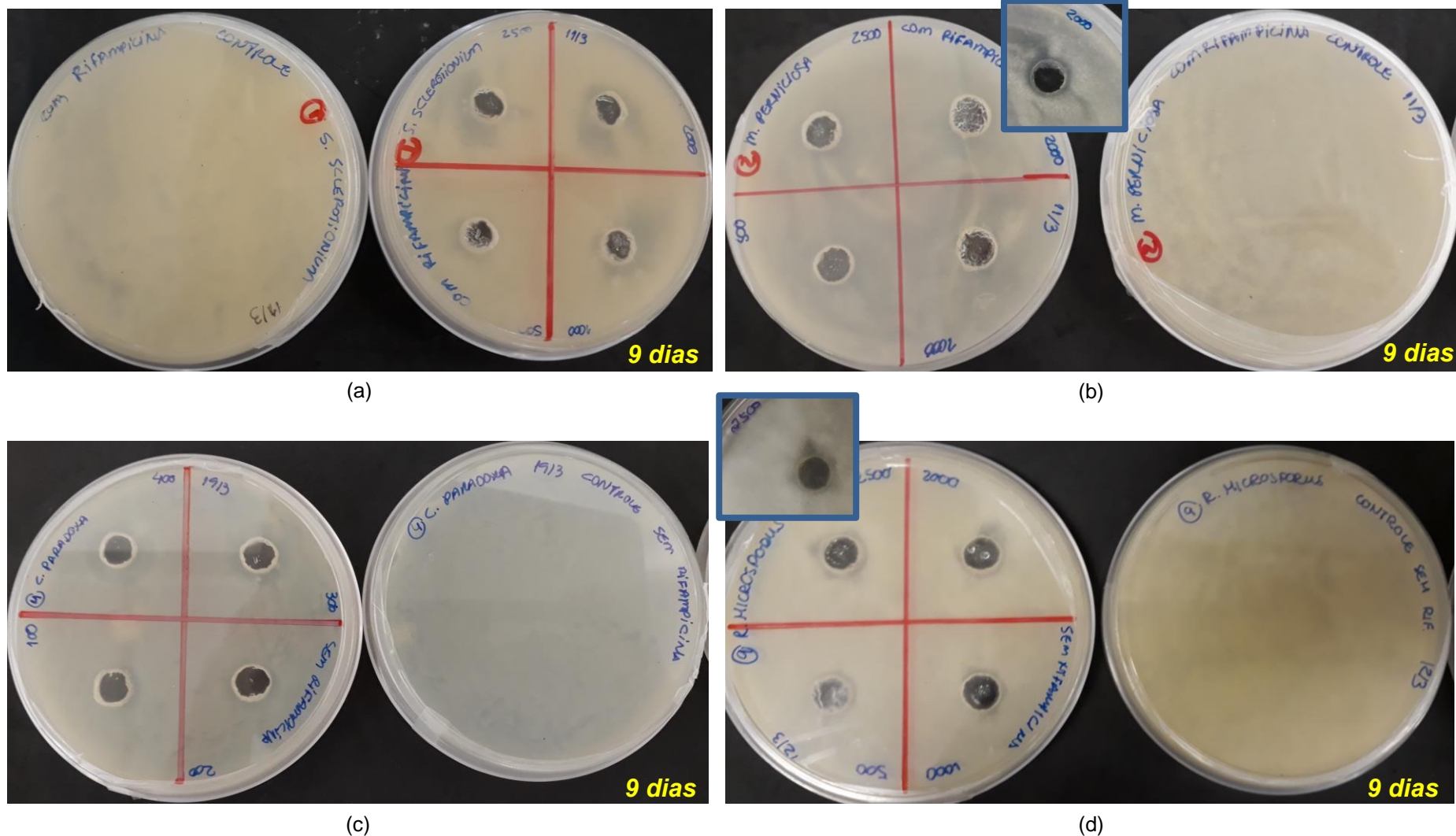


Figura 35 - Ensaio de inibição do crescimento de esporos após 5 dias de cultivo em (a) *Sclerotinia sclerotiorum*, (b) *Moniliophthora perniciosa*, (c) *Ceratocystis paradoxa* e (d) *Rhizopus microsporus*. Ao lado de cada placa-teste, está a placa controle (placa com ausência de poços) com rifampicina (a, b) e sem rifampicina (c, d).

Fonte: Elaborada pela autora.

5.4.2 Avaliação da atividade antibacteriana

Os lipopeptídeos são descritos na literatura como compostos que apresentam grande atividade contra uma ampla gama de bactérias, incluindo patógenos resistentes à meticilina.^{19,222-224} A atividade dos lipopeptídeos depende de sua concentração e ocorre pela sua capacidade em desestabilizar as estruturas e funções de membranas biológicas, acarretando no aumento de sua permeabilidade.²²⁵

Os ensaios por disco difusão mostraram uma inibição discreta contra as linhagens *S. epidermidis* 35984 Figura 36(a), *P. fluorescens* 13525 Figura 36(b), *B. subtilis* 6633 Figura 36(c) e *B. subtilis* 21332 Figura 36(d). Embora exista uma possível inibição, os halos apresentados são muito pequenos, dando margem a interpretações errôneas. Assim, foi realizado um teste de inibição pelo método de microdiluição para a avaliação da possível atividade bacteriostática ou bactericida.

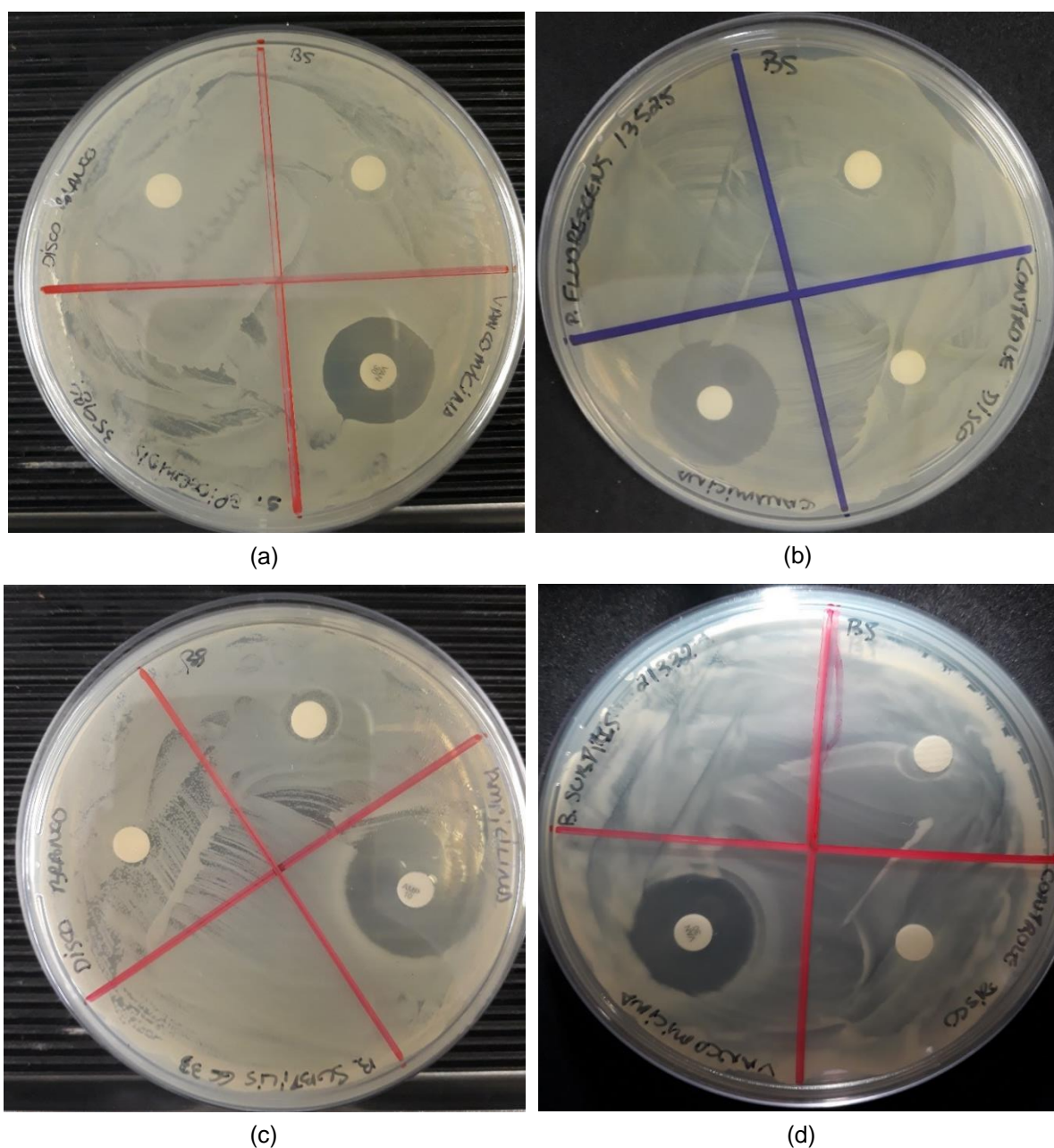


Figura 36 - Resultado do teste de disco-difusão para a confirmação da sensibilidade das bactérias testadas ao biossurfactante produzido por Ar70C7-2. (a) *S. epidermidis* 35984, (b) *P. fluorescens* 13525, (c) *B. subtilis* 6633 e (d) *B. subtilis* 21332.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os testes de microdiluição mostraram que, na presença do biossurfactante semipurificado, houve uma inibição inicial significativa no crescimento dos microrganismos *B. subtilis* 6633 (Figura 37), *S. epidermidis* 12228 (Figura 41) e *S. epidermidis* 35984 (Figura 42) e moderada em *P. fluorescens* 13525 (Figura 40) se

comparados ao controle. Já para *E. coli* 25922 (Figura 39) e *B. subtilis* 21332 (Figura 38) não foi observada diferença no crescimento em nenhuma das concentrações de BS utilizadas. As interferências no crescimento ocorreram a partir das concentrações de 1.500 µg/mL para *S. epidermidis* 35984 e *B. subtilis* 6633, 2.000 µg/mL para *S. epidermidis* 12228 e 750 µg/mL para *P. fluorescens* 13525. Para confirmar a inibição parcial ou total no crescimento das bactérias testadas, o BS deverá ser testado em sua forma mais pura.

Bouassida e colaboradores²²⁶ investigaram a ação antimicrobiana da adição de um biossurfactante à composição de pasta dental. Os autores utilizaram uma formulação base contendo diferentes combinações naturais e a ela adicionaram tanto SDS quanto o BS produzido pela linhagem *B. subtilis* SPB1, além de usarem a formulação base e também uma pasta dental comercial. Para o experimento, foram selecionadas as linhagens *E. coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (29212), *Enterobacter* sp., *Listeria monocytogenes* (ATCC 43251), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella entérica* (ATCC 43972), *Salmonella typhimurium* (ATCC 19430) e *Micrococcus luteus* (ATCC 4698). A formulação contendo BS se mostrou eficaz contra *Enterobacter* sp. e *S. typhimurium*, com pequena zona de inibição para *L. monocytogenes*. Além disso, a formulação contendo BS se mostrou mais eficaz do que a pasta comercial e do que o SDS contra *L. monocytogenes*, *K. pneumoniae* e *S. typhimurium*.

Bernat *et al.*²²⁵ estudaram a atividade de inibição da mistura de iturina A e fengicina produzida por duas linhagens de *B. subtilis*, com destaque para uma linhagem isolada de uma refinaria de óleo na Polônia. Os lipopeptídeos foram testados contra dez linhagens uropatogênicas pertencentes a seis espécies - *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* e *E. faecalis* -, todas isoladas de biofilmes formados em cateteres urinários. Os testes incluíram a inibição da formação de biofilmes em superfícies abióticas, o ensaio por microdiluição e a difusão em ágar. Todas as bactérias testadas apresentaram sensibilidade à mistura de lipopeptídeos, com halos de inibição entre 5-19 mm, redução na absorvância das culturas de até 92% e inibição média de 80% da formação de biofilmes. Os autores concluíram que a mistura produzida de iturina e fengicina possuiu alta atividade nas formas tanto planctônicas quanto sésseis dos uropatógenos testados, sugerindo potencial aplicação médica desses lipopetídeos produzidos.

