

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS
POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE AMBIENTES CONTAMINADOS COM
PETRÓLEO PARA USOS BIOTECNOLÓGICOS**

Glaci Venturini Moro

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marilene Henning Vainstein

Co-orientadora: Prof. Dr. Fátima Menezes Bento

Porto Alegre, agosto de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para seu desenvolvimento, este trabalho contou com fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*À Angélica e ao Diogo pelo indispensável apoio, companheirismo e exemplo;
À minha família pelo amor incondicional;
Ao meu noivo Rodrigo pelo incentivo e carinho;
Vocês fazem toda a diferença.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, professora Marilene Henning Vainstein, pela confiança, apoio e carinho. Muito obrigada por todos esses anos de parceria e ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À professora Fátima Bento pela co-orientação e disponibilidade em ajudar.

Agradeço ao professor Diogo e a professora Angélica pela ajuda incondicional durante a realização do meu doutorado.

Ao Professor Eduardo Pilau e a Rafaela Takako Almeida pela parceria e realização das análises de UHPLC.

Aos professores Augusto Schrank, Lívia Kmetzsch e Charley C. Staats pela amizade, ensinamentos e apoio;

A todos os colegas e amigos dos laboratórios pela amizade, risadas, ajudas e incentivo, em especial à Amanda, Evandro, Sara, Francine e Vanessa.

À minha grande amiga Graciele Neumann pela parceria, pelo companheirismo e apoio sempre;

Ao professor Charley pela disponibilidade e sugestões na revisão desse trabalho.

Ao professor Alexandre Macedo membro da comissão de acompanhamento.

À professora Gelsa e a professora Fátima pela disponibilização do medidor de tensão superficial.

Aos secretários do PPGBCM pela disponibilidade e auxílio no decorrer do doutorado.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização de um Ensino Superior de qualidade.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE APÊNDICE	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. Surfactantes	13
1.2. Biossurfactantes	20
1.2.1. Classes de biossurfactantes	22
1.2.1.1. Glicolípídeos	22
1.2.1.2. Lipopeptídeos	25
1.2.1.3. Fosfolípídeos ou ácidos graxos	28
1.2.1.4. Biossurfactantes poliméricos	28
1.2.1.5. Biossurfactantes particulados	29
1.2.2. Produção de biossurfactantes	29
1.2.3. Biossurfactantes produzidos por <i>Bacillus</i> spp.....	33
1.2.4. Biossíntese de surfactinas em <i>Bacillus</i> spp.	35
1.2.5. Detecção e identificação de biossurfactantes	38
1.2.6. Aplicações dos biossurfactantes	44
1.3. Comparação entre biossurfactantes e surfactantes sintéticos	48
2. OBJETIVOS	50
3. RESULTADOS	51
4. DISCUSSÃO GERAL	86
5. CONCLUSÕES	97
6. PERSPECTIVAS	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. APÊNDICE	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ala: Alanina

Asp-OMe: Éster metílico do ácido aspártico

Asp: Ácido aspártico

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*

CMC: Concentração Micelar Crítica

CTAB: Brometo de Cetil Trimetilamonio

E₂₄: Índice de Emulsificação

EM: Espectrometria de massas

ESI: Ionização por Eletrospray, do inglês, *Electrospray Ionization*

ESI/EM-EM: Espectrometria de massas com ionização electrospray, do inglês, *electrospray ionization - mass spectrometry*

g/L: gramas/litro

Gln: Glutamina

Glu: Ácido Glutâmico

Ile: Isoleucina

IV: Espectroscopia no Infravermelho

LAS: Sulfonato de Alquilbenzeno, do inglês, *Linear Alkylbenzene Sulphonate*

Leu: Leucina

m/v: razão massa/volume

m/z: razão massa/carga

[M+H]⁺: Representação da molécula ionizada através de protonação

MALDI-TOF: Dessorção ionizada por laser associada à matriz - tempo de voo, do inglês, *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time Of Flight*

MEOR: Recuperação terciária do petróleo, do inglês, *Microbial Enhanced Oil Recovery*

mg/L: razão miligramas/litro

mN/m: razão miliNewton/metro

Orn: Ornitina

PCP: Proteína Carreadora de Peptídeo

pH: potencial hidrogeniônico

Pro: Prolina

RL: Ramnolípídeo

RMN: Espectroscopia de Ressonância Magnética

rpm: rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*

Srf: Surfactina

TE: enzima tioesterase

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

UHPLC: Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada à Espectrometria de Massa de Alta Resolução, do inglês, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*

Val: Valina

µm: micrômetro

µMol/L: razão micromol/litro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos surfactantes de acordo com o grupo polar	13
Figura 2. Comportamento do surfactante na interface ar-água. Fonte: Felipe & Dias, 2017	15
Figura 3. Organização das moléculas de tensoativos	16
Figura 4. Relação entre tensão superficial, concentração de biossurfactante e formação de micelas. Fonte: Santos <i>et al.</i> , 2016	16
Figura 5. Estrutura química dos ramnolipídeos formados por uma (a), ou duas (b) moléculas de ramnose	23
Figura 6. Diferentes estruturas químicas de trealolipídeos	24
Figura 7. Exemplos de sofrorolipídeos: (a) forma acíclica diacetilada, (b) forma lactônica não acetilada	24
Figura 8. Estrutura química da surfactina	25
Figura 9. Estrutura química da iturina	27
Figura 10. Estrutura química da fengicina	27
Figura 11. Estrutura química do emulsan	29
Figura 12. Biossíntese da surfactina A. Adaptado de Bruner <i>et al.</i> , 2002 ..	37
Figura 13. Reação de transesterificação enzimática	38
Figura 14. Método de colapso da gota: (a) gota não colapsada (ausência de biossurfactante), (b) gota colapsada (presença de biossurfactante)	39
Figura 15. Teste de espalhamento do óleo: (a) amostra sem biossurfactante na cultura, (b) amostra com biossurfactante na cultura	40
Figura 16. Medida do Índice de Emulsificação: (a) amostra negativa para a formação de emulsão, (b) amostra positiva para a formação de emulsão ...	40
Figura 17. Estrutura geral de surfactinas	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de surfactantes de acordo com o grupo polar. Adaptado de Daltin, 2011.....	14
Tabela 2. Aplicações industriais dos surfactantes. Adaptado de Singh <i>et al.</i> , 2007.....	18
Tabela 3. Comparação entre as propriedades superficiais, interfaciais e a CMC de alguns biossurfactantes e de surfactantes sintéticos. Adaptado de Christofi & Ivshina, 2002.....	21
Tabela 4. Principais classes de biossurfactantes e os microrganismos produtores. Adaptado de Soares, 2014	31

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Padrão de fragmentação das surfactinas A	119
Apêndice 2. Padrão de fragmentação das surfactinas B	119
Apêndice 3. Padrão de fragmentação das surfactina monometil éster	119
Apêndice 4. Padrão de fragmentação das surfactina [Leu4]	120
Apêndice 5. Padrão de fragmentação das novas isoformas de surfactina	120

RESUMO

A contaminação por hidrocarbonetos é uma questão importante para o equilíbrio dos ecossistemas e resulta em problemas ecológicos e sociais. Os derrames de petróleo, em particular, são uma das principais fontes de contaminação de ambientes marinhos com hidrocarbonetos. Neste contexto, várias estratégias de remediação de águas contaminadas por petróleo foram desenvolvidas sendo mais frequentes a remoção física e o uso de surfactantes. Os surfactantes químicos são moléculas anfifílicas que apresentam capacidade emulsificante que reduzem a tensão superficial entre dois fluidos de diferentes polaridades. No entanto, estes compostos não são biodegradáveis e podem ser tóxicos para o meio ambiente. Uma alternativa é o uso de biossurfactantes, que são compostos sintetizados por microrganismos como subprodutos metabólicos. Os biossurfactantes apresentam vantagens quando comparados aos surfactantes tradicionais, principalmente a baixa toxicidade e a excelente biodegradabilidade. Podem ser obtidos por fermentação usando substratos de baixo custo, como açúcares e óleo vegetal como fontes de carbono. Nesse trabalho foi realizado um estudo para a identificação e a caracterização de biossurfactantes pela triagem de microrganismos isolados de ambientes contaminados com petróleo. Cinco entre 200 isolados testados foram positivos para os testes de colapso da gota, espalhamento de óleo, ensaios de emulsificação e diminuição significativa da tensão superficial abaixo de 30 mN/m. Os biossurfactantes produzidos por esses microrganismos foram caracterizados e sua identificação revelou que são bactérias do gênero *Bacillus*. Os biossurfactantes produzidos foram quimicamente caracterizados por análise por UHPLC-HRMS, indicando a produção de homólogos de surfactinas, destacando uma nova classe dessas moléculas. Cabe salientar que a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* MO4B se destacou por ser um produtor de biossurfactantes muito promissor para a reparação de danos ambientais causados por derramamentos de petróleo, através de processos de biorremediação e lavagem do solo, mesmo quando as amostras foram submetidas a alterações de pH ou expostos a elevadas temperaturas.

ABSTRACT

Oil pollution is an important issue for marine and terrestrial ecosystems and is responsible for major ecological and social problems. Oil spills, in particular, are a major source of contamination of marine environments with hydrocarbons. In this context, several strategies to clean water contaminated by oil were developed and the two most recent ones are the physical removal and the use of surfactants. Surfactants are amphiphilic molecules that have an emulsifying capacity and are capable of reducing the surface tension between two fluids of different polarities. However, these compounds are not biodegradable and may be toxic to the environment. An alternative is the use of biosurfactants, which are compounds synthesized by microorganisms as metabolic byproducts. Biosurfactants have a number of advantages when compared to surfactants, mainly low toxicity and excellent biodegradability. In addition, they can be fermented using low cost substrates such as sugars and vegetable oil as carbon sources. In this work, a study was carried out to identify and characterize biosurfactants through the screening of microorganisms isolated from environments contaminated with petroleum. Five out of 200 tested positive in drop collapse test, oil spreading, emulsification and reduction of surface tension below 30 mN/m assays. The biosurfactants produced were further investigated and have been identified as being related to the *Bacillus* genus. Additionally, the biosurfactants produced were chemically characterized via UHPLC-HRMS experiments, indicating the production of surfactin homologues, including a new class of these molecules. Worth pointing out is that *Bacillus amyloliquefaciens* MO4B has shown to be a very promising biosurfactant producer, potentially useful for the repair of environmental damage caused by oil spills, through bioremediation and soil washing processes, even when the samples were submitted to pH changes or exposed to high temperatures.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Surfactantes

Surfactantes são uma classe importante de compostos muito utilizados nos mais variados setores da indústria, com diversas aplicações em processos envolvendo produtos automotivos, alimentícios, farmacêuticos, de limpeza e em processos de refino de petróleo (Banat *et al.*, 2000; Christofi & Ivshina, 2002, Franzetti *et al.*, 2010). Surfactante é um composto orgânico caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. São moléculas anfifílicas ou anfipáticas, que apresentam uma parte hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar), podendo ser obtidas sinteticamente, através de reações químicas, ou naturalmente, através de microrganismos específicos. Os surfactantes são classificados de acordo com sua cadeia polar hidrofílica em surfactantes não-iônicos, aniônicos, catiônicos e zwitteriônicos (Figura 1).

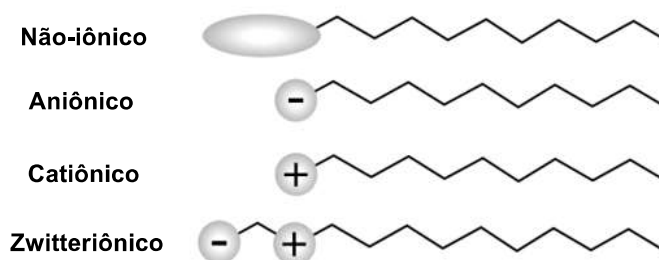


Figura 1. Classificação dos surfactantes de acordo com o grupo polar.

A porção apolar, na maioria das vezes, é uma cadeia formada por hidrocarbonetos de cadeia alifática, grupos aromáticos e policíclicos. A porção apolar confere a molécula baixa solubilidade em água devido ao efeito hidrofóbico provocado principalmente pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água (Lichtenberg *et al.*, 1983). Já a porção polar interage fortemente com o meio aquoso, permitindo ainda, a capacidade de formar microemulsões (Ron & Rosenberg, 2001). Alguns exemplos de surfactantes muito utilizados comercialmente incluem ésteres sulfatados ou sulfatos de ácidos graxos (aniônicos) e micronutrientes (sais) de amônio quaternário (catiônicos) (Nitschke & Pastore, 2002; Chen *et al.*, 2015). Alguns exemplos de diferentes tipos de surfactantes estão apresentados na Tabela 1

(Desai & Banat, 1997; Yeh *et al.*, 2005; Nitschke & Pastore, 2006).

Tabela 1. Exemplos de surfactantes de acordo com o grupo polar. Adaptado de Daltin, 2011.

Classes	Nomenclatura	Estrutura Química
Não-iônico	éter hexadecil (20)-polioxietilênico (Brij 58®)	
	Triton X-100	
Aniônico	sulfonato de alquilbenzeno (LAS)	 n = 9, 11, 13, 15, 17
	dodecil sulfato de sódio (SDS)	
	N-lauroilsarcosinato de sódio (Gardol®)	
Catiônico	cloreto de cetilpiridínio	
	brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	
	cloreto de hexadecilbenzildimetilamônio	
Zwitteriônico	cocamidopropil betaína	

Uma das propriedades mais importantes dos surfactantes é a capacidade que as moléculas possuem de se concentrarem nas interfaces dos fluidos imiscíveis com orientações específicas, conhecidas também por substâncias de adsorção, que alteram as condições prevalentes nas interfaces (Figura 2). Essas substâncias de adsorção têm capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial, aumentando a solubilidade e mobilidade dos compostos hidrofóbicos ou compostos orgânicos insolúveis (Ron & Rosenberg, 2001; Singh *et al.*, 2007).

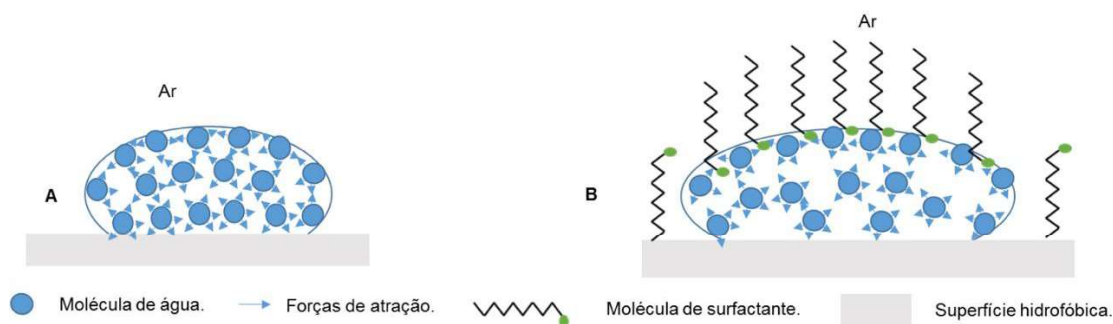


Figura 2. Comportamento do surfactante na interface ar-água.

Fonte: Felipe & Dias, 2017.

Outra propriedade fundamental dos surfactantes é sua capacidade em formar agregados orientados em meio aquoso, também conhecidos como micelas. Quando uma solução está com baixa concentração de tensoativo, as moléculas de surfactante permanecem na forma de monômeros. Se a concentração do tensoativo aumentar, os monômeros começam a saturar a interface, aumentando assim a interação desfavorável entre a fração apolar e as moléculas de água até o ponto em que os monômeros se reorganizam e se agregam formando as micelas globulares (Figura 3). A fração apolar está orientada para o centro da estrutura e a fração polar para o solvente (água) (Mulligan, 2005).

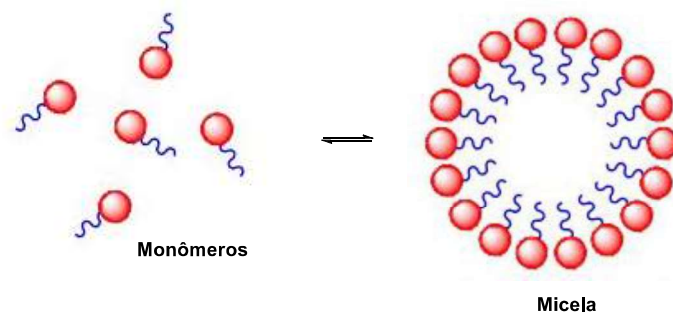


Figura 3. Organização das moléculas de tensoativos.

O tamanho da micela varia de acordo com a natureza da parte apolar do tensoativo. A concentração de tensoativos, na qual a termodinâmica do sistema tensoativo-solvente favorece a formação de micelas, é chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC), definida como a concentração mínima necessária para iniciar o processo de formação de micelas (Lin, 1996; Christofi & Ivshina, 2002; Mulligan, 2005). A partir do início da formação das micelas, a tensão superficial se mantém constante ou apresenta mudanças muito pequenas (Figura 4). Um dos índices mais utilizados para avaliar a eficiência de um surfactante é a determinação da CMC, que varia na solução aquosa em função da estrutura do tensoativo, temperatura da solução, pH, presença de eletrólitos e compostos orgânicos (Mulligan & Gibbs, 1993; Mulligan, 2005).

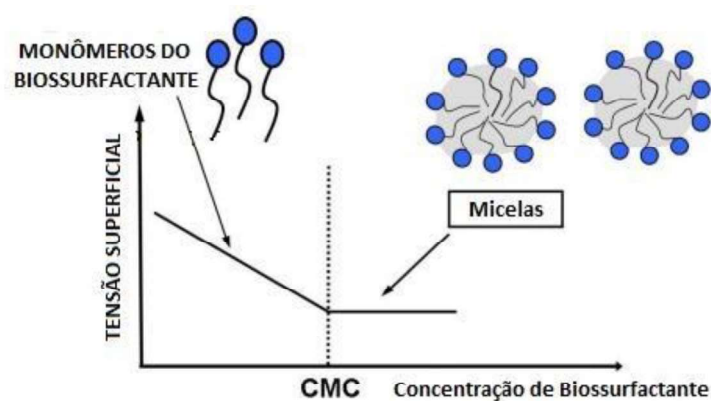


Figura 4. Relação entre tensão superficial, concentração de biossurfactante e formação de micelas. Fonte: Santos *et al.*, 2016.

Surfactantes eficientes apresentam baixos valores de CMC, ou seja, reduzem a energia livre do sistema através da substituição da maior parte das moléculas de alta energia na interface, diminuindo assim, a tensão superficial e interfacial dos líquidos. Sendo assim, um surfactante considerado eficiente é aquele capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 35 mN/m e a tensão interfacial entre água e *n*-hexadecano de 40 para 1mN/m (Mulligan, 2004; Piróllo, 2006). Alguns surfactantes apresentam também propriedades emulsificantes, auxiliando na dispersão de um líquido em outro, como óleo e água. Esta propriedade está relacionada com o tamanho da cadeia hidrofóbica e a porção hidrofílica, sendo assim, nem todos os surfactantes apresentam capacidade emulsionante (Christofi & Ivshina, 2002; Lindner, 2005; Daltin, 2011). Essas características, capacidade de redução da tensão superficial e capacidade de emulsionar líquidos, tornam os surfactantes compostos químicos amplamente comercializados e de extrema importância nos mais diversos processos.

Os surfactantes apresentam diversas aplicações industriais tais como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhabilidade, solubilização e dispersão de fases, proteção anticorrosiva, entre outras (Tabela 2).

Um dos maiores mercados para os surfactantes ainda é a indústria petrolífera, onde são amplamente utilizados para recuperação terciária do petróleo (MEOR - *Microbial Enhanced Oil Recovery*), para a remoção e mobilização de resíduos de óleo e biorremediação. Entretanto, por não serem biodegradáveis, os surfactantes podem ser tóxicos para os ecossistemas (Banat, 1995; Ron & Rosenberg, 2002; Singh *et al.*, 2007; Bueno, 2010).

Tabela 2. Aplicações industriais dos surfactantes. Adaptado de Singh *et al.*, 2007.

Área	Aplicação	Função
Petróleo	Recuperação melhorada do petróleo	Melhoramento da drenagem do óleo dentro do poço; molhabilidade de superfícies sólidas; redução da viscosidade do óleo e da tensão interfacial.
	Desemulsificante	Desemulsificação de emulsões de óleo; redução da viscosidade; agente umectante.
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos; redução da tensão interfacial; complexação de metais.
Alimentícia	Emulsificação e Desemulsificação	Emulsificante; solubilizante; desemulsificante; agente lubrificante.
	Ingrediente funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos.
Biologia	Microbiológica	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular, competição célula-célula, disponibilidade de nutrientes.
Agrícola	Biocontrole	Facilitação de mecanismos de biocontrole de microrganismos tais como parasitismo, antibiose, competição e hipovirulência.

Um dos surfactantes sintéticos mais expressivamente vendido e tradicionalmente utilizado nos últimos anos é o sulfonato de alquilbenzeno (LAS), um tensoativo aniônico constituído de uma mistura de homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares variando de C10 a C16 com predominância de C10 a C13. O LAS está presente na composição de vários detergentes, sabões e outros produtos de limpeza, além de ser usado em processos de remediação de áreas contaminadas por petróleo e derivados. O LAS é um produto regulamentado como biodegradável, mas sabe-se que este composto no meio aquático é responsável pela diminuição de oxigênio dissolvido e permeabilidade da luz, além de aumentar as concentrações de

compostos xenobióticos potencialmente tóxicos, que interferem nos processos biológicos, como o ciclo do nitrogênio, acarretando na morte de animais em grande número (Da Ros *et al.*, 1995; Haigh, 1996; Brandt *et al.*, 2001; Penteado, *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, em função dos grandes acidentes petrolíferos, os surfactantes serviram como importantes ferramentas no processo de remediação. No Kuwait em 1991, houve um derramamento de aproximadamente 5 milhões de barris de petróleo no Golfo Pérsico. Mais recentemente, em 2010, uma explosão na plataforma *Deepwater Horizon – British Petroleum*, nos Estados Unidos, foi responsável por um acidente em que vazaram aproximadamente 4,9 milhões de barris de petróleo no Golfo do México. Nestas catástrofes ambientais, o surfactante mais utilizado foi o Corexit, que contribuiu no processo de remediação das áreas contaminadas, removendo o petróleo de forma eficiente. O Corexit é composto por uma mistura de 1,2-propanodiol, 2-butoxietanol, sais de ácidos sulfônicos alifáticos. Embora apresente eficiência na remediação de águas contaminadas com petróleo, esse produto tem sido relatado como tóxico e o efeito ecológico da mistura do dispersante com óleo é desconhecida, assim como a toxicidade dos produtos de degradação do dispersante. Com isso, a eficácia do Corexit é questionável, especialmente em termos de implicações ambientais quando a biodiversidade e a abundância são alteradas de maneira não favorável (Kleindienst *et al.*, 2015).

Sabendo que a maioria dos surfactantes utilizados comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo e que não são biodegradáveis, nos últimos anos tem aumentado o interesse por surfactantes produzidos a partir de recursos renováveis, com baixa ou nenhuma toxicidade e biodegradáveis. Na busca por processos mais verdes e ambientalmente adequados, os biosurfactantes se apresentam como uma opção bastante promissora e em destaque (Zhang *et al.*, 1999; Makkar & Cameotra, 2002).

1.2. Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos que apresentam propriedades surfactantes/emulsificantes, com ação intra ou extracelular, são sintetizados por uma grande variedade de organismos vivos, desde plantas (saponinas) e microrganismos (glicolipídios), até estruturas animais mais complexas como o corpo humano (sais biliares e surfactante pulmonar) (Bento *et al.*, 2008).

Os biossurfactantes apresentam as mesmas características dos surfactantes químicos, ou seja, capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial nas soluções aquosas. Além disso, tipicamente apresentam baixos valores de CMC e capacidade de formar e estabilizar emulsões de óleos em água, o que propicia o aumento da área superficial de substratos hidrofóbicos, permitindo o crescimento de microrganismos em substratos imiscíveis de maneira mais eficiente (Rosenberg & Ron, 1999; Maier, 2003).

Os biossurfactantes podem ser obtidos por procedimentos relativamente simples como, por exemplo, processos fermentativos contendo açúcares, óleos, alcanos, resíduos industriais e agrícolas e podem apresentar diferentes estruturas químicas e propriedades surfactantes, fazendo com que tenham diferentes funções naturais com diferentes aplicações (Haba *et al.*, 2000).

A CMC é o estado de menor energia entre a água e as moléculas de biossurfactantes e, assim como para medir surfactantes sintéticos, é utilizada para medir a eficiência de um biossurfactante, sendo os valores variáveis entre 1-2000 mg/L (Desai & Banat, 1997; Nitschke & Pastore, 2002; Van Hamme & Urban, 2009). A surfactina, por exemplo, é um dos biossurfactantes mais eficientes já descritos, e tem capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m, que é próximo do valor mínimo detectável, em uma concentração muito baixa (Christofi & Ivshina, 2002). Na Tabela 3, são apresentadas as propriedades superficiais, interfaciais e a CMC de alguns biossurfactantes e de surfactantes quimicamente sintetizados, mostrando que a CMC dos surfactantes sintéticos é mais elevada quando comparada as dos biossurfactantes.

Tabela 3. Comparação entre as propriedades superficiais, interfaciais e a CMC de alguns biossurfactantes e de surfactantes sintéticos. Adaptado de Christofi & Ivshina, 2002.

Surfactante	Tensão superficial (mN/m)	Tensão interfacial (mN/m)	CMC (mg/L)
Complexo de glicolípido de <i>Rhodococcus ruber</i>	26,8	0,9	54
Trealose dicorinomicolato de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	36,0	17,4	4
Trealose tetraester de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	26,0	<1,0	15
Ramnolípídeos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29,0	0,25	50-200
Soforolípídeos de <i>Torulopsis bombicola</i>	33,0	1,8	82
Surfactina de <i>Bacillus subtilis</i>	27,0	1,0	23
Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	37,0	0,02	2120
Bromato de Cetiltrimetilamônio (CTAB)	30,0	5,0	1300
Tween 20	30,0	4,8	600
Sulfonato de Alquilbenzeno	47,0	<1,0	590

Assim como os surfactantes químicos, a estrutura dos biossurfactantes possui uma porção hidrofílica e outra porção hidrofóbica. A maioria dos biossurfactantes tem caráter aniônico ou neutro, enquanto alguns, que contêm grupos amônio, são catiônicos. A porção hidrofílica geralmente é composta por um peptídeo ou um mono, di ou polissacarídeo. A porção hidrofóbica geralmente é composta por cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados usualmente derivada de ácidos graxos, compreendendo uma cadeia de aproximadamente 8-18 átomos de carbono (Bognolo, 1999; Mulligan *et al.*, 2001, Felipe & Dias, 2017).

1.2.1. Classes de Biossurfactantes

Enquanto os surfactantes sintéticos são geralmente classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar (não-iônico, aniônico, catiônico ou zwitteriônico), os biossurfactantes são classificados conforme a sua estrutura e/ou composição química, como por exemplo, glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfolipídeos, poliméricos, dentre outros. Os biossurfactantes também podem ser agrupados como moléculas de baixo ou alto peso molecular. Biossurfactantes de baixo peso molecular incluem os glicolipídeos, lipopeptídeos ou lipoproteínas e fosfolipídeos ou ácidos graxos. Biossurfactantes de alto peso molecular incluem os poliméricos e particulados que não possuem, necessariamente, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica na mesma molécula, mas podem possuir polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos de misturas desses biopolímeros (Desai & Banat, 1997; Ron & Rosenberg, 2001; Chen *et al.*, 2015). O tipo de biossurfactante produzido por microrganismos é muito específico, podendo variar de espécie para espécie.

1.2.1.1. Glicolipídeos

Os glicolipídeos são constituídos por carboidratos associados por via glicosídica a uma longa cadeia de ácidos graxos (Desai & Banat, 1997), sendo o grupo de biossurfactante mais conhecido. O carboidrato envolvido pode ser glicose, manose, galactose, ácido galacturônico ou ramnose (Holmberg, 2001). Estas moléculas se encontram envolvidas na captação de hidrocarbonetos de baixo peso molecular por microrganismos. Dentre os glicolipídeos mais encontrados estão os ramnolipídeos, trealolipídeos e soforolipídeos (Chen *et al.*, 2015).

Os ramnolipídeos são formados por uma ou duas moléculas de ramnose ligadas a um ou dois ácidos graxos de cadeia alquílica saturada ou insaturada entre C8 e C12 (Figura 5). A ramnose é uma deoxihexose extensamente encontrada em bactéria e plantas, mas não em humanos. A L-ramnose é mais encontrada do que seu isômero D-ramnose (Rendell *et al.*, 1990; Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

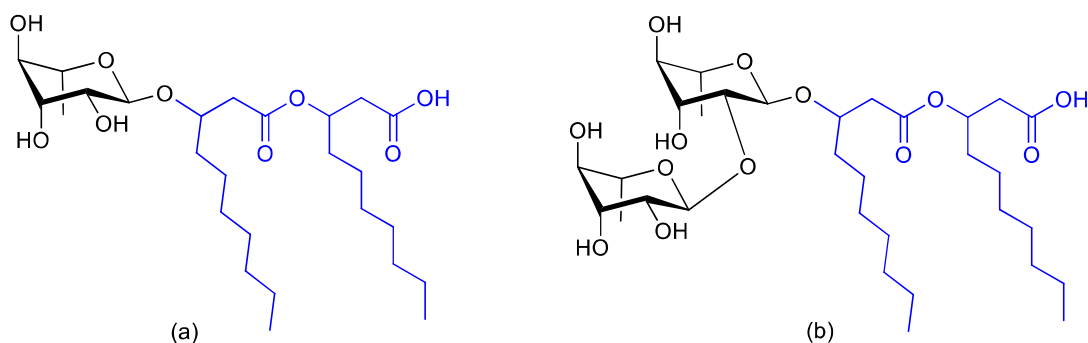


Figura 5. Estrutura química dos ramnolipídeos formados por uma (a) ou duas (b) moléculas de ramnose.

Os ramnolipídeos (RL) são produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* os quais têm sido bastante estudados e são relatados como uma mistura de espécies homólogas (Lang & Wagner, 1987). Os homólogos de ramnolipídeos são produzidos por diferentes linhagens de *P. aeruginosa* e podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN/m em uma CMC entre 5-200 mg/L (Desai & Banat, 1997; Maier & Soberón-Chavez, 2000; Abalos *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2007). Várias outras espécies também são capazes de produzir ramnolipídeos, como por exemplo espécies de *Burkholderia* spp., *Renibacterium salmoninarum*, *Tetragenococcus koreensis*, *Myxococcus* spp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pantoea* spp. (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

Os trealolipídeos são associados, na maioria das vezes, à célula e são compostos que possuem uma trealose ligada a dois ou mais ácidos graxos. A trealose é um dissacarídeo não redutor em que duas unidades de glicose são unidas via ligação 1,1- α,α -glicosídica (Figura 6). Microrganismos produtores de trealolipídeos estão distribuídos em uma ampla variedade de gêneros, incluindo *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter* e *Gordonia* (Franzetti *et al.*, 2010).

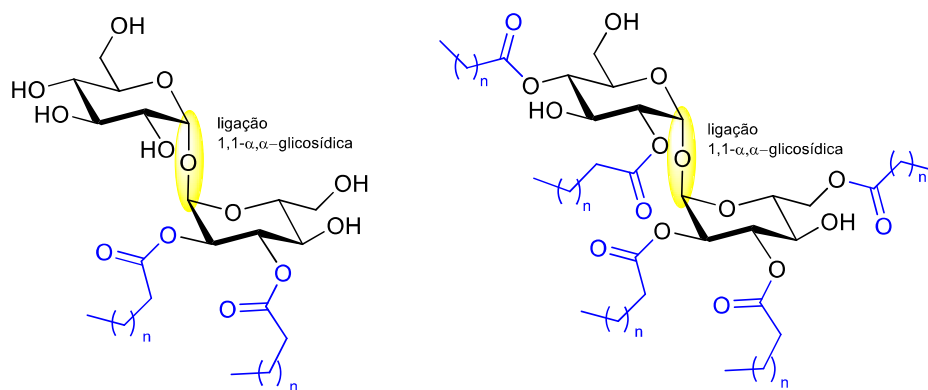


Figura 6. Diferentes estruturas químicas de trealolídeos.

Os sofrorolípídeos são compostos que possuem uma sofrorose ligada a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado (Figura 7). Sofrorose é um dissacarídeo em que duas unidades de glicose são unidas via ligação 1,2- β -glicosídica. Variações no comprimento da cadeia do ácido graxo podem ser encontradas, bem como misturas de moléculas sem e com um ou dois grupos acetilados. Além disso, sofrorolípídeos podem ser encontrados na forma cíclica, devido à lactonização entre a hidroxila da posição 4 do carboidrato com o ácido carboxílico do ácido graxo. Este tipo de glicolípídeo é produzido principalmente por leveduras como *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum* e *T. apicola* (Kosaric, 1996; Desai & Banat, 1997; Van Bogaert *et al.*, 2011).