Apesar do BSSP60 não ter apresentado atividade bactericida nos testes realizado no presente trabalho, observou-se um atraso considerável no crescimento inicial de algumas das linhagens testadas, bem como um menor rendimento celular (baseado nas medidas de DO), resultados esses que podem ser amplificados com o aumento da pureza da amostra. Valores de concentração acima de 2.500 µg/mL não foram testados pois este era o limite de dissolução de BSSP60, o que também pode ser favorecido com o aumento da pureza da amostra.

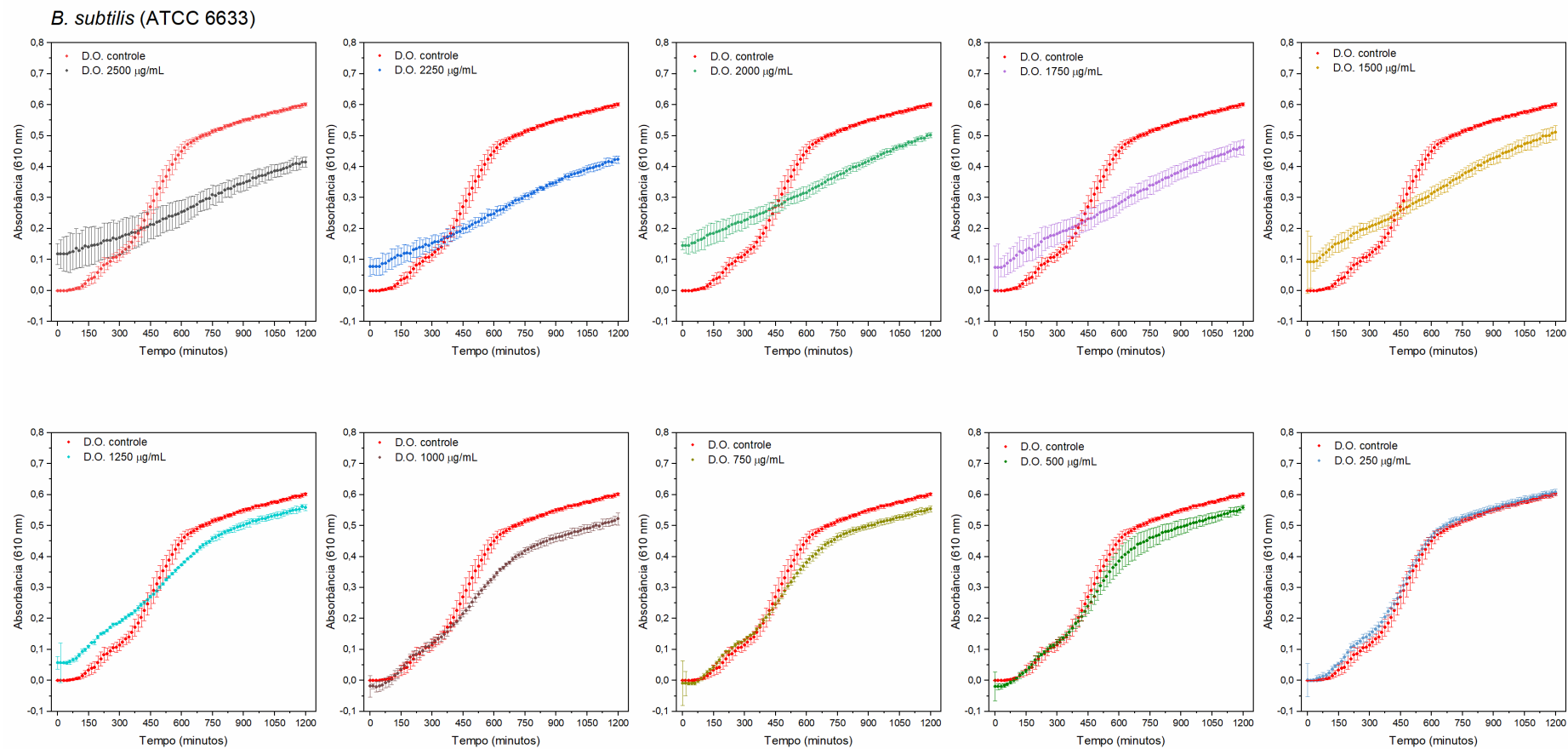


Figura 37 - Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra *B. subtilis* 6633.

Fonte: Elaborada pela autora.

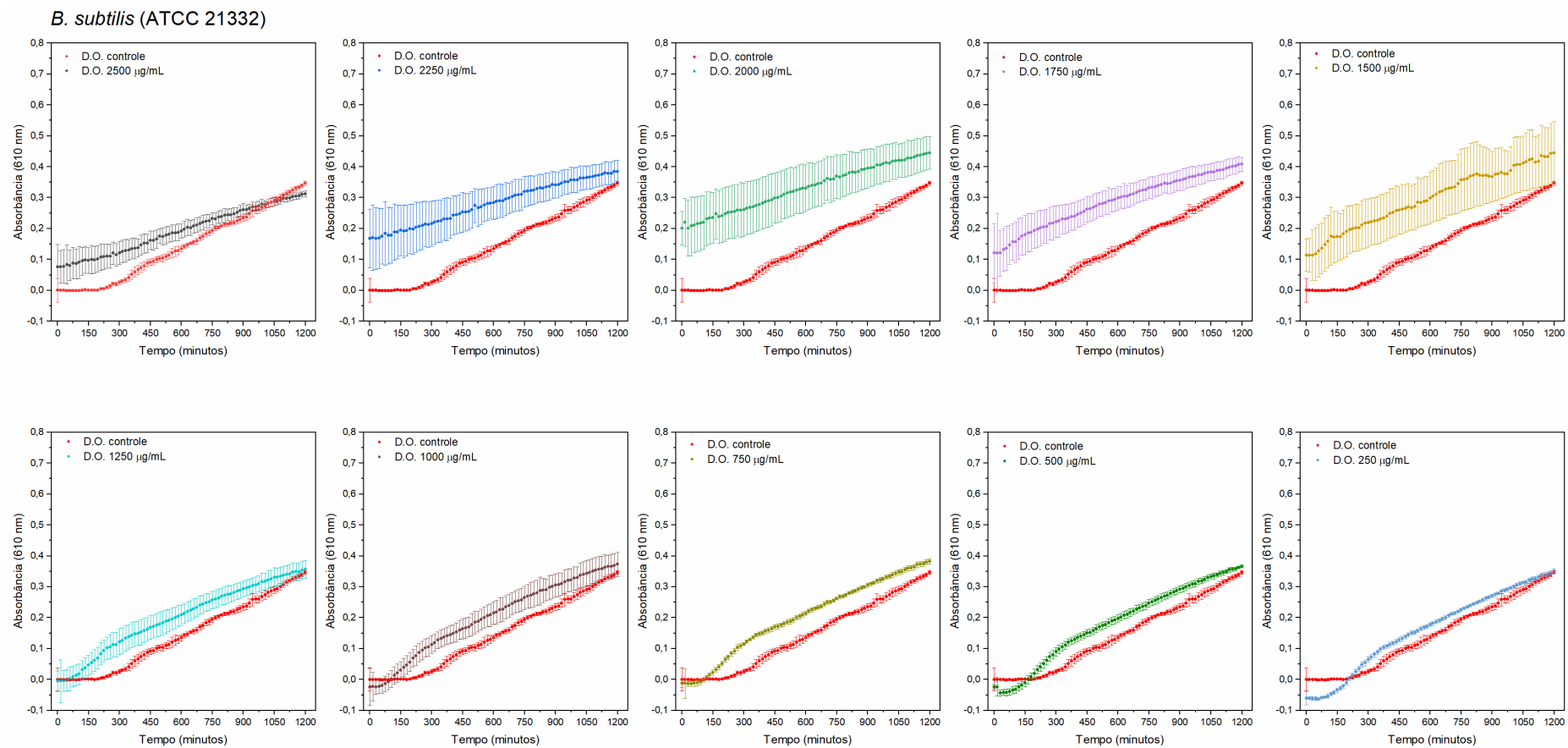


Figura 38 - Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra *B. subtilis* 21332.

Fonte: Elaborada pela autora.

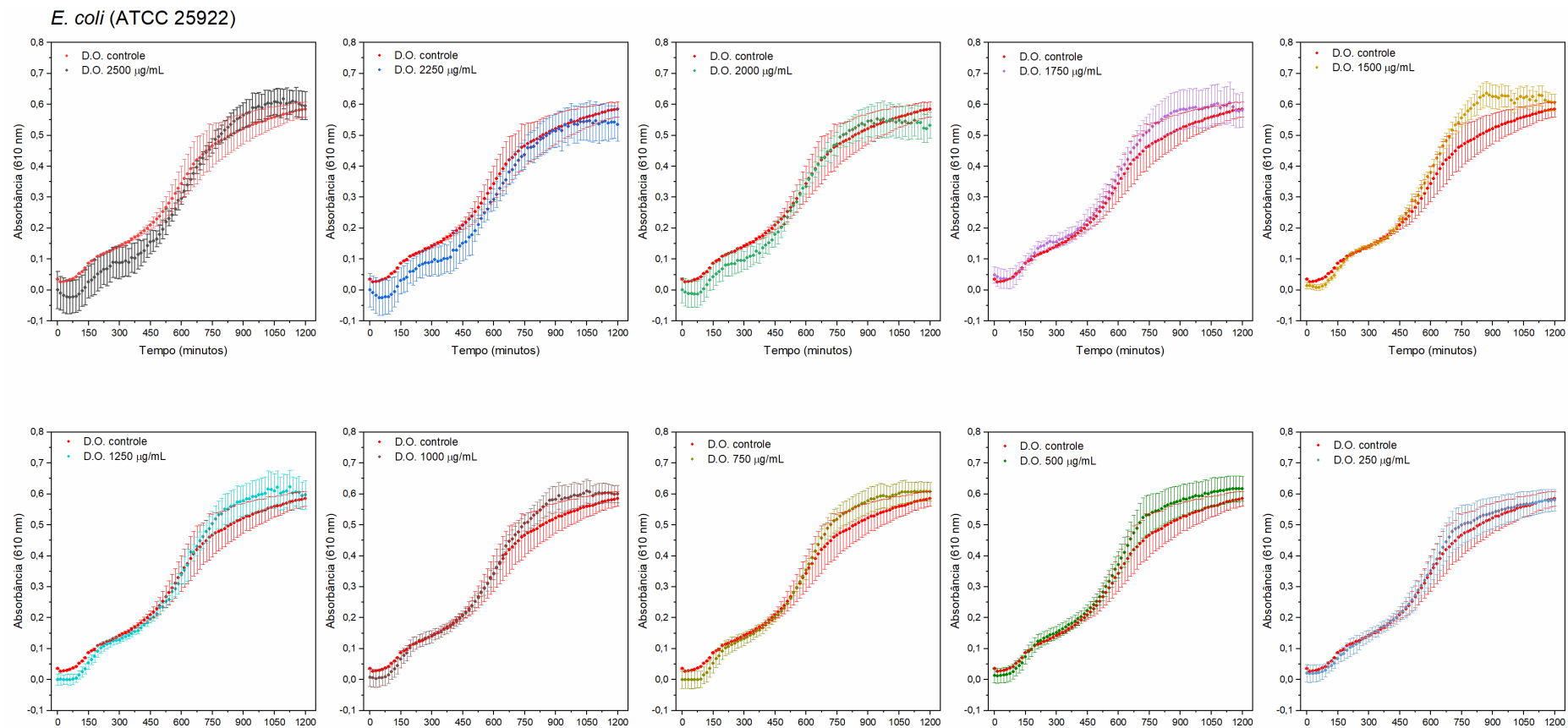


Figura 39 - Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra *E. coli* 25922.

Fonte: Elaborada pela autora.

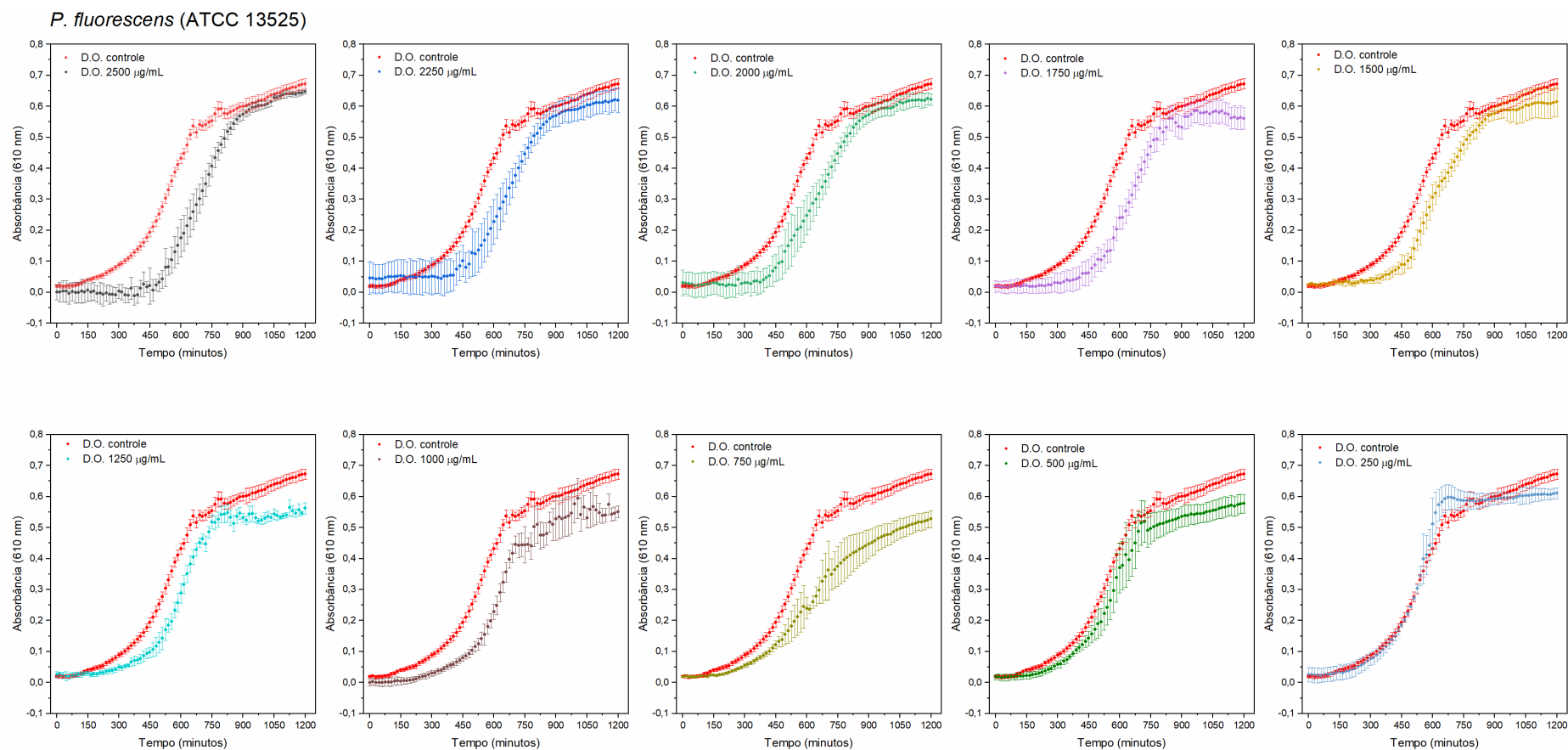


Figura 40 - Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra *P. fluorescens* 13525.

Fonte: Elaborada pela autora.

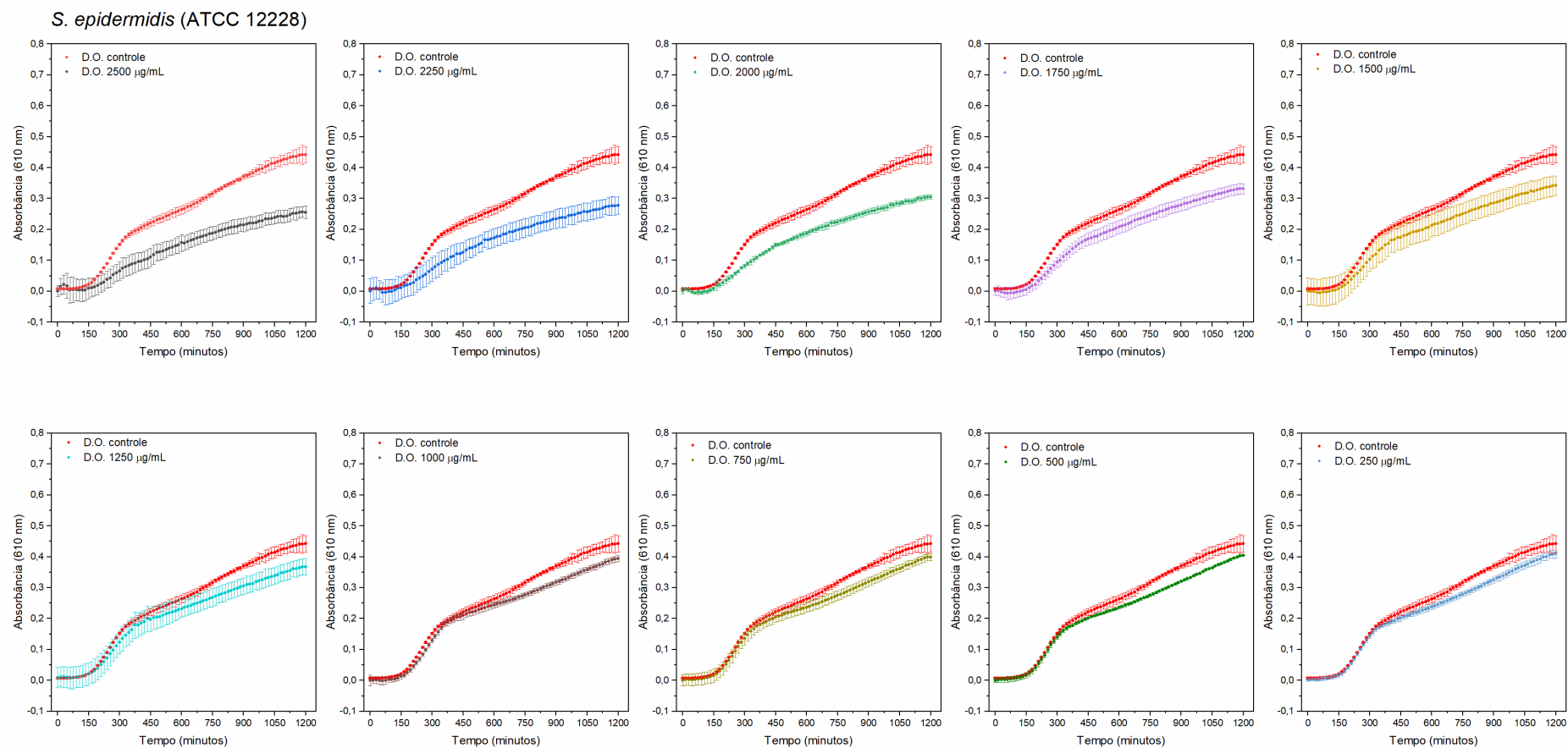


Figura 41 - Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biosurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra *S. epidermidis* 12228.

Fonte: Elaborada pela autora.

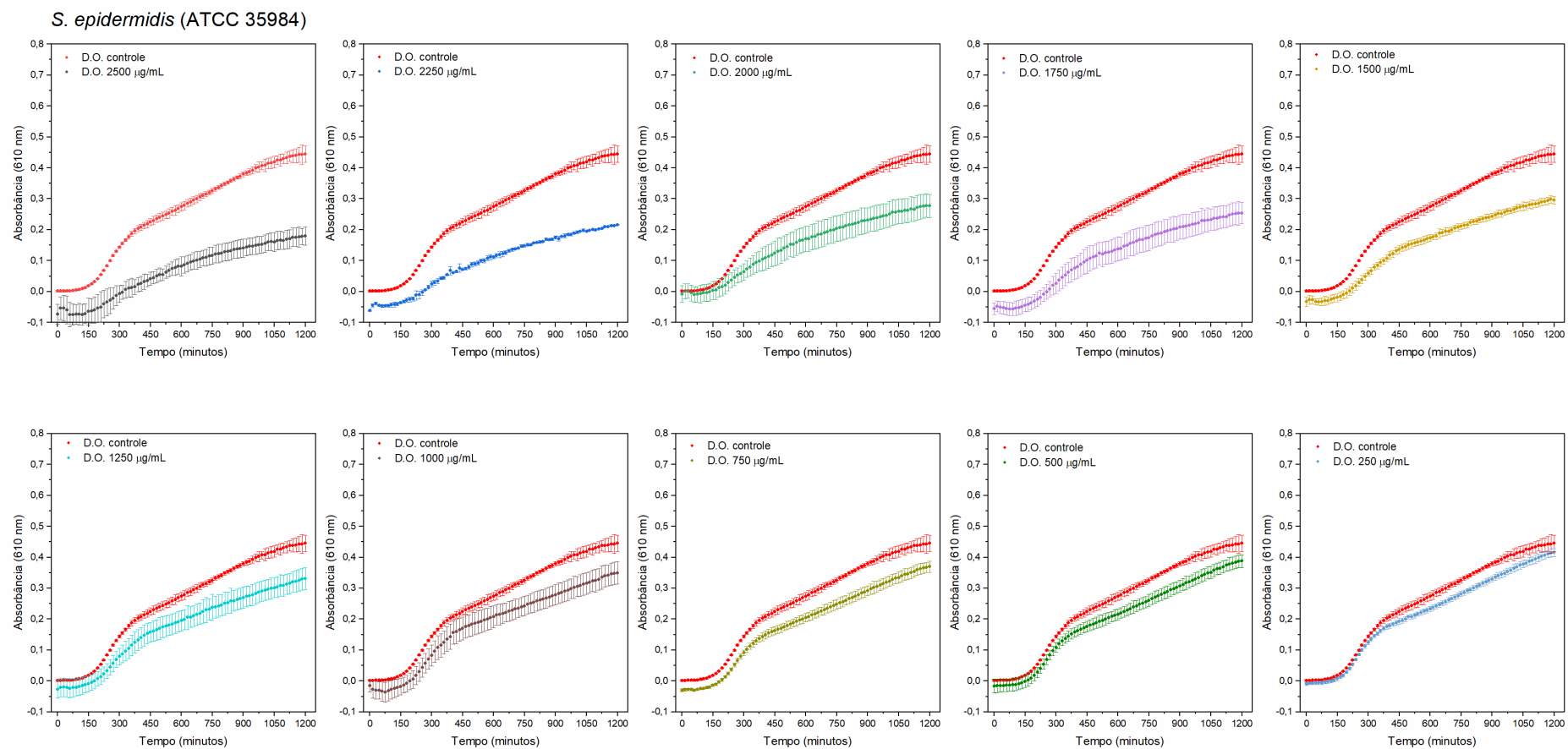


Figura 42 - Resultados do teste de microdiluição em caldo para avaliação da ação antimicrobiana do biossurfactante semi-purificado em diferentes concentrações contra *S. epidermidis* 35984.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os biossurfactantes rompem a membrana celular, causam vazamento de conteúdo celular ou aumentam a pressão osmótica dentro da célula.²²⁷ Além da atividade contra fungos e bactérias aeróbicas, os biossurfactantes também tiveram seus efeitos relatados sobre bactérias redutoras de sulfato (BRS).^{94,228} Essas bactérias, que estão presentes nos reservatório de petróleo, são capazes de reduzir o sulfato em sulfeto, que, por sua vez, passa a se acumular nesses reservatórios, causando o processo de acidificação biogênica e biocorrosão em reservatórios de petróleo.^{94,229-230} De acordo com Korenblum *et al.*,⁹⁴ a inibição desse grupo de bactérias geralmente é realizada com o uso de biocidas, como sais de amônio quaternário que, por sua vez, possuem alto custo e alto impacto ambiental. Assim, a busca por alternativas para se evitar ou limitar o acúmulo de sulfetos em reservatório, bem como se identificar novas substâncias antimicrobianas ativas contra BRS é de extrema importância.