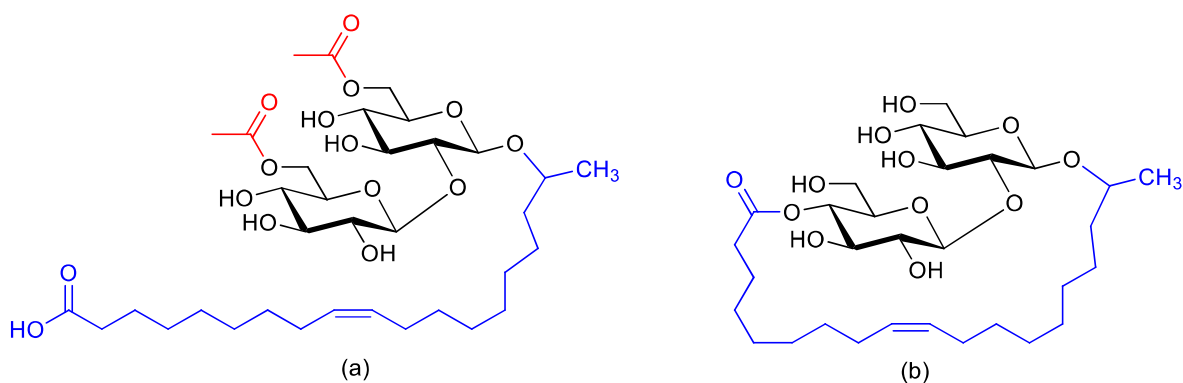


Figura 7. Exemplos de sofrorolípídeos: (a) forma acíclica diacetilada. (b) forma lactônica não acetilada.

1.2.1.2. Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são constituídos por peptídeos cíclicos resultantes da condensação entre um ácido graxo e um oligopeptídeo, que contém uma única cadeia de ácido graxo. Os lipopeptídeos apresentam atividade antimicrobiana como antibióticos, antivirais e antitumorais, imunomoduladores ou inibidores específicos de toxinas e enzimas. As surfactinas, iturinas e as fengicinas são os lipopeptídeos de maior destaque, os quais são sintetizados pelo gênero *Bacillus* spp. (Muthusamy *et al.*, 2008; Makkar *et al.*, 2011; Kanmani *et al.*, 2013).

A surfactina é o lipopeptídeo cíclico mais conhecido e um dos biossurfactantes mais potentes (Kowal *et al.*, 1998; Bonmatin *et al.*, 2003; Singh & Cameotra, 2004). A surfactina possui um anel formado por sete aminoácidos (heptapeptídeo) e uma cadeia de β -hidroxi ácido graxo, com comprimento entre 11 a 17 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (Figura 8).

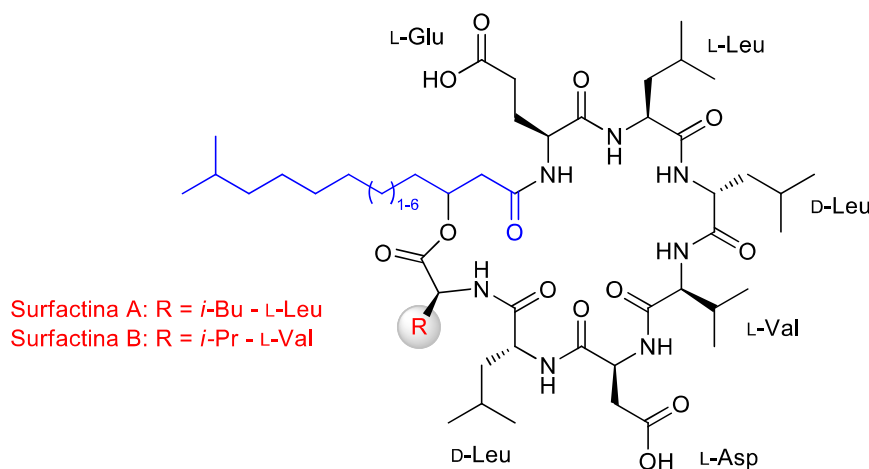


Figura 8. Estruturas químicas da surfactina A e da Surfactina B.

As surfactinas naturais são uma mistura de isoformas A, B, C e D com várias propriedades, que diferem na composição dos aminoácidos da parte peptídica. As isoformas da surfactina podem ainda ser subdivididas em séries homólogas, o qual diferem pelo número de átomos de carbono entre 11 e 17 na porção lipídica (Kowall *et al.*, 1998). A surfactina A é a principal isoforma e possui em sua porção peptídica a sequência de aminoácidos L-ácido glutâmico, L-leucina, D-leucina, L-valina, ácido L-aspártico, D-leucina, L-leucina

(Liu *et al.*, 2008).

A atividade das surfactinas é influenciada pela composição de aminoácidos, tamanho do peptídeo e da natureza da fonte lipídica. Os fatores que influenciam a síntese das isoformas e as proporções produzidas depende do microrganismo e das condições ambientais e nutricionais (Kowall *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2008). As surfactinas são compostos conhecidos por apresentar excepcional atividade superficial com capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m e a tensão interfacial do sistema água/n-hexadecano de 43 mN/m para valores abaixo de 1 mN/m e uma CMC em água de 25 mg/L. Os valores relatados para a CMC da surfactina encontram-se em torno de 10 mg/L, 12,4 mg/L e 20 mg/L (Gudiña *et al.*, 2012; De Oliveira *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). Esses valores de CMC são altamente relevantes, especialmente quando comparada a outros biosurfactantes e a alguns surfactantes sintéticos, como dodecil sulfato de sódio (SDS) e brometo de trimetil amônio (BTA), cujos valores de CMC são muito mais elevados (2120 mg/L e 1300 mg/L, respectivamente). A surfactina possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial e apresenta valores menores de CMC comparada a maioria dos surfactantes sintéticos (Kim *et al.*, 1998, Shaligram & Singhal, 2010).

Bacillus subtilis é o microrganismo citado como o de maior importância na produção de surfactina, mas, outras espécies também são capazes de sintetizar surfactinas, como *Bacillus pumilus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus amyloliquefaciens* (Chen *et al.*, 2015). A surfactina é bastante estável quando submetida à diversas condições, sendo este considerado um importante atributo, já que processos industriais estão frequentemente associados a condições extremas de pH, temperatura, força iônica, pressão e presença de solventes orgânicos (Cameotra & Makkar, 1998).

A iturina também é um lipo-heptapeptídeo que possui uma sequência peptídica diferente da surfactina (Figura 9). Esses compostos apresentam a sequência de aminoácidos ligados a um ácido graxo β -aminado como componente lipofílico, com cadeias carbônicas que variam de 13 a 17 átomos de carbono. Consiste de duas principais isoformas, A e B, que diferem apenas em um aminoácido na porção peptídica. As iturinas A e B têm ação antibiótica e antifúngica (Vater *et al.*, 2002; Ongena *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2007). As

Iturinas são produzidas por *B. subtilis* e outros *Bacillus* spp. intimamente relacionadas, tais como *B. amyloliquefaciens* (Narendra Kumar *et al.*, 2017).

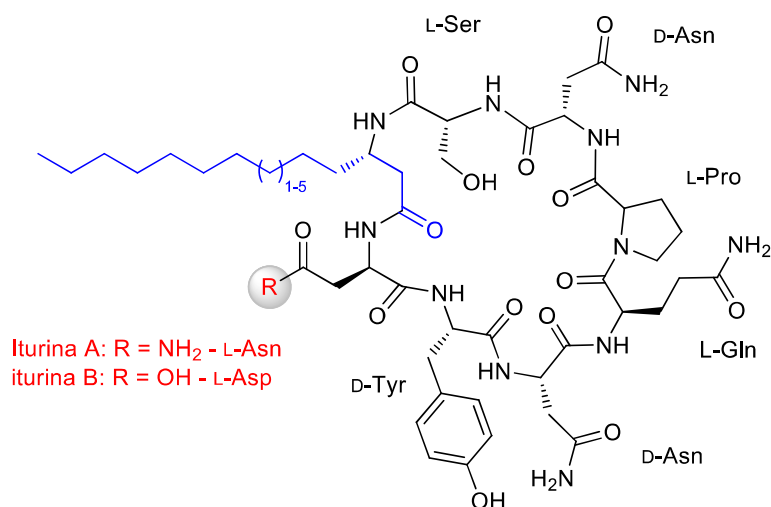


Figura 9. Estruturas químicas da iturina A e da iturina B.

A fengicina é um lipodecapeptídeo cíclico contendo um ácido graxo β -hidroxilado com uma cadeia lateral, consistindo em um número variável de átomos de carbono (Figura 10) (Steller & Vater, 2000). Consiste de duas principais isoformas, A e B, que diferem pela troca de um aminoácido na cadeia (um resíduo de aminoácido D-Ala é substituído por D-Val). A fengicina possui forte atividade antifúngica, mas é ineficaz frente a bactérias e leveduras (Vanittanakom *et al.*, 1986; Vater *et al.*, 2002; Ongena *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2007).

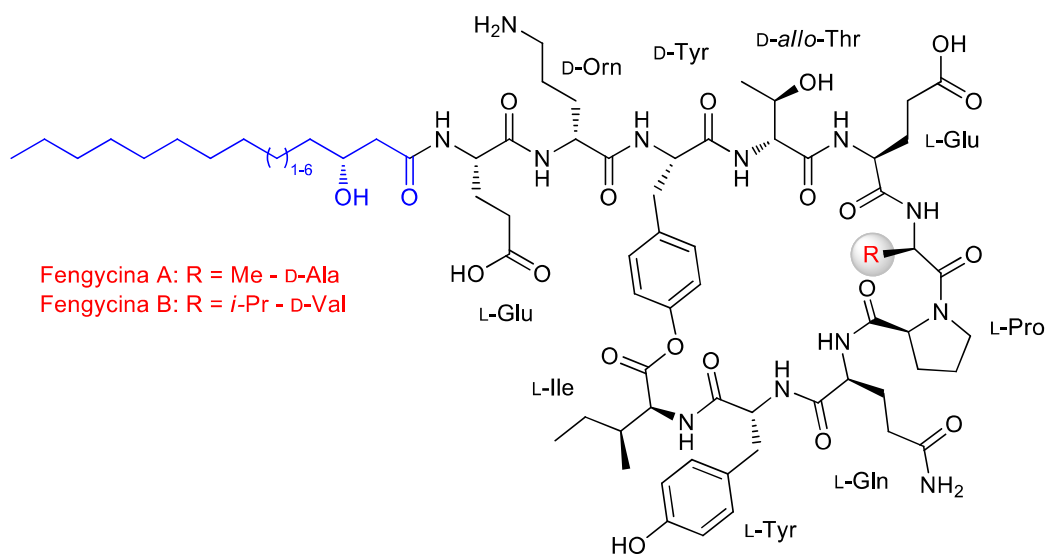


Figura 10. Estruturas químicas da fengicina A e da fengicina B.

1.2.1.3. Fosfolipídeos ou ácidos graxos

Os fosfolipídeos ou ácidos graxos podem ser produzidos por diferentes bactérias e leveduras. Esses microrganismos, quando cultivados em n-alcenos como substrato, apresentam potentes propriedades tensoativas (Muthusamy *et al.*, 2008; Rahman & Gakpe, 2008; Santos *et al.*, 2016). São capazes de formar microemulsões e diminuir a tensão interfacial entre água e hexadecano, para valores inferiores a 1mN/m (Cirigliano & Carmam, 1985). O tamanho da cadeia de hidrocarbonetos determina o balanço hidrofílico e lipofílico dos ácidos graxos e são mais ativos quando a cadeia é composta por 12 a 14 átomos de carbonos (Rosenberg & Ron, 1999). Uma variedade de microrganismos como *Acinetobacter* spp., *Aspergillus* spp., *Theobacillus theooxidants* e *Rhodococcus erythropolis* têm sido referidos como produtores de fosfolipídeos (Desai & Banat, 1997).

1.2.1.4. Biossurfactantes poliméricos

Dentre os biossurfactantes poliméricos um dos bioemulsificantes poliméricos mais estudados é o emulsan (Figura 11), seguido pelo liposan, alasan, lipomanan e outros complexos proteína-polissacarídeo. O emulsan produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* RAG -1 é um poderoso emulsificante extracelular, mesmo em baixas concentrações, na faixa de 0,01 a 0,1 g/L. É composto por uma cadeia de ácidos graxos ligado a um extenso esqueleto heteropolissacarídico e apresenta elevada massa molecular (Rosenberg & Ron, 1999). Este é um dos poucos surfactantes microbianos produzidos em maior escala (Mulligan & Gibbs, 1993). O liposan, um emulsificante extracelular, sintetizado por *Candida lipolytica* é composto por 83% de carboidrato e 17% de proteína (Gautam & Tyagi, 2005). São emulsificantes extracelulares solúveis em água, com alta afinidade na interface óleo-água. Além disso, acredita-se que esse biossurfactante apresente um importante papel na adaptação de microrganismos em mudanças específicas tais como adesão e adsorção da superfície e na utilização de fontes carbono e energia (Zajic & Seffens, 1984; Kosaric, 1996).

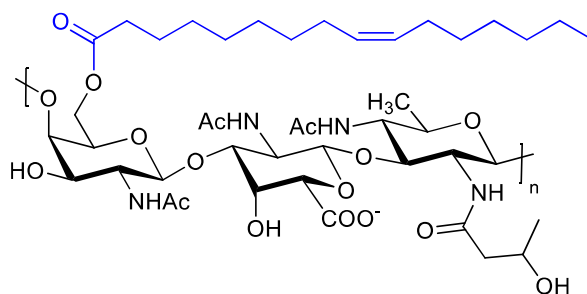


Figura 11. Estrutura química do Emulsan.

1.2.1.5. Biossurfactantes particulados

Os biossurfactantes particulados são vesículas e células microbianas que apresentam elevada hidrofobicidade superficial, sendo consideradas por si só como biossurfactantes, como por exemplo, bactérias degradadoras de hidrocarbonetos como *Serratia* spp., *Cyanobacteria* spp. e *Staphylococcus aureus*. Outro exemplo são as bactérias do gênero *Acinetobacter* envolvidas na captação de alcanos para célula microbiana, apresentando assim, elevada atividade surfactante (Nitschke & Pastore, 2002; Muthusamy *et al.*, 2008).

1.2.2. Produção de Biossurfactantes

Alguns dos surfactantes produzidos por microrganismos são constitutivos, enquanto outros requerem a presença de alcanos para induzirem a síntese. Vários autores constataram a produção de biossurfactantes em outras fontes que não hidrocarbonetos, como foi relatado por Zhang & Miller (1992), os quais extraíram ramnolipídeos de *P. aeruginosa* ATCC 9027 depois do seu crescimento em meio contendo proteose-peptona-glicose-amônio (Bento *et al.*, 2008). Alguns biossurfactantes secretados são considerados metabólitos secundários por exercerem um papel essencial para a sobrevivência dos microrganismos produtores, atuando no transporte de nutrientes, propiciando interação com outros microrganismos ou agindo como biocidas. As espécies capazes de produzir biossurfactante têm sido isoladas de vários ambientes como solo, água do mar e sedimentos marinhos, sendo esses contaminados ou não (Lin, 1996; Ron & Rosenberg, 2001).

A busca por microrganismos produtores de biossurfactante com valores baixos de CMC, baixa toxicidade e alta atividade emulsificante tem aumentado nas últimas décadas. Sabe-se que diversos microrganismos, como bactérias,

leveduras e alguns fungos filamentosos, são capazes de produzir biossurfactantes com diferentes estruturas moleculares e atividade superficial (Silva *et al.*, 2014).

Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são consideradas os melhores produtores de biossurfactantes. Contudo, existem outros microrganismos que também tem apresentado ótimos resultados, como *Candida* spp., *Corynebacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulopsis* spp. (Christofi & Ivshina, 2002; Chen *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016). A Tabela 4 descreve alguns tipos de biossurfactantes e seus respectivos microrganismos produtores.

A ação desses microrganismos vem sendo amplamente descrita em diversos trabalhos. Por exemplo, o gênero *Rhodococcus* produz glicolipídeos contendo trealose, com maior capacidade de reduzir a tensão superficial e apresentar baixa CMC quando comparados aos surfactantes sintéticos (Bicca *et al.*, 1999). O gênero de *Mycobacterium* produz um glicolipídeo que pode ser utilizado em processos de biorremediação do solo e o gênero *Nocardia* produz dois tipos de biossurfactantes quando cultivadas em *n*-hexadecano, um tipo com fortes propriedades emulsificantes e outro com forte habilidade de redução da tensão superficial (Kim *et al.*, 2000). Espécies de *Acinetobacter* produzem biossurfactantes com capacidade bioemulsificantes, como emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*, e o alasan, produzido por *Acinetobacter radioresistens* (Lang, 2002; Ron & Rosenberg, 2002). A levedura *Pseudozyma fusiformata* produz um biossurfactante termoestável com propriedade fungicida (Lang, 2002). *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus erythropolis* são descritos pela eficiência na produção de biossurfactantes para desorção de poluentes do solo (Bueno, 2008). *P. fluorescens* produzem lipopeptídeos viscosinas, que são empregados como agentes de biocontrole de fungos fitopatogênicos ou fitotóxicos (Kuiper *et al.*, 2004).

Alguns parâmetros podem influenciar o tipo, a quantidade e a qualidade dos biossurfactantes produzidos. A natureza da fonte de carbono e possíveis limitações nutricionais como P, Fe, S, Mg e Mn, influenciam diretamente a síntese de biossurfactantes, tanto por indução ou repressão. Fatores

ambientais tais como pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio podem afetar a produção de biossurfactantes através de seus efeitos na atividade e no crescimento celular e ainda, a utilização de substratos solúveis ou imiscíveis em água, que depende diretamente da fisiologia do microrganismo produtor (Desai & Banat, 1997; Fiechter, 1992; Cameotra & Makkar, 1998; Soares, 2014).

Tabela 4. Principais classes de biossurfactantes e os microrganismos produtores. Adaptado de Soares, 2014.

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Serratia rubidea</i>
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis apícola</i> , <i>Torulopsis petrophilium</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida apícola</i>
Trealolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Iturina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> sp.
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Acinetobacter</i> sp.
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Manana-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Variados tipos de substratos podem ser utilizados como fonte de carbono para produção de biossurfactantes como hidrocarbonetos, óleos vegetais e carboidratos. O sucesso na produção depende da escolha adequada do substrato que permita tanto o crescimento celular como o acúmulo do produto de interesse. Os biossurfactantes que são produzidos em substratos solúveis em água são considerados mais promissores em termos de custo de produção, porém, a síntese microbiana dos biossurfactantes ocorre especialmente durante o crescimento em substratos imiscíveis em água (Castiglioni *et al.*, 2009).

Diversos substratos alternativos de fontes renováveis vêm sendo utilizados como substrato para a produção de biossurfactantes, tais como resíduos da indústria de laticínios (soro do leite) e melação de cana, além de resíduos hidrofóbicos como efluentes domésticos, óleos vegetais, resíduos de fritura de óleos vegetais, resíduos de destilaria de óleos e glicerina (Nitschke *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004; Makkar *et al.*, 2011).

Os diferentes tipos de fontes de carbono são relatados por influenciar ainda a concentração de compostos biossurfactantes que são produzidos. Kim *et al.* (1997), avaliaram o uso de n-hexadecano, óleo de soja e glicose para produzir um biossurfactante lipopeptídico usando *B. subtilis* C9 e observaram que o biossurfactante lipopeptídico foi produzido apenas quando a glicose foi utilizada como fonte de carbono. Além disso, Yeh *et al.* (2005), destacaram a importância da concentração da fonte de carbono na produção de compostos biossurfactantes. Os autores citaram que, o uso de altas concentrações (50-60 g/L) de glicose como principal fonte de carbono para a produção de surfactina por *B. subtilis* causou a redução do pH do meio de crescimento, afetando negativamente a produção de surfactina, sendo a melhor produção de biossurfactantes obtida em concentrações de 20-30 g/L de glicose.

A eficiência da produção de biossurfactantes é um dos processos de fundamental importância para qualquer indústria dessa área. Com isso, faz-se necessário a busca pelo aumento da produtividade através da adição de componentes ao meio de cultura que induzirão a máxima ou ótima produtividade.

1.2.3. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* spp.

Bacillus são bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, formadoras de endósporos, pertencentes ao filo Firmicutes. São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, dependendo da espécie, naturalmente encontradas no solo e na vegetação, são bactérias não patogênicas, não colonizadoras de tecidos e são formadoras de esporos. Bactérias do gênero *Bacillus* se desenvolvem na faixa de temperatura mesofílica de 25-37 °C e desenvolveram um conjunto de estratégias que lhes permitem sobreviver sob condições extremas, como o estresse por falta de nutrientes (Chen *et al.*, 2015).

São capazes de produzir biossurfactantes como a surfactina, além de produzirem outros biossurfactantes como iturina, fengicina, subtilisina e bacilomicina. Embora com estruturas químicas diferentes de biossurfactantes, os comprimidos peptídicos são semelhantes. Esses lipopeptídeos além de apresentarem baixos valores de CMC e alto poder de redução da tensão superficial, apresentam também diversas propriedades biológicas tais como capacidade de afetar tumores, bactérias, fungos, vírus e micoplasmas (Vollenbroich *et al.*, 1997; Lang, 2002; Queiroga *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2007; Ongena & Jacques, 2008).

A secreção de lipopeptídeos, por *Bacillus* podem aumentar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos, considerados hidrófobos a célula microbiana, responsáveis por solubilizar e emulsionar esses substratos. De acordo com Colla & Costa, (2003), a produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp. provavelmente ocorre devido a mecanismos de proteção da célula ao ataque de outros microrganismos.

A primeira espécie de *Bacillus* descrita na literatura como produtor de surfactina foi *B. subtilis* IAM (Arima *et al.*, 1986), e desde então muitas outras linhagens de *B. subtilis* vem sendo amplamente empregadas em diversos processos industriais há várias décadas, como na produção de enzimas como proteases. As proteases, são empregadas na indústria de fabricação de detergentes e sabão em pó e para fins industriais ou laboratoriais, por serem produzidas por um organismo não-patogênico são considerados totalmente seguros para o homem e para os animais, assim como os insumos por eles produzidos (Harwood, 1992; Phan *et al.*, 2006).

A produção de biossurfactantes lipopeptídicos por *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* ocorre durante as fases exponencial e estacionária do crescimento. Os biossurfactantes emulsionam substratos e facilitam a captação desses substratos por poros presentes na membrana celular bacteriana (Peypoux *et al.*, 1999; Mulligan *et al.*, 2014). *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. licheniformis* também sintetizam biossurfactantes antimicrobianos quando cultivados em meios contendo hidrocarbonetos (Bodour *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2006).

Em testes contendo óleo diesel como única fonte de carbono, *B. amyloliquefaciens* An6 foi considerado um potente produtor de biossurfactante por apresentar propriedades desejáveis como baixa toxicidade, estabilidade sob várias condições de calor e biodegradabilidade e sua eficácia para aumentar a solubilidade do diesel melhor do que os surfactantes sintéticos além da excelente capacidade de melhorar a biodegradação de diesel por microrganismos (Ayed *et al.*, 2015).

A surfactina produzida por *B. amyloliquefaciens* TSBSO 3.8 isolado de ambientes contaminados com petróleo apresentou potencial para aplicação em MEOR devido a sua expressiva atividade superficial sob as condições físicas, químicas e adversas que podem ser enfrentadas durante o processo, com grande potencial de aplicação em acidentes ambientais, provocados pela indústria e distribuição do petróleo (Alvarez *et al.*, 2015).

O uso de resíduos industriais e agroindustriais vem sendo incentivado como uma alternativa para a produção de biossurfactantes por contribuir para a redução da poluição ambiental. Fox & Bala, (2000), utilizaram meio contendo resíduos de batata, para produção de biossurfactante por *B. subtilis* e verificaram que o microrganismo apresentou alto potencial de produção de biossurfactante através da redução da tensão superficial. Reis *et al.*, (2004), investigaram a produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 6633 utilizando uma ampla variedade de fontes de carbono renovável como açúcar comercial, caldo de cana-de-açúcar, melão de cana, suco de cana-de-açúcar, álcool, glicerol, manitol e óleo de soja. Os resultados mostraram baixas tensões superficiais e maiores índices de emulsificação, indicando a viabilidade de produzir biossurfactantes a partir de uma fonte de carbono renovável e de baixo custo.

Nitschke & Pastore (2003) testaram preparações de água residual da farinha de mandioca (manipueira) como meio de cultura para a produção de biossurfactante por isolados de *Bacillus* spp. A produção de biossurfactante foi observada em todas as preparações. Em um estudo subsequente (Nitschke *et al.*, 2004), foram utilizados dois isolados de *B. subtilis* para a produção de biossurfactante em efluente de mandioca como substrato. Tanto *B. subtilis* ATCC 21332 e *B. subtilis* LB5a, exibiram boa atividade superficial e produziram rendimentos semelhantes aos de surfactina.

Ayed *et al.*, (2014) demonstraram que *B. mojavensis* A21 foi considerado um potente produtor de biossurfactante, devido à sua alta capacidade de emulsão e sua alta tolerância a valores de pH e salinidade ácida e alcalina. Comparado com SDS e Tween 80 apresentou propriedades físico-químicas elevadas em termos de atividades de superfície e alto índice de emulsão. McInerney em 1990, também já havia descrito que a liquenisina produzida por *B. licheniformis* não foi afetada pela temperatura (até 50 °C), pH (4,5 - 9,0) e por concentrações de NaCl e Ca até 50 e 25 g/L, respectivamente.

Em trabalhos utilizando *B. licheniformis* BAS50, foi possível observar a produção de biossurfactantes que reduzem a tensão superficial da água para valores próximos a 29 mN/m, apresentando ainda estabilidade nas salinidades acima de 40 % (Yakimov *et al.*, 1995). *B. licheniformis* JF-2 também produziu biossurfactantes que reduziram a tensão superficial da água para valores abaixo de 27 mN/m (Javaheri *et al.*, 1985).

A biossíntese de alguns lipopeptídeos, como as iturinas, parece ser limitada a *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*, enquanto que a produção de surfactina e fengicina é mais difundida entre espécies múltiplas, incluindo *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mojavensis*, *B. megaterium*, *B. polyfermenticus* e *Brevibacillus brevis* (Kalinovskaya *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Huszcza & Burczyk, 2006; Haddad *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Pueyo *et al.*, 2009; Snook *et al.*, 2009; Raaijmakers *et al.*, 2010, Narendra Kumar *et al.*, 2017).

1.2.4. Biossíntese de Surfactinas em *Bacillus* spp.

Os peptídeos são compostos que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Os peptídeos podem ser

sintetizados via ribossomal ou não-ribossomal. Peptídeos sintetizados pela via ribossomal são produzidos por todas as espécies como componente principal do sistema de defesa. Na síntese ribossômica de peptídeos, a formação das ligações peptídicas é direcionada pelos ribossomos e o mRNA funciona como molde determinando a sequência de aminoácidos do composto sintetizado. Os peptídeos sintetizados pela via não-ribossomal são amplamente produzidos por bactérias. A síntese não-ribossômica utiliza uma grande variedade de substratos, como aminoácidos não-protéicos, hidroxiácidos e substâncias policetídicas. A rota enzimática para a síntese desses peptídeos se desenrola através de um complexo enzimático modular chamado de peptídeo sintase não-ribossomal (Shakeri Fard, 2010).

Os lipopeptídeos obtidos a partir de *B. subtilis* são sintetizados via catálise pela enzima peptídeo sintase não-ribossomal (Bruner *et al.*, 2002). Essas proteínas modulares são megaproteínas organizadas em unidades funcionais interativas, chamadas de módulos, que catalisam diferentes reações levando aos polipeptídeos ou transformações em peptídeos (Figura 12). Cada módulo é subdividido em vários domínios catalíticos responsáveis por cada reação bioquímica. Um módulo geralmente é formado por cerca de 1000 resíduos de aminoácidos e é responsável por um ciclo reacional envolvendo reconhecimento do substrato e ativação como adenilato (domínio A), formação do intermediário tioéster (domínio PCP - *proteína carreadora de peptídeo*) e formação da ligação peptídica (domínio C - *condensação*). Três grandes blocos codificadores para as surfactinas sintases são chamados de *srfA-A*, *srfA-B* e *srfA-C*. Eles apresentam um arranjo linear de 7 módulos, sendo 3 módulos presentes em *srfA-A* e *srfA-B* e um último módulo em *srfA-C*. A cadeia de ácido graxo é adicionada ao aminoácido ativado no primeiro bloco. A enzima tioesterase (TE), ligada ao domínio PCP na última ativação, é responsável pela liberação do produto sintetizado da enzima. Segundo Bruner *et al* (2002) inicialmente um éster seria formado entre um resíduo de serina da TE e o lipopeptídeo. Por fim, a ciclização ocorre via uma transesterificação da hidroxila, presente na cadeia do ácido graxo, com o grupo acila, resultando na formação do macrociclo surfactina. Além da participação de um resíduo de serina, resíduos de ácido aspártico e histidina catalisariam a reação de ciclização (Figura 13).

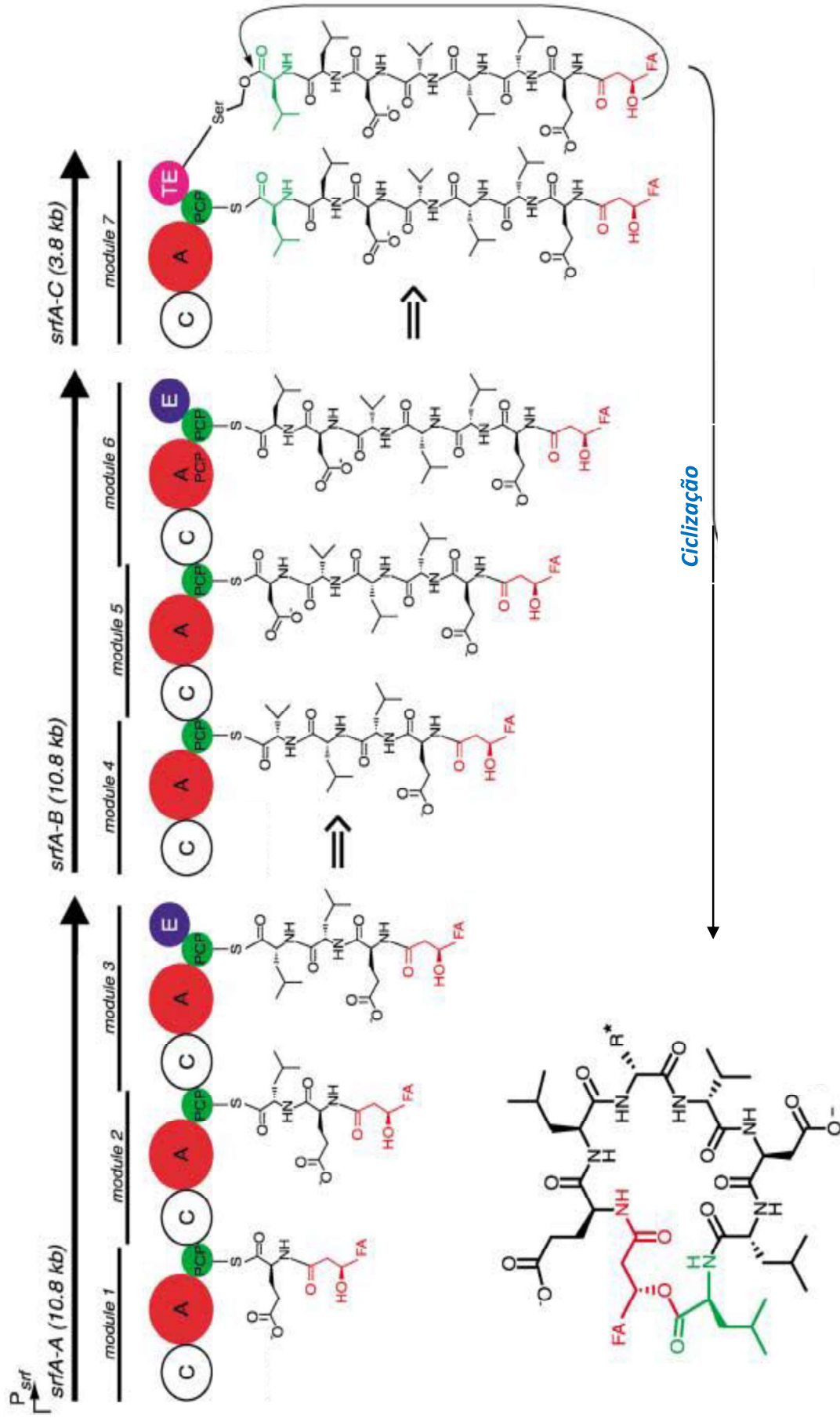


Figura 12. Biossíntese da surfactina A. A: adenilação; PCP: Proteína Carreadora de Peptídeo (formação do tioéster); C: Condensação (formação de ligação peptídica); TE: enzima tioesterase; FA: ácido graxo. Adaptado de Bruner *et al.*, 2002.

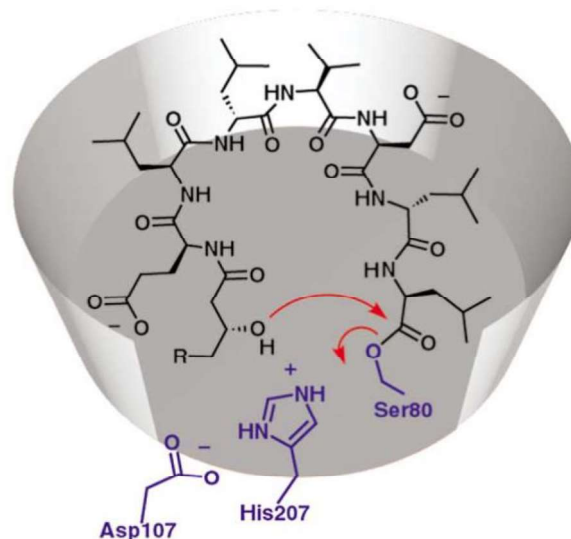


Figura 13. Reação de transesterificação enzimática.