O ensaio para avaliação da atividade antibacteriana do BS contra BRS foi dividido em duas etapas. Na primeira, foram testadas as concentrações de 500, 1.000, 1.500 e 2.000 µg/mL do BS produzido por Ar70C7-2 para verificar a sensibilidade de *Desulfovibrio marinus* ao mesmo. O teste foi realizado em triplicata por 5 dias e o resultado é apresentado na Tabela 9.

Não houve crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações de BS testadas, no período de 24h iniciais, considerando que, no controle, já havia a presença de precipitados pretos no frasco, indicando um crescimento inicial da *D. marinus* (o precipitado preto é resultado da reação entre o sulfeto produzido e o ferro presente no meio). Após 48h, observou-se crescimento em ao menos uma das réplicas em todas as concentrações testadas. Em seguida, a partir de 96h, o crescimento em todas as concentrações de BS testadas foram similares ao crescimento do controle. Esse atraso no escurecimento do meio pode indicar que o BS inibe um crescimento inicial da BRS; entretanto, nenhuma das concentrações usadas foram capazes de inibir por completo o crescimento da bactéria no período testado. Pode-se observar também, na Tabela 9, que uma das réplicas em ambas concentrações de 1.000 e 2.000 µg/mL não apresentou crescimento. Somente a ausência de crescimento em uma das réplicas não é suficiente para indicar a total inibição, principalmente porque houve crescimento na concentração intermediária (1.500 µg/mL) e nas outras duas réplicas. Essa discrepância entre as réplicas pode ser explicada pela diferença na quantidade de células presentes no inóculo. Outra

consideração a ser feita para a interpretação dos resultados deste ensaio é o tempo de cultivo estipulado para se determinar a CIM (concentração mínima inibitória). Esta é dada como a menor concentração de um composto que impede o crescimento visível após incubação,¹³⁹ para este estudo, foi selecionado o período de 48h para a observação dos cultivos em anaerobiose.²³¹ Os resultados mostram que o biossurfactante apresenta um valor de MIC acima de 2.000 µg/mL pois há discrepância entre as réplicas a partir de 48h.¹³⁷ Porém, como *D. marinus* apresenta um crescimento mais lento, se comparado a alguns microrganismos aeróbios, sendo necessário até 5 dias para se observar o máximo escurecimento do meio, esse prazo de 5 dias foi escolhido para se fazer o acompanhamento do crescimento do microrganismo durante os testes.

Tabela 9 - Resultado obtido para o teste de atividade contra *D. marinus*. Onde: (-) indica ausência de crescimento e (+), (++) e (+++) indicam os níveis progressivos de crescimento, como demonstrado na Figura 43. T1, T2 e T3 indicam as réplicas.

Tempo (h)	Controle			500 µg/ml			1000 µg/ml			1500 µg/ml			2000 µg/ml		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
24	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+++	+	++	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-
72	+++	+	++	+	+	+	+	-	+	++	++	-	++	++	-
96	+++	++	+++	++	++	+	++	-	++	+++	++	+	+++	+++	-
120	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	-

Fonte: Elaborada pela autora.

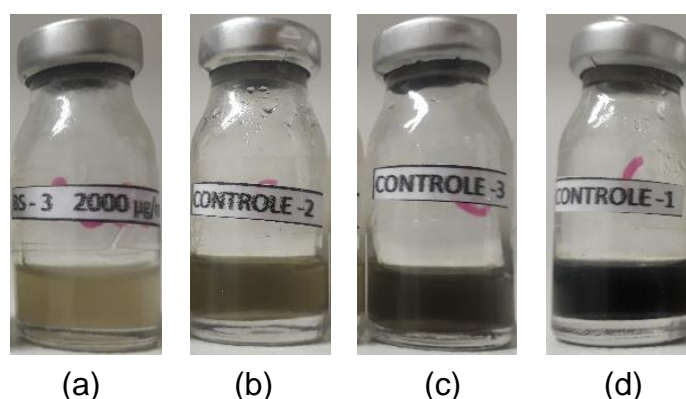


Figura 43 - Imagem representativa dos níveis de crescimento utilizado para a confecção da Tabela 9, onde (a) mostra ausência de crescimento (-) e (b), (c) e (d), níveis progressivos de crescimento, respectivamente (+), (++) (+++).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do resultado apresentado na Tabela 9, foi realizado um novo teste de atividade antimicrobiana, com as concentrações de 2.250 e 2.500 µg/mL, em triplicata por 5 dias. Para os tempos 48h e 120h, os frascos que não apresentaram crescimento foram usados para inocular um frasco contendo 30 mL de meio Postgate B; esta etapa foi realizada para a diferenciação da atividade do BS entre bactericida e bacteriostática. Os resultados são apresentados nas Tabela 10 e 11.

Tabela 10 - Resultado obtido para o teste de atividade contra *D. marinus*. Onde: (-) indica ausência de crescimento, (+), (++) e (+++) indicam os níveis progressivos de crescimento, como demonstrado na Figura 43 e (*) frascos utilizados como inóculo. T1, T2 e T3 indicam as tréplicas.

Tempo (h)	Controle			2.250 µg/ml			2.500 µg/ml		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
24	+	++	+++	-	-	+	-	-	-
48	+	+++	+++	- (*)	- (*)	++	- (*)	- (*)	- (*)
72	++	+++	+++	-	-	+++	-	-	-
96	+++	+++	+++	-	-	+++	-	-	-
120	+++	+++	+++	- (*)	- (*)	+++	- (*)	- (*)	- (*)

Fonte: Elaborada pela autora.

Não foram observados crescimento nos frascos na concentração de 2.500 µg/mL durante este experimento, já para a concentração de 2.250 µg/mL, somente uma das réplicas apresentou crescimento que foi notado a partir de 24h. Esse resultado se opõe aos resultados apresentados na Tabela 9, onde não ocorreu crescimento nas 24h iniciais do teste em nenhum dos frascos que continham BS. Essa discrepância dos resultados pode ter ocorrido durando a confecção do meio, onde pode ter havido a transferência incorreta da quantidade necessária de biossurfactante ou durante a adição do inóculo.

Após o período selecionado (48h e 120h), dos frascos que não apresentaram crescimento, T1 e T2 de 2.250 µg/mL e T1, T2 e T3 2.500 µg/mL, identificados com (*) na Tabela 10, foram coletadas alíquotas para serem inoculadas em novos frascos contendo meio Postgate B sem adição de biossurfactante. Essa segunda etapa do teste foi realizada para se observar se a ação do BS ocorreria de forma bacteriostática ou bactericida. Um composto bacteriostático é aquele cuja ação limita a multiplicação dos microrganismos, sem que haja aumento em número de células, porém, não ocorre a morte celular, como se verifica em compostos bactericidas.²³²

A partir dos dados apresentados na Tabela 11, tem-se que, para os cultivos inoculados com material proveniente das amostras que continham 2.250 µg/mL de BS, foi possível constatar a presença de precipitado preto nos frascos, após 5 dias. Ou seja, embora o crescimento tenha ocorrido de forma mais lenta, ele ainda existiu, o que pode indicar que, na presença de 2.250 µg/mL de BS o biossurfactante se comportaria de forma bacteriostática. Resultado similar ao apresentado nos cultivos inoculados com material proveniente das amostras de 48h que continham 2.500 µg/mL de BS. Porém, esse fato não ocorreu naquelas amostras de 120h. Assim, foi observado que, quando o biossurfactante produzido por Ar70C7-2 permanece em contato com *D. marinus* por 120h, sua ação pode ser bactericida. O BS usado pode causar a morte celular pois as células de *D. marinus*, após 120h em contato com o biossurfactante, não foram capazes de apresentar crescimento em um meio novo, mesmo se mantidas por 5 dias em estufa, prazo suficiente para se haver grande propagação das células, como indicado pelos controles nas Tabela 9 e Tabela 10.

Tabela 11 - Resultado do crescimento dos frascos usados no teste de atividade após 5 dias. Onde: (-) indica ausência de crescimento, (+), (++) e (+++) indicam os níveis progressivos de crescimento, como demonstrado na Figura 43 e (*) frascos utilizados como inóculo. T1, T2 e T3 indicam as réplicas.

Tempo (h)	2.250 µg/ml				2.500 µg/ml					
	48(T1)	48(T2)	120 (T1)	120 (T2)	48(T1)	48(T2)	48(T3)	120 (T1)	120 (T2)	120 (T3)
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	+++	-	-	+	-	++	+++	-	-	-
96	+++	++	-	+++	-	+++	+++	-	-	-
120	+++	+++	+	+++	-	+++	+++	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Korenblum *et al.*⁹⁴ purificou e caracterizou uma surfactina produzida por *Bacillus* sp., isolado de água conata de um reservatório brasileiro. Esse lipopeptídeo se mostrou um biocida promissor ao inibir o crescimento de *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491, uma bactéria redutora de sulfato, em concentrações abaixo de 5 µg/mL. Já uma linhagem de *Bacillus licheniformis*, isolada de reservatório de petróleo, foi descrita por El-Sheshtawy *et al.*²³³ como produtora de surfactina. Esse lipopeptídeo, na concentração de 1%, foi capaz de inibir completamente o

crescimento de BRS após 3h de cultivo. Por fim, Zhao e colaboradores²²⁸ observaram que a cepa bacteriana, modificada pelos autores, *Pseudomonas stutzeri* Rhl não só foi capaz de inibir o crescimento de BRS, mas também, de remover o H₂S presente no meio, durante a produção de um ramnolipídeo.

Os biossurfactantes são identificados por alguns autores como uma opção mais ecológica e ambientalmente mais sustentável, pois, devido às limitações relacionadas aos biocidas químicos, se faz necessário a busca por novos produtos baseados em fontes naturais e de baixa toxicidade.^{3,234} A pesquisa relacionada a essas moléculas é um campo de rápido desenvolvimento e de amplas aplicações, como recuperação de óleo de petróleo, inibição de corrosão, poluição da água e do solo, ciências médicas, ciências biológicas, química, entre outras; assim, os biossurfactantes parecem ser candidatos promissores como uma opção ecologicamente mais viável.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, o isolado termo-halofílico Ar70C7-2 apresentou 100% de similaridade com *Bacillus alveayuensis* TM1. A presença de diferenças fenotípicas entre os isolados pode indicar que ambos passaram por pressões ambientais diferentes, o que pode ser corroborado por serem provenientes de ambientes distintos.

A linhagem Ar70C7-2 foi capaz de produzir uma mistura de lipopeptídeos, que pode conter isoformas de surfactina, iturina e fengicinas, considerando os resultados obtidos no aminograma, na análise de ácidos graxos e nos espectros de massas. Essa mistura de tensoativos se mostrou capaz de reduzir a tensão superficial e interfacial da água bem como de inverter a molhabilidade do carbonato tratado com óleo; também foi eficiente na remoção de óleo presente em amostras porosas. Essas características, associadas à sua alta estabilidade em condições extremas de temperatura, salinidade e pH (resultados obtidos em pesquisa anterior), indicam que estes biossurfactantes são promissores no uso em processos de recuperação de petróleo (MEOR *in situ*, por exemplo), bem como na biorremediação de solos/areia contaminados com óleo.