Uma grande variedade de produtos naturais, com diversas aplicações terapêuticas, são sintetizados por enzimas multimodulares que atuam em um sistema de linha de montagem. Por exemplo, antibióticos policetídeos, fármacos para diminuição do colesterol, antibióticos peptídicos não-ribossomais da classe β -lactâmicos, vancomicina e bacitracina são sintetizados por essas enzimas (Shakeri Fard, 2010).

1.2.5. Detecção e Identificação de Biossurfactantes

Técnicas e metodologias eficientes para a detecção e identificação da produção de biossurfactantes são de extrema importância, permitindo a otimização de processo e ainda a seleção de microrganismos com maior potencial (Walter *et al.*, 2010). Os métodos utilizados para o rastreamento da presença de biossurfactantes nas amostras são baseados em algumas alterações físicas facilmente detectáveis. As propriedades físico-químicas dos compostos biossurfactantes são importantes para sua funcionalidade e também facilitam a identificação de sua presença em meio de cultura. Diversos métodos qualitativos e quantitativos podem ser utilizados para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes.

Os métodos de triagem comumente empregados para avaliação da produção de biossurfactante são baseados em sua atividade interfacial ou de superfície que contribuem para a baixa CMC destes compostos (Walter *et al.*,

2010). Além disso, as atividades de emulsificação e formação de espuma dos compostos biossurfactantes também são determinadas.

Alguns métodos qualitativos são considerados suficientes para a detecção inicial de microrganismos produtores de biossurfactantes e dentre esses métodos o mais conhecido é a técnica do colapso da gota. O método baseia-se na desestabilização de gotículas líquidas por surfactantes, descritos como compostos de superfície ativa (Jain *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 2010). A presença de biossurfactantes faz com que as gotículas líquidas se espalhem ou colapsem sobre uma superfície hidrofóbica devido à tensão interfacial entre a gota líquida e a superfície hidrofóbica (Figura 14) (Hsieh *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2010). A concentração de surfactante determina a estabilidade da gota, o que implica que este método também poderia ser usado para a quantificação indireta de biomoléculas biossurfactantes puras determinando o tamanho da gota (Bodour & Miller-Maier, 1998; Bodour *et al.*, 2003).

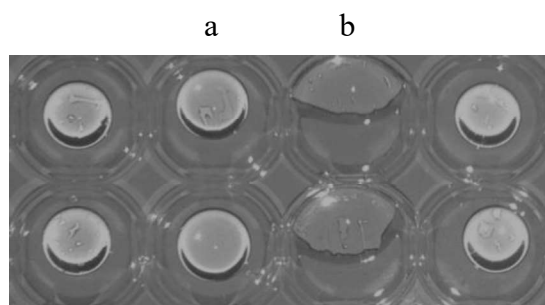


Figura 14. Método de colapso da gota: (a) gota não colapsada (ausência de biossurfactante), (b) gota colapsada (presença de biossurfactante).

A técnica de espalhamento do óleo é outro método que pode ser usado para rastrear a produção de biossurfactante. Foi descrito por Morikawa *et al.* (2000), durante um estudo da relação entre estrutura e função das biomoléculas de biossurfactante, artrofactina e surfactina. Nesse método, se houver a presença de um biossurfactante na cultura, o óleo é deslocado e uma zona límpida é observada (Figura 15). O diâmetro desta zona límpida na superfície do óleo geralmente se correlaciona positivamente com a atividade do surfactante, também conhecida como a atividade de deslocamento de óleo. Semelhante ao método de colapso da gota, é fácil de executar, rápido, nenhum equipamento especializado é necessário e apenas um pequeno volume de amostra é utilizado. Diversos grupos de pesquisa indicaram que a técnica de

espalhamento de óleo é um meio confiável de detectar a produção de biossurfactante por vários microrganismos (Hsieh *et al.* 2004; Youssef *et al.* 2004; Plaza *et al.*, 2006; Thavasi *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Belgacem *et al.*, 2015).

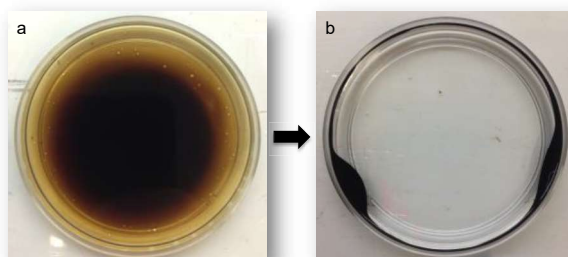


Figura 15. Teste de espalhamento do óleo: (a) amostra sem biossurfactante na cultura, (b) amostra com biossurfactante na cultura.

Testes para avaliar a capacidade dos biossurfactantes em formar emulsões também foram desenvolvidos e são expressos através do Índice de Emulsificação (E_{24}). A emulsificação é uma propriedade funcional dos biossurfactantes, que se refere à dispersão de uma fase líquida em outra, causando a mistura de dois líquidos imiscíveis (Inès & Dhouha, 2015). A medição da atividade de emulsificação é um dos métodos indiretos utilizados para o rastreamento da possível produção de biossurfactante por microrganismos. Este método foi descrito pela primeira vez por Panchal & Zajic (1978), e requer a mistura de um mesmo volume de um composto à base de hidrocarbonetos (querosene é o óleo comumente usado) com a amostra e subsequentemente deixar a mistura à temperatura ambiente por 24 horas (Figura 16).

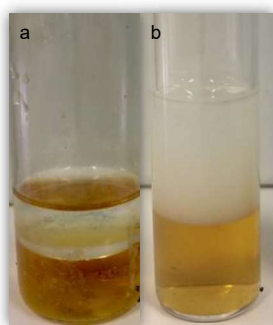


Figura 16. Medida do Índice de Emulsificação: (a) amostra negativa para a formação de emulsão, (b) amostra positiva para a formação de emulsão.

O E_{24} pode ser calculado dividindo-se a altura da emulsão após 24 horas pela altura da emulsão no tempo zero conforme equação 1. (Cooper & Goldenberg, 1987; Bento *et al.*, 2005).

Equação 1

$$E_{24} = \frac{\text{altura da camada da emulsão}}{\text{altura total do líquido}} \times 100$$

A atividade de emulsificação é uma característica importante dos biossurfactantes e é explorada por várias indústrias, especialmente na produção de emulsões de água/óleo para os cosméticos, alimentos e particularmente as indústrias farmacêuticas. Certos metabólitos, tais como bioemulsionantes (por exemplo, emulsan e liposan) são secretados por várias linhagens de *Acinetobacter calcoaticus* e *Candida lipolytica* e apresentam uma atividade de emulsificação mais alta quando comparados com biossurfactantes de baixo peso molecular sintetizados a partir de compostos à base de hidrocarbonetos (Satpute *et al.*, 2010; Uzoigwe *et al.*, 2015). Os biossurfactantes poliméricos, incluindo emulsan e liposan, têm uma massa molecular elevado e apresentam propriedades emulsionantes excepcionais (Desai & Banat, 1997). Emulsan é capaz de formar emulsões estáveis em concentrações muito baixas, e é considerado como o melhor estabilizador de emulsão. Entretanto, biossurfactantes com massas moleculares mais baixos (lipopeptídeos e biossurfactantes à base de glicolipídeos) também são conhecidos por formarem emulsões estáveis (Kim *et al.* 1997; Benincasa *et al.* 2004).

Outra forma de avaliar a produção de biossurfactante é através da medida da tensão superficial, considerada um método quantitativo confiável, preciso e muito apropriado para a seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes (Lin, 1996; Tardos, 2005; Walter *et al.*, 2008). A medição direta da tensão superficial em um sobrenadante é geralmente realizada usando um tensiômetro, através da medida de energia livre da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (Bodour *et al.*, 2003; Youssef *et al.*, 2004; Salihi *et al.*, 2009). A tensão superficial da água é de 72 mN/m e quando um surfactante é adicionado à água, esse valor é reduzido, ou seja, uma menor energia é

necessária para trazer uma molécula até a superfície e a tensão superficial é reduzida (Satpute *et al.*, 2010). Um composto biossurfactante eficaz é aquele com capacidade de reduzir a tensão superficial da água para aproximadamente 35 mN/m (Abdel-Mawgoud *et al.* 2010; Soberón-Chávez & Maier, 2011). Para a surfactina, descrita como um dos surfactantes mais eficazes, são observadas medidas reduzidas de valores de tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m (Cooper & Goldenberg; 1987, Banat, 1993). Para o biossurfactante ramnolípídeo, produzido principalmente por *P. aeruginosa*, foi descrita a redução da tensão superficial da água para valores aproximados de 30 mN/m e a tensão interfacial da água/óleo de 43 mN/m para aproximadamente 1 mN/m (Dusane *et al.*, 2010).

Recentemente, um significativo avanço em técnicas de caracterização e identificação estrutural de compostos orgânicos vem sendo descritas. Dentre os diversos métodos analíticos existentes os mais utilizados para caracterizar estruturalmente os biossurfactantes são aqueles que empregam a espectrometria de massa (EM) como método de detecção. Tipicamente a análise por espectrometria de massas está acoplada a um método cromatográfico de separação, sendo que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a mais utilizada (Mulligan *et al.*, 2014). As análises via CLAE-EM permitem a elucidação estrutural de vários biossurfactantes em um tempo relativamente curto e utilizando pequena quantidade de amostra (Peypoux *et al.*, 1999; Lin, 1996).

Dentre os diversos métodos de ionização em espectrometria de massa, o MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*) e o ESI (*Electro-Spray Ionization*) são os mais utilizados para a caracterização estrutural de biossurfactantes (Smyth *et al.*, 2010), devido às suas características de ionização branda de moléculas com altas massas moleculares sem alteração de suas estruturas. Essas técnicas brandas de ionização, ao contrário de técnicas convencionais como o impacto de elétrons (EI), que fragmenta a amostra durante a ionização, permite a ionização e detecção de moléculas mais frágeis, sem que haja decomposição das mesmas, sendo por isso indicadas para biomoléculas.

Recentemente, Sharma *et al.* (2015), utilizaram com sucesso o CLAE e MALDI-TOF para a caracterização de um composto biossurfactante à base de

lipopeptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus pumilus*. A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS) é um método altamente sensível que foi utilizado com sucesso para distinguir entre diferentes homólogos de fengicina produzidos por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis* (Wang *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2007). Além disso, o método permite a elucidação da sequência de aminoácidos da porção peptídica de fengicinas naturais e hidrolisadas (Deleu *et al.*, 2008).

Experimentos utilizando o modo EM/EM (fragmentação do íon molecular) podem ser amplamente explorados na diferenciação de produtos naturais, já que os fragmentos gerados são características definitivas de uma molécula. Desta forma, experimentos utilizando o modo íon/fragmentos (EM/EM) são mais discriminatórias do que apenas utilizar a massa do íon molecular. Atualmente, a pesquisa de produtos naturais incorpora a análise de CLAE-EM e CLAE-EM/EM, sendo que os dados desses experimentos podem ser simultaneamente adquiridos na maioria dos espectrômetros de massas. Assim, a metodologia de *molecular networking* (mapa químico) pode auxiliar na otimização do atual processo de busca de produtos naturais. Desta forma, a integração das técnicas de EM com a geração de um mapa químico (rede de ligação de padrões de fragmentação) tem se mostrado uma abordagem inovadora e efetiva para determinação das estruturas de produtos naturais (Yang *et al.*, 2013).

A metodologia de *molecular networking* permite visualizar moléculas estruturalmente semelhantes, onde as semelhanças entre os padrões de fragmentação (experimentos de EM/EM) são avaliadas via relação vetorial e exibidos como uma rede de relações massa/carga (m/z) dos íons fragmentos. O *molecular networking* é construído em três passos básicos: (i) os espectros de EM/EM são recolhidos; (ii) um mapa químico é gerado utilizando um "valor de cosseno", que determina parentesco entre espectros de EM/EM e pode ser visualizado utilizando o software Cytoscape27, uma ferramenta usada para visualizar correlações de um grande número de dados; (iii) finalmente, o mapa químico pode ser analisado, como uma representação visual de "parentesco molecular" (semelhança química) de qualquer conjunto de compostos (Watrous, *et al.* 2012; Yang *et al.*, 2013)

Metabólitos estruturalmente semelhantes apresentam padrões de fragmentação semelhantes, sendo assim, famílias moleculares tendem a se agrupar dentro de um mesmo grupo no mapa químico. Esses modelos permitem a exploração visual simultânea de moléculas idênticas, análogos, e/ou famílias de moléculas, dentro de um conjunto de dados único ou múltiplo e de composto por diversas fontes biológicas.

1.2.6. Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes são uma classe de compostos que possuem ampla diversidade química, mas com propriedades para aplicações específicas. As variadas propriedades funcionais dos biossurfactantes incluem emulsificação, desemulsificação, separação de fases, molhamento, formação de espumas, solubilização e redução de viscosidades de óleos pesados. A aplicação comercial em larga escala dos biossurfactantes têm ganhado considerável atenção mundial devido a sua baixa toxicidade, natureza biodegradável e diversidade de propriedades físico-químicas e biológicas (Nitschke *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2006).

Dentre as várias aplicações que os biossurfactantes apresentam destaca-se a recuperação melhorada do petróleo (MEOR), biorremediação, agricultura, indústrias de alimentos, têxteis, fármacos, cosméticos, higiene pessoal, detergentes, papel e celulose, tintas e mineração (Banat *et al.*, 2000).

Os principais usos dos biossurfactantes ainda estão na área da indústria petrolífera, a qual não requer alto grau de pureza. Os biossurfactantes podem ser utilizados na recuperação terciária do petróleo (MEOR) através do molhamento de superfícies sólidas, auxiliando assim a redução da viscosidade do óleo e petróleo ao ponto de fluidez, reduzindo a tensão interfacial, solubilizando o petróleo, facilitando a remoção e a mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem (Kosaric, 1992; Kim *et al.*, 2000). O MEOR é uma técnica que consiste na adição de microrganismos ou produtos de seu metabolismo, como polímeros e biossurfactantes, para a recuperação de óleos de reservatórios que já estão esgotados. Isso permite, a redução da tensão superficial óleo-rocha-água de injeção, reduzindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha. Os biossurfactantes produzidos também auxiliam na emulsificação e na quebra

dos filmes de óleo das rochas (Banat *et al.*, 2000; Nitschke & Pastore, 2002; Lazar *et al.*, 2007, Banat *et al.*, 2010). Dentre os biossurfactantes mais utilizados na indústria petrolífera destacam-se os ramnolipídeos além de outros vários tipos de biossurfactantes que têm se mostrado eficaz na recuperação de petróleo como as surfactinas e o emulsan (Sen, 2008).

Os biossurfactantes são ainda utilizados na remoção de resíduos e frações de óleos pesados que sedimentam no fundo de tanques de estocagem. Esses resíduos são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A redução da viscosidade e a formação de emulsões, permite a facilitação do bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru após quebra da emulsão (Bezerra, 2012). Testes usando biossurfactantes foram realizados para avaliar a capacidade de limpar tanques de armazenamento de petróleo e de recuperar os hidrocarbonetos da lama e ao final do processo, aproximadamente 91 % do petróleo bruto foi recuperado, sendo que os sólidos restantes continham um baixo teor de óleo residual tornando o descarte desses resíduos ambientalmente seguro. Assim, o processo torna-se altamente desejável, pois é economicamente compensador, ambientalmente saudável e é menos perigoso para as pessoas envolvidas do que o processo convencional (Banat *et al.*, 1991).

O acúmulo de materiais tóxicos na água e no solo pode ocorrer devido à derramamentos e/ou vazamentos acidentais de óleo, resíduos depositados inadequadamente em contêineres, além de contaminações que provém de aterros sanitários mal gerenciados, estabelecimentos de serviços automotivos, uso indiscriminado de pesticidas na agricultura e corantes usados nos processos de tingimento de roupas. Uma alternativa aceitável do ponto de vista ambiental é o uso de biossurfactantes para a bioremediação de áreas contaminadas tanto no mar, quanto em terra (Lima, 1996, Cameotra & Makkar, 2010). A biorremediação é um processo de tratamento que emprega microrganismos naturais ou adaptados de um local que são os principais responsáveis pela biodegradação de compostos contaminantes do meio ambiente em outros mais simples, podendo gerar como produtos finais CO₂, H₂O e CH₄. A adição de biossurfactantes também tem sido sugerida no processo de biorremediação de solos e aquíferos devido a sua capacidade de

emulsificar misturas de hidrocarbonetos do meio ambiente, minimizando os riscos para a saúde e meio ambiente (Lin, 1996; Piróllo, 2006).

Vários estudos têm mostrado o efeito dos biossurfactantes na biodegradação de contaminantes orgânicos em água e solo, porém, o tratamento de um solo contaminado é mais complexo e difícil quando comparado ao tratamento de um efluente, principalmente quando o solo contaminado abrange uma área extensa. No entanto, existem dois mecanismos que podem estar envolvidos na eficácia da biodegradação na presença dos biossurfactantes. Um destes mecanismos é devido ao aumento da solubilidade dos compostos hidrofóbicos, tornando-os mais acessíveis à célula e o outro é por interação dos biossurfactantes com a superfície celular, o que gera um aumento da hidrofobicidade e permite maior interação dessa superfície com os substratos hidrofóbicos. A estratégia a ser utilizada dependerá do tipo de poluente, das condições ambientais do solo e da viabilidade de adaptação da cultura (Kosaric, 2001; Nitschke & Pastore, 2002).

Estudo realizado por Aparna *et al.*, (2012), mostrou o efeito dos biossurfactantes na biodegradação de contaminantes orgânicos em solo, onde um biossurfactante produzido por *Pseudomonas* sp. 2B foi responsável pela remoção de valores significativos (92,4 %) de petróleo residual em areia contaminada. Santa Anna *et al.*, (2007), utilizaram os ramnolipídeos sintetizados por *P. aeruginosa* para a aplicação no processo de remediação de solo contaminado com petróleo e observaram que a ação dos biossurfactantes foi similar aos de surfactantes comerciais concentrados.

O emulsan, composto sintetizado por *A. calcoaceticus* é comercializado para a recuperação e tratamento de áreas contaminadas por hidrocarbonetos provenientes do petróleo, com redução significativa da tensão superficial e da viscosidade do óleo (Rosenberg & Rosenberg, 1981, Sen, 2008).

A capacidade dos biossurfactantes em reduzir a tensão superficial, formar e estabilizar emulsões na indústria de alimentos, permite a esses compostos o controle da aglomeração de glóbulos de gordura, estabilidade de sistemas aerados, melhoramento da textura e tempo de prateleira de produtos contendo amido, modificação de propriedades reológicas de massas de trigo, melhora da consistência e textura de produtos baseados em lipídeos e ainda apresentaram grande potencial de aplicação em preparações de molhos

(Kachhol & Schlingmann, 1987). Estudos com ramnolipídeos mostraram que esse biossurfactante apresenta melhoria de estabilidade, textura, volume e conservação de produtos de padaria (Van Haesendonck & Vanzeveren, 2004).

Mireles *et al.*, (2001), descreveram o uso de surfactina como agentes antiadesivos na indústria de alimentos, sendo capazes de reduzir a formação de biofilmes formados por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* em placas de PVC.

No mercado de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal os biossurfactantes vêm ocupando grande destaque devido as propriedades físico-químicas e boa compatibilidade com a pele, aceitabilidade ecológica e propriedades biológicas (Banat *et al.*, 2000). Eles são usados como emulsificantes, agentes espumantes, solubilizantes, agentes umidificantes e de limpeza. Ramnolipídeos já foram patenteados e usados como produtos antirrugas e antienvhecimento na indústria de cosméticos (Piljac & Piljac, 1999).

Os biossurfactantes se apresentam como uma alternativa apropriada ao uso de agentes terapêuticos e medicamentos sintéticos, por possuir atividades antivirais, antitumorais e antibacterianas que os tornam relevantes moléculas para atuar como agentes terapêuticos no combate a doenças. Dentre as diversas categorias de biossurfactantes, os lipopeptídeos como surfactinas são particularmente interessantes e possuem uma expressiva atividade de superfície devido à ação como agentes antibióticos, antivirais, antitumorais, imunomoduladores ou como específicas toxinas e inibidores enzimáticos (Desai & Banat, 1997; Seydlová & Svobodová, 2008).

A surfactina possui um vasto espectro de aplicação farmacêutica, das quais podemos citar a inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas (Banat *et al.*, 2000), além de atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiviral (Nitschke & Pastore, 2002).

O composto flocculosin produzido a partir da *P. flocculosa* mostrou atividade contra diversas leveduras patogênicas associadas a micoses humanas (Mimee *et al.*; 2005). Já os ramnolipídeos produzidos a partir de resíduos de óleo de soja tiveram atividade antimicrobiana contra várias bactérias e fungos, entre eles, *B. cereus*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehei* e *Neurospora crassa* (Nitschke *et al.*, 2010).

Outras aplicações dos biossurfactantes incluem a propriedade emulsificante no processamento de matérias-primas, a formulação de herbicidas e pesticidas, para a agricultura, no setor de mineração onde são utilizados no processo de separação dos minerais, na indústria de tintas, por gerar uma maior dispersão dos componentes e aumentar as propriedades da mistura (Kosaric, 2001). Há ainda aplicações na indústria têxtil, papel, construção civil, entre outros (Nitschke & Pastore, 2002).

1.3. Comparação entre biossurfactantes e surfactantes sintéticos

Os biossurfactantes devido à sua diversidade, quando comparados com os surfactantes sintéticos convencionais possuem as seguintes vantagens: baixa toxicidade, biocompatibilidade e digestibilidade, que permitem sua aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e temperos alimentares, baixa CMC possibilitando maior taxa de redução de tensão superficial em menores concentrações, alta biodegradabilidade, o que os torna adequados para aplicações na biorremediação, tratamento de resíduos e derramamento de óleo. A matéria-prima é de fácil disponibilidade para a produção de biossurfactante e possuem maior habilidade para complexar metais pesados e melhor capacidade espumante. Em condições extremas como elevada temperatura, salinidade ou variações de pH, os biossurfactantes geralmente não perdem sua capacidade de emulsificar ou de reduzir a tensão superficial do meio (Banat *et al.*, 2000; Nitschke & Pastore, 2002).

Vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídeos e glicopeptídeos, funcionam como antibióticos. Permitem o desenvolvimento de microrganismos, pela capacidade de emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos e possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os tornam comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência. Além disso, os biossurfactantes, podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e produzidos em grande escala, um fator importante à medida que o preço do petróleo aumenta. Assim os biossurfactantes estão assumindo grande importância sobre os surfactantes químicos (Kim *et al.*, 2000; Banat *et al.*, 2000; Jennings & Tanner, 2000; Nitschke & Pastore, 2002; Andrew *et al.*, 2004; Nitschke *et al.*, 2010).

Apesar de bastante promissor o uso de biossurfactantes, a utilização em larga escala ainda é um desafio devido aos altos custos de produção associado ao uso de substratos onerosos e aos métodos de recuperação dos produtos que nem sempre são eficientes e geram baixos rendimentos (Nitschke & Pastore, 2002).

Uma alternativa ao alto custo de produção de biossurfactantes é o emprego de mosto fermentado com células inativadas, eliminando assim os custos relativos à fase de extração, concentração e purificação do biossurfactante (Santa Anna, 2002). Além disso, Kosaric *et al.*, (1987), já citavam que o emprego de resíduos industriais na produção de biossurfactantes viabilizaria ainda mais o processo pela redução de seu custo.

Os autores mencionavam ainda que, mesmo com as barreiras econômicas para produção do biossurfactante, o surfactante quimicamente sintetizado tem o petróleo como matéria-prima, que tem seu custo variável e passível de esgotamento, necessitando assim de tecnologias alternativas para a produção comercial dos outros tensoativos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação de microrganismos produtores de biossurfactantes isolados de ambientes contaminados com petróleo e a caracterização dos biossurfactantes produzidos.

Objetivos Específicos

- Realizar a seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes isolados de ambientes contaminados com petróleo;
- Determinar a capacidade emulsificante dos microrganismos produtores de biossurfactantes.
- Caracterizar as classes e tipos de biossurfactantes produzidos pelos microrganismos selecionados;
- Identificar os microrganismos selecionados;
- Avaliar a estabilidade do biossurfactante por medidas da tensão superficial e índice de emulsificação frente a variações no pH, tempo de exposição a elevadas temperaturas, pressão e diferentes concentrações salinas.

3. RESULTADOS

Os resultados apresentados foram publicados na forma de um artigo científico no periódico *Microbial Biotechnology* (Moro *et al.*, 2018).

As contribuições de cada autor no artigo publicado foram as seguintes: Moro, G. V., realizou a triagem de microrganismos e experimentos referentes à produção, determinação de propriedades, isolamento dos biossurfactantes e redação do manuscrito. Moro, G. V. e Napp, A. N., realizaram os experimentos de identificação molecular. Moro, A. V., Almeida, R. T., Porto, C. e Pilau, E. J., realizaram e analisaram os experimentos UPLC-HRMS. Ludtke, D. S., Moro, A. V. e Vainstein, M. H. auxiliaram o projeto e escreveram o manuscrito com a contribuição de todos os autores. Vainstein, M. H., coordenou o projeto. Todos os autores contribuíram para a discussão dos resultados e revisão do manuscrito.

Identification and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry characterization of biosurfactants, including a new surfactin, isolated from oil-contaminated environments

Glaci V. Moro,¹ Rafaela T.R. Almeida,²
Amanda P. Napp,¹ Carla Porto,² Eduardo J. Pilau,²
Diogo S. Lüdtkke,³ Angélica V. Moro^{3,†} and
Marilene H. Vainstein^{1,*†} 

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá (UEM), 87020-900, Maringá, PR, Brazil.

³Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Summary

Biosurfactant-producing bacteria were isolated from samples collected in areas contaminated with crude oil. The isolates were screened for biosurfactant production using qualitative drop-collapse test, oil-spreading and emulsification assays, and measurement of their tensoactive properties. Five isolates tested positive for in the screening experiments and displayed decrease in the surface tension below 30 mN m⁻¹. The biosurfactants produced by these isolates were further investigated and their molecular identification revealed that they are bacteria related to the *Bacillus* genus. Additionally, the biosurfactants produced were chemically characterized via UHPLC-HRMS experiments, indicating the production of surfactin homologues, including a new class of these molecules.

Received 26 January, 2018; revised 11 April, 2018; accepted 12 April, 2018.

*For Correspondence. E-mail mhv@cbiot.ufrgs.br; Tel. +55 (51) 33086060; Fax +55 (51) 33087309.

†Shared last co-authorship.

Microbial Biotechnology (2018) 0(0), 1–11

doi:10.1111/1751-7915.13276

Funding Information

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

Introduction

A variety of remediation strategies have surfaced as a way to minimize the damage created by the liberation of hydrocarbons onto the environment. In this context, a number of cleaning strategies have been developed for oil-contaminated water; the two most frequent being physical removal and the use of chemical dispersants, also known as surfactants. Surfactants are amphiphilic molecules with both hydrophilic and hydrophobic moieties; they display emulsification abilities and also reduce the surface tension between two fluids of different polarities (Banat *et al.*, 2010; Franzetti *et al.*, 2010; Hassanshahian, 2014). However, these compounds are not biodegradable and can be toxic to the environment. An alternative solution to this problem is the use of biosurfactants, which are produced by a wide range of different microorganisms through relatively cheap fermentation processes using sugars or vegetal oils as carbon sources. Biosurfactants have received growing attention due to their advantages over synthetic surfactants, these include biodegradability, low water toxicity and higher tolerance levels to temperature, pH and salt concentration (Yang *et al.*, 2015). Biosurfactants can be chemically classified into low-molecular-weight compounds (e.g. glycolipids and lipopeptides) and high-molecular-weight compounds (e.g. polysaccharides, proteins and lipoproteins) (Zhou *et al.*, 2015). Amongst the most efficient biosurfactant-producing microorganisms are those from the genus *Bacillus*, mostly due to its ability to produce cyclic lipopeptides bearing a long acyclic side-chain. The three main families of lipopeptides produced by *Bacillus* spp. are surfactins, iturins and fengycins (Geissler *et al.*, 2017). Each of these families of lipopeptides consists of several congeners, which differ either in the length of the fatty acid side-chain or in the amino acid sequence at the cyclic peptide (Jacques, 2011).

Biosurfactants have been used in a number of environmental applications, particularly in the bioremediation of oil spills and in the removal of residual oil from storage tanks (Sousa *et al.*, 2012). Additionally, biosurfactants have potential uses as emulsifiers in the food, cosmetic

and pharmaceutical industries. The surfactin lipopeptide is known for its antiviral, antibacterial and antitumoral properties, while iturins and fengycins display antifungal properties (Malfanova *et al.*, 2012; Meena and Kanwar, 2015).

Considering the importance of the discovery of new and efficient biosurfactant-producing organisms, our results regarding the isolation, identification and characterization of biosurfactants by the screening of microorganisms isolated from oil-contaminated environments are herein outlined (Gudiña *et al.*, 2012). A detailed study to characterize the chemical composition of the biosurfactants produced was carried out. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) revealed the production of a series of surfactin homologues, including a new class of these biosurfactants.

Results and Discussion

Screening of microorganisms for the production of the biosurfactants

Two hundred microorganisms isolated from oil-contaminated soil samples obtained from different Brazilian terrestrial sites were used in this study. These microorganisms were subjected to liquid fermentation using 5% glucose as the only carbon source, to evaluate their biosurfactant-producing ability. Crude oil was also used as the carbon source in preliminary experiments. However, only poor production of biosurfactants was observed, even in longer incubation periods. Therefore, to assess whether the microorganism had the ability to produce biosurfactants or not, the faster and more efficient growing method, using glucose as the carbon source, was chosen.

The drop-collapse test and oil-spreading assay are qualitative and easy-to-read tests which were used for preliminary evaluation of the ability of a given microorganism to produce a biosurfactant. Initial screening revealed that 14 out of 200 microorganism isolates tested positive for both assays (Table 1). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 was used as the positive control. As the negative control, a sample of the MSM supplemented with 5% glucose was used.

Tensoactive properties of biosurfactants

The 14 isolates were then subjected to the emulsification assay (E_{24}) and measurement of the surface tension (Table 2). It is worth pointing out that despite displaying good results in the drop-collapse and oil-spreading assays, some of the isolates did not perform well in the emulsification assay. For example, negative results were observed with ODW109, ODW115, ODW16, ODW4A and *P. aeruginosa*, while MO13 and ODW04 have shown low emulsification ability. It should be mentioned, however,

Table 1. Biosurfactant production by microorganisms isolates cultivated in MSM with 5% glucose as the only carbon source.

Isolates	Origin	Drop-collapse test ^c	Oil-spreading test ^c
Negative control ^a	–	–	–
Positive control ^b	UFRGS	+++	+++
BPB 1.6	UFRGS	++	++
ODW02	ODW	+++	++
ODW109	ODW	++	++
ODW115	ODW	++	+
ODW12	ODW	+++	++
ODW123	ODW	++	+
ODW15	ODW	++	++
ODW16	ODW	++	+
ODW04	ODW	++	+
MO13	UFRGS	+++	+++
MO4A	UFRGS	++	++
MO4B	UFRGS	+++	+++
BPB 1.18	UFRGS	++	++
MO74	UFRGS	++	++

^aNegative Control = MSM medium with 5% glucose.

^bPositive control = *P. aeruginosa* ATCC 27853.

^cSymbol means: (–) no results; (+) average results; (++) good results (+++) excellent results.

Table 2. Measurements of emulsification index (E_{24}) and surface tension of culture after growth of isolates in minimal medium with 5% glucose as the carbon source for the production of biosurfactants. The results for water, ethanol, negative control and positive control (*Pseudomonas aeruginosa*) are also shown.

Isolates	E_{24} (%) ^a	Surface tension (mN m ⁻¹) ^a
Negative control	0	70.7 ± 0.09
Positive control	0	28.4 ± 0.16
Water	Not applicable	71.8 ± 0.25
Ethanol	Not applicable	23.0 ± 0.11
BPB 1.6	71.8 ± 3.12	34.9 ± 0.58
ODW02	80.5 ± 8.33	28.8 ± 0.00
ODW109	0	34.2 ± 0.16
ODW115	0	33.9 ± 0.08
ODW12	77.7 ± 5.55	28.7 ± 0.41
ODW123	66.8 ± 6.84	38.7 ± 0.64
ODW15	68.3 ± 1.66	28.4 ± 0.00
ODW16	0	31.7 ± 0.70
ODW04	34.3 ± 9.37	34.8 ± 1.23
MO13	36.1 ± 2.77	27.1 ± 0.64
MO4A	0	35.2 ± 0.95
MO4B	65.7 ± 0.98	27.6 ± 1.05
BPB 1.18	72.2 ± 5.55	32.2 ± 0.86
MO74	71.6 ± 3.40	31.9 ± 0.10

^aValues reported are averages of three replicates ± the standard error.

that these tests are used to measure different properties of tensoactive compounds. The remaining eight isolates have displayed excellent results, with E_{24} in the range of 65.7–80.5%, values that are higher than the 40%, which is considered satisfactory (Youssef *et al.*, 2004).

A decrease in the surface tension measurements was observed in the selected isolates, in comparison with pure water and the negative control. For example, five isolates

(ODW02, ODW12, ODW15, MO13 and MO4B) and the positive control (*P. aeruginosa*) have displayed surface tensions below 30 mN m^{-1} , which are exceptional results when compared to existing literature, which indicates that a surface tension value of 35 mN m^{-1} is required for an efficient biosurfactant (Patowary *et al.*, 2015). All tests were performed with cell-free supernatants. This is an important feature, as isolates that liberate biosurfactants into the culture medium render the recovery process simpler, making them more interesting from an industrial perspective (Kuyukina *et al.*, 2001; Batista *et al.*, 2006).