Os lipopeptídeos estudados também foram capazes de interferir no crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos. Sobre a bactéria anaeróbia redutora de sulfato *Desulfovibrio marinus* BRS-1, os biossurfactantes mostraram ação bacteriostática em concentrações acima de 2.250 µg/mL e atividade bactericida na concentração de 2.500 µg/mL, após tempo de contato de 120 horas, indicando seu uso potencial como agente de controle de acidificação (*souring*) e biocorrosão em reservatórios de petróleo, fenômenos ocasionados por este grupo de bactérias.

A completa inibição do crescimento das hifas dos fungos *Moniliophthora perniciosa*, *Phytophthora sojae* e *Lasiodiplodia euphorbicola* promovida pelo biossurfactante, bem como a inibição parcial do crescimento de outras linhagens fúngicas, também revela este composto como um agente promissor no biocontrole de pragas na agricultura.

REFERÊNCIAS

- 1 SAIK, K.; EUSTON, S. R. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. **Process Biochemistry**, v. 85, p. 143–155, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2019.06.027.
- 2 SCHULTZ, J.; ROSADO, A. S. Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. **Extremophiles**, v. 24,n.2, p. 189–206, 2020. DOI: 10.1007/s00792-019-01151-2.
- 3 PIŁAZA, G.; ACHAL, V. Biosurfactants: eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21,n. 6, p. 2152, 2020. DOI: 10.3390/ijms21062152.
- 4 BIOSURFACTANT. Disponível em: http://www.kaneka.co.jp/en/business/qualityoflife/nbd_002.html. Acesso em: 05 dez. 2021.
- 5 SABOSOL RF. Disponível em: <https://www.ulprospector.com/en/eu/personalcare/detail/31175/698851/sabosol-rf>. Acesso em: 05 dez. 2021.
- 6 RHAMNOLIPID Inc. Disponível em: <http://www.rhamnolipid.com/> Acesso em: 05 dez. 2021.
- 7 MAKING surfactants cleaner and greener. 2020. Disponível em: <https://natsurfact.com>. Acesso em: 05 dez. 2021.
- 8 AGAE Technologies. 2021. Disponível em: <https://www.agaetech.com>. Acesso em: 05 dez. 2021.
- 9 REWOFERM® SL ONE. Disponível em: <https://corporate.evonik.com/en/products/search-products/pages/product-details.aspx?productid=70212&letter=r>. Acesso em: 05 dez. 2021.
- 10 COSMETICS INGREDIENTS TOYOBO. Disponível em: <http://www.toyoboglobal.com/seihin/cosme/surfmellow.htm>. Acesso em: 05 dez. 2021.
- 11 FENIBO, E. O. *et al.* Microbial surfactants: the next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. **Microorganisms**, v. 7, n. 11, p. 581, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7110581.
- 12 XI, W.; PING, Y.; ALIKHANI, M. A. A review on biosurfactant applications in the petroleum industry. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2021, p. 10, 2021. DOI: 10.1155/2021/5477185.
- 13 ALVAREZ, V. M. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery.

Colloids and Surfaces B: biointerfaces, v. 136, p. 14–21, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.08.046.

14 HENTATI, D. *et al.* Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 441–449, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.036.

15 DATTA, P.; TIWARI, P.; PANDEY, L. M. Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated *Bacillus tequilensis* MK 729017 from Assam reservoir soil. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 195, p. 107612, 2020. DOI: 10.1016/j.petrol.2020.107612.

16 NIKOLOVA, C.; GUTIERREZ, T. Biosurfactants and their applications in the oil and gas industry: current state of knowledge and future perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 626639, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.626639.

17 CAROLIN C, F.; KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: types, production, properties and its application in the bioremediation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, p. 124827, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124827.

18 JANEK, T. *et al.* Structure and mode of action of cyclic lipopeptide pseudofactin II with divalent metal ions. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 146, p. 498–506, 2016. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.06.055.

19 KHAN, M. M. *et al.* Response surface optimization of culture conditions for cyclic lipopeptide MS07 from *Bacillus siamensis* reveals diverse insights targeting antimicrobial and antibiofilm activity. **Processes**, v. 8, n. 6, p. 744, 2020.

20 LI, M. S. M. *et al.* Evaluating the biocontrol potential of Canadian strain *Bacillus velezensis* 1B-23 via its surfactin production at various pHs and temperatures. **BMC Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 31, 2021.

21 LIU, W.-T. *et al.* Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review. **Microbial Pathogenesis**, v. 156, p. 104915, 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104915.

22 SANTOS, D. K. F. *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

23 YÁNEZ-MENDIZÁBAL, V.; FALCONÍ, C. E. Efficacy of *Bacillus* spp. to biocontrol of anthracnose and enhance plant growth on Andean lupin seeds by lipopeptide production. **Biological Control**, v. 122, p. 67–75, 2018. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2018.04.004.

24 KRONBERG, B.; HOLMBERG, K.; LINDMAN, B. Types of surfactants, their synthesis, and application. *In*: KRONBERG, B.; HOLMBERG, K.; LINDMAN, B.

Surface Chemistry of Surfactants and Polymers. New York: Wiley, 2014. cap. 1, p. 1-48.

25 JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, n. 12, p. 4124-1426, 1949.

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

27 BONHOMME, S.; DESSEN, A.; MACHEBOEUF, P. The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activities. **Open Biology**, v. 11, n 5, p. 200386. DOI: 10.1098/rsob.200386.

28 VIEIRA, I. M. *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1–18, 2021. DOI: 10.1016/j.jiec.2021.05.017.

29 SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 2-13 , 2018. DOI: 10.1111/jam.14057.

30 HOOGEVEST, P. V.; WENDEL, A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 9, p. 1088–1107, 2014.

31 KARLAPUDI, A. P. *et al.* Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. **Petroleum** , v. 4, n. 3, p. 241-249, 2018.

32 FENIBO, E. O.; DOUGLAS, S. I.; STANLEY, H. O. A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 1-22, 2019.

33 DALTIM, D. **Tensoativos**: química, propriedades e aplicações. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2012.

34 INÈS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100–112, 2015. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.07.006.

35 PATHAK, K. V.; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 41-48, 2014. DOI: 10.1007 / s13205-013-0119-3.

36 YANG, H. *et al.* Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 9, p. 2529–2542, 2015.

- 37 SOUZA, C. G. *et al.* Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 26, p. 6827–6836, 2018.
- 38 NANJUNDAN, J. *et al.* Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 374–380, 2019. DOI: 10.1016 / j.micpath.2019.01.037.
- 39 FANAEI, M.; JURCIC, K.; EMTIAZI, G. Detection of simultaneous production of kurstakin, fengycin and surfactin lipopeptides in *Bacillus mojavensis* using a novel gel-based method and MALDI-TOF spectrometry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 97, 2021.
- 40 YARAGUPPI, D. A. *et al.* Response surface methodology-based optimization of biosurfactant production from isolated *Bacillus aryabhatai* strain ZDY2. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, v. 10, p. 2483–2498, 2020. DOI: 10.1007/s13202-020-00866-9.
- 41 MEI, Y. *et al.* Enhanced surfactin fermentation via advanced repeated fed-batch fermentation with increased cell density stimulated by EDTA–Fe (II). **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 288–294, 2021. DOI: 10.1016 / j.fbp.2021.03.012.
- 42 CHANG, P.-H. *et al.* Mg-Fe layered double hydroxides enhance surfactin production in bacterial cells. **Crystals**, v. 9, n. 7, p. 355, 2019.
- 43 BARTAL, A. *et al.* Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2675, 2018.
- 44 KHIRE, J. M. Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *In*: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 146-157. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 45 AL-WAHAIBI, Y. *et al.* Injection of biosurfactant and chemical surfactant following hot water injection to enhance heavy oil recovery. **Petroleum Science**, v. 13, p. 100–109, 2016. DOI: 10.1007/s12182-015-0067-0.
- 46 BAKER, S. C.; CHEN, C.-Y. Enrichment and purification of lipopeptide biosurfactants. *In*: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 281-288. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672)
- 47 GARCÍA-REYES, S.; YAÑEZ-OCAMPO, G. Microbial biosurfactants: methods for their isolation and characterization. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 641-648, 2016.
- 48 CHEN, W.-C.; JUANG, R.-S.; WEI, Y.-H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158–169, 2015. DOI: 10.1016/j.bej.2015.07.009.

- 49 FANGYU, C. *et al.* Characterization of a blend-biosurfactant of glycolipid and lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* TU2 isolated from underground oil-extraction wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 390–396, 2013.
- 50 GUPTA, S. *et al.* In vitro apoptosis induction in a human prostate cancer cell line by thermotolerant glycolipid from *Bacillus licheniformis* SV1. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, p. 1141–1151, 2017. DOI: 10.1007/s11743-017-1986-0.
- 51 AZAIEZ, S. *et al.* Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. **Microbiological Research**, v. 217, p. 23–33, 2018. DOI: 10.1016/j.micres.2018.08.013.
- 52 SINGH, V. *et al.* Assessment of rheological behaviour of water-in-oil emulsions mediated by glycolipid biosurfactant produced by *Bacillus megaterium* SPSW1001. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2021. DOI: 10.1007/s12010-021-03717-3.
- 53 VENKATARAMAN, S. *et al.* Extraction, purification and applications of biosurfactants based on microbial-derived glycolipids and lipopeptides: a review. **Environmental Chemistry Letters**, 2021. DOI: 10.1007/s10311-021-01336-2.
- 54 GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, C.; BENAUD, N.; FERRARI, B. C. The ecological roles of microbial lipopeptides: where are we going? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 1400–1413, 2021. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.02.017.
- 55 BANAT, I. M.; DE RIENZO, M. A. D.; QUINN, G. A. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9915–9929, 2014.
- 56 CORONEL, J. R. *et al.* Interaction of the lipopeptide biosurfactant lichenysin with phosphatidylcholine model membranes. **Langmuir**, v. 33, n. 38, p. 9997–10005, 2017.
- 57 LU, J.-K.; WANG, H.-M.; XU, X.-R. **Applications of surfactin in cosmetic products and thereof**. WO 2016/015536 A1, 4 Feb. 2016.
- 58 LU, J.-K.; WANG, H.-M.; XU, X.-R. **Applications of surfactin in cosmetic products**. US 2016/0030322 A1, 4 Feb. 2016.
- 59 LU, J.-K.; WANG, H.-M.; XU, X.-R. **Method for anti-aging treatment by surfactin in cosmetics via enhancing sirtun**. US 9,364.413 B2, 14 June 2016.
- 60 SHARMA, D. *et al.* Surfactin like broad spectrum antimicrobial lipopeptide co-produced with sublancin from *Bacillus subtilis* strain A52: dual reservoir of bioactives. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1167, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01167.

- 61 MEENA, K. R.; SHARMA, A.; KANWAR, S. S. Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 423–433, 2020. DOI: 10.1007/s10989-019-09848-w.
- 62 ROUTHU, S. R. *et al.* Induction of apoptosis in lung carcinoma cells by antiproliferative cyclic lipopeptides from marine algicolous isolate *Bacillus atrophaeus* strain AKLSR1. **Process Biochemistry**, v. 79, p. 142–154, 2019. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.12.010.
- 63 WÓJTOWICZ, K. *et al.* Surfactin cyclic lipopeptides change the plasma membrane composition and lateral organization in mammalian cells. **Biochimica and Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1863, n. 12, p. 183730, 2021.
- 64 PEYPOUX, F. *et al.* Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v. 17, n. 19, p. 3992-3996, 1978.
- 65 DEY, G. *et al.* Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3 β and FoxO3a signaling and triggers apoptosis in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10316, 2015. DOI: 10.1038/srep10316.
- 66 FUJITA, S.; YOKOTA, K. Disease suppression by the cyclic lipopeptides iturin A and surfactin from *Bacillus* spp. against *Fusarium wilt* of lettuce. **Journal of General Plant Pathology**, v. 85, p. 44–48, 2019. DOI: 10.1007/s10327-018-0816-1.
- 67 JIANG, C. *et al.* *Bacillus subtilis* inhibits *Aspergillus carbonarius* by producing iturin A, which disturbs the transport, energy metabolism, and osmotic pressure of fungal cells as revealed by transcriptomics analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 330, p. 108783, 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108783.
- 68 VANITTANAKOM, N. *et al.* Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* f-29-3. **Journal of Antibiotics**, v. 39, n. 7, p. 888-901, 1986.
- 69 ABDELLAZIZ, L. *et al.* Lipopeptide biodiversity in antifungal *Bacillus* strains isolated. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 8, p. 1205–1216, 2018.
- 70 ZHANG, L.; SUNA, C. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus magnapor the grisea by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 18, p. e00445, 2018.
- 71 SUR, S.; ROMO, T. D.; GROSSFIELD, A. Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular dynamics. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 8, p. 2219–222, 2018.
- 72 GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M. *et al.* Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 156, p. 114–122, 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.021.