Despite the negative result displayed by the *P. aeruginosa* supernatant in the emulsification assay, other tensoactive properties experiments such as oil spreading, drop collapsing and surface tension experiments tested positive and the production of biosurfactants was confirmed. Similar behaviour was also observed by other authors (Belgacem *et al.*, 2015). It is known from the literature (Christova *et al.*, 2011; Ndlovu *et al.*, 2017; Nicolò *et al.*, 2017) that several growing factors such as the carbon source, specific culture conditions, age of culture and the *Pseudomonas* strain influence the composition of the rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas*, influencing the emulsification activity.

The isolates that produced biosurfactants which displayed surface tensions below 30 mN m^{-1} (ODW15, ODW12, ODW02, MO4B and MO13) were selected for molecular identification, chemical characterization of the biosurfactants produced, determination of their critical micelle concentration (CMC) and chemical stability.

Molecular identification

Molecular identification of the five selected isolates was performed based on the 16S rRNA gene sequences, using the GenBank BLAST tool. It was found that all of the microorganisms were closely related to the *Bacillus* genus. The isolates were related to the following species: ODW15: *Bacillus subtilis* (99%), ODW12: *Bacillus gibsonii* (98%), ODW02: *Bacillus subtilis* (99%), MO4B: *Bacillus amyloliquefaciens* (99%) and MO13: *Bacillus amyloliquefaciens* (99%). It is worth pointing out that only the best-performing microorganisms have been molecularly characterized. From the entire panel studied, microorganisms that were not *Bacillus* have been identified. However, as those did not perform well as biosurfactant producer, further efforts for a more detailed characterization were not pursued.

Chemical characterization of the biosurfactants

The chemical biosurfactant characterization of isolates *B. subtilis* ODW15, *B. gibsonii* ODW12, *B. subtilis* ODW02, *B. amyloliquefaciens* MO4B and

B. amyloliquefaciens MO13 was performed using TLC and UHPLC-HRMS techniques. For the characterization of the biosurfactants, the supernatants of the bacterial cultures were initially extracted with chloroform/methanol, yielding brown oils after the removal of the organic solvent. TLC analysis was performed using ethyl acetate as the eluent and the plates were visualized; ninhydrin was used as a developing agent for the detection of peptides, anisaldehyde staining for the detection of carbohydrates and anthrone for the detection of reducing sugars. The TLC analysis suggested that the biosurfactants produced were peptides, as they developed colour when ninhydrin was used (Smyth *et al.*, 2010). When the developing agent anthrone was used, a blue colour was not observed in any of the samples. However, the positive control *P. aeruginosa*, known for the production of rhamnolipids, showed a blue colour when exposed to anthrone. Altogether, these findings further support the view that the biosurfactants produced are not glycolipids, but are instead lipopeptides.

High-resolution mass spectrometry studies

To fully elucidate the structures of the biosurfactants produced, UHPLC-HRMS studies have been performed, and these studies revealed the presence of surfactins (Fig. 1). The surfactin family consists of a mixture of surfactin isoforms, in which an amino acid of the cyclic peptide chain of surfactin Glu/Leu/Leu/Val/Asp/Leu/Leu, is replaced by another amino acid (Peypoux *et al.*, 1994). These isoforms were differentiated according to their fragmentation pattern and structural features (Fig. 1A–E). The MS/MS spectra of surfactins isoforms presented common fragments $[M+H]^+$ at m/z 685.44 (Fig. 1A), 671.43 (Fig. 1B), 699.46 (Fig. 1C) and 699.46 (Fig. 1D). These ions are from characteristic amino acid sequences, previously reported as Val/Leu/Asp/Val/Leu/Leu, Leu/Leu/Asp/Val/Leu/Leu, Leu/Leu/Asp-OMe/Val/Leu/Leu and Leu/Leu/Asp/Leu/Leu/Leu respectively (Bonmatin *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2010; Biniarz and Lukaszewicz, 2017). Common fragments of an isoform with Val/Leu/Asp/Val/Leu/Val as amino acid sequence have been found and are proposed in Fig. 1E, which is a new surfactin that, to the best of our knowledge, is not reported in the literature.

The MS/MS spectrum of $[M+H]^+$ ion with m/z 1036.6869 presented fragments corresponding to losses of amino acid residues Leu/Leu/Asp/Val/Leu/Leu, with m/z 923.6034, 810.5202, 695.4935, 596.4253, 483.3418 and 370.2570 respectively (Fig. 2). The m/z 370.2570 corresponded to glutamic acid residue with aliphatic fatty acid chains containing 15 carbons, indicating similarities between the proposed surfactin A (C15) produced by all five selected samples and literature surfactin (Liao *et al.*, 2016). Additional fragment ions $[M+H]^+$ confirmed the

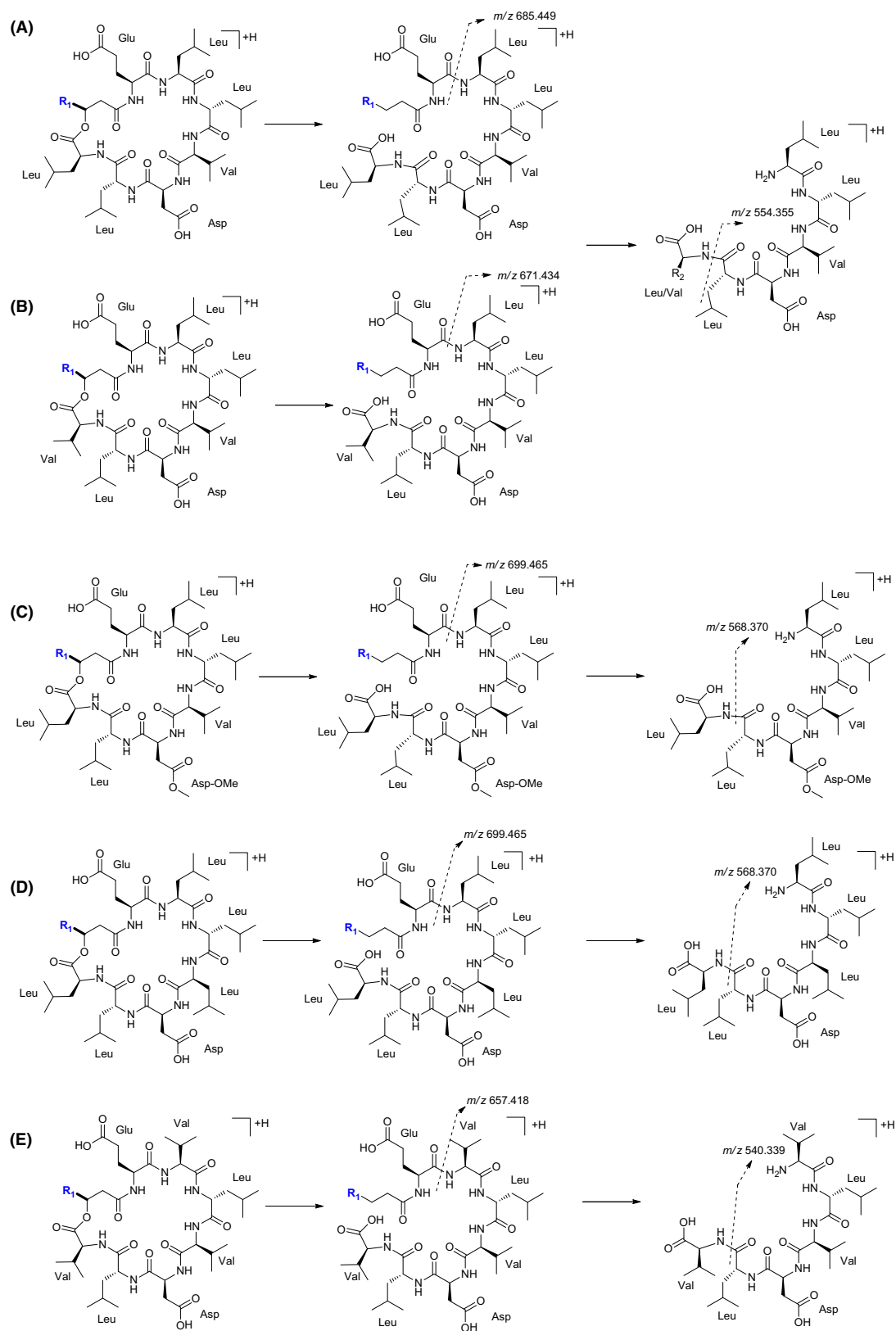


Fig. 1. Fragmentation pattern for surfactin isoforms. (A) Surfactin A, fragment ions with m/z 685.449 and 554.355. (B) Surfactin B, fragments ions with m/z 671.434 and 554.355. (C) Surfactin monomethyl ester, fragments ions with m/z 699.465 and 568.370. (D) [Leu4]surfactin, fragments ions with m/z 699.465 and 568.370. (E) Isoform surfactin, fragments ions with m/z 657.418 and 540.339. Groups R1: (CH₂)₅-11CH(CH₃)₂.

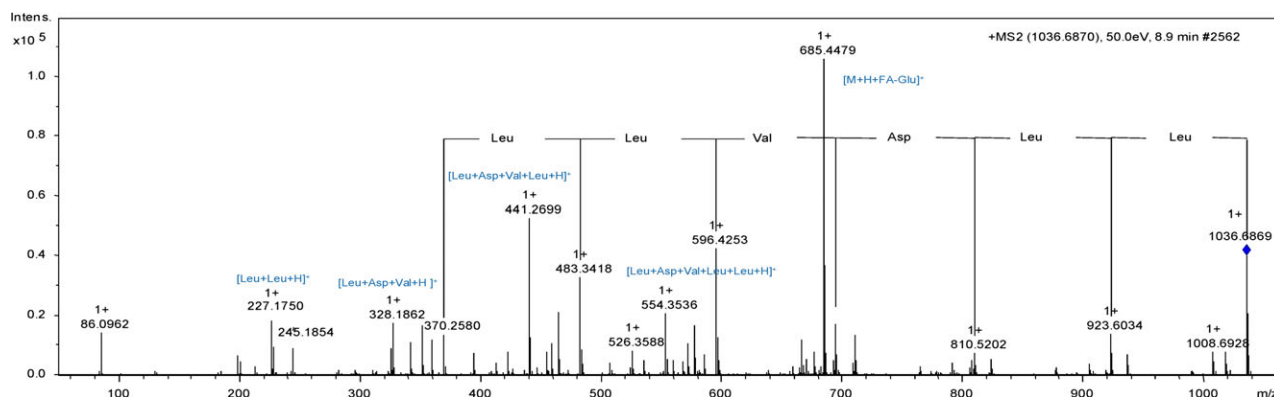


Fig. 2. Fragmentation spectrum ESI(-)-MS/MS of ion m/z 1036.6855 of sample *B. amyloliquefaciens* MO4B and the fragmentation proposal for isoform Surfactin A (C15).

presence of amino acid residues sequence as m/z 227.1750 [Leu+Leu+H]⁺, m/z 328.1862 [Leu+Asp+Val+H]⁺, m/z 441.2699 [Leu+Asp+Val+Leu+H]⁺ and m/z 554.3536 [Leu+Asp+Val+Leu+Leu+H]⁺. The MS/MS spectra of [M+H]⁺ ions for all surfactins are depicted in the Supporting Information, in Figs S1–S17.

The molecular networking analysis of the five selected extracts showed compounds with m/z differences of 14.015, 28.035 and 42.047, suggesting molecules with different lengths of fatty acid chains within the same isoform family (Fig. 3).

The visualization of mass differences on the chemical map leads to further investigations on the series of homologues, which were confirmed by manual interpretation of their MS/MS spectrum. Series homologue from ions [M+H]⁺ of surfactin isoforms are displayed in Table 3 for *B. amyloliquefaciens* MO4B. The same analysis was performed for all samples, and the results are depicted in the Supporting Information in Tables S1–S5.

Critical micelle concentration

The CMC is the minimum concentration of a tensoactive compound necessary to reduce the surface tension to the maximum extent. The CMC is a characteristic property of each tensoactive compound, and it is commonly used to define its efficiency (Ferhat *et al.*, 2011). Measurement of the CMC was performed for the five most promising isolates, *B. subtilis* ODW15, *B. gibsonii* ODW12, *B. subtilis* ODW02, *B. amyloliquefaciens* MO4B and *B. amyloliquefaciens* MO13, using the cell-free crude biosurfactant. The results are shown in Fig. 4.

According to Zhang and Miller (1992), the concentration needed to reduce the water surface tension from 71.2 mN m⁻¹ to values below 40 mN m⁻¹ is typically between 1 and 200 mg l⁻¹. As can be seen in Fig. 4, in our samples four out of the five isolates have been able

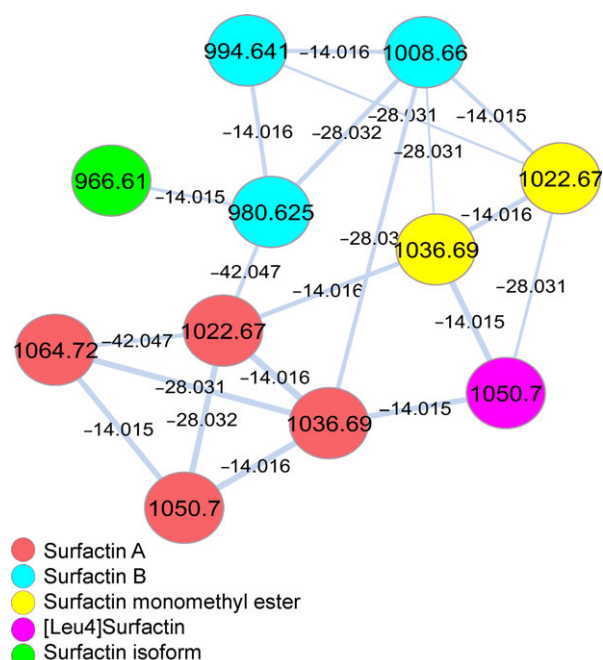
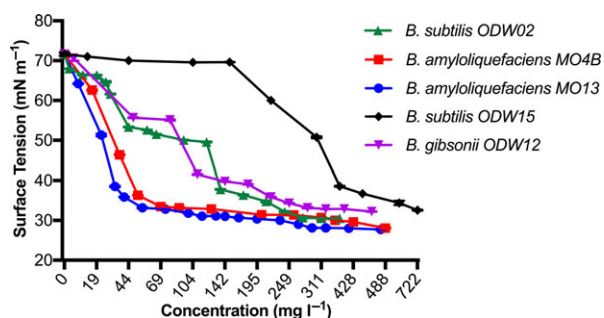


Fig. 3. Molecular networking generated when the five selected samples of *Bacillus* were analysed via UHPLC-MS/MS. The inlaid portions of the network were rearranged in Cytoscape for easier visualization of node connectivity.

to reduce the water surface tension below 40 mN m⁻¹ in CMC below 200 mg l⁻¹. The only exception is *B. subtilis* ODW15, which needed higher concentrations (389 mg l⁻¹) to reduce the water surface tension. The most efficient isolate, *B. amyloliquefaciens* MO13, displayed a CMC of 36 mg l⁻¹ and was able to reduce the water surface tension to 27 mN m⁻¹. The efficiency of the biosurfactant produced by *B. amyloliquefaciens* MO13 is noteworthy and is comparable with the surfactant produced by *B. subtilis* recovered from cassava waste which displayed a surface tension of 26.6 mN m⁻¹ and a CMC of 33 mg l⁻¹ (Nitschke and Pastore, 2006).

Table 3. Lipopeptide composition of *Bacillus amyloliquefaciens* MO4B analysed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Structure	Molecular formula	[M+H] ⁺	Observed [M+H] ⁺	Error (ppm)
Surfactin A				
C11	C ₄₉ H ₈₅ N ₇ O ₁₃	980.628361	980.6229	5.57
C12	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6401	3.93
C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6560	3.63
C14	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6703	4.90
C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6869	3.92
C16	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7020	4.39
C17	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7187	3.34
Surfactin B				
C12	C ₄₉ H ₈₅ N ₇ O ₁₃	980.628361	980.6245	3.94
C13	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6381	5.94
C14	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6554	4.22
C15	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6681	7.05
Surfactin monomethyl ester				
C13	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6719	3.34
C14	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6864	4.40
C16	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7188	3.25
[Leu4] Surfactin				
C15	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7015	4.86
Surfactin isoform				
C12	C ₄₈ H ₈₃ N ₇ O ₁₃	966.612711	966.6077	5.18
C15	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6553	4.32

**Fig. 4.** Surface tension values (mN/m) versus biosurfactant concentration (mg l⁻¹) obtained with the cell-free crude biosurfactant produced by bacterial isolates *B. subtilis* ODW15, *B. gibsonii* ODW12, *B. subtilis* ODW02, *B. amyloliquefaciens* MO4B and *B. amyloliquefaciens* MO13, dissolved in deionized water. Results represent the average of three independent measurements ± standard deviation.

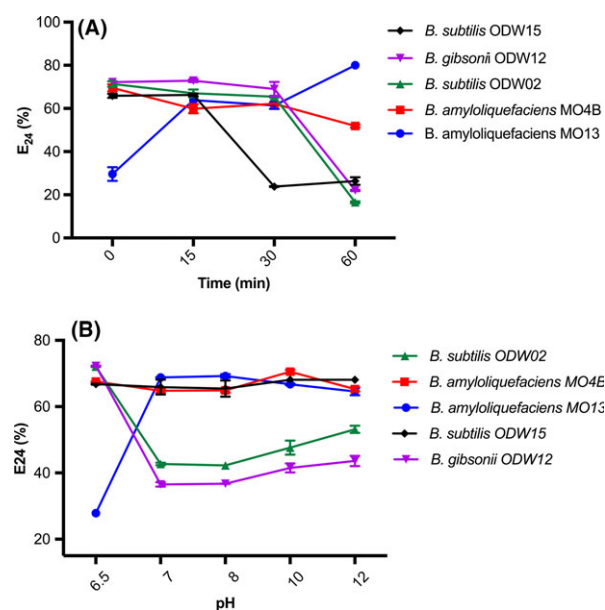
Study of the stability of the biosurfactant

The chemical stability of the biosurfactants produced was evaluated towards a set of different conditions, such as autoclaving, temperature, salt concentration and pH (Fig. 5). The biosurfactants' stability in terms of surface tension was not affected following the variation of any of the specific parameters. On the other hand, emulsification activity was affected in response to changes in temperature and pH.

For example, autoclaving the samples did not result in any change on the surface tension or emulsification activity. On the other hand, when the crude biosurfactant

was heated at 100°C for 15, 30 and 60 min a more pronounced difference in the behaviour was observed for all samples (Fig. 5A). The emulsification ability of *B. subtilis* ODW15, *B. gibsonii* ODW12, *B. subtilis* ODW02 was reduced, while *B. amyloliquefaciens* MO13 increased significantly after heating. On the other hand, *B. amyloliquefaciens* MO4B has shown a higher thermal stability and a smaller decrease in the emulsification activity was observed after 1 h of heating at 100°C. For all, the surface tension resulted unchanged, thereby attesting for the thermal stability of the compounds produced (Fig. 5A). Addition of increasing amounts of NaCl (from 0.5% to 35%) did not affect the tensoactive properties.

Finally, the influence of the pH was also evaluated (Fig. 5B). We have evaluated the stability of the biosurfactant in either acidic or basic conditions using pH values varying from 2 to 12. The initial pH values for all samples were 6.5. In any of the pH values studied, we did not observe changes in the ability of the surfactant to reduce the water surface tension. However, when the pH was lowered to 4 and 2, the emulsification activity has ceased, likely due to partial precipitation of the biosurfactant, because of the presence of the carboxyl groups at the surfactin structure. In strongly acidic conditions, the carboxylate will be protonated and the surfactin becomes less soluble in water, losing its emulsification ability. This feature was already reported in the literature (Nitschke and Pastore, 2006) and allowed the recovery of surfactins by acidic precipitation.

**Fig. 5.** (A) Emulsification activity (%) versus time (minutes), obtained after heating the samples at 100°C for 15, 30 and 60 min. (B) Emulsification activity (%) versus pH. Results represent the average of three independent measurements ± standard deviation.

On the other hand, under neutral or basic conditions (pH values of 7, 8, 10 and 12) a strong decrease in the emulsification activity was observed for *B. gibsonii* ODW12 and *B. subtilis* ODW02. Conversely, *B. amyloliquefaciens* MO4B has shown stable values for E_{24} and *B. subtilis* ODW15 did not display any significant difference for E_{24} values. A significant increase in E_{24} was observed again for *B. amyloliquefaciens* MO13. In this case, the more basic the medium, the more ionized the carboxyl groups of the surfactins and, therefore, the compounds become more water-soluble. As a consequence, the ability to stabilize the emulsions also increases (Long *et al.*, 2017). This different behaviour depending on the acidity/basicity of the medium renders to surfactins the property of a pH-responsive tensoactive agent.

In summary, we have reported the screening of biosurfactant-producing bacteria isolated from areas contaminated with crude oil or its byproducts. Five of two hundred isolates furnished significant decrease in surface tension below 30 mN m^{-1} . Worth pointing out is that *B. amyloliquefaciens* MO4B has shown to be a very promising biosurfactant producer, particularly, due to its ability to efficiently reduce the surface tension and emulsification ability that remained stable even when the samples were submitted to pH changes or exposed to high temperatures. The biosurfactants produced were fully chemically characterized via UPLC-HRMS, indicating the production of surfactin homologues, including a new member of this family is reported for the first time in the literature.

Experimental procedures

Microorganism isolation

The microorganisms used in this study were isolated from oil-contaminated soil samples obtained from different Brazilian terrestrial sites: (i) isolates of petroleum-contaminated soil (1:20 m/m) and oil-contaminated soil collected at gas stations in the city of Porto Alegre (RS) from the inventory of the Laboratory of Fungi of Medical and Biotechnological Importance from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; (ii) oil-drilling waste (ODW) samples obtained from a petroleum production batch at the northeastern coast of the city of Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

The cultures were grown in Erlenmeyer flasks (250 ml) containing 50 ml Luria-Bertani (LB) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA.) or 50 ml YPD (glucose 20 g l^{-1} , peptone 20 g l^{-1} , yeast extract 10 g l^{-1}). The flasks with both samples were kept in agitation at 200 rpm for 7 days at 30°C . After this period, aliquots (100 μl) of this mixture were subjected to

successive decimal dilutions and were then plated on LB agar and YPD. The plates were incubated for 5 days at 30°C . Microorganisms with morphological differences were transferred to new media to obtain pure colonies. The microorganisms isolated were kept refrigerated at 4°C .

Screening for biosurfactant production

To assess the biosurfactant-producing ability of the microorganisms, the isolates were inoculated in YPD liquid medium on a rotary shaker at 180 rpm at 30°C for 24 h. The isolates were then subjected to liquid fermentation in minimal salt medium (MSM) (Na_2HPO_4 (6 g l^{-1}), KH_2PO_4 (3 g l^{-1}), NaCl (0.5 g l^{-1}), NH_4Cl (1 g l^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (0.24 g l^{-1}), using glucose (5%) as the only carbon source. The samples were incubated on a rotary shaker at 180 rpm for 5 days at 30°C . Following incubation, cultures were centrifuged at 9000 rpm for 10 min, and the cell-free supernatant was used to test biosurfactant activity (Belgacem *et al.*, 2015). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, which has previously been described as a biosurfactant producer, was used as the positive control (Sakthipriya *et al.*, 2015).

Drop-collapse test. Drop-collapse tests were carried out according to the method described by Jain *et al.* (1991) and modified by Bodour and Maier (1998). The tests were carried out on a clear flat surface. About 1.8 μl of oil (SINGER™, São Paulo, Brazil.) and 20 μl of supernatant were added to the oil surface. The shape of the droplet was inspected after 1 min. If the drop remained beaded, the assay was scored negative and if the drop collapsed, the result was considered positive.

Oil-spreading assay. Fifty milliliter of distilled water was brought into a large Petri dish (15 cm diameter) followed by the addition of 200 μl of oil to the water surface to form a thin oil layer. About 20 μl of the supernatant was then carefully added to the center of the oil layer, and the diameter of the clearing zone was measured. If biosurfactants are present, the oil will be displaced, resulting in an oil-free clearing zone where the diameter correlated with the surfactant activity (Pornsunthornatwee *et al.*, 2008).

The combined results of these two assays were used to select the most promising microorganisms for further evaluation of the emulsification capacity and surface tension.

Emulsification activity (E_{24}). The emulsification activity (E_{24}) was measured using the method described by Cooper and Goldenberg (1987). The test was performed by mixing 2 ml of kerosene with an equal volume of supernatant (vortexed for 2 min) and left to stand for

24 h. Emulsions formed by each isolate were compared with those formed by negative control. The emulsification activity was calculated as the ratio of the height of the emulsion layer (cm) and the total height of liquid in the tube (cm), multiplied by 100.

Surface tension measurement. The surface tension was measured using a digital tensiometer (Gibertini, Milan, Italy). Fifteen milliliter of the supernatant of the microorganism cultures was used. Distilled water and ethanol (96%) were used as standards. The measurements were made by immersing a coverslip underneath the surface of the supernatant (ca 1 mm), which was then slowly pulled out, the maximum force was then measured and taken.

Molecular identification of microorganisms

The genomic DNA of each culture was extracted according to Sambrook *et al.* (2001). A fragment of the V3 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified from microbial DNA using the primers 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') and 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Amplification was performed in a reaction containing 20 ng μl^{-1} of DNA template, 1 U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1X Taq buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP and 10 pmol of each primer, resulting in a final volume of 50 μl . The amplifications were carried out as follows: one cycle at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 0.3 min, 72°C for 2 min and a final extension step at 72°C for 6 min.

The PCR products were analysed with 1% agarose gel electrophoresis. The amplicons obtained were purified from Kit PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's instructions. Approximately, 200 ng of genomic DNA was used for sequencing on a BI-Prism 3500 Genetic Analyzer Platform (Applied Biosystems). Nucleotide sequence similarity searches were conducted using the GenBank nucleotide collection BLAST searches.

Biosurfactant identification

Extraction of the biosurfactant. Liquid fermentation was performed in 500 ml Erlenmeyer flasks using 150 ml MSM supplemented with 5% glucose. Following incubation at 180 rpm for 5 days at 30°C, the cells were removed by centrifugation at 9000 rpm for 10 min. The pH of the supernatant was adjusted to 2 using concentrated HCl, and the supernatant was left standing for 24 h at 4°C and it was then extracted three times using chloroform/methanol (2:1 v/v) in a separatory funnel for the extraction of organic compounds. The organic layer was separated and dried with anhydrous sodium sulphate to remove water traces, and it was then evaporated under reduced

pressure in a rotary evaporator at 45°C, yielding a viscous, brown oil (Belgacem *et al.*, 2015).

Preliminary identification of the biosurfactants by TLC. To preliminary determine the type of biosurfactant, a portion of the crude extract was separated on silica gel TLC plates (F254, 0.2 mm thickness) using ethyl acetate as running solvent agent. For the detection of lipopeptides, the plates were air-dried, sprayed with 0.5% ninhydrin (VWR), once again air-dried and then heated for 15 min at 110°C for colour development. Anisaldehyde reagent (100:2:1 (v/v/v) acetic acid:sulphuric acid:*p*-anisaldehyde (Sigma)) was used for carbohydrate detection. Anthrone reagent (63 ml of sulphuric acid, 25 ml of water and 0.125 g of anthrone (Sigma)) was used for sugar detection and the colour was developed by heating plates at 110°C for 10 min. Lipid components were detected after placing the plates in a closed jar saturated with iodine vapour. Once visible, the retention factor (*R_f*) of each spot was determined by dividing the distance travelled by the product by the total distance travelled by the solvent (Belgacem *et al.*, 2015).

High-resolution mass spectrometry analysis. Crude extracts were analysed by UHPLC (Shimadzu, Nexera X2) coupled with HRMS (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, USA) equipped with an electrospray ionization source. The capillary voltage was operated in positive ionization mode, set at 4500 V, and with an endplate offset potential of -500 V. The dry gas parameters were set to 8 l min^{-1} at 200°C with a nebulization gas pressure of 4 bar. Data were collected from *m/z* 50–1600 with an acquisition rate of five spectrums per second, and the ions of interest were selected by auto MS/MS scan fragmentation. Chromatographic separation was performed with a gradient mixture of solvents A H_2O (0.1% formic acid v/v) and acetonitrile B (0.1% formic acid v/v) using a C18 column (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 × 100 mm; Waters, USA). The gradient is described in Table 4.

MS/MS data processing – molecular networking. Raw data from UHPLC-MS/MS analysis were converted to mzXML format with Bruker's Data Analysis software and uploaded to the global natural product social (GNPS) molecular networking tools. In GNPS (Wang *et al.*, 2016), the data were subjected to molecular networking using the online workflow at GNPS. The data were clustered with MS-Cluster with a parent mass tolerance of 1.0 Da and a MS/MS fragment ion tolerance of 0.5 Da to create consensus spectra. A network was then created where edges parameters were cosine score above 0.65 and more than four matched peaks. The data were filtered by removing all MS/MS peaks within \pm

Table 4. Gradient programme used for the separation of the crude extracts.

Time (min)	% Solvent B	Flow (ml min ⁻¹)
1.0	60	0.200
3.0	70	0.200
20.0	98	0.200
21.0	2	0.200
22.0	60	0.200
25.0	60	0.200
25.0	stop	–

17 Da of the precursor *m/z*. The network was then searched against GNPS's spectral libraries, and all matches between network spectra and library spectra had requisite to present a score above 0.65 and at least four matched peaks. The network analysis was exported from GNPS and analysed in Cytoscape (Shannon *et al.*, 2003).

Critical micelle concentration

At the CMC, an increasing concentration of the surfactant will lead to a sudden change in the decreasing rate of surface tension. Different concentrations of the biosurfactants' crude extracts were prepared in distilled water, and the changes in surface tension values were measured at 25°C. The CMC was determined from the inflection point of surface tension versus biosurfactant concentration (Nitschke and Pastore, 2006).

Studies of the stability of the biosurfactant

The biosurfactants' stability was evaluated using the cell-free supernatant, according to the methodology adapted from Abdel-Mawgoud *et al.* (2008). The effect of temperature on the biosurfactants' stability was evaluated by heating the samples in a water bath for 15, 30 and 60 min at 100°C; the samples were then allowed to cool to room temperature. After the designated times, the surface tension and emulsification activity were measured for each sample to check for any possible changes.

To measure the biosurfactants' salinity stability, NaCl was added to the supernatant until final saline concentration of 2.5%, 5%, 10%, 20% and 35% was reached. After the addition of NaCl, the solutions were stirred to complete dissolution. The resulting solutions were then incubated for 30 min at 30°C before being allowed to reach room temperature. The surface tension of each sample was then measured to check for any possible changes.

To measure the effect of pressure, the supernatant was placed in an autoclave at 1 atm for 15 min at 121°C. Analysis of pH stability was performed by

adjusting the pH of the supernatant to 2, 4, 7, 8, 10 and 12. The surface tension and emulsification activity were then measured to check for any possible changes.