73 FAN, H. *et al.* Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. **Microbiological Research**, v. 199, p. 89–97, 2017. DOI: 10.1016/j.micres.2017.03.004.

74 COZZOLINO, M. E. *et al.* Control of postharvest fungal pathogens in pome fruits by lipopeptides from a *Bacillus* sp. isolate SL-6. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108957, 2020. DOI: 10.1016/j.scienta.2019.108957.

75 LIN, L.-Z. *et al.* Isolation and characterization of fengycins produced by *Bacillus amyloliquefaciens* JFL21 and its broad-spectrum antimicrobial potential against multidrug-resistant foodborne pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 579621, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.579621.

76 HATHOUT, Y. *et al.* Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 11, p. 1492–1496, 2000.

77 BÉCHET, M. *et al.* Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 593–600, 2012.

78 DIMKIC, I. *et al.* The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 925, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00925.

79 LABIADH, M. *et al.* Antifungal lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of Citrus trees. **Rhizosphere**, v. 19, p. 100399, 2021. DOI: 10.1016/j.rhisph.2021.100399.

80 DE ALMEIDA, D. G. *et al.* Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1718, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01718.

81 PAL, S. *et al.* Review of surfactant-assisted chemical enhanced oil recovery for carbonate reservoirs: challenges and future perspectives. **Petroleum Science**, v. 15, p. 77–102, 2018. DOI: 10.1007/s12182-017-0198-6.

82 BACHMANN, R. T.; JOHNSON, A. C.; EDYVEAN, R. G. J. Biotechnology in the petroleum industry: an overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 86, part C, p. 225-237, 2014.

83 LAZAR, I.; PETRISOR, I. G.; YEN, T. F. Microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Petroleum Science and Technology**, v. 25, p. 1353-1366, 2007. DOI: 10.1080/10916460701287714.

84 GEETHA, S. J.; BANAT, I. M.; JOSHI, S. J. Biosurfactants: production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 23–32, 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.01.010.

85 HITZMAN, D. O. **Microbiological secondary recovery of oil**. US3032472A, 16 June 1960, 1 May 1962.

86 BRYANT, R. S. *et al.* Microbial enhanced oil recovery. *In*: DONALDSON, E. C.; CHILINGARIAN, G. V.; YEN, T. F. (ed.). **Developments in petroleum science**. New York: Elsevier, 1989. Cap. 14, v. 17, part B, p. 423-450. DOI: 10.1016/S0376-7361(08)70466-7.

87 JINFENG, L. *et al.* The field pilot of microbial enhanced oil recovery in a high temperature petroleum reservoir. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 48, n. 3, p. 265–271, 2005.

88 YOUSSEF, N. *et al.* In-situ lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* strains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 127-132, 2013. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.05.010.

89 CHAI, L. *et al.* Impact of a microbial-enhanced oil recovery field trial on microbial communities in a low-temperature heavy oil reservoir. **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 14, n. 3, p. 455-462, 2015.

90 CERÓN-CAMACHO, R. *et al.* Synergistic effect of alkyl-O-glucoside and -cellobioside biosurfactants as effective emulsifiers of crude oil in water. a proposal for the transport of heavy crude oil by pipeline. **Fuel**, v. 110, p. 310-317, 2013. DOI: 10.1016/j.fuel.2012.11.023.

91 MULLIGAN, C. N. *et al.* Green chemistry and biosurfactant research. *In*: MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. (ed.). **Biosurfactants: research trends and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 1–30.

92 MATSUI, T. *et al.* Removal of oil tank bottom sludge by novel biosurfactant. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 55, n. 2, p. 138-141, 2012.

93 SOUZA, P. M. *et al.* Growth inhibition of sulfate-reducing bacteria in produced water from the petroleum industry using essential oils. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 648, 2017.

94 KORENBLUM, E. *et al.* Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 252, 2012. DOI: 10.1186/1471-2180-12-252.

95 GAATHAUG, A. V. *et al.* Experimental study of gas explosions in hydrogen sulfide-natural gas-air mixtures. **Journal of Combustion**, v. 2014, n. 3, p. 1-12, 2014. DOI: 10.1155/2014/905893.

96 TIBURCIO, S. R. G. *et al.* Sulphate-reducing bacterial community structure from produced water of the Periquito and Galo de Campina onshore oilfields in Brazil. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 20311, 2021.

97 WOOD, T. L. *et al.* Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* disperse the biofilms of sulfate-reducing bacteria. **Biofilms and Microbiomes**, v. 4, p. 22, 2018. DOI: 10.1038/s41522-018-0066-1.

98 ASTUTI, D. I.; PURWASENA, I. A.; PUTRI, F. Z. Potential of biosurfactant as an alternative biocide to control biofilm associated biocorrosion. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 2, p. 104-111, 2018.

99 PURWASENA, I. A. *et al.* Inhibition of microbial influenced corrosion on carbon steel ST37 using biosurfactant produced by *Bacillus* sp. **Materials Research Express**, v. 6, n. 11, p. 115405, 2019.

100 FELIX, A. K. N. *et al.* Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oilcontaminated soil. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 175, p. 256–263, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.062.

101 DURVAL, I.; RUFINO, R.; SARUBBO, L. Biosurfactant as an environmental remediation agent: toxicity, formulation, and application in the removal of petroderivate in sand and rock walls. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 34-48, 2022.

102 IBRAHIM, M. L. *et al.* Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 81, p. 28-34, 2013. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.11.012.

103 MAHMOUD, T. *et al.* Modification wettability and interfacial tension of heavy crude oil by green bio-surfactant based on *Bacillus licheniformis* and *Rhodococcus erythropolis* strains under reservoir conditions: microbial enhanced oil recovery. **Energy Fuels**, v. 35, p. 1648–1663, 2021. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.0c03781

104 BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Biosurfactant from *Paenibacillus dendritiformis* and its application in assisting polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and motor oil sludge removal from contaminated soil and sand media. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 98, p. 354–364, 2015. DOI: 10.1016/j.psep.2015.09.004

105 MAIDAK, B. L. *et al.* A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 1, p. 171–173, 1999.

106 WIEGEL, J. Methods for isolation and study of thermophiles. *In*: BROCK, T. D. (ed.). **Thermophiles: general, molecular; and applied microbiology**. New York: Wiley, 1986. p. 17-37.

107 BRUMANO, L. P. *et al.* Estirpes bacterianas-padrão, formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratórios de ensino e pesquisa. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 3, n. único, p. 21-26, 2011.

- 108 RAINEY, F. A. *et al.* The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. **Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 1088-1092, 1996.
- 109 KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- 110 ALTSCHUL, S. F. *et al.* Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- 111 KIM, O. S. *et al.* Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 716-721, 2012.
- 112 MYERS, E. W.; MILLER, W. Optimal alignments in linear space. **Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 11-17, 1988.
- 113 ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search. **Journal Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 40-410, 1990.
- 114 REIMER, L. C. *et al.* BacDive in 2019: bacterial phenotypic data for High-throughput biodiversity analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D631–D636, 2019.
- 115 MILLER, L. T. A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 584-586, 1982.
- 116 KUYKENDALL, L. D. *et al.* Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 4, p. 358-361, 1988.
- 117 AGARWAL, P.; SHARMA, D. K. Studies on the production of biosurfactant for the microbial enhanced oil recovery by using bacteria isolated from oil contaminated wet soil. **Petroleum Science and Technology**, v. 27, n. 16, p. 1880-1893, 2009.
- 118 COOPER, D. C.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.
- 119 ATLAS, R. M. **Handbook of microbiological media**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- 120 DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1675–1684, 2008.

- 121 LIU, B. *et al.* Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 107, n. 1, p. 46-51, 2016.
- 122 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.
- 123 SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110-116, 1987. DOI: 10.1007/BF00251931.
- 124 BALAN, S. S.; KUMAR, C. G.; JAYALAKSHMI, S. Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter korlensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. **Process Biochemistry**, v. 51, n.12, p. 2198–2207, 2016.
- 125 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.
- 126 GODDARD, W. A. *et al.* **Screening methods for selection of surfactant formulations for IOR from fractured Carbonate Reservoirs**. 2005. Disponível em: <https://www.osti.gov/servlets/purl/842013-La7YD8/native/>. Acesso em: 23 jan. 2021.
- 127 KIRDPONPATTARA, S.; PHISALAPHONG, M.; NEWBY, B. Z. Applicability of Washburn capillary rise for determining contact angles of powders/porous materials. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 397, p. 169-176, 2013. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.01.033.
- 128 WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.
- 129 HAGEN, S. R.; FROST, B.; AUGUSTIN, J. Pre-column phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v. 72, n. 6, p. 912-916, 1989.
- 130 SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1413-1416, 1967.
- 131 URUM, K.; PEKDEMIR, T.; ÇOPUR, M. Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 276, n. 2, p. 456–464, 2004. DOI: 10.1016/j.jcis.2004.03.057.
- 132 LIU, C. *et al.* Oil recovery from tank bottom sludge using rhamnolipids. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, p. 14–20, 2018. DOI: 10.1016/j.petrol.2018.06.031.

133 CASTELLANI, A. A maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

134 DA SILVA, T. H. *et al.* Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. **Extremophiles**, v. 24, n. 4, p. 565–576, 2020.

135 AMBRICO, A.; TRUPO, M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold. **Postharvest Biology and Technology**, v. 134, p. 5–10, 2017. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2017.08.001.

136 ZHANG, X.; FU, M. Inhibitory effect of chlorine dioxide (ClO₂) fumigation on growth and patulin production and its mechanism in *Penicillium expansum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 335–343, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.05.051.

137 CLINICAL and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**- ninth edition. 2012. (M07-A9). Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=564ceedf5e9d97daf08b45a2&assetKey=AS%3A297254750572544%401447882463055>. Acesso em: 04 fev. 2020.

138 COLLINS, C. H. *et al.* **Microbiological methods**. 8th ed. London: Oxford University Press, 2004.

139 CLINICAL and Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria**. 3rd ed. 2015. (M45). Disponível em: https://clsi.org/media/1450/m45ed3_sample.pdf. Acesso em: 04 fev. 2020.

140 CLINICAL and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 26th. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016. (CLSI supplement M100S).

141 KUSHKEVYCH, I. *et al.* The sulfate-reducing microbial communities and meta-analysis of their occurrence during diseases of small–large intestine axis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1656, 2019.

142 BAE, S. S.; LEE, J. H.; KIM, S. J. *Bacillus alveayuensis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from deep-sea sediments of the Ayu Trough. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1211-1215, 2005. DOI: 10.1099/ijs.0.63424-0.

143 GUGLIANDOLO, C. *et al.* *Bacillus aeolius* sp. nov. a Novel Thermophilic, Halophilic Marine *Bacillus* Species from Eolian Islands (Italy). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 172–176, 2003.

144 ATANASSOVA, M. *et al.* *Anoxybacillus bogrovensis* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Dolni Bogrov, Bulgaria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2359–2362, 2008. DOI: 10.1099/ijs.0.65745-0.