Statistical analysis

The data are presented in terms of arithmetic averages of at least three replicates, and the error bars indicate the standard deviations. The analyses were carried out using ANOVA, followed by Tukey test with a confidence level of 95%.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflict of interests

References

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., and Hassouna, N.A.H. (2008) Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl Biochem Biotechnol* **150**: 289–303.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., *et al.* (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 427–444.
- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R., and Tótoia, M.R. (2006) Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour Technol* **97**: 868–875.
- Belgacem, Z.B., Bijttebier, S., Verreth, S., Voorspoels, S., Van de Voorde, I., Aerts, G., *et al.* (2015) Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. *J Appl Microbiol* **118**: 1370–1384.
- Biniarz, P., and Lukaszewicz, M. (2017) Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 4747–4759.
- Bodour, A.A., and Maier, R.M.M. (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* **32**: 273–280.
- Bonmatin, J.M., Labbé, H., Grangemard, I., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Ptak, M., *et al.* (1995) Production, isolation and characterization of [Leu4]- and [Ile4]surfactins from *Bacillus subtilis*. *Lett Pept Sci* **2**: 41–47.
- Christova, N., Tuleva, B., Cohen, R., Ivanova, G., Stoev, G., Stoilova-Disheva, M., *et al.* (2011) Chemical

- characterization and physical and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* BN10. *Z Naturforsch* **66**: 394–402.
- Cooper, D.G., and Goldenberg, B.G. (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* **53**(2): 224–229.
- Ferhat, S., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaoui, R., Boucherit, A., et al. (2011) Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *Int Biodeterior Biodegradation* **65**: 1182–1188.
- Franzetti, A., Tamburini, E., and Banat, I.M. (2010) Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Adv Exp Med Biol* **672**: 121–134.
- Geissler, M., Oellig, C., Moss, K., Schwack, W., Henkel, M., and Hausmann, R. (2017) High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *J Chromatography B* **1044**: 214–224.
- Gudiña, E.J., Pereira, J.F.B., Rodrigues, L.R., Coutinho, J.A.P., and Teixeira, J.A. (2012) Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial enhanced oil recovery. *Int Biodeterior Biodegradation* **68**: 56–64.
- Hassanshahian, M. (2014) Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian gulf (Bush-ehr provenance). *Mar Pollut Bull* **86**: 361–366.
- Jacques, P. (2011) Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. In *Biosurfactants: From Genes to Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer Microbiology Monographs **20**: 57–93.
- Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., and Trevors, J.T. (1991) A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *J Microbiol Methods* **13**: 271–279.
- Kuyukina, M.S., Ivshina, I.B., Philp, J.C., Christofi, N., Dunbar, S.A., and Ritchkova, M.I. (2001) Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl-tertiary butyl ether extraction. *J Microbiol Methods* **46**: 149–156.
- Liao, J.H., Chen, P.Y., Yang, Y.L., Kan, S.C., Hsieh, F.C., and Liu, Y.C. (2016) Clarification of the antagonistic effect of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BPD1 against *Pycnarhiza oryzae* via in situ MALDI-TOF IMS Analysis. *Molecules* **21**: 1670.
- Long, X., He, N., He, Y., Jiang, J., and Wu, T. (2017) Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresour Technol* **241**: 200–206.
- Malfanova, N., Franzil, L., Lugtenberg, B., Chebotar, V., and Ongena, M. (2012) Cyclic lipopeptide profile of the plant-beneficial endophytic bacterium *Bacillus subtilis* HC8. *Arch Microbiol* **194**: 893–899.
- Meena, K.R. and Kanwar, S.S. (2015) Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res Int* 1–9 (Article ID 473050).
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Khan, S., and Khan, W. (2017) Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Expr* **7**: 109.
- Nicolò, M.S., Cambria, M.G., Impallomeni, G., Rizzo, M.G., Pellicorio, C., Ballistreri, A., et al. (2017) Carbon source effects on the mono/di-rhamnolipid ratio produced by *Pseudomonas aeruginosa* L05, a new human respiratory isolate. *New Biotechnol* **39**: 36–41.
- Nitschke, M., and Pastore, G.M. (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour Technol* **97**: 336–341.
- Patowary, K., Saikia, R.R., Kalita, M.C., and Deka, S. (2015) Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2. *Ann Microbiol* **65**: 225–234.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Grangemard, I., Das, B.C., Ptak, M., et al. (1994) [Ala4] Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *Eur J Biochem* **224**: 89–96.
- Pornsunthorntawe, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M., and Rujiravanit, R. (2008) Structural and physico-chemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum contaminated soil. *Bioresour Technol* **99**: 1589–1595.
- Sakthipriya, N., Doble, M., and Sangwai, J.S. (2015) Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source – their production, modeling and properties. *J Ind Engin Chem* **31**: 100–111.
- Sambrook, J., Russell, D. and Irwin, N. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual/Joseph Sambrook, David W. Russell; [assoc. ed.: Nina Irwin, Kaaren A. Janssen].
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* **13**: 2498–2504.
- Smyth, T.J.P., Perfumo, A., Marchant, R., and Banat, I.M. (2010) Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed). Berlin: Springer-Verlag, pp. 3705–3723.
- Sousa, M., Melo, V.M.M., Rodrigues, S., Sant'ana, H.B. and Gonçalves, L.R.B. (2012) Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**: 897–906.
- Tang, J.-S., Zhao, F., Gao, H., Dai, Y., Yao, Z.-H., Hong, K., et al. (2010) Characterization and online detection of surfactin isomers based on HPLC-MSn analyses and their inhibitory effects on the overproduction of nitric oxide and the release of TNF- α and IL-6 in LPS-induced macrophages. *Marine Drugs* **8**: 2605–2618.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., et al. (2016) Sharing and community curation of mass spectrometry data with GNPS. *Nat Biotechnol* **34**: 828.
- Yang, H., Yu, H., and Shen, Z. (2015) A novel high throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY 15 for surfactin production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**: 1139–1147.

- Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., and McInerney, M.J. (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J Microbiol Methods* **56**: 339–347.
- Zhang, Y., and Miller, R.M. (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* **58**: 3276–3282.
- Zhou, H., Chen, J., Yang, Z., Qin, B., Li, Y., and Kong, X. (2015) Biosurfactant production and characterization of *Bacillus* sp. ZG0427 isolated from oil-contaminated soil. *Ann Microbiol* **65**: 2255–2264.

Supporting information

Additional supplemental material may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

- Fig. S1.** Surfactin A (C11).
Fig. S2. Surfactin A (C12).
Fig. S3. Surfactin A (C13).
Fig. S4. Surfactin A (C14).

- Fig. S5.** Surfactin A (C15).
Fig. S6. Surfactin A (C16).
Fig. S7. Surfactin A (C17).
Fig. S8. Surfactin B (C12).
Fig. S9. Surfactin B (C13).
Fig. S10. Surfactin B (C14).
Fig. S11. Surfactin B (C15).
Fig. S12. Surfactin monomethyl ester (C13).
Fig. S13. Surfactin monomethyl ester (C14).
Fig. S14. Surfactin monomethyl ester (C16).
Fig. S15. [Leu4] Surfactin (C15).
Fig. S16. Surfactin isoform (C12).
Fig. S17. Surfactin isoform (C15).
Table S1. Lipopeptide composition of *B. amyloliquefaciens* MO13 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.
Table S2. Lipopeptide composition of *B. amyloliquefaciens* MO4B analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.
Table S3. Lipopeptide composition of *B. subtilis* ODW 02 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.
Table S4. Lipopeptide composition *B. gibsonii* ODW12 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.
Table S5. Lipopeptide composition *B. subtilis* ODW15 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Supporting Information

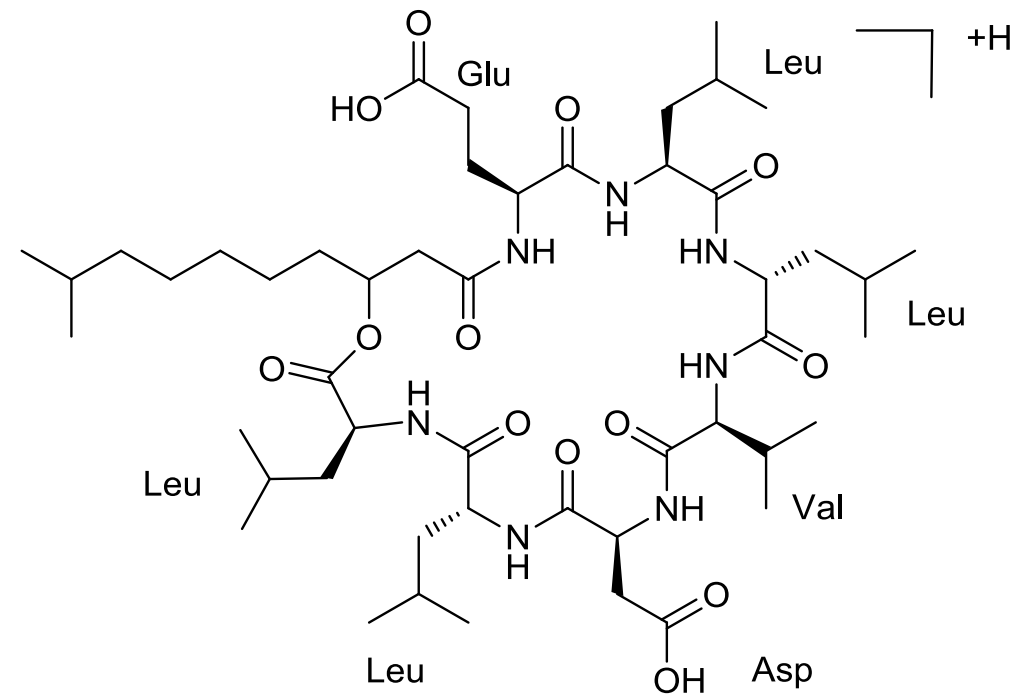
Identification and UHPLC-HRMS Characterization of Biosurfactants, Including a New Surfactin, Isolated from Oil-Contaminated Environments

Glaci V. Moro,^a Rafaela T. R. Almeida,^b Amanda P. Napp,^a Carla Porto,^b Eduardo J. Pilau,^b Diogo S. Lüdtkke,^c Angélica V. Moro,^{c,*} Marilene H. Vainstein^{a,*}

^a *Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b *Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá (UEM), 87020-900, Maringá-PR, Brazil*

^c *Institute of Chemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*



Surfactin A (C11)

Exact Mass: 980.6284

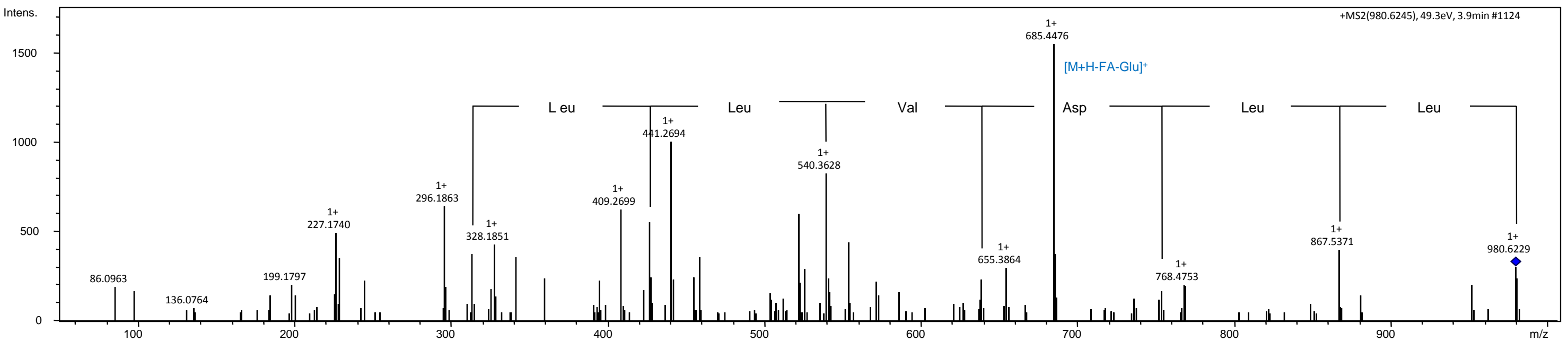
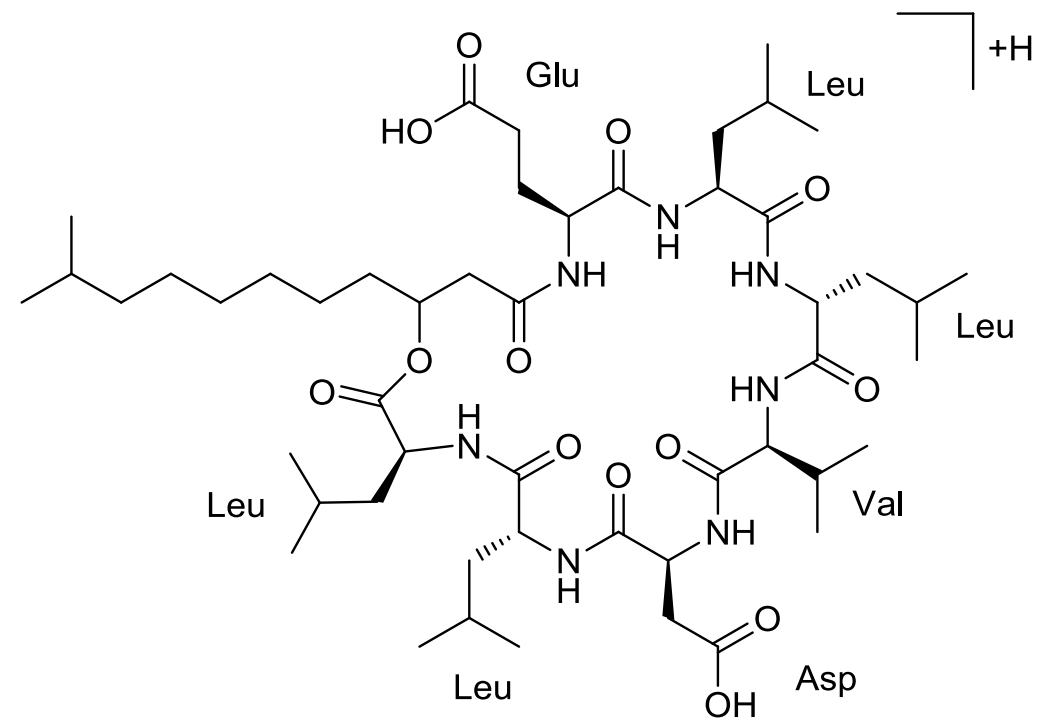


Figure S1. Surfactin A (C11). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 5.57 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin A (C12)

Exact Mass: 994.6440

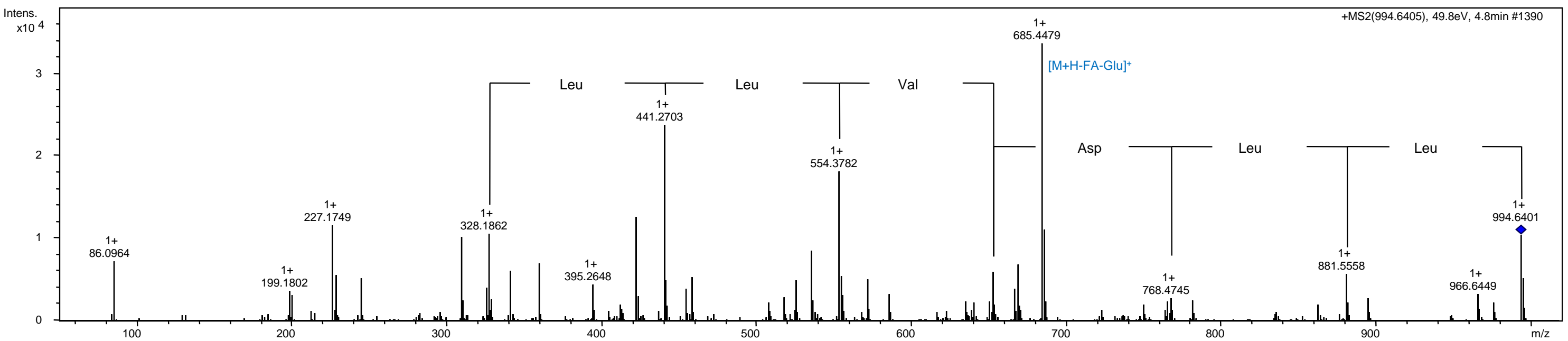
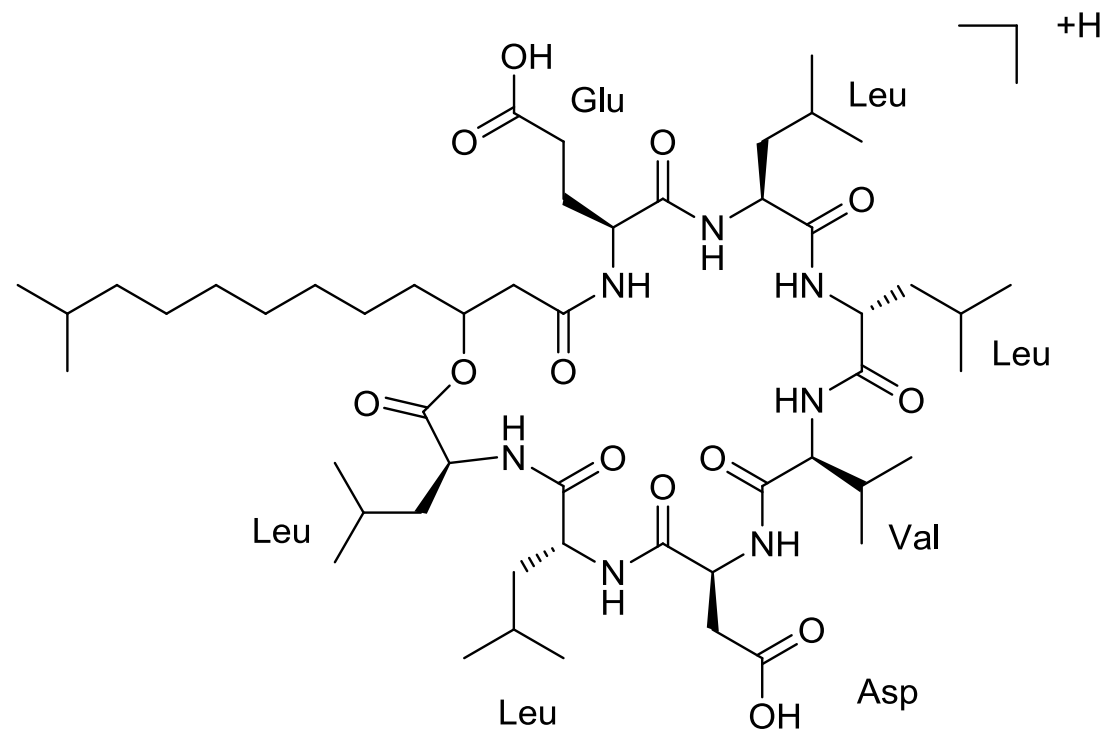


Figure S2. Surfactin A (C12). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 3.93 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin A (C13)

Exact Mass: 1008.6597

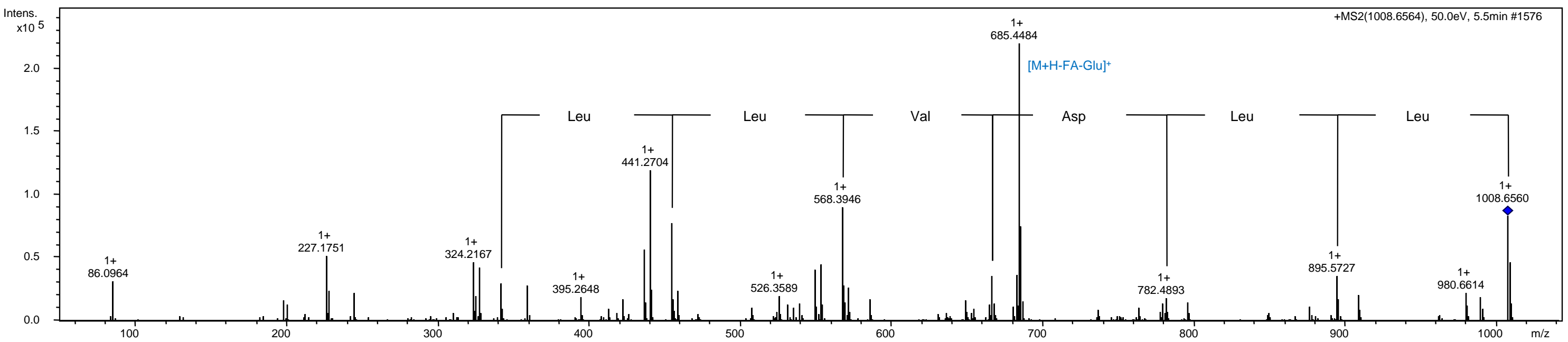
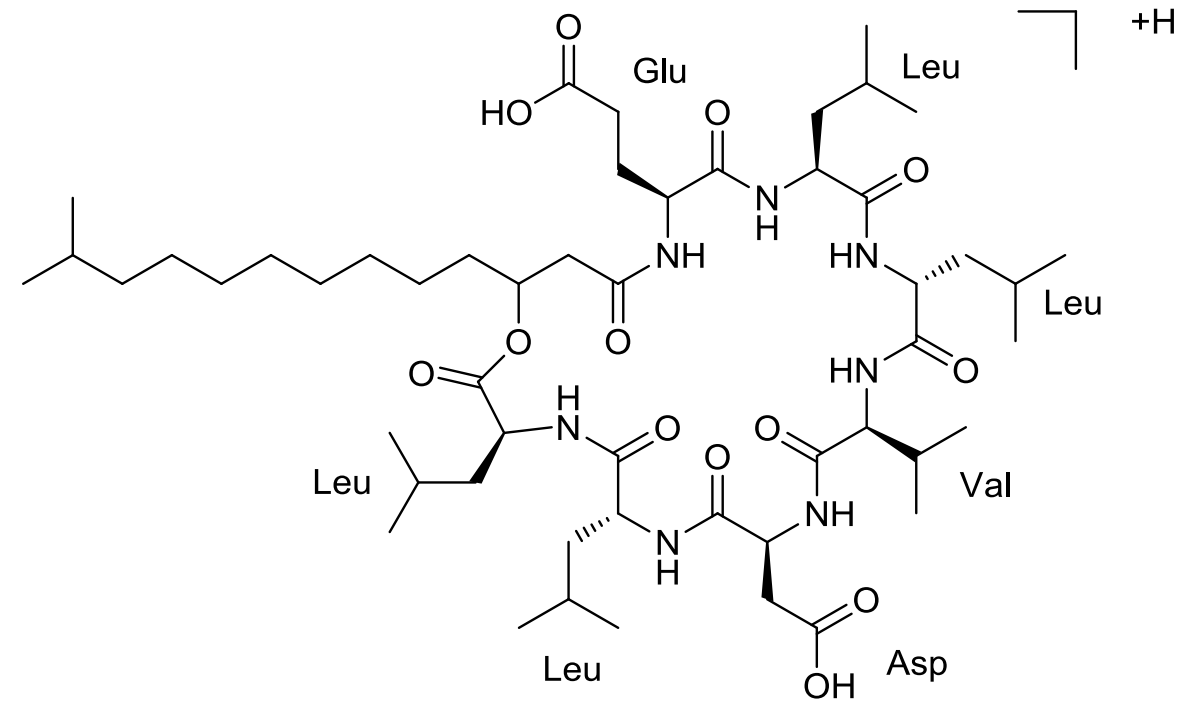


Figure S3. Surfactin A (C13). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 3.63 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin A (C14)

Exact Mass: 1022.6753

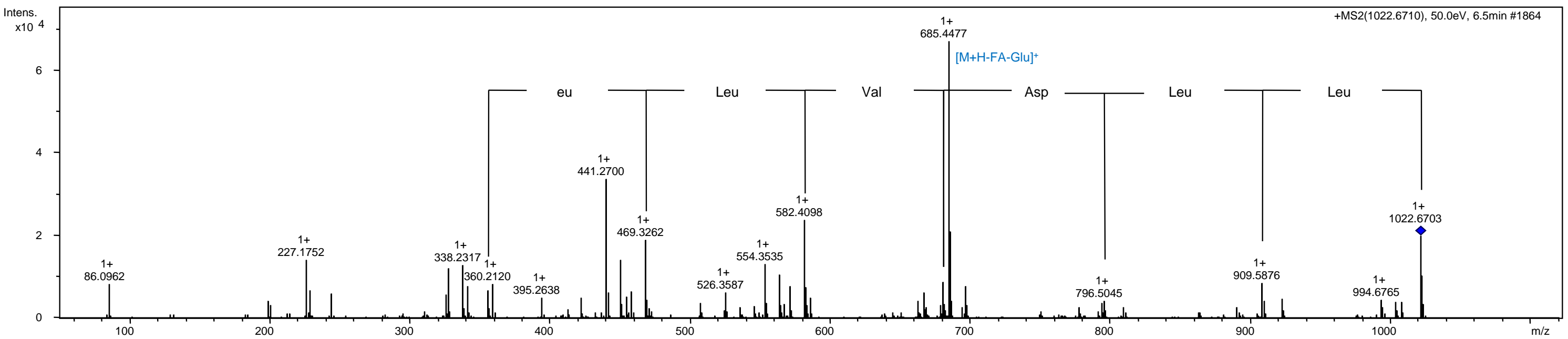
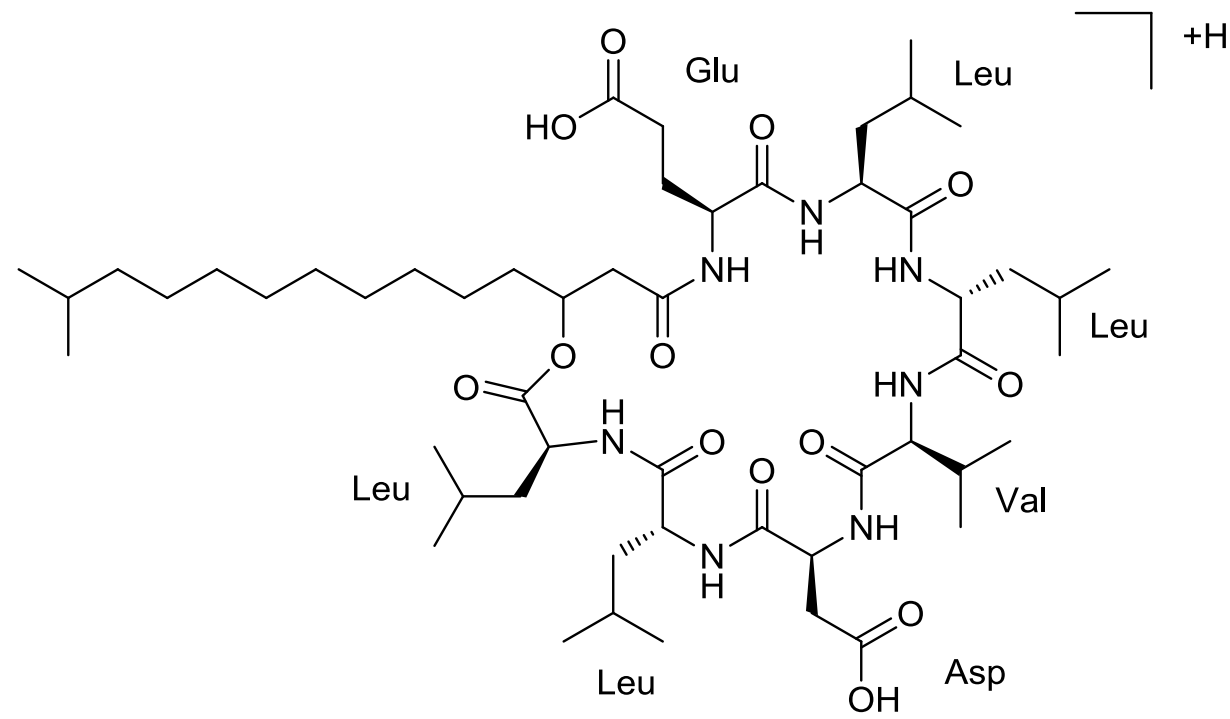


Figure S4. Surfactin A (C14). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 4.90 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin A (C15)

Exact Mass: 1036.6910

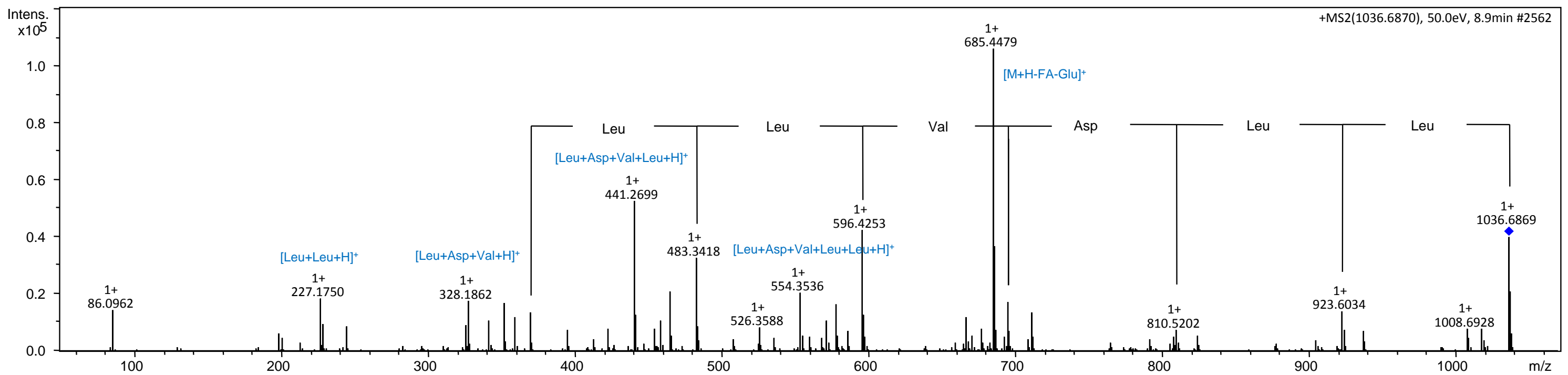
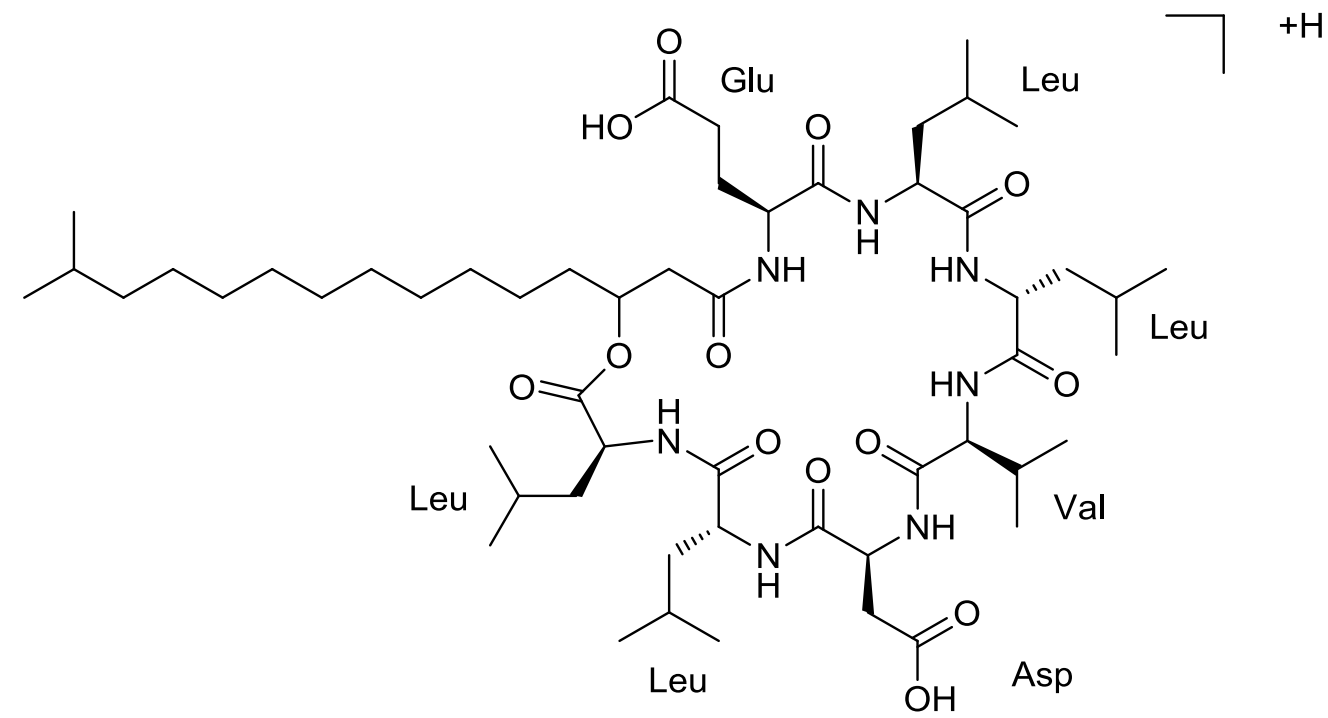


Figure S5. Surfactin A (C15). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 3.92 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin A (C16)

Exact Mass: 1050.7066

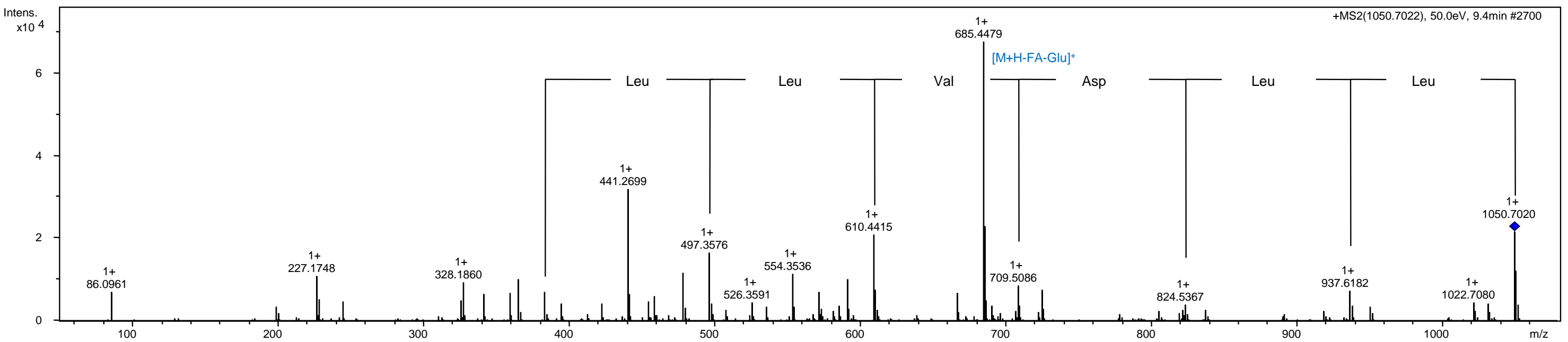
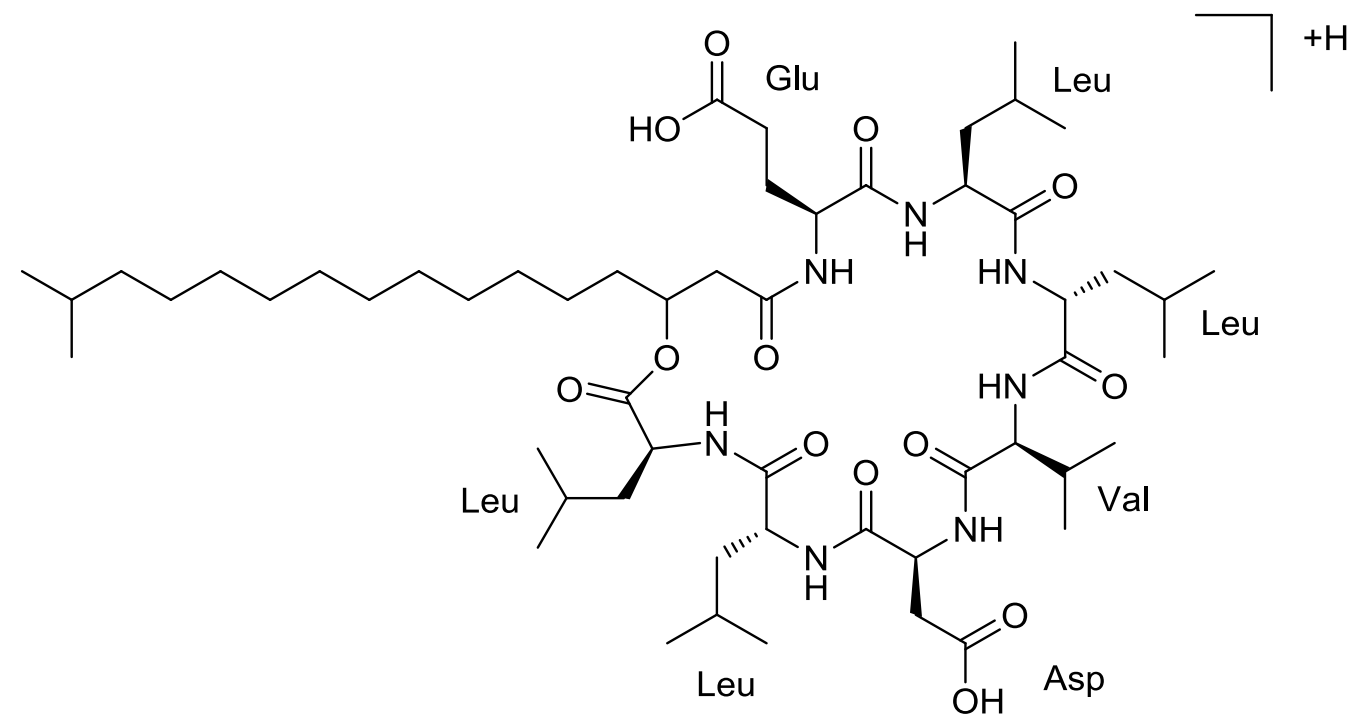