145 ROOHI, A. *et al.* *Bacillus pakistanensis* sp. nov., a halotolerant bacterium isolated from salt mines of the Karak Area in Pakistan. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 6, p. 1163–1172, 2014.

146 DUNLAP, C. A. *et al.* *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 3487–3492, 2015. DOI: 10.1099/ijsem.0.000441.

147 SCHOLZ, T. *et al.* *Bacillus pallidus* sp. nov., a New Thermophilic species from Sewage. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 9, n. 1-2, p. 91-96, 1987. DOI: 10.1016/S0723-2020(87)80061-9.

148 ARGENTIN, M. N. **Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de Bacillus isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo.** 2016. 123 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. DOI:10.11606/D.76.2018.tde-08052017-154809.

149 KOSKELLA, B.; VOS, M. Adaptation in natural microbial populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 46, p. 503–522, 2015. DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-112414-054458.

150 LIU, B. *et al.* *Bacillus wuyishanensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of a medical plant, *Prunella vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2030–2035, 2015.

151 BLANC, M. *et al.* Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1246-1248, 1997.

152 BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; RAHMAN, T. J. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2197–2201, 2004. DOI: 10.1099/ijs.0.63231-0.

153 MIÑANA-GALBIS, D. *et al.* Reclassification of *Geobacillus pallidus* (Scholz *et al.* 1988) Banat *et al.* 2004 as *Aeribacillus pallidus* gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1600–1604, 2010. DOI: 10.1099/ijs.0.003699-0.

154 ARFMAN, N. *et al.* *Bacillus methanolicus* sp. nov., a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 439-445, 1992.

155 CHOI, J.-H.; CHA, C.-J. *Bacillus panacisoli* sp. nov., isolated from ginseng soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 901–906, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.054320-0.

156 SHIVANI, Y. *et al.* *Bacillus crescens* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 2531–2536, 2015.

157 ZHAO, F. *et al.* *Bacillus fengqiuensis* sp. nov., isolated from a typical sandy loam soil under long-term fertilization. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2849–2856, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.063081-0.

158 KANG, H. *et al.* *Bacillus songklensis* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4189–4195, 2013. DOI: 10.1099/ijs.0.050682-0.

159 KÄMPFER, P. Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus species*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 17, p. 86-98, 1994. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80035-4.

160 NERURKAR, A. S. Structural and molecular characteristics of lichenysin and its relationship with surface activity structural and molecular char. *In*: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 304-315. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).

161 NALINI, S.; PARTHASARATHI, R.; PRABUDOSS, V. Production and characterization of lipopeptide from *Bacillus cereus* SNAU01 under solid state fermentation and its potential application as anti-biofilm agent. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 123-132, 2016. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.01.007.

162 ZHU, Z. *et al.* Biosurfactant production by marine-originated bacteria *Bacillus subtilis* and its application for crude oil removal. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 9, p. 328, 2016.

163 JOY, S.; RAHMAN, P. K. S. M.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**, v. 317, p. 232–241, 2017. DOI: 10.1016/j.cej.2017.02.054

164 NAYAK, N. S. *et al.* Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant *Bacillus licheniformis* LRK1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 29, p. 101808, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101808.

165 HABA, E. *et al.* Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 379–387, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00961.x.

- 166 MEHTA, S. K. *et al.* Biomimetic amphiphiles: properties and potential use. *In*: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 102-120. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 167 SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R. M. Biosurfactants: a general overview. *In*: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (ed.). **Biosurfactants**. Berlin: Springer, 2011. (Microbiology monographs, v. 20).
- 168 MUKHERJEE, A. K.; DAS, K. Microbial surfactants and their potential applications: an overview. *In*: SEN, R. **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 54-64. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 169 SATPUTE, S. K. *et al.* Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms. *In*: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 14-41. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672).
- 170 WANG, Q. *et al.* Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. **Process Biochemistry**, v. 70, p. 36–44, 2018. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.04.003.
- 171 COOPER, D. G. *et al.* Enhanced production of surfactin from *B. subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408-412, 1981.
- 172 YEY, M.-S.; WEI, Y.-H.; CHANG, J.-S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1329–1334, 2005. DOI: 10.1021/bp050040c.
- 173 FAHIM, S.; HUSSEIN, W. Antibacterial potentials of surfactins against multidrug resistant bacteria. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 1076-1083, 2017.
- 174 MEI, Y. *et al.* Enhanced surfactin fermentation via advanced repeated fed-batch fermentation with increased cell density stimulated by EDTA–Fe (II). **Food and Bioproducts Processing**, v. 127, p. 288–294, 2021. DOI: 10.1016 / j.fbp.2021.03.012.
- 175 LONG, X. *et al.* Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 200–206, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.120.
- 176 DATTA, P.; TIWARI, P.; PANDEY, L. M. Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 439–448, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.09.047.

- 177 KIOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I. E. *et al.* Rhamnolipid CMC prediction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 10–19, 2017. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.10.055.
- 178 WARD, O. P. Microbial biosurfactants and biodegradation. *In*: SEN, R. (ed.). **Biosurfactants**. New York: Springer, 2010. p. 65-74. (Advances in experimental medicine and biology, v. 672)
- 179 RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L. *et al.* Extraction, separation and characterization of lipopeptides and phospholipids from corn steep water. **Separation and Purification Technology**, v. 248, p. 117076, 2020. DOI: 10.1016/j.seppur.2020.117076.
- 180 SUTHAR, H.; NERURKAR, A. Characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* TT42 having potential for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 2, p. 248–260, 2016. DOI: 10.1007/s12010-016-2096-6.
- 181 OLIVEIRA, D. W. F. *et al.* Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 101, p. 34–43, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.06.011
- 182 SINGH, A. K.; RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 67, 2014. DOI: 10.1186/1475-2859-13-67.
- 183 MESBAIAH, F. Z. *et al.* Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus* sp. under thermophilic conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 14, p. 14221–14230, 2016.
- 184 GUIMARÃES, C. R. *et al.* Surfactin from *Bacillus velezensis* H2O-1: production and physicochemical characterization for postsalt applications. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, n. 3, p. 451–462, 2019.
- 185 GUIMARÃES, C. R. *et al.* *Bacillus velezensis* H2O-1 surfactin efficiently maintains its interfacial properties in extreme conditions found in post-salt and pre-salt oil reservoirs. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 208, p. 112072, 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2021.112072.
- 186 Auvinen, H. Powder wettability measurements. Disponível em: <https://content.biolinscientific.com/powder-wettability?hsCtaTracking=0bb18092-6202-4b71-88b5-c0132306e8ca%7C9c826180-02d1-4715-8bb4-565190c24122>. Acesso em: 26/12/2021.
- 187 SHENG, J. J. Review of surfactant enhanced oil recovery in carbonate reservoirs. **Advances in Petroleum Exploration and Development**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2013.
- 188 COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 4–31, 2016.

- 189 GOND, S. K. *et al.* Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. **Microbiological Research**, v. 172, p. 79–87, 2015. DOI: 10.1016/j.micres.2014.11.004.
- 190 LÓPEZ-ISASMENDI, G. *et al.* Aphicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strains in the peach-potato aphid (*Myzus persicae*). **Microbiological Research**, v. 226, p. 41–47, 2019. DOI: 10.1016/j.micres.2019.05.006.
- 191 SOUSSI, S. *et al.* Utilization of grape seed flour for antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* C5 Strain. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 4, p. 1460–1474, 2019. DOI: 10.1007/s12010-018-2885-1.
- 192 JELUSIC, A. *et al.* Changes in the winter oilseed rape microbiome affected by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and biocontrol potential of the indigenous *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates. **Biological Control**, v. 160, p. 104695, 2021. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2021.104695.
- 193 LI, X. *et al.* Combined mass spectrometry-guided genome mining and virtual screening for acaricidal activity in secondary metabolites of *Bacillus velezensis* W1. **RSC Advances**, v. 11, n. 41, p. 25441, 2021.
- 194 YUN-FENG, Y. *et al.* Identification of Antifungal Substance (Iturin A2) Produced by *Bacillus subtilis* B47 and Its Effect on Southern Corn Leaf Blight. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 11, n. 1, p. 90-99, 2012.
- 195 TORRES, M. J. B. C. P. *et al.* Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research**, v. 182, p. 31–39, 2016. DOI: 10.1016/j.micres.2015.09.005.
- 196 WU, L. *et al.* Bacterial iturins mediate biocontrol activity of *Bacillus* sp. against postharvest pear fruit-rotting fungi. **Journal of Phytopathology**, v. 167, n. 9, p. 501–509, 2019. DOI: 10.1111/jph.12837.
- 197 JEMIL, N. *et al.* Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. **Journal of Chromatography B**, v. 1060, p. 374–386, 2017. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.06.013.
- 198 SOARES, M. A. *et al.* Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive English ivy (*Hedera helix*L.). **Plant Soil**, v. 405, p. 107–123, 2016. DOI: 10.1007/s11104-015-2638-7.
- 199 FANAEI, M.; K., J.; EMTIAZI, G. Detection of simultaneous production of kurstakin, fengycin and surfactin lipopeptides in *Bacillus mojavensis* using a novel

gel-based method and MALDI-TOF spectrometry. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 97, 2021.

200 YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B. . H. G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 7, p. 955-963, 2002. DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00027-5.

201 PABEL, C. T. *et al.* Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Marine Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 424–434, 2003. DOI: 10.1007/s10126-002-0088-8.

202 JEMIL, N. *et al.* Isolation and characterization of kurstakin and surfactin isoforms produced by *Enterobacter cloacae* C3 strain. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 54, n. 1, p. 7-18, 2019. DOI: 10.1002/jms.4302.

203 PARASZKIEWICZ, K. *et al.* Agricultural potential of rhizospheric *Bacillus subtilis* strains exhibiting varied efficiency of surfactin production. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 802–809, 2017. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.07.034.

204 PATHAK, K. V.; BOSE, A.; E KEHARIA, H. Characterization of novel lipopeptides produced by *Bacillus tequilensis* P15 using liquid chromatography coupled electron spray ionization tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS/MS). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, n. 3, p. 349-356, 2014.

205 MONACI, L. *et al.* Rapid profiling of antimicrobial compounds characterising *B. subtilis* TR50 cell-free filtrate by high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution Orbitrap™ mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 30, n. 1, p. 45–53, 2016. DOI: 10.1002/rcm.7408.

206 PATHAK, K. V. *et al.* Lipopeptides from the Banyan Endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 23, p. 1716-1728, 2012. DOI: 10.1007/s13361-012-0437-4.

207 BIE, X.; LU, Z.; LU, F. Identification of fengycin homologues from *Bacillus subtilis* with ESI-MS/CID. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 3, p. 272–278, 2009. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.013.

208 JACQUES, P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. *In*: SOBERON-CHAVEZ, G. **Biosurfactants: from genes to applications**. Berlin: Springer, 2011. p. 57–91. (Microbiology monographs, v. 20)

209 MA, Y. *et al.* Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC–ESI–MS/MS. **AMB Express**, v. 6, p. 79, 2016. DOI: 10.1186/s13568-016-0252-6.

210 SA, R.-B. *et al.* Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* from poplar wood bark. **Australasian Plant Pathology**, v. 47, n. 3, p. 259-268, 2018.