Figure S6. Surfactin A (C16). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 4.39 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin A (C17)

Exact Mass: 1064.7223

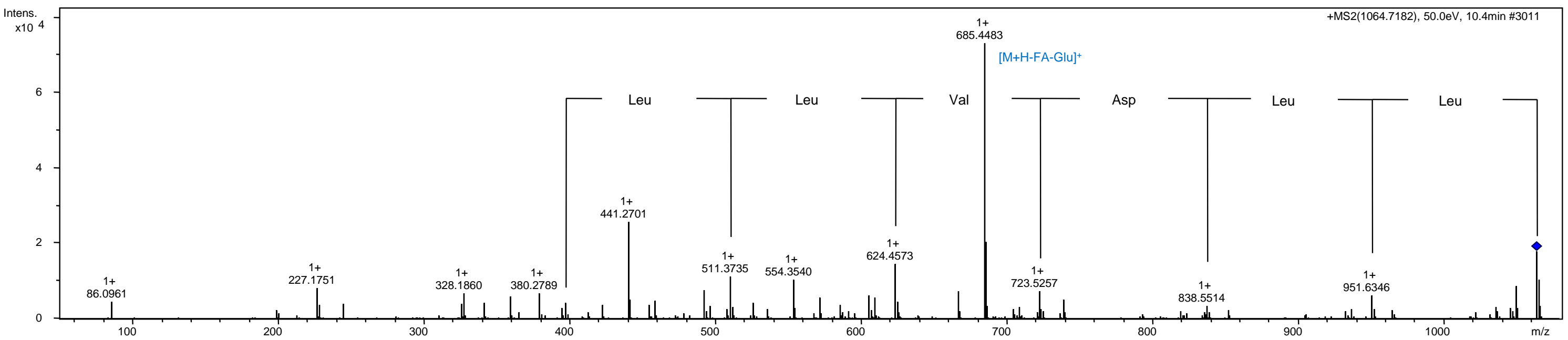
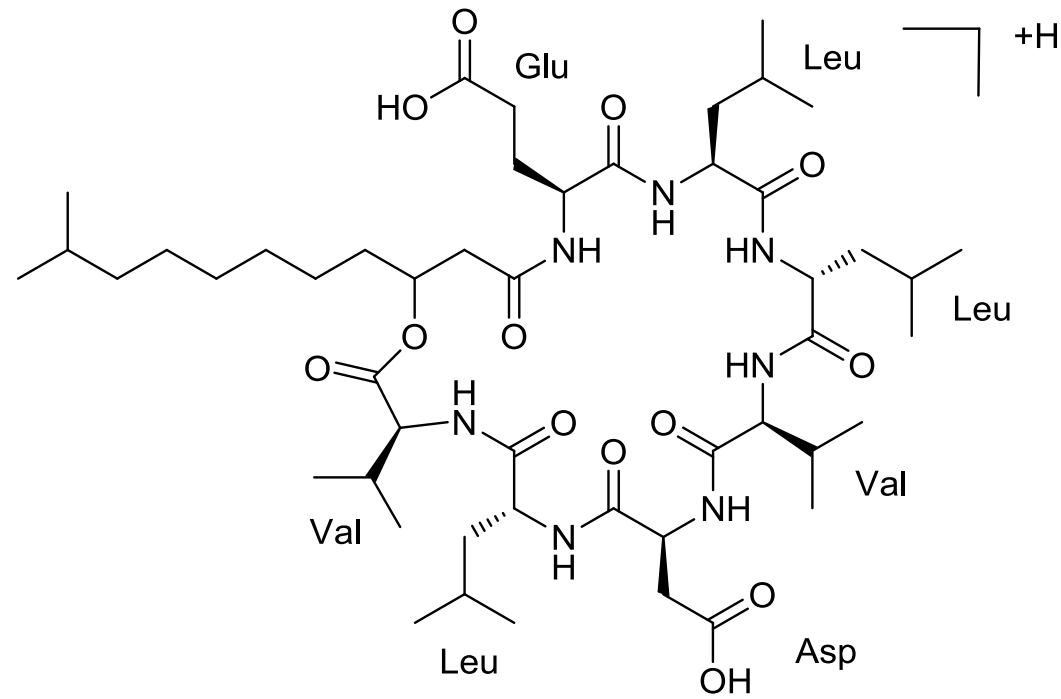


Figure S7. Surfactin A (C17). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 3.34 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin B (C12)

Exact Mass: 980.6284

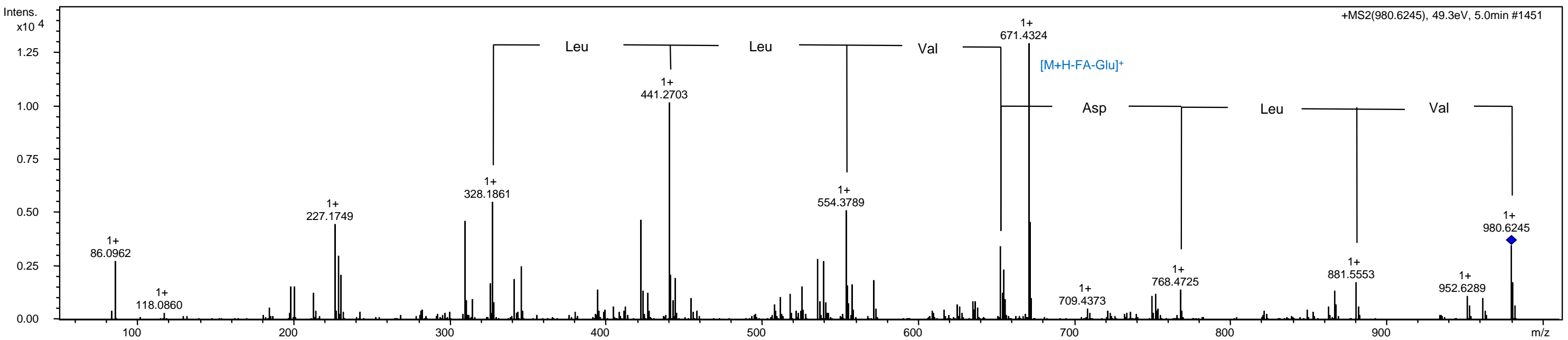
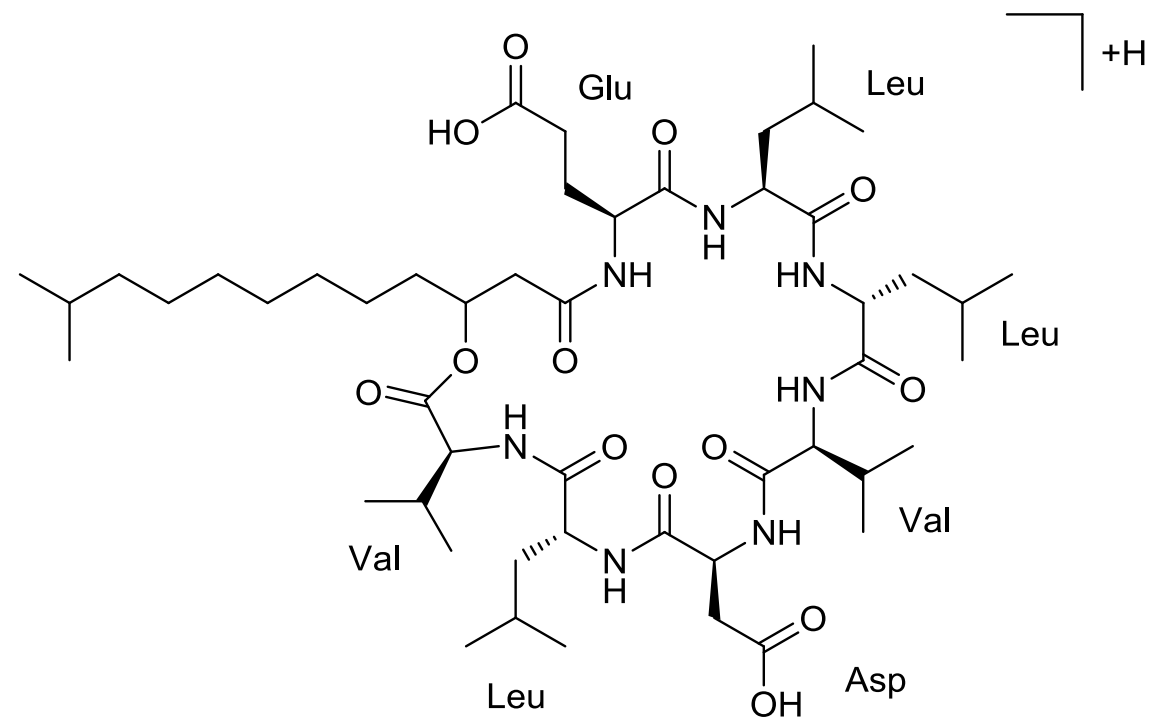


Figure S8. Surfactin B (C12). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 3.94 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin B (C13)

Exact Mass: 994.6440

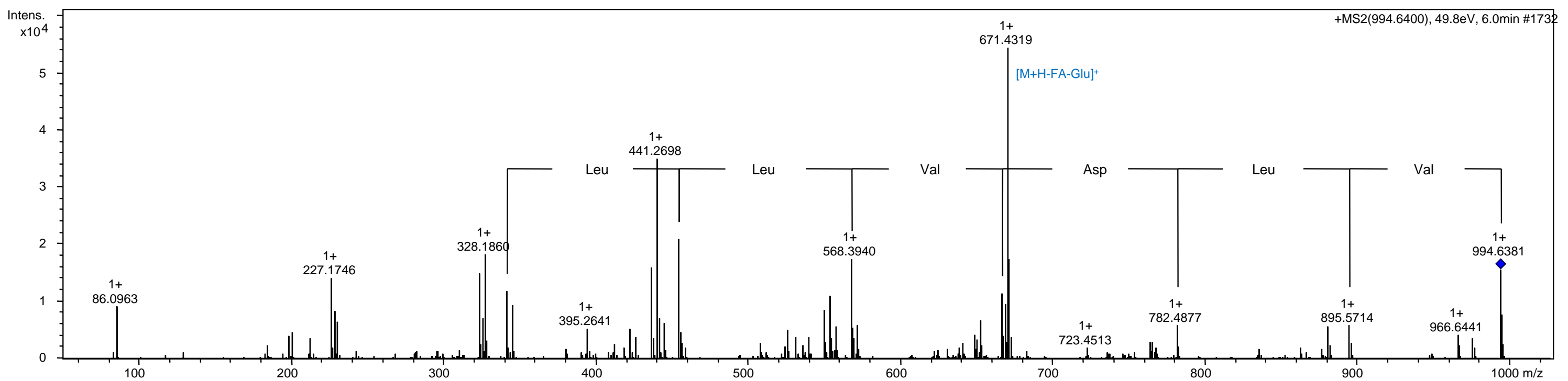
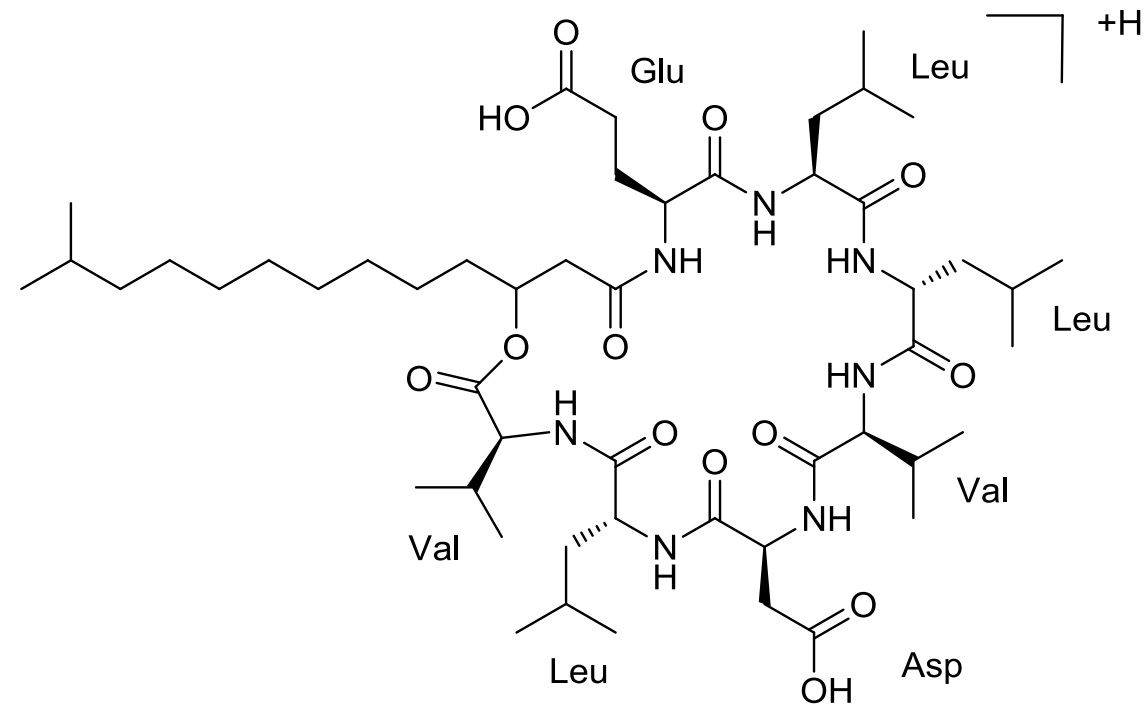


Figure S9. Surfactin B (C13). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the $[M+H]$ ion at 5.94 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin B (C14)

Exact Mass: 1008.6597

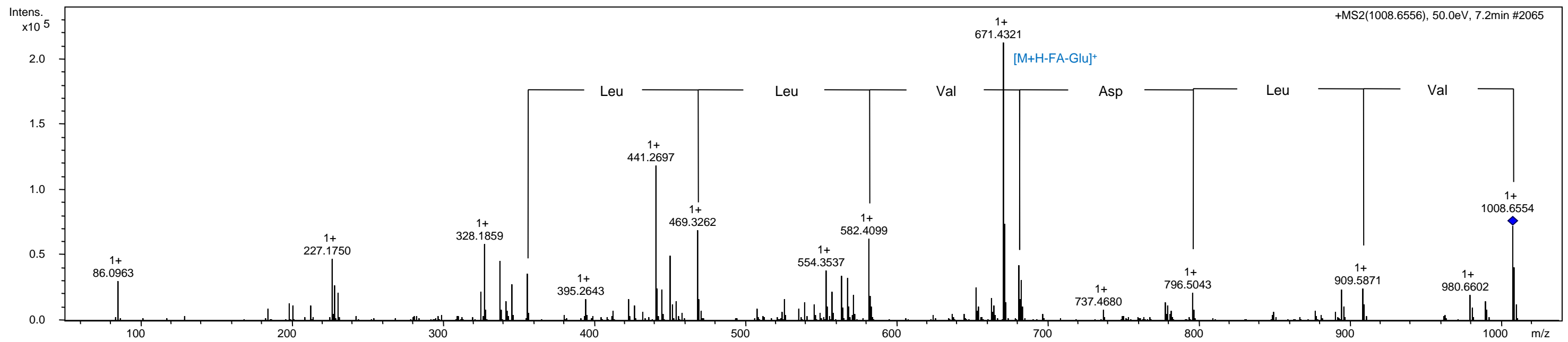
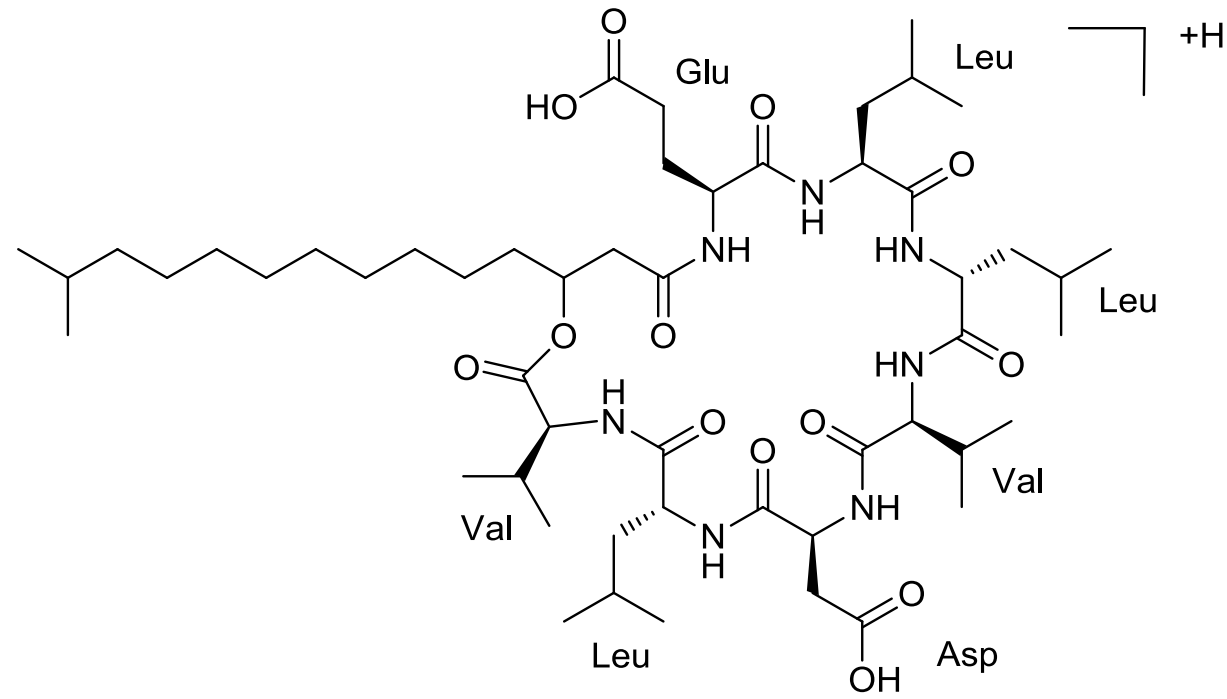


Figure S10. Surfactin B (C14). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 4.22 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin B (C15)

Exact Mass: 1022.6753

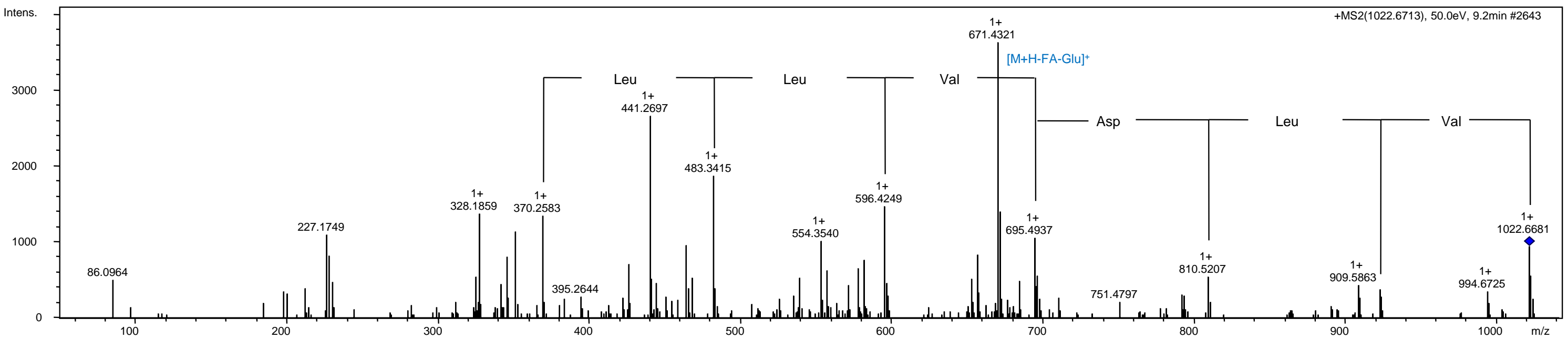
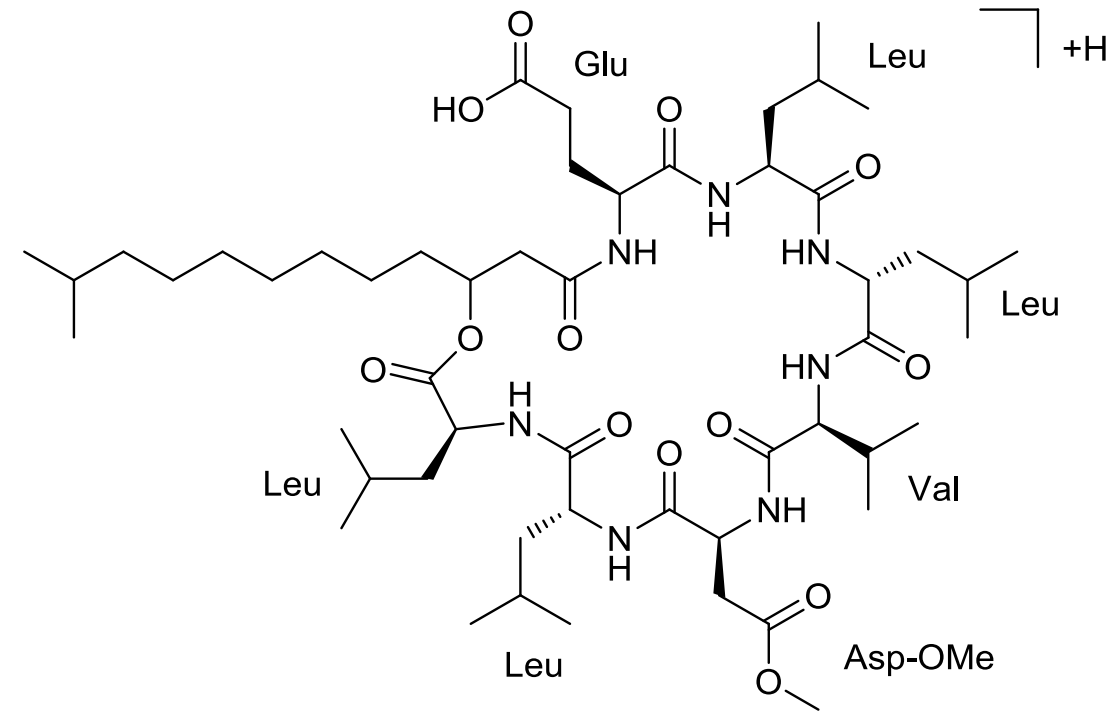


Figure S11. Surfactin B (C15). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 3.92 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.



Surfactin monomethyl ester (C13)

Exact Mass: 1022.6753

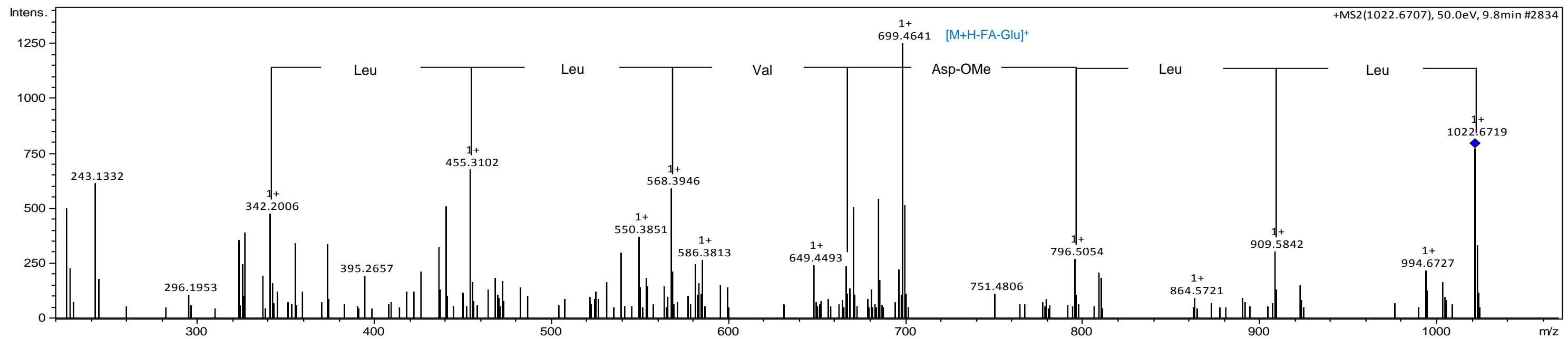
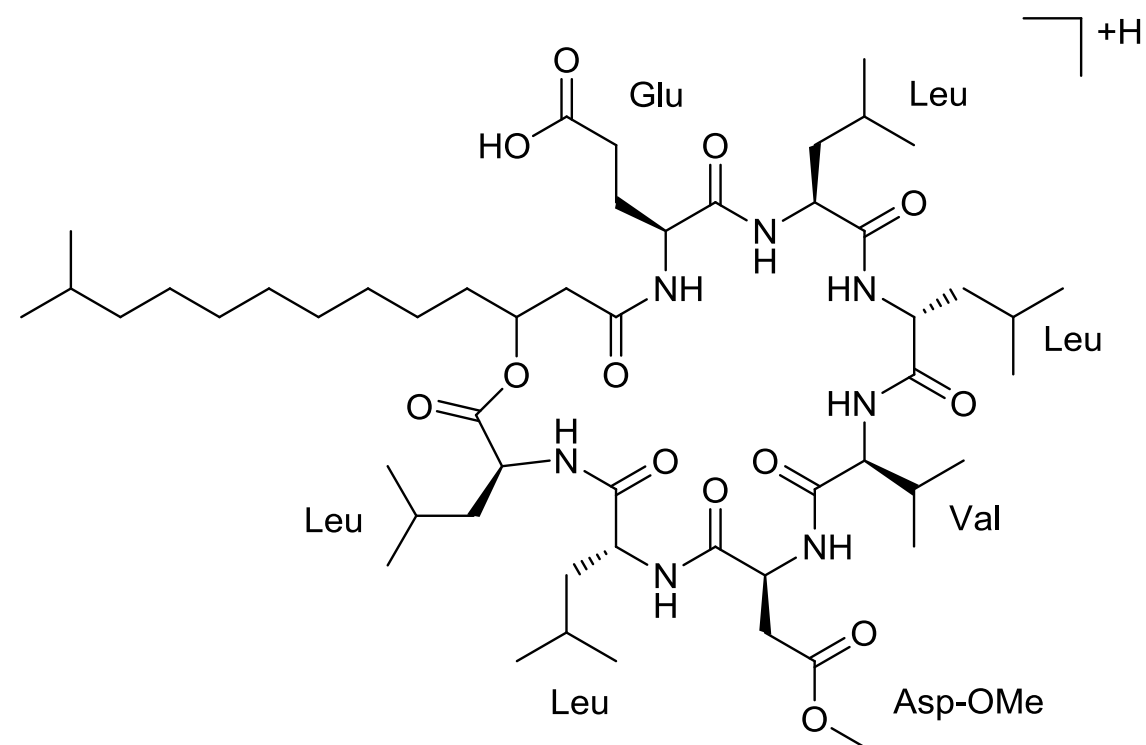


Figure S12. Surfactin monomethyl ester (C13). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the $[M+H]$ ion at 3.34 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin monomethyl ester (C14)

Exact Mass: 1036.6910

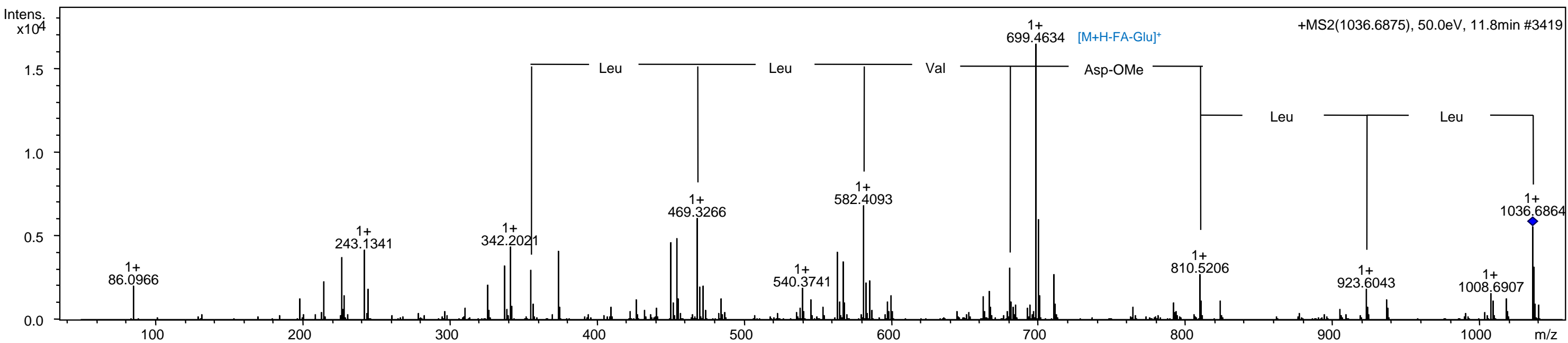
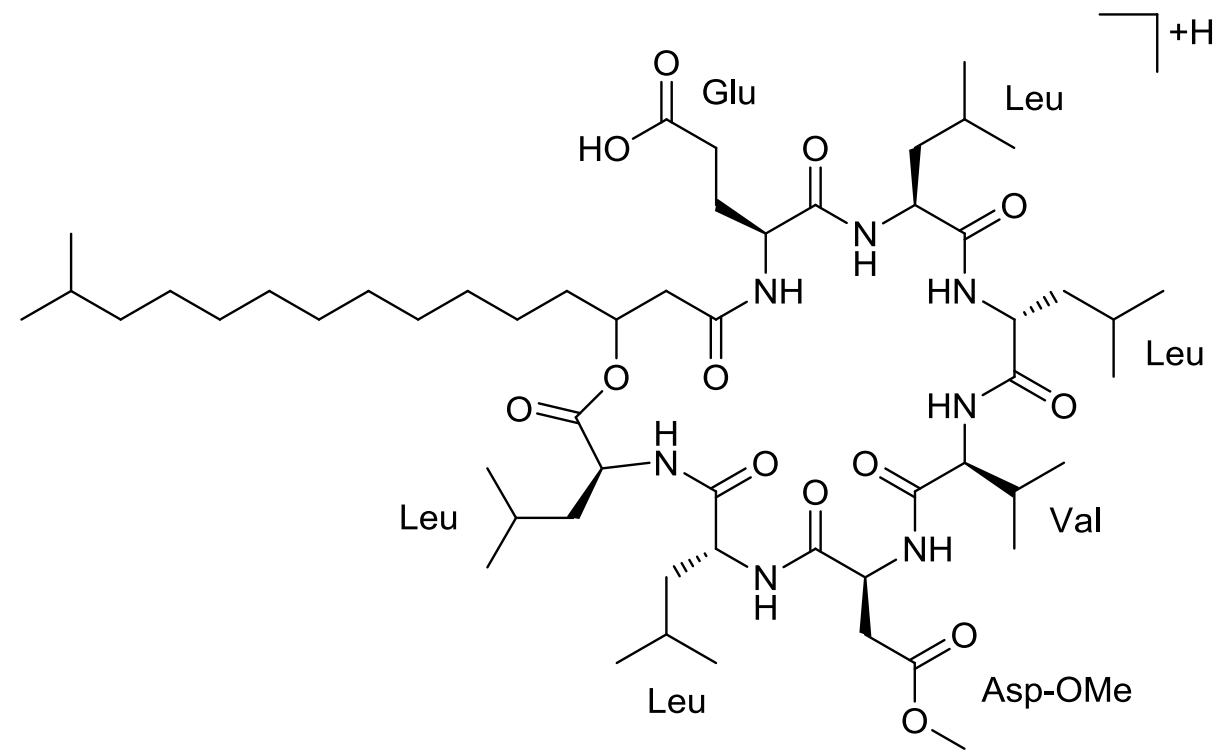


Figure S13. Surfactin monomethyl ester (C14). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 4.40 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin monomethyl ester (C16)

Exact Mass: 1064.7223

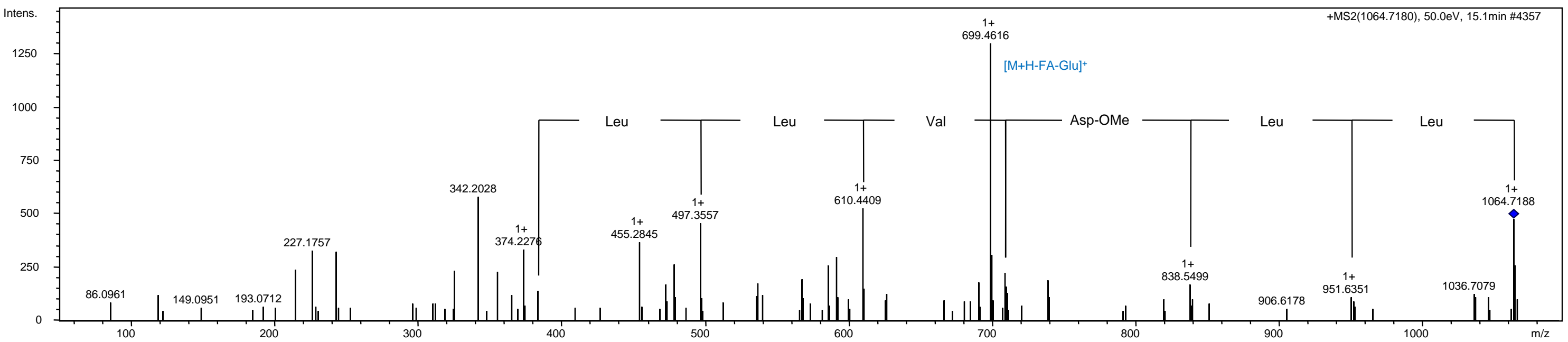
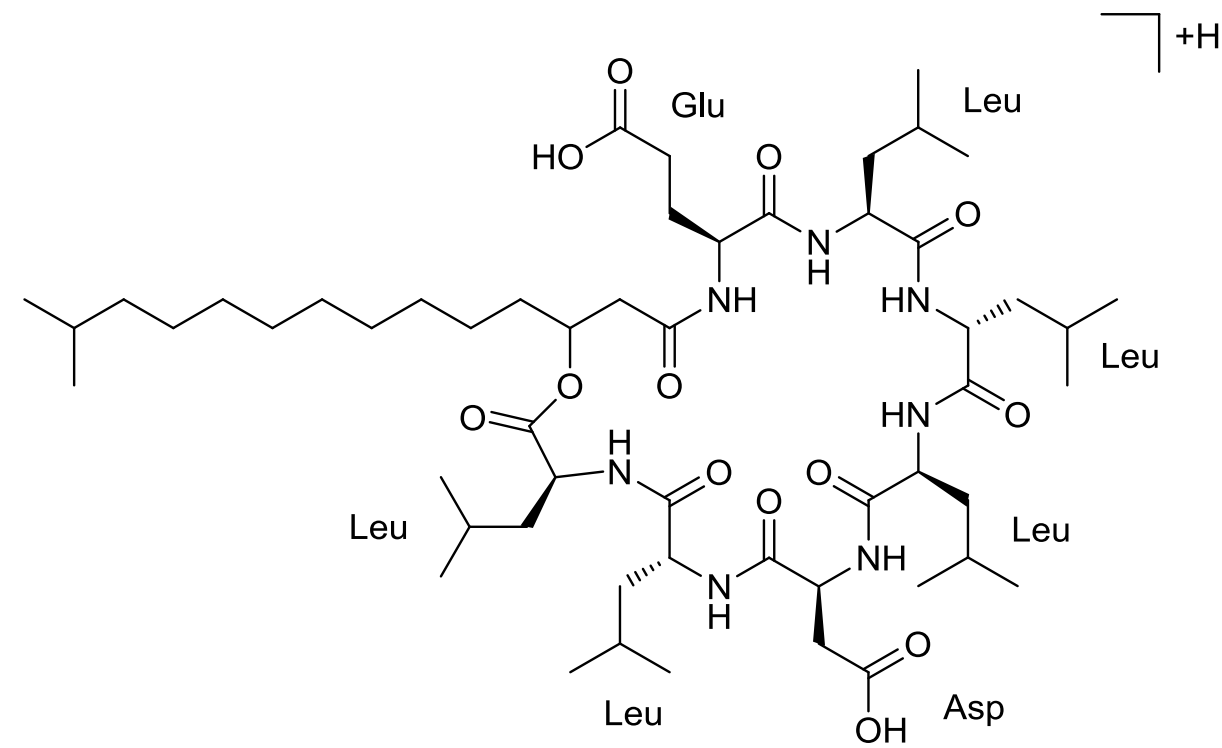


Figure S14. Surfactin monomethyl ester (C16). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the $[M+H]^+$ ion at 3.25 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



[Leu4] Surfactin (C15)

Exact Mass: 1050.7066

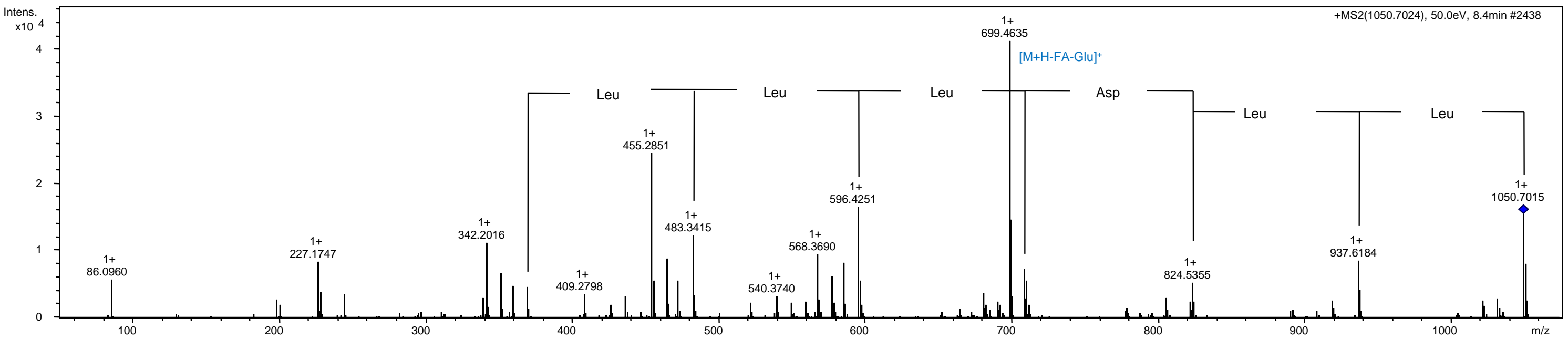
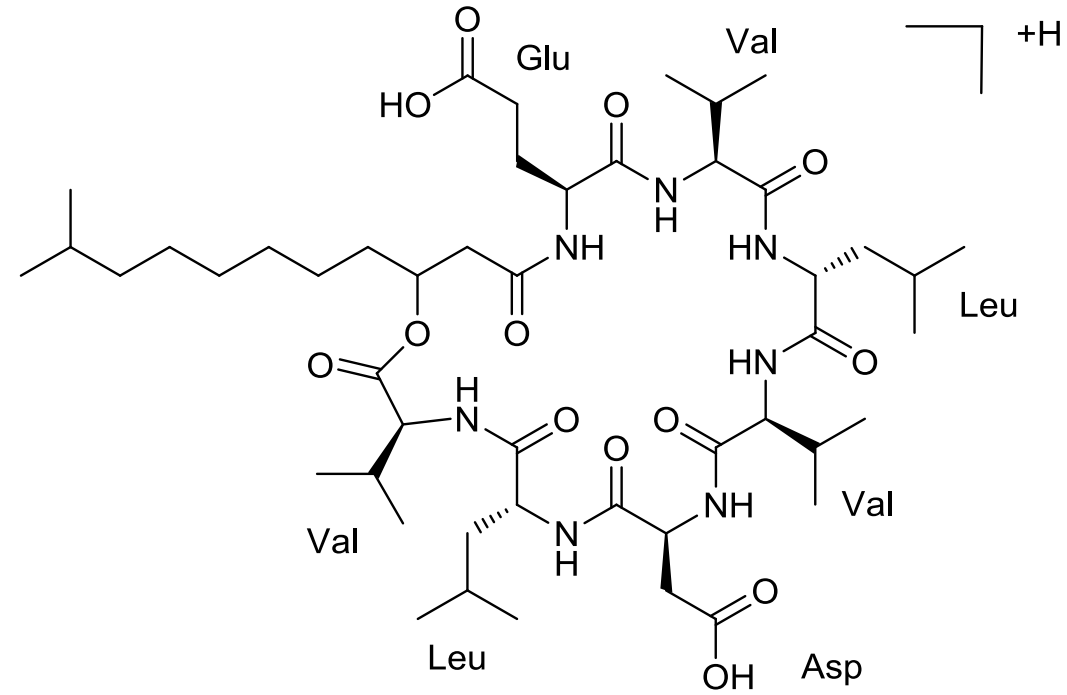


Figure S15. [Leu4] Surfactin (C15). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 4.86 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.



Surfactin isoform (C12)

Exact Mass: 966.6127

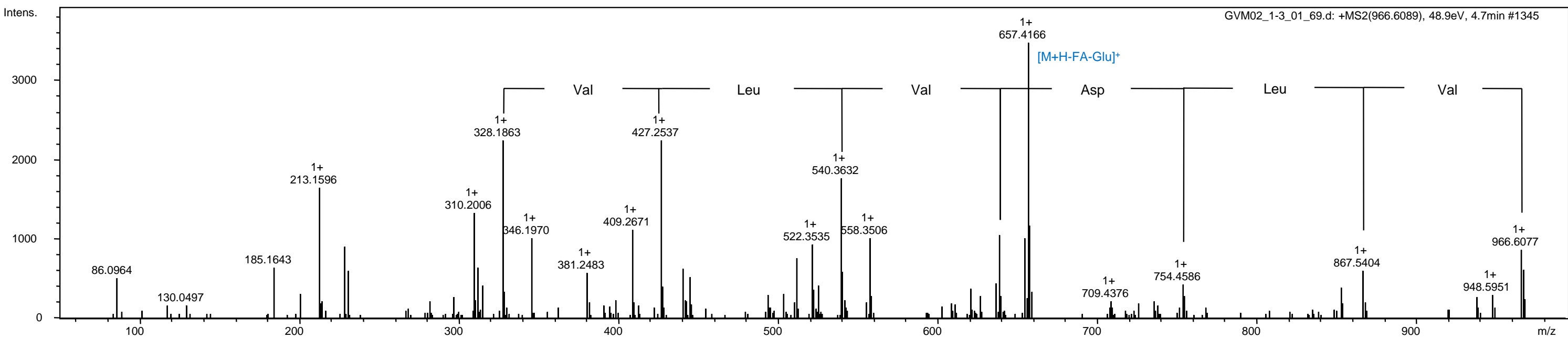
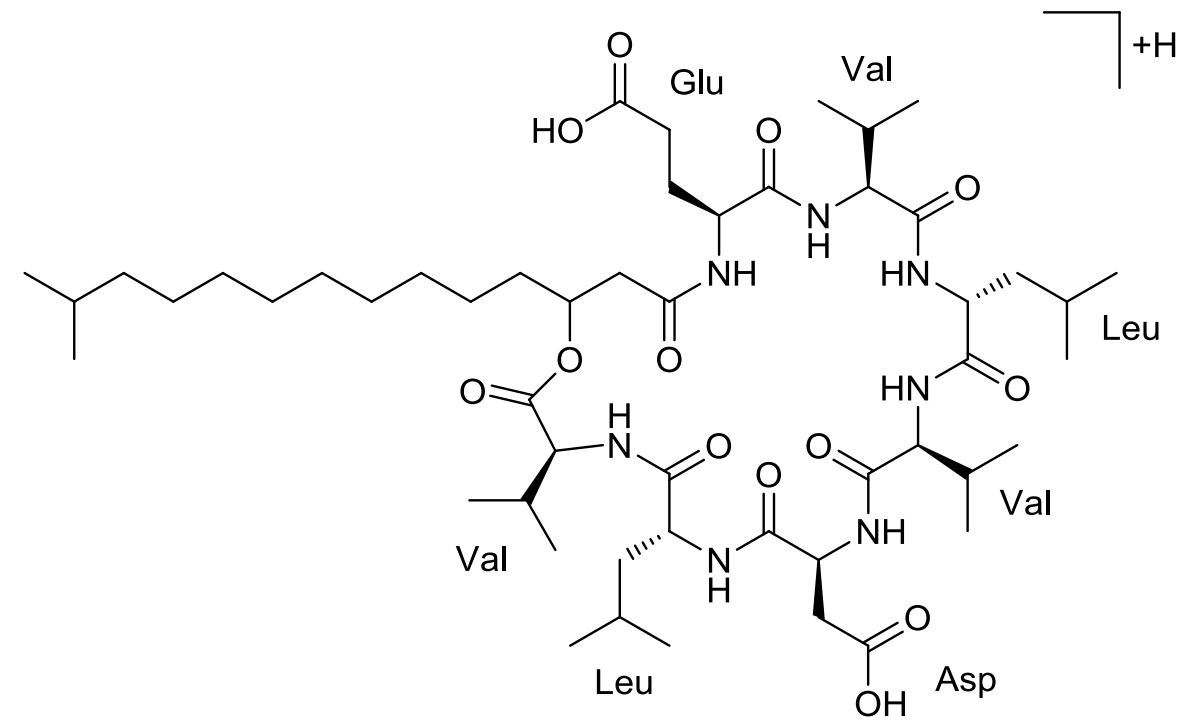


Figure S16. Surfactin isoform (C12). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 5.18 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

B. amyloliquefaciens MO4B



Surfactin Isoform (C15)

Exact Mass: 1008.6597

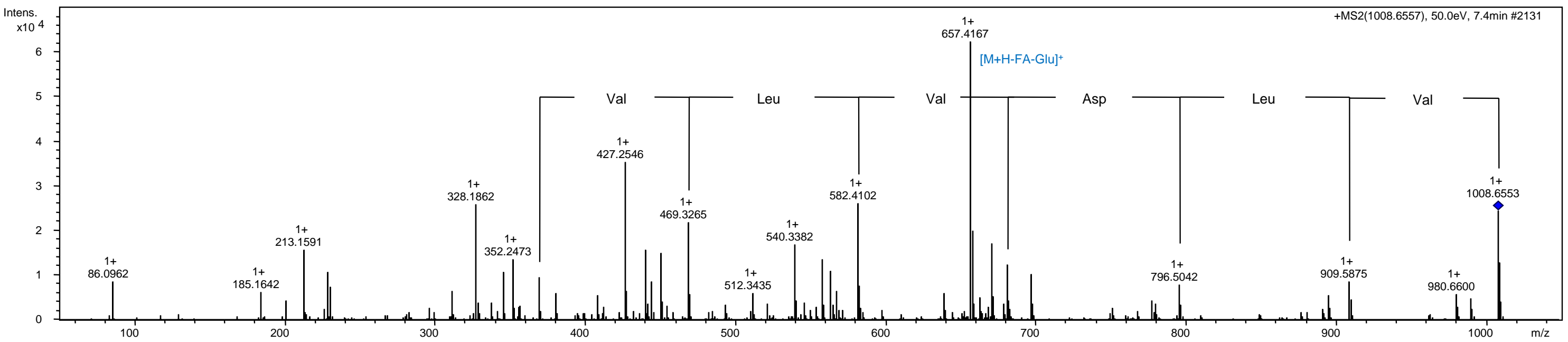


Figure S17. Surfactin isoform (C15). Tandem mass spectrometry (UHPLC-HRMS/MS) was used to identify the [M+H] ion at 4.32 ppm mass error. Identified fragments loss are depicted in the structure insert.

Table S1. Lipopeptide composition of *B. amyloliquefaciens* MO13 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Structure	Molecular Formula	[M+H] ⁺	Observed [M+H] ⁺	Error (ppm)
Surfactin A				
C11	C ₄₉ H ₈₅ N ₇ O ₁₃	980.628361	980.6245	3.94
C12	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6394	4.64
C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6555	4.13
C14	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6719	3.34
C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6874	3.44
C16	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7019	4.48
C17	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7178	4.19
Surfactin B				
C12	C ₄₉ H ₈₅ N ₇ O ₁₃	980.628361	980.6237	4.75
C13	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6399	4.13
C14	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6557	3.93
C15	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6717	3.53
Surfactin monomethyl ester				
C13	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6724	2.85
C14	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6869	3.92
C16	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7175	4.47
[Leu4] Surfactin				
C15	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7036	2.87
Surfactin isoform				
C15	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6560	3.63

Table S2. Lipopeptide composition of *B. amyloliquefaciens* MO4B analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Structure	Molecular Formula	[M+H] ⁺	Observed [M+H] ⁺	Error (ppm)
Surfactin A				
C11	C ₄₉ H ₈₅ N ₇ O ₁₃	980.628361	980.6229	5.57
C12	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6401	3.93
C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6560	3.63
C14	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6703	4.90
C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6869	3.92
C16	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7020	4.39
C17	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7187	3.34
Surfactin B				
C12	C ₄₉ H ₈₅ N ₇ O ₁₃	980.628361	980.6245	3.94
C13	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6381	5.94
C14	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6554	4.22
C15	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6681	7.05
Surfactin monomethyl ester				
C13	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6719	3.34
C14	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6864	4.40
C16	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7188	3.25
[Leu4] Surfactin				
C15	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7015	4.86
Surfactin isoform				
C12	C ₄₈ H ₈₃ N ₇ O ₁₃	966.612711	966.6077	5.18
C15	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6553	4.32

Table S3. Lipopeptide composition of *B. subtilis* ODW 02 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Structure	Molecular Formula	[M+H] ⁺	Observed [M+H] ⁺	Error (ppm)
Surfactin A				
C12	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6404	3.63
C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6560	3.63
C14	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6727	2.55
C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6879	2.95
C16	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7012	5.15
C17	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7192	2.87
Surfactin B				
C13	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6400	4.03
C14	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6556	4.03
C15	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6726	2.65
Surfactin monomethyl ester				
C14	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6877	3.15
[Leu4] Surfactin				
C15	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7028	3.63
Surfactin isoform				
C15	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6569	2.74

Table S4. Lipopeptide composition *B. gibsonii* ODW12 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Structure	Molecular Formula	[M+H] ⁺	Observed [M+H] ⁺	Error (ppm)
Surfactin A				
C12	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6426	1.42
C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6567	2.94
C14	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6734	1.87
C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6880	2.86
C16	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7029	3.53
C17	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7182	3.81
Surfactin B				
C13	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6403	3.73
C14	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6565	3.13
C15	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6734	1.87
Surfactin monomethyl ester				
C14	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6881	2.76
[Leu4] Surfactin				
C15	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7034	3.06
Surfactin isoform				
C15	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6566	3.03

Table S5. Lipopeptide composition *B. subtilis* ODW15 analyzed by UHPLC-ESI-MS/MS.

Structure	Molecular Formula	[M+H] ⁺	Observed [M+H] ⁺	Error (ppm)
Surfactin A				
C12	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6414	2.63
C13	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6555	4.13
C14	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6731	2.16
C15	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6885	2.37
C16	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7036	2.87
C17	C ₅₅ H ₉₇ N ₇ O ₁₃	1064.72226	1064.7196	2.50
Surfactin B				
C13	C ₅₀ H ₈₇ N ₇ O ₁₃	994.644011	994.6410	3.03
C14	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6580	1.65
C15	C ₅₂ H ₉₁ N ₇ O ₁₃	1022.67531	1022.6719	3.34
Surfactin monomethyl ester				
C14	C ₅₃ H ₉₃ N ₇ O ₁₃	1036.69096	1036.6878	3.05
[Leu4] Surfactin				
C15	C ₅₄ H ₉₅ N ₇ O ₁₃	1050.70661	1050.7035	2.96
Surfactin isoform				
C15	C ₅₁ H ₈₉ N ₇ O ₁₃	1008.65966	1008.6569	2.74

4. DISCUSSÃO GERAL

Biossurfactantes são metabolismos secundários sintetizados por células microbianas em desenvolvimento ou em repouso e são classificados em diferentes grupos com base em sua estrutura química e tipo de microrganismo que o sintetiza (Ron & Rosenberg, 2001; Mulligan, 2005; Bento *et al.*, 2008). Além de serem conhecidos por exibir uma atividade antimicrobiana são ainda utilizados em larga escala pelas indústrias agrícola, petrolífera, alimentar, cosmética, biotecnológica e farmacêutica como aditivos, emulsionantes, anti-adesivos e agentes espumantes (Hood & Zottola, 1995; Rosenberg & Ron, 1999; Dembitsky, 2004; Rodrigues *et al.*, 2006; Piljac *et al.*, 2008; do Valle Gomes & Nitschke, 2012).

O gênero *Bacillus* é o principal produtor de biossurfactantes lipopeptídicos, sendo esse um dos compostos biossurfactantes mais bem caracterizados (Vollenbroich *et al.*, 1997; Makovitzki *et al.*, 2006; Raaijmakers *et al.*; 2010; Mandal *et al.*, 2013). As surfactinas, sintetizadas por várias espécies de *Bacillus* como metabólitos secundários, são os principais lipopeptídeos cíclicos conhecidos e os mais utilizados comercialmente. A natureza anfífilica dos compostos biossurfactantes permite que eles exibam excelente capacidade de redução da tensão superficial e emulsificação (Satpute *et al.* 2010).

Neste estudo foram selecionados microrganismos produtores de biossurfactantes a partir de um meio contendo glicose, como única fonte de carbono. Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos de solos contaminados com petróleo. O sobrenadante das amostras que apresentaram ótimo desempenho a partir dos testes qualitativos para surfactantes, como colapso da gota e espalhamento do óleo, foram selecionados como produtores potencial de biossurfactantes e foram investigados de forma mais aprofundada e detalhada.

A identificação molecular revelou que os microrganismos pertenciam ao gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. gibsonii* e *B. amyloliquefaciens*), que é amplamente descrito pela produção dos mais efetivos biossurfactantes, especialmente as surfactinas (Banat *et al.*, 2000; Nitschke & Pastore, 2002). Segundo Banat *et al.*, (2014), várias linhagens de uma única espécie podem

produzir diferentes proporções de misturas de biossurfactantes sob as mesmas condições de cultivo.

Os microrganismos selecionados, que se destacaram na produção de biossurfactantes por apresentarem redução da medida de tensão superficial sendo também, capazes de emulsionar hidrocarbonetos (querosene). Ron & Rosenberg (2001) descreveram que nem todo biossurfactante constitui um bioemulsificante, ou seja, as duas propriedades estudadas, redução da tensão superficial e poder emulsificante, não apresentam obrigatoriamente correlação como indicativo de produção, mas os valores em ambos os testes são relevantes.

Para os testes de emulsificação, os valores de E₂₄ foram considerados satisfatórios pois as emulsões formadas pelas amostras foram superiores a 60 %. Valores descritos na literatura indicam que um microrganismo é produtor de um bom bioemulsificante quando os valores são superiores a 40 % (Youssef *et al.*, 2004). A emulsificação é uma propriedade importante nos biossurfactantes pois se refere à dispersão de uma fase líquida em outra, causando a mistura de dois líquidos imiscíveis (Inès & Dhouha, 2015). Felix (2012) ao formular emulsões com diesel, querosene, gasolina, tolueno, n-hexadecano e heptano, utilizando o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI005, relatou um E₂₄ com valores em torno de 60 % para os combustíveis e hidrocarbonetos. Alvarez *et al.*, (2015) obtiveram um índice de emulsificação de 40 % para uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, isolada de amostras ambientais contaminadas com petróleo. Ndlovu (2017) mostrou a formação de emulsões estáveis, até 90 % em querosene e óleo mineral, para *B. subtilis* ST33 enquanto que para *B. amyloliquefaciens* ST34 a atividade de emulsificação em querosene foi de 77,3 %.

No que diz respeito a medidas de tensão superficial, alguns autores descrevem que um composto biossurfactante eficaz é aquele com capacidade de reduzir a tensão superficial da água (72 mN/m) para aproximadamente 35 mN/m (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Soberón-Chávez, 2010). Segundo Patowary *et al.* (2015), um biossurfactante eficiente é aquele que produz a redução na medida da tensão superficial para em torno de 35 mN/m. Decesaro *et al.* (2013) avaliaram a produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel e obtiveram valores de redução

da medida de tensão superficial para *Bacillus* spp. de 33 % com tensão superficial final de 35,67 mN/m. Aayed et al. (2015) mostraram que utilizando *B. amyloliquefaciens* An6 a medida da tensão de um sobrenadante de cultura, contendo glicose como fonte de carbono, diminuiu rapidamente após a inoculação e atingiu o seu valor mais baixo (29 mN/m) após cerca de 35 horas de cultivo e permaneceu quase constante até ao final (72 horas).

Ndlovu et al. (2017a) obtiveram com isolados de *Bacillus* spp., em meio de cultivo suplementado com 2 % de glicose ou glicerol, uma produção de biossurfactantes com capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 67,9 mN/m para 32,1 mN/m (menor tensão superficial registrada) pelos isolados. Já Faria et al. (2011) utilizando glicerol bruto, sub-produto do biodiesel, para produção e caracterização de surfactina de *B. subtilis* LSFM-05, obtiveram uma tensão superficial de 29,5 mN/m. Alvarez et al. (2015) observaram com *B. amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, isolado de amostras ambientais contaminadas com petróleo, a redução da tensão superficial de 28,5 mN/m (água 72 mN/m) após 48 h de cultivo a 32 °C.

o estudo, as amostras provenientes do crescimento do *Bacillus* que apresentaram redução significativa das medidas de tensão superficial foram então submetidas aos testes para determinar a concentração micelar crítica do biossurfactante. Segundo Zhang & Miller (1992), a concentração necessária para reduzir a tensão superficial da água de 71,2 mN/m para valores abaixo de 40 mN/m é tipicamente entre 1 e 200 mg/L. Sousa et al. (2012) relataram a CMC da surfactina padrão (Sigma Aldrich - pureza ≥ 98 %) de 7-20 $\mu\text{mol/L}$ e para o biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI009 e *B. subtilis* LAMI005 de 32,4 mg/L e 28,0 mg/L, respectivamente.

Neste trabalho, os isolados de *Bacillus* spp., coletadas de solos contaminados com petróleo, tais como *B. gibsonii* ODW12, *B. subtilis* ODW02, *B. amyloliquefaciens* MO4B e *B. amyloliquefaciens* MO13, apresentaram resultados eficientes quando comparadas com os resultados propostos pela literatura, com CMC abaixo de 200 mg/L, destacando a melhor eficiência do biossurfactante produzido por *B. amyloliquefaciens* MO13 e MO4B que alcançaram valores abaixo de 45 mg/L reduzindo a tensão superficial para valores abaixo de 30 mN/m. A exceção foi o *B. subtilis* ODW15 que necessitou de concentrações mais altas de biossurfactantes (389 mg/L) para reduzir a

tensão superficial. *B. amyloliquefaciens* se destacou em relação ao *B. subtilis*, que é amplamente descrito pela sua eficiência de CMC (Nitschke *et al.*, 2006).

Ayed *et al.* (2015), obtiveram para *B. amyloliquefaciens* An6 uma CMC de 100 mg/L. Vaz *et al.* (2012) obtiveram valores de CMC de 40 mg/L de um biossurfactante produzido por uma linhagem de *B. subtilis* isolada de amostras de óleo bruto. Liu *et al.* (2013) avaliaram linhagens produtoras de biossurfactante isoladas de campo petrolífero de águas residuais e obtiveram valores de concentração de CMC de 21,8 mg/L.

Fox & Bala (2000), utilizaram meio contendo resíduos de batata, para produção de biossurfactante por *B. subtilis* e relataram uma CMC 100 mg/L. Ismail *et al.* (2013) testaram diferentes fontes de carbono (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, glicose, petróleo bruto e produtos de refinaria) para produção de biossurfactantes por um determinado *Bacillus* sp. I-15 e obtiveram resultados satisfatórios apenas utilizando glicose, com uma CMC de 200 mg/L.

As diferenças nos valores de CMC relatadas por diferentes autores podem ser atribuídas aos diferentes graus de purezas dos biossurfactantes estudados, já que a presença de sais e/ou produtos do metabolismo celular afetam a determinação da CMC (Samson *et al.*, 1990). Portanto, vale ainda ressaltar que os biossurfactantes encontrados neste trabalho não são puros e, mesmo assim, os resultados de CMC são satisfatórios.

Dentre as inúmeras vantagens apresentadas pelos biossurfactantes, a estabilidade frente às condições extremas é uma característica muito importante e apresentada por grande parte dos compostos. Compostos estáveis são descritos como àqueles que não perdem sua capacidade de emulsificação ou de redução a tensão superficial do meio.

A estabilidade dos biossurfactantes selecionados foram avaliados frente ao efeito da temperatura, pH, salinidade e pressão a fim de avaliar a capacidade de manter a redução das medidas de tensão superficial e a emulsificação da fase hidrocarboneto.

Os biossurfactantes produzidos pelos isolados de *Bacillus* deste trabalho se apresentaram estáveis e não perderam a capacidade de reduzir a tensão superficial, mantendo os valores inalterados após serem submetidos a variações de pH, temperatura, pressão e salinidade.

Os estudos realizados por Nitschke & Pastore (2006) mostram que a temperatura, salinidade e pHs alcalinos não influenciaram na tensão superficial para a surfactina produzida por *B. subtilis* em meio manipueira (água de mandioca utilizada para produção de farinha) a 100 °C por 120 minutos. Horowitz *et al.* (1990) ao estudarem o lipopeptídeo de *B. licheniformis* JF-2 verificaram que o mesmo é estável a temperaturas em torno de 75 °C por 140 horas e pH entre 5,0 e 12,0. Segundo Alvarez *et al.* (2015), uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, isolada de amostras ambientais contaminadas com petróleo não alterou suas propriedades de biossurfactante após autoclavagem a 121 °C por 15 min.

A capacidade de emulsificação de algumas amostras de *Bacillus* spp. utilizadas neste trabalho, mostraram alterações quando submetidas ao aquecimento. A capacidade de emulsificação de *B. subtilis* ODW15, *B. gibsonii* ODW12, *B. subtilis* ODW02 foi reduzida, enquanto *B. amyloliquefaciens* MO13 aumentou significativamente após o aquecimento. Por outro lado, *B. amyloliquefaciens* MO4B apresentou maior estabilidade térmica e menor decréscimo na capacidade de emulsificação após 1 hora de aquecimento a 100 °C.

Bezza *et al.* (2015) avaliaram um biossurfactante produzido por *B. subtilis* CN2, que se mostrou termoestável. A atividade de emulsificação e a tensão superficial do biossurfactante permaneceram constantes ao longo da faixa de temperatura estudada (25 - 125 °C) com valor médio de tensão superficial de 31 mN/m e valor médio de E₂₄ de 82 %. O aquecimento do sobrenadante a 120 °C por meia hora não causou efeito significativo no desempenho do biossurfactante.

Ayed *et al.* (2014) demonstraram que *B. mojavencis* A21 possui atividade de emulsificação em uma ampla faixa de temperatura de 20 a 100 °C, com resultados mais altos em temperaturas mais baixas. A atividade de mais de 60 % de emulsificação a 100 °C sugeriu que o biossurfactante A21 poderia ser útil em ambientes extremos.

Neste projeto, quando avaliada a estabilidade do biossurfactante em condições ácidas e básicas, não foram observadas mudanças na capacidade do surfactante de reduzir a tensão superficial da água, mas houve alterações na emulsificação. Quando o pH foi reduzido para 4 e 2, a atividade de

emulsificação cessou, provavelmente devido à precipitação parcial do biossurfactante, pela presença dos grupos carboxila na estrutura da surfactina. Em condições fortemente ácidas, o carboxilato é protonado e a surfactina torna-se menos solúvel em água, perdendo sua capacidade de emulsificação. Essa característica já foi relatada na literatura (Nitschke & Pastore, 2006) e permitiu a recuperação de surfactinas por precipitação ácida. Por outro lado, sob condições neutras ou básicas (valores de pH de 7, 8, 10 e 12), observou-se um forte decréscimo na atividade de emulsificação para *B. gibsonii* ODW12 e *B. subtilis* ODW02. Para *B. amyloliquefaciens* MO4B a emulsificação apresentou valores estáveis e *B. subtilis* ODW15 não apresentou diferença para os valores de E_{24} . Um aumento significativo em E_{24} foi observado novamente para *B. amyloliquefaciens* MO13. Neste caso, quanto mais básico o meio, mais ionizados são os grupos carboxila das surfactinas e, portanto, os compostos tornam-se mais solúveis em água. Como consequência, a capacidade de estabilizar as emulsões também aumenta (Long *et al.*, 2017).

Ayed *et al.*, (2014), relataram que para *B. mojavencis* A21 o índice de emulsificação mais elevado foi observado em pH 6. Khopade *et al.*, (2012), relataram que o aumento do pH de 5 para 12 diminuiu a tensão superficial de 34 para 30 mN/m e houve um aumento de 15 % na emulsificação.