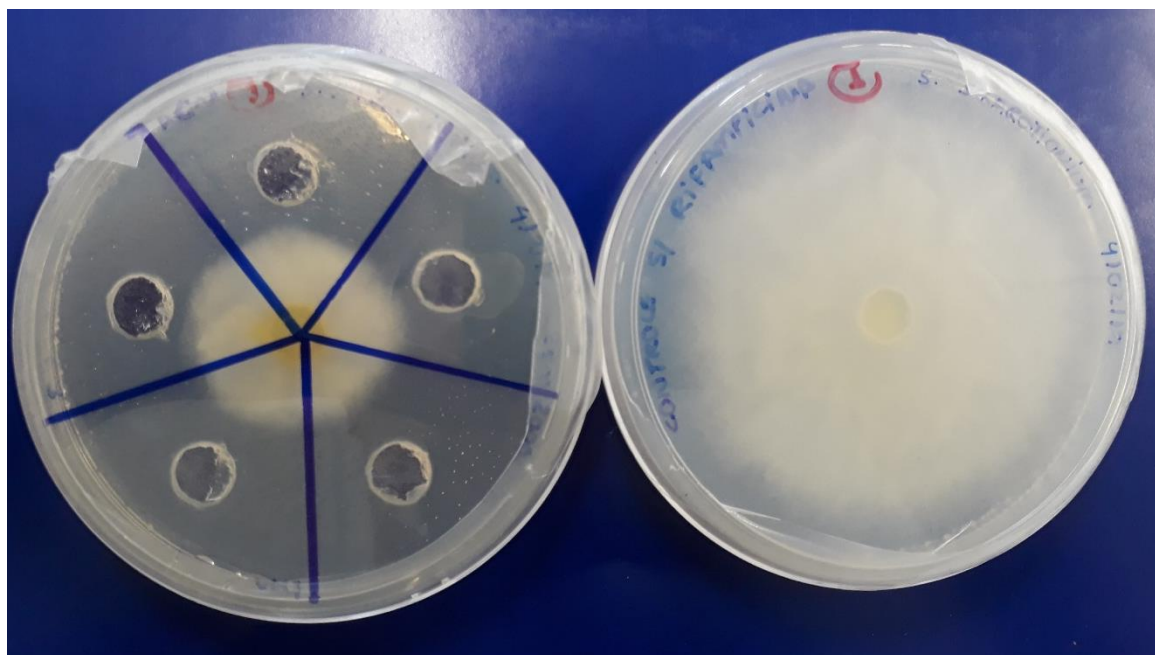
- 211 RUFINO, R. D. *et al.* Removal of petroleum derivative adsorbed to soil by biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica*. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 109, p. 117–122, 2013. DOI: 10.1016/j.petrol.2013.08.014.
- 212 ASHISH, M. D. Application of biosurfactant produced by an adaptive strain of *C. tropicalis* MTCC230 in microbial enhanced oil recovery (MEOR) and removal of motor oil from contaminated sand and water. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 170, p. 40–48, 2018. DOI: 10.1016/j.petrol.2018.06.034
- 213 SILVA, E. J. *et al.* Recovery of contaminated marine environments by biosurfactant-enhanced bioremediation. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 172, p. 127–135, 2018. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.034
- 214 DESHPANDE, S. *et al.* Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 351-360, 1999.
- 215 PRAMUDITO, T. E. *et al.* A novel variant of narrow-spectrum antifungal bacterial lipopeptides that strongly inhibit *ganoderma boninense*. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 1, p. 110–117, 2018.
- 216 YASEEN, Y. *et al.* Polynucleotide phosphorylase is involved in the control of lipopeptide fengycin production in *Bacillus subtilis*. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 5, p. 783–791, 2018.
- 217 WANG, Y. *et al.* *Bacillus megaterium* WL-3 lipopeptides collaborate against *phytophthora infestans* to control potato late blight and promote potato plant growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1602, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01602
- 218 KABORÉ, D. *et al.* Rapid screening of starter cultures for maari based on antifungal properties. **Microbiological Research**, v. 207, p. 66–74, 2018. DOI: 10.1016/j.micres.2017.11.005.
- 219 CAULIER, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 302, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302.
- 220 ZHOU, S. *et al.* Structural and functional insights into iturin W, a novel lipopeptide produced by the deep-sea bacterium *Bacillus* sp. strain wsm-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 21, p. e01597, 2020.
- 221 SERRANO, L. *et al.* Biosurfactants synthesized by endophytic *Bacillus* strains as control of *Moniliophthora perniciosa* and *Moniliophthora roreri*. **Scientia Agricola**, v. 78, Suppl. 1, p. e20200172, 2021.
- 222 COCHRANE, S. A.; VEDERAS, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. **Medicinal Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 4–31, 2016.

- 223 ZIDOUR, M. *et al.* Genome sequencing and analysis of *Bacillus pumilus* ICVB403 isolated from *acartia tonsa* copepod eggs revealed surfactin and bacteriocin production: insights on anti-staphylococcus activity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 3, p. 990–998, 2019.
- 224 MOLINA, K. C. *et al.* The emerging role of B-Lactams in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 7, p. e00468-20, 2020.
- 225 BERNAT, P. *et al.* Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 157, 2016.
- 226 BOUASSIDA, M. *et al.* Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptides in toothpaste formulation. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 4, p. 425–433, 2017.
- 227 PANCHABHAI, A. Application of biosurfactant for effective production of biocides from sulfate-reducing bacteria. *In*: INAMUDDIN; C. O. A.; ASIRI, A. M. (ed.). **Green sustainable process for chemical and environmental engineering and science**. Amsterdam: Elsevier, 2021. Cap. 18, p. 367-377.
- 228 ZHAO, F. *et al.* Simultaneous inhibition of sulfate-reducing bacteria, removal of H₂S and production of rhamnolipid by recombinant *Pseudomonas stutzeri* Rhl: Applications for microbial enhanced oil recovery. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 24–30, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.01.126.
- 229 HUSSAIN, A. *et al.* Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. **3 Biotech**, v. 6, p. 119, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0437-3.
- 230 SINGH, N. K.; CHOUDHARY, S. Bacterial and archaeal diversity in oil fields and reservoirs and their potential role in hydrocarbon recovery and bioprospecting. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 58819–58836, 2021. DOI: 10.1007/s11356-020-11705-z.
- 231 CORDOVANA, M.; AMBRETTI, S. Antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria by broth microdilution method using the MICRONAUT-S Anaerobes MIC plates. **Anaerobe**, v. 63, p. 102217, 2020. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2020.102217.
- 232 MADIGAN, M. T. *et al.* Crescimento e controle microbiano. *In*: MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. Cap. 5, p. 143-182.
- 233 EL-SHESHTAWY, H. S. *et al.* Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, n. 2, p. 155–162, 2015.

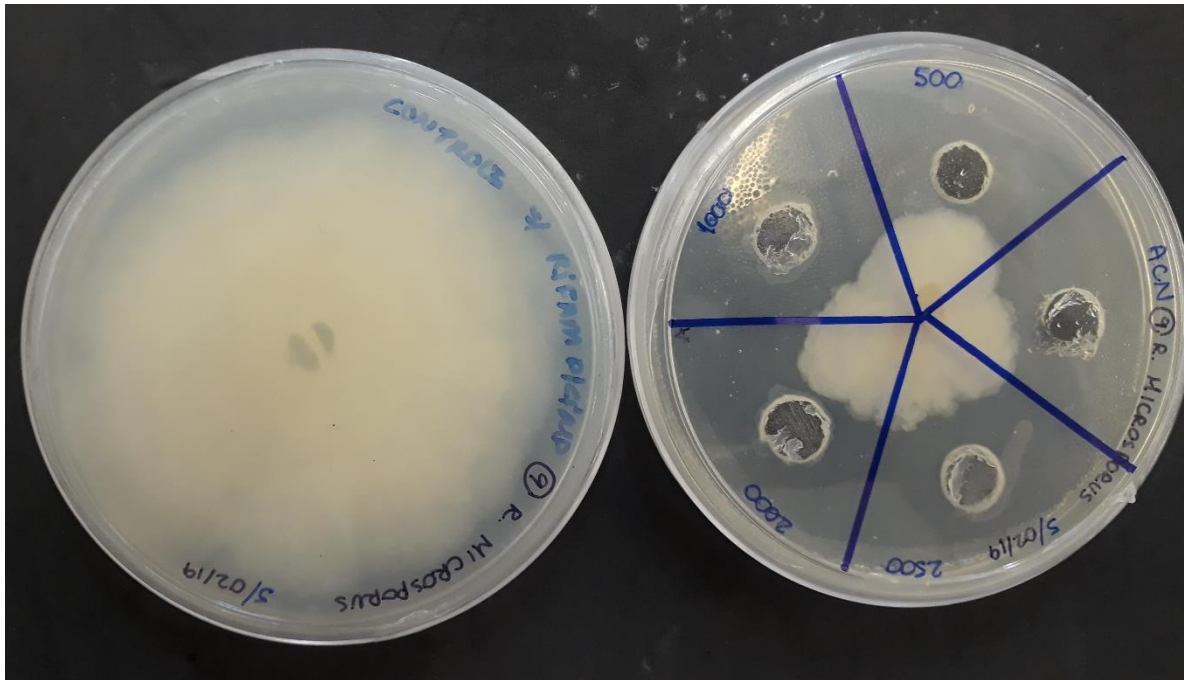
234 JIMOH, A. A.; LIN, J. Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecotoxicology and Environmental Safety** , v. 184 , p. 109607, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109607.

APÊNDICE – Ensaio de inibição de micélio exposto a diferentes concentrações de BSSP60

Resultados obtidos para as linhagens *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizopus microsporus*, *Aspegillus flavus* (ATCC 16883) e *Aspegillus niger* (ATCC 10535) para o ensaio de inibição do crescimento dos micélios na presença de diferentes concentrações de BSSP60.



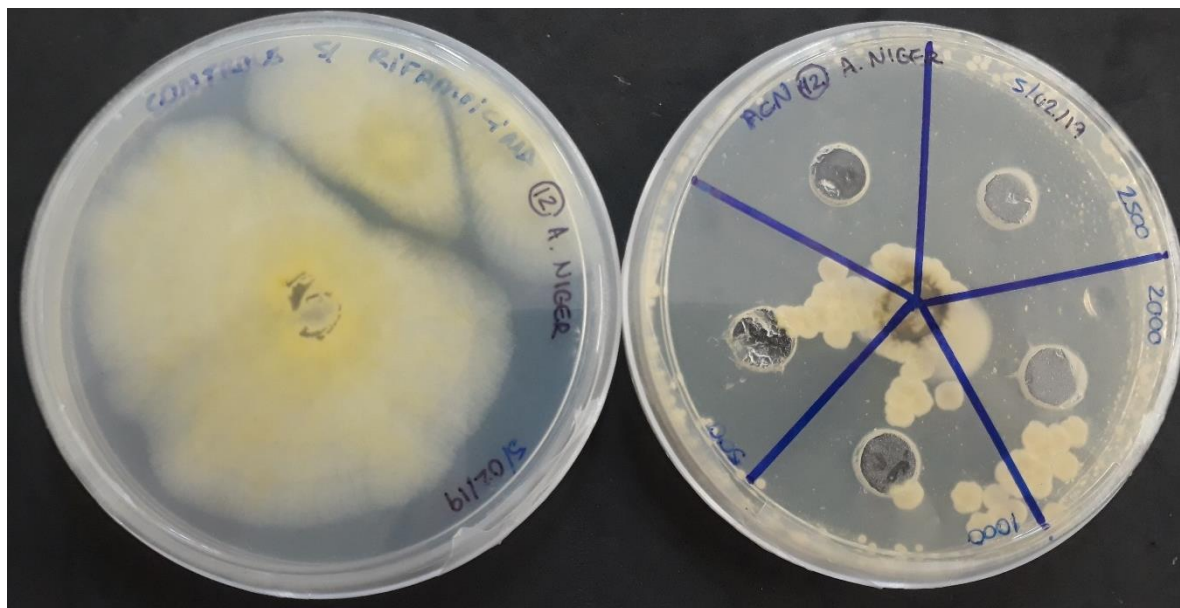
Sclerotinia sclerotiorum após 3 dias de cultivo. Placas sem rifampicina.



Rhizopus microsporus após 5 dias de cultivo. Placas sem rifampicina.



Aspegillus flavus (ATCC 16883) após 5 dias de cultivo. Placas sem rifampicina.



Aspegillus niger (ATCC 10535) após 5 dias de cultivo. Placas sem rifampicina.