Os valores extremos de pH podem transformar espécies ativas de superfície fracas em emulsificadores mais ativos, aumentando a ionização (Shin *et al.*, 2004; Abouseoud *et al.*, 2008). Biossurfactantes que apresentam elevada estabilidade frente à temperatura e pH são considerados ótimos bioprodutos para serem utilizados na remediação de ambientes contaminados em condições mais drásticas (Banat, 1993; Das & Mukherjee, 2005).

A adição de quantidades crescentes de NaCl (de 0,5 % a 35 %) não afetou as propriedades tensoativas porém não houve emulsificação na presença de NaCl. No entanto, estudos realizados por Rossmann (2008) e Nitschke & Pastore (2006) mostraram que a adição de sal não influenciou na tensão superficial como também no índice de emulsificação.

Alguns tensoativos biológicos são capazes de suportar concentração de até 10 % de NaCl, possibilitando a utilização deste em biorremediações de ambientes marinhos. Uma concentração salina de 2-3 % é suficiente para inativar surfactantes químicos convencionais (Bognolo, 1999).

Ayed *et al.* (2015) mostraram que *B. amyloliquefaciens* An6 apresentou alta capacidade de emulsificação e uma eficiência em condições ambientais extremas para pH e salinidade. Bezza *et al.* (2015), relatou que a atividade de emulsificação e a tensão superficial do biossurfactante produzido por *B. subtilis* CN2 permaneceram constantes em toda a faixa estudada de salinidade (5 – 20 % m/v) com valor médio de tensão superficial de 31 mN/m e valor médio de 82 % para E₂₄.

A estabilidade do biossurfactante em condições altamente alcalinas e salinidade extrema sugere alto potencial do biossurfactante para a biorremediação de derramamentos em ambientes marinhos de alta salinidade e condições alcalinas (Shin *et al.*, 2004; Abouseoud *et al.*, 2008).

Uma variedade de métodos pode ser utilizada para classificar e caracterizar os compostos biossurfactantes produzidos por microrganismos, dependendo da natureza das biomoléculas. Dependendo do microrganismo e das condições de crescimento podem ser produzidos biossurfactantes e ou bioemulsificantes com características estruturais distintas. Desta forma, em cada caso deve-se procurar conhecer pelo menos o gênero dos microrganismos estudados e testar diferentes métodos de extração, visando ao melhor rendimento do biossurfactante a partir do meio de cultura (Bento *et al.*, 2008). Vários trabalhos apresentam a precipitação (ácida, com acetona ou com sulfato de amônio) do biossurfactante, seguida ou não da extração com diferentes combinações de solventes, tais como: clorofórmio-metanol, diclorometano-metanol, butano, acetato, pentano, hexano, entre outros. A precipitação ácida é muito utilizada na primeira parte da extração das surfactinas e de glicolipídios (Bento *et al.* 2005; Nitschke *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2008).

Para isso, inicialmente foi realizada a extração dos biossurfactantes por precipitação ácida de acordo com Belgacem *et al.* (2015). A extração foi realizada por três vezes usando clorofórmio/metanol em um funil de separação para extração dos compostos orgânicos. A fase orgânica forneceu um óleo marrom viscoso que foi então utilizado nas análises cromatográficas através das técnicas de cromatografia em camada delgada (TLC) e Cromatografia Líquida de Alto Desempenho acoplada à Espectrometria de Massa de Alta Resolução (UHPLC-HRMS).

A TLC foi realizada para a determinação preliminar dos tipos de biossurfactantes, utilizando acetato de etila como eluente. O reagente ninidrina foi utilizado como agente de desenvolvimento da cor para a detecção de peptídeos. Para a detecção de carboidratos foi utilizado como agente de desenvolvimento da cor o reagente anisaldeído e o reagente antrona para a detecção de açúcares redutores. A análise da TLC sugeriu que os biossurfactantes produzidos eram peptídeos, uma vez que foi observada coloração na placa cromatográfica quando o reagente ninidrina foi usado (Smyth *et al.*, 2010). Por outro lado, quando as amostras foram reveladas com o reagente anisaldeído não houve o desenvolvimento da cor na amostra, indicando a ausência de carboidratos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Bezza *et al.*, (2015), que caracterizaram biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* CN2 e observaram a presença de aminoácidos na amostra, quando reveladas com reagente de ninidrina enquanto que não foi observado o desenvolvimento da cor quando a amostra foi exposta a anisaldeído, o que confirma a ausência de porção de açúcar. Resultados semelhantes foram relatados por Sriram *et al.* (2011), que confirmaram a presença de biossurfactante lipopeptídico produzido por *B. cereus* NK1. Esses resultados foram similares aos relatados por Fernandes *et al.* (2007), para uma surfactina comercial padrão (Sigma). Os resultados observados também corroboram com o resultado de Yu *et al.* (2002), que obtiveram a partir de *B. amyloliquefaciens* B94 a presença de compostos peptídicos.

Quando o agente de desenvolvimento antrona foi utilizado nas amostras, a cor azul não foi observada. No entanto, para o controle positivo *P. aeruginosa*, conhecido pela produção de ramnolipídeos, houve a formação de cor azul quando exposto a antrona. Em conjunto, estes achados apoiam ainda mais a visão de que os biossurfactantes produzidos por *Bacillus* spp. não são glicolipídeos, mas sim lipopeptídeos.

O foco seguinte deste trabalho foi a caracterização dos biossurfactantes lipopeptídicos produzidos pelo gênero *Bacillus* por UHPLC-HRMS. Esses estudos revelaram a presença de várias surfactinas. A surfactina é um heptapeptídeo cíclico ligado a uma porção lipídica (Figura 17). A família das surfactinas consiste em uma mistura de isoformas devido a variações dos aminoácidos da cadeia peptídica cíclica e a variações no número de átomos de

carbono e hidrogênio da porção lipídica (Peypoux *et al.*, 1994). Essas isoformas foram diferenciadas de acordo com seu padrão de fragmentação e características estruturais (Bonmatin *et al.*, 1995; Tang *et al.*, 2010; Biniarz & Lukaszewicz, 2017).

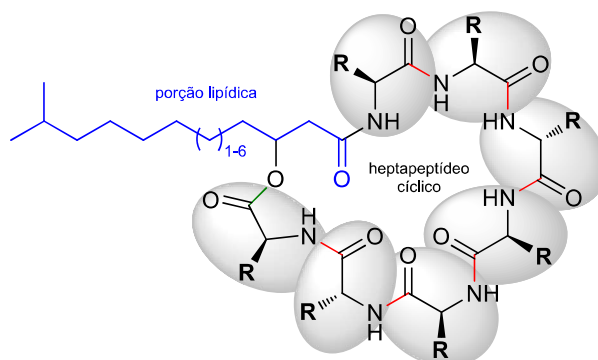


Figura 17. Estrutura geral de surfactinas.

A surfactina A possui a cadeia peptídica composta pela seguinte sequência de aminoácidos Glu/Leu/Leu/Val/Asp/Leu/Leu. Os espectros EM/EM revelaram a presença de 6 ou 7 surfactinas A nas amostras analisadas, devido a diferentes tamanhos na cadeia lipídica (11 a 17 átomos de carbono). Todas as surfactinas A apresentaram o mesmo fragmento comum $[M+H]^+$ de 685,449 referente a sequência de aminoácidos Leu/Leu/Asp/Val/Leu/Leu e 554,355 referente a sequência de aminoácidos Leu/Asp/Val/Leu/Leu (Apêndice 1).

A surfactina B possui a cadeia peptídica composta pela seguinte sequência de aminoácidos Glu/Leu/Leu/Val/Asp/Leu/Val. Os espectros EM/EM revelaram a presença de 3 ou 4 surfactinas B nas amostras analisadas, devido a diferentes tamanhos na cadeia lipídica (12 a 15 átomos de carbono). Todas as surfactinas B apresentaram o mesmo fragmento comum $[M+H]^+$ de 671,434 referente a sequência de aminoácidos Leu/Leu/Asp/Val/Leu/Val e 554,355 referente a sequência de aminoácidos Leu/Asp/Val/Leu/Val (Apêndice 2).

A surfactina monometil éster possui a cadeia peptídica composta pela seguinte sequência de aminoácidos Glu/Leu/Leu/Val/Asp-OMe/Leu/Leu. Os espectros EM/EM revelaram a presença de 3 surfactinas monometil éster nas amostras *B. amyloliquefaciens* MO13 e *B. amyloliquefaciens* MO4B, com cadeias carbônicas de 13, 14 e 16 átomos. Para *B. subtilis* ODW 02, *B. gibsonii* ODW12 e *B. subtilis* ODW15 apenas uma surfactina monometil éster, com 14

átomos de carbono na cadeia lipídica, foi encontrada. Todas as surfactinas monometil éster apresentaram o mesmo fragmento comum $[M+H]^+$ de 699,465 referente a sequência de aminoácidos Leu/Leu/Asp-OMe/Val/Leu/Leu e 568,370 referente a sequência de aminoácidos Leu/Asp-OMe/Val/Leu/Leu (Apêndice 3).

A surfactina [Leu4] possui a cadeia peptídica composta pela seguinte sequência de aminoácidos Glu/Leu/Leu/Leu/Asp/Leu/Leu. Os espectros EM/EM revelaram a presença de apenas uma surfactina [Leu4], com cadeia carbônica de 15 átomos, em todas as amostras analisadas. A surfactina [Leu4] apresentou o fragmento $[M+H]^+$ de 699,465 referente a sequência de aminoácidos Leu/Leu/Asp/Leu/Leu/Leu e 568,370 referente a sequência de aminoácidos Leu/Asp/Leu/Leu/Leu (Apêndice 4).

Além das surfactinas acima relatadas uma nova isoforma de surfactina, ainda não relatada na literatura, contendo a sequência de aminoácidos Glu/Val/Leu/Val/Asp/Leu/Val foi observada (Apêndice 5). Os espectros EM/EM revelaram a presença dessa surfactina com cadeia lipídica contendo 15 átomos de carbonos em todas as amostras analisadas. Para a amostra *B. amyloliquefaciens* MO4B também foi observado uma isoforma com cadeia lipídica contendo 12 átomos de carbono. Essas surfactinas apresentaram o fragmento $[M+H]^+$ de 657,418 referente a sequência de aminoácidos Val/Leu/Asp/Val/Leu/Val e 540,339 referente a sequência de aminoácidos Leu/Asp/Val/Leu/Val.

Por UHPLC-ESI-EM/EM foi possível identificar 16 isoformas de surfactinas para *B. amyloliquefaciens* MO13, 17 isoformas para *B. amyloliquefaciens* MO4B, 12 isoformas para *B. subtilis* ODW02, *B. gibsonii* ODW12 e *B. subtilis* ODW15. Os espectros MS/MS de todas as surfactinas identificadas para a amostra *B. amyloliquefaciens* MO4B são encontradas no *Supporting Information* do artigo. Inès & Dhouha (2015) reportaram a produção de surfactina, iturina e fengicina por *B. subtilis* JKK328. Já *B. subtilis* BBK-1 produziu surfactina, plipastatina e bacilomicina L e *Bacillus licheniformis* F2.2 produziu plipastatina e surfactina.

Os extratos obtidos de *B. amyloliquefaciens* ST34 cultivados em MSM suplementados com diferentes substratos imiscíveis e miscíveis em água confirmaram a produção extracelular de quatro grupos de surfactina, quando

analisados por UPLC-MS. O que diferiu entre as amostras foi a abundância do grupo de lipopeptídeo encontrado, demonstrando que a fonte de carbono tem uma influência no tipo de lipopeptídeo produzido (Ndlovu *et al.*, 2017b). Essa conclusão já havia sido relatada anteriormente por Singh *et al.* (2014), que utilizaram diferentes fontes de carbono (sacarose e glicerol) para produção de lipopeptídeos por *B. amyloliquefaciens* AR2.

Vater *et al.* (2002) detectaram por espectrometria de massa MALDI-TOF que os biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* C-1 em meio contendo 2 % de glicose como fonte de carbono, foram capazes de produzir três complexos lipopeptídicos, as surfactinas, as iturinas e as fengicinas. Alajlani *et al.* (2016) analisaram a produção de biossurfactantes de *B. subtilis* BIA por MALDI-TOF-MS e observaram dois agrupamentos de picos com diferentes proporções massa/carga (m/z) para o produto purificado o qual revelou que os compostos eram surfactina e iturina.

Faria *et al.* (2011), caracterizaram a produção de uma surfactina por *B. subtilis* LSFM-05 por espectrometria de massa concluindo que a isoforma predominante para essa surfactina foi relativa ao íon m/z 1036,7, e a fragmentação desse íon possibilitou a elucidação da molécula que continha 7 aminoácidos na cadeia peptídica na sequência - GluOMe-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu e uma porção lipídica contendo 14 átomos de carbono.

Nam *et al.* (2015) identificaram lipopeptídios produzidos por *B. amyloliquefaciens* BC32-1, do tipo iturina (m/z 1032, 1046 e 1060), surfactina (m/z 995, 1009 e 1023) e fengicina (m/z 1464, 1478, 1492 e 1506) utilizando análise por espectrometria de massa de cromatografia líquida (LC-MS). Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) caracterizaram a produção de surfactinas em *B. subtilis* BS5 por HPLC e identificaram novas isoformas.

Por fim, a metodologia de *molecular networking* permitiu correlacionar as moléculas estruturalmente semelhantes, pelo uso de seus padrões de fragmentação, confirmando a interpretação dos espectros de massas e a formação de uma série de homólogos de surfactinas.

5. CONCLUSÕES

Foi realizada a prospecção, identificação e caracterização de biossurfactantes através da seleção de microrganismos isolados de solos contaminados com petróleo. Cinco dos 200 isolados testados foram positivos em testes de colapso da gota, espalhamento de óleo, ensaios de emulsificação e diminuição significativa da medida de tensão superficial (abaixo de 30 mN/m). Os isolados bacterianos selecionados pelos critérios acima, foram identificados por sequenciamento parcial da região 16S como do gênero *Bacillus*, com as seguintes espécies *B. subtilis*, *B. gibsonii* e *B. amyloliquefaciens*. Os biossurfactantes produzidos em meio aquoso com glicose foram quimicamente caracterizados por meio da análise por UHPLC-HRMS, indicando a produção de homólogos de surfactinas, incluindo uma nova classe dessas moléculas. Cabe salientar que *B. amyloliquefaciens* MO4B se destacou por ser um produtor de biossurfactantes muito promissor para a reparação de danos ambientais causados por derramamentos de petróleo, mesmo quando as amostras foram submetidas a alterações de pH ou expostos a elevadas temperaturas.

6. PERSPECTIVAS

Em virtude dos resultados obtidos, futuros experimentos avaliarão o potencial das surfactinas produzidas por *B. amyloliquefaciens* através da:

- síntese de surfactinas em biorreator utilizando como fonte de carbono a glicose;
- influência da temperatura, agitação, pH e razão de aeração na produção de surfactinas em biorreator;
- avaliação da eficiência das surfactinas produzidas no biorreator em conjunto com microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo;
- avaliação potencial de biorremediação dos biossurfactantes em tanques contaminados com óleo (avaliação em maior escala).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from oil refinery wastes. *Langmuir*, 17(5): 1367-1371, 2001.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. -H. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150: 289-303, 2008.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins, and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1323-1336, 2010.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, S.; NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223: 143-151, 2008.

ALAJLANI, M.; SHIEKH, A.; BRANTNER, A. Purification of Bioactive Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strain BIA. *Chromatographia*, 79: 1527-1532, 2016.

ALVAREZ, V. M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J. M.; DE SOUZA, P. M.; DE ARAÚJO, L. V.; BARROS, T. G.; SOUZA, R.; FREIRE, D. M. G.; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136: 14-21, 2015.

ANDREW J. HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P. Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7): 861-868, 2004.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 95: 23-29, 2012.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31: 488-494, 1986.

AYED, H. B.; JEMIL, N.; MAALEJ, H.; BAYOUDH, A.; HMIDET, N. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99: 8-14, 2015.

AYED, H. B.; JRIDI, M.; MAALEJ, H.; NASRI, M.; HMIDET, N. Characterization and stability of biosurfactant produced by *Bacillus mojavensis* A21 and its application in enhancing solubility of hydrocarbon. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89: 1007-1014, 2014.

BANAT, I. M. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced oil Recovery and oil pollution Remediation: A Review. *Bioresource Technology*, 51(1): 1-12, 1995.

BANAT, I. M. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 15: 591-594, 1993.

BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I. BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L.; SMYTH T. J. MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology Biotechnolgy*, 87: 427-444, 2010.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5): 495-508, 2000.

BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5: 697, 2014.

BANAT, I.; SAMARAH, N.; MURAD, M.; HORNE, R.; BANERJEE S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7: 80-88, 1991.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; MARÓSTICA, M. R.; PASTORE, M. G. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. *Química Nova*, 30(2): 01-14, 2007.

BELGACEM, Z. B.; BIJTTEBIER, S.; VERRETH, S.; VOORSPOELS, S.; VAN DE VOORDE, I.; AERTS, G.; WILLEMS, K. A.; JACQUEMYN, H.; RUYTERS, S.; LIEVENS, B. Biosurfactant production by *Pseudomonas* strains isolated from floral nectar. *Journal of Applied Microbiology*, 118: 1370-1384, 2015.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical

structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85: 1-8, 2004.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENGERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96: 1049-1055, 2005.

BENTO, F. M.; OLIVEIRA, F. A. C.; GAYLARDE, C. G. Biossurfactantes. In: MELO, ITAMAR SOARES DE. *Microbiologia ambiental*. Editado por ITAMAR SOARES DE MELO & JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO. – 2ª. edição rev. ampl. - Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 647, 2008.

BEZERRA, MÁRCIO SILVA. Estudo da produção de biossurfactantes sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AP029-GVIIA utilizando manipueira como fonte de carbono. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, 101: 168-178, 2015.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, 30(8): 231-236, 1999.

BINIARZ, P. & LUKASZEWICZ, M. Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101: 4747-4759, 2017.

BODOUR, A. A. & MILLER-MAIER, R. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 273-280, 1998.

BODOUR, A. A.; DREES, K. P.; MAIER, R. M. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3280-3287, 2003.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*, 152: 41-52, 1999.

BONMATIN, J. M.; LAPRÉVOTE, O.; PEYPOUX, F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Journal of Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6(6): 541-556, 2003.

BONMATIN, J.; LABBÉ, H.; GRANGEMARD, I.; PEYPOUX, F.; MAGET-DANA, R.; PTAK, M.; MICHEL, G. Production, isolation and characterization of [Leu (5)] surfactins and [Ile (4)] surfactins from *Bacillus subtilis*. *Letters in Peptide Science*, 2: 41-47, 1995.

BRANDT, K. K.; HESSELSON, M.; ROSLEV, P.; HENRIKSEN, K.; SORENSEN, J. Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate on metabolic activity, growth rate, and microcolony formation of *Nitrosomonas* and *Nitrospira* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2489-2498, 2001.

BRUNER, S. D.; WEBER, T.; KOHLI, R. M.; SCHWARZER, D.; MARAHIEL, M. A.; WALSH, C. T.; STUBBS, M. T. Structural Basis for the Cyclization of the Lipopeptide Antibiotic Surfactin by the Thioesterase Domain SrfTE. *Structure*, 10: 301-310, 2002.

BUENO, S. M. *Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo*. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, SP.

BUENO, S. M.; DA SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Química Nova*, 33(7): 1572-1577, 2010.

CAMEOTRA, S. S. & MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure and Applied Chemistry*, 82:97-116, 2010.

CAMEOTRA, S. S. & MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactant in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50: 520-529, 1998.

CASTIGLIONI, G. L.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Produção de biossurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. *Química Nova*, 32(2): 292-295, 2009.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*. 103: 158-169, 2015.

CHRISTOFI, N. & IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 915-929, 2002.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4): 846-850, 1985.

COLLA, L. M. & COSTA, J. A. V. Obtenção e Aplicação de Biossurfactantes. *Vetor*, 13: 85-103, 2003.

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

DA ROS, L.; NASCI, C.; CAMPESAN, G.; SARTORELLO, P.; STOCCO, G.; MENETTO, A. Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and cadmium in the digestive gland of mussel, *Mytilus* sp. *Marine Environmental Research*, 39(1-4): 321-324, 1995.

DALTIN, D. Tensoativos: Química, Propriedades e Aplicações. São Paulo: *Edgar Blucher*. 2011.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(2): 192-199, 2005.

DE OLIVEIRA, D. W. F.; FRANÇA, I. W. L.; FÉLIX, A. K. N.; MARTINS, J. J. L.; GIROA, M. E. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101: 34- 43, 2013.

DECESARO, A. & RIGON, M. R. Produção de Biossurfactantes por Microrganismos Isolados de Solo Contaminado com Óleo Diesel. *Química Nova*, 36(7): 947-954, 2013.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophysical Journal*, 94: 2667-2679, 2008.

DEMBITSKY, V. M. Astonishing diversity of natural surfactants: 1. Glycosides of fatty acids and alcohols. *Lipids* 39: 933-953, 2004.

DESAI, J. D.; BANAT, J. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1): 47-67, 1997.

DO VALLE GOMES, Z. M.; NITSCHKE, M. Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria. *Food Control*. 25: 441-447, 2012.

DUSANE, D. H.; ZINJARDE, S. S.; VENUGOPALAN, V. P.; MCLEAN, R. J.; WEBER, M. M.; RAHMAN, P. K. S. M. Quorum sensing: Implications on Rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 27: 159-184, 2010.

FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; BARBOSA G. N. O.; VAZ B. G.; SILVA I. S.; GARCIA J. S.; TÓTOLA M. R.; EBERLIN M. N.; GROSSMAN M.; ALVES O. L.; DURRANT L. R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from biodiesel industry. *Process Biochemistry*, 46: 1951-1957, 2011.

FELIPE, L. O. & DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. *Química Nova Escola*, 39(3): 228-236, 2017.

FELIX, A. K. N. *Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por Bacillus subtilis LAMI005 a partir do suco de caju*. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

FERNANDES, P. L. *Produção de biossurfactantes por Bacillus spp. em condição anaeróbia*. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*, 10: 208-217, 1992.

FOX, S. L. & BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresearch Technology*, 75: 235-40, 2000.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I. M. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672: 121-134, 2010.

GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. K. Microbial surfactants: A review. *Journal of Oleo Science*, 55: 155-166, 2005.

GUDIÑA, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; RODRIGUES, L. R.; COUTINHO, J. A. P.; TEIXEIRA, J. A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial enhanced oil recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 68: 56-64, 2012.

HABA, E.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3): 379-387, 2000.

HADDAD, N. I. A.; WANG, J.; MU, B. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacillus brevis* HOB1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 1597-1604, 2008.

HAIGH, S. D. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *Science of The Total Environment*, 185(1-3): 161-170, 1996.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*, 10: 247-256, 1992.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6: 148-159, 2001.

HOOD, S. K. & ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. *Food Control*, 6: 9-18, 1995.

HOROWITZ, S.; GILBERT, J. N.; GRIFFIN, W. M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. *Journal of Industrial Microbiology*, 6: 243-248, 1990.

HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 49: 186-191, 2004.

HU, L. B.; SHI, Z. Q.; ZHANG, T.; YANG, Z. M. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiology Letters*, 272(1):91-98, 2007.

HUANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LU, L. The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29: 381-389, 2015.

HUSZCZA, E. & BURCZYK, B. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 61: 727-733, 2006.

INÈS, M. & DHOUBA, G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71: 100-112, 2015.

ISMAIL, W.; AL-ROWAIHI, I. S.; AL-HUMAM, A. A.; HAMZA, R. Y.; EL-NAYAL A. M.; BOUOUDINA, M. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84: 168-178, 2013.

JAIN, D. K.; COLLINS-THOMPSON, D. L.; LEE, H.; TREVORS, J. T. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, 13: 271-279, 1991.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 698-700, 1985.

JENNINGS, E. M. & TANNER, R. S. Biosurfactant - producing bacteria found in contaminated and uncontaminated soils. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research. 299-306, 2000.

KACHHOLZ, T. & SCHLINGMANN, M. Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment. In: Kosaric N, Cairns WL, Grey NCC, (eds.), *Biosurfactant and Biotechnology*, New York, Marcel Dekker Inc. 25: 183-208, 1987.

KALINOVSKAYA, N. I.; KUZNETSOVA, T. A.; IVANOVA, E. P.; ROMANENKO, L. A.; VOINOV, V. G.; HUTH, F.; LAATSCH, H. Characterization of Surfactin-like Cyclic Depsipeptides Synthesized by *Bacillus pumilus* from Ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine Biotechnology*, 4: 179-188, 2002.

KANMANI, P.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Probiotics and Its Functionally Valuable Products-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(6): 641-658, 2013.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, 3: 198-204, 2012.

KIM, H. S.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnology*

Applied Biochemistry, 31: 249- 253, 2000.

KIM, H. S.; YOON, B. D.; LEE, C. H.; SUH, H. H.; OH, H. M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1): 41-46, 1997.

KIM, K. M.; LEE, J. Y.; KIM, C. K.; KANG, J. S. Isolation and Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *Archives of Pharmacal Research*, 32: 711-715, 2009.

KIM, K.; JUNG, S. Y.; LEE, D. K.; JUNG, J. K.; PARK, J. K.; KIM, D. K.; LEE, C. H. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochemical Pharmacology*, 55: 975-985, 1998.

KIM, P. I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y. T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 942-949, 2004.

KLEINDIENST, S.; SEIDAL, M.; ZIERVOGEL, K.; GRIM, S.; LOFTIS, K.; HARRISON, S.; MALKIN, S. Y.; PERKINS, M. J.; FIELD, J.; SOGIN, M. L.; DITTMAR, T.; PASSOW, U.; MEDEIROS, P. M.; JOYE, S. B. Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 112: 14900-14905, 2015.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 39: 295-304, 2001.

KOSARIC, N. Biosurfactants in industry. *Pure Applied Chemistry*, 64: 1731-1737, 1992.

KOSARIC, N. Biosurfactants. *In: Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise*. REHMAND, H.-J., REED, G. (Eds.), 6(17): 659-713, 1996.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. Biosurfactants and biotechnology. *Surfactant science series*, 25: 342, 1987.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *Journal of colloid and interface science*, 204: 1-8, 1998.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; PICKFORD, R.; DERRICK, J. P.; LAMERS, G. E. M.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Characterization of Two *Pseudomonas putida* Lipopeptide Biosurfactants,

Putisolvin I and II, Which Inhibit Biofilm Formation and Break Down Existing Biofilms. *Molecular Microbiology*, 51(1): 97-113, 2004.

LANG, S. Biological Amphiphiles (Microbiol Biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7: 12-20, 2002.

LANG, S. & WAGNER, F. Structures and properties of biosurfactants. In: Kosaric N, Cairns WL, Gray NCC, editors. *Biosurfactants and biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc, 21-45, 1987.

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

LI Y. M.; HADDAD N. I.; YANG S. Z.; MU B. Z. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 14: 229-235, 2008.

LICHTENBERG, D.; ROBSON, R. J.; DENNIS, E. A. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochemistry Biophysical Acta*, 737: 285-304, 1983.

LIMA, A. S. *Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por Saccharomyces lipolytica*. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

LIN, S. C. Biosurfactants: Recent Advances. *Journal Chemistry Technology and Biotechnology*, 66: 109-120, 1996.

LINDNER, A. *Síntese de surfactantes altamente biodegradáveis pela transesterificação de ésteres de ácidos graxos com sacarose*. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.

LIU, J.; CHEN, Y.; XU, R.; JIA, Y. Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oilfield wastewater. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2): 168-174, 2013.

LIU, Q.; LIN, J.; WANG, W.; HUANG, H.; LI, S. Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 93: 31-37, 2015.

LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Isolation and characterization of a C-12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *Journal of Peptide Science*,

4: 864-875, 2008.

LONG, X.; HE, N.; HE, Y.; JIANG, J.; WU, T. Biosurfactant surfactin with pH-regulated emulsification activity for efficient oil separation when used as emulsifier. *Bioresource Technology*, 241: 200-206, 2017.

MAIER, R. M. Biosurfactant: Evolution and diversity in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 52: 101-121, 2003.

MAIER, R. M. & SOBERÓN-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 625-633, 2000.

MAKKAR, R. S. & CAMEOTRA, S. S. An update on the Use of Unconventional substrates for Biosurfactant Production and their New Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58: 428-434, 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *Applied Microbiology and Biotechnology Express*, 1: 5, 2011.

MAKOVITZKI, A.; AVRAHAMI, D.; SHAI, Y. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 15997-16002, 2006.

MANDAL, S. M.; BARBOSA, A. E.; FRANCO, O. L. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*, 31: 338-345, 2013.

MIMEE, B.; LABBE, C.; PELLETIER, R. & BELANGER, R. R. Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 1597-1599, 2005.

MIRELES, J. R. 2nd.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R. M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183: 5848-5854, 2001.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of the lipopeptide biosurfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488: 211-218, 2000.

MULLIGAN, C. N. Environment applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, Barking, 133: 183-198, 2004.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133: 183-198, 2005.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. Factors influencing the economics of biosurfactants. In: *Biosurfactants: production, properties, applications*. KOSARIC, N. ed., Marcel Decker Inc., New York, 392-371, 1993.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60: 371, 2001.

MULLIGAN, C. N.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. Biosurfactants: Research trends and applications. *CRC Press*. New York, 2014.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T.; SIVACHIDAMBARAM, P. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science*, 94: 736-747, 2008.

NAM, J.; JUNG, M. Y.; KIM, P. I.; LEE, H. B.; KIM, S. W.; LEE, C. W. Structural characterization and temperature-dependent production of C17-fengycin B derived from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BC32-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(4): 708-713, 2015.

NARENDRA KUMAR, P.; SWAPNA, T. H.; KHAN. M. Y.; REDDY, G.; HAMEEDA, B. Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 4: 1722-1740, 2017.

NDLOVU, T. *Bioprospecting for Novel Biosurfactants and Biosurfactant Producing Bacteria in Wastewater*. 2017. Thesis (Doctor of Philosophy) - Faculty of Science Department of Microbiology, University of Stellenbosch, South Africa.

NDLOVU, T.; RAUTENBACH, M. KHAN, S. AND KHAN, W. Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Express*, 7: 109, 2017a.

NDLOVU, T.; RAUTENBACH, M.; VOSLOO, J. A.; KHAN, S.; KHAN, W. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*, 7: 108, 2017b.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.; CONTIERO, J. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(7): 2066-2074, 2010.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 81-85, 2004.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, São Paulo, 25: 772-776, 2002.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 106: 295-302, 2003.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97(2): 336-341, 2006.

ONGENA M., JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*, 16: 115-125, 2008.

ONGENA, M.; JOURDAN, E.; ADAM, A.; PAQUOT, M.; BRANS, A.; JORIS, B.; ARPIGNY, J. L.; THONART, P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4): 1084-1090, 2007.

PANCHAL, C. & ZAJIC, J. Isolation of emulsifying agents from a species of *Corynebacterium*. *Developments in Industrial Microbiology*. 19: 569-576, 1978.

PENTEADO, J. C. P.; EL SEOUD, O. A.; CARVALHO, L. R. F. Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica. *Química Nova*, 29: 1038-1046, 2006.

PATOWARY, K.; SAIKIA, R. R.; KALITA, M. C.; DEKA, S. Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2. *Annals of Microbiology*, 65: 225-234, 2015.

PEYPOUX, F., BONMATIN, J.M., LABBE, H., GRANGEMARD, I., DAS, B.C., PTAK, M.; WALLACH, J.; MICHEL, G. [Ala4] Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *European Journal of Biochemistry*, 224: 89-96, 1994.

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

1999.

PHAN, T. T. P.; NGUYEN, H. D.; SCHUMANN, W. Novel plasmid based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Science*, 46: 189-195, 2006.

PILJAC, A.; STIPCEVIC, T.; PILJAC-ZEGARAC, J.; PILJAC, G. "Successful treatment of chronic decubitus ulcer with 0.1% dirhamnolipid ointment." *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 12(3): 142-6, 2008.

PILJAC, T. & PILJAC, G. Use of rhamnolipids in wound healing, treating burn shock, atherosclerosis, organ transplants, depression, schizophrenia and cosmetics (European Patent 1 889 623), *Paradigm Biomedical Inc New York*, 1999.

PIRÔLLO, M. P. S. *Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50: 71, 2006.

PUEYO, M. T.; BLOCH, C.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; DI MASCIO, P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain. *Microbial Ecology*, 57: 367-378, 2009.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRRA, G. E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 1321-324, 2003.

RAAIJMAKERS, J. M.; BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 1037-1062, 2010.

RAHMAN, P. & GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology*, 7: 360-370, 2008.

REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; DE FRANÇA, F. P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 115(1): 899-912, 2004.

RENDELL, N. B.; TAYLOR, G. W.; SOMERVILLE, M.; TODD, H.; WILSON, R.; COLE J. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1045(2): 189-193, 1990.

RODRIGUES, L.; BANAT, I.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 609- 618, 2006.

ROMERO, D.; VICENTE, A.; OLMOS, J.L.; DÁVILA, J.C.; PÉREZ-GARCÍA, A. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 969-976, 2007.

RON, E. Z. & ROSENBERG, E. Biosurfactants and Oil Bioremediation. *Environmental Biotechnology*, 13: 249-252, 2002.

RON, E. Z. & ROSENBERG, E. Minireview: natural roles of biosurfactantes. *Environmental Microbiology*, 3(4): 229-236, 2001.

ROSENBERG, E. & RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 154-162, 1999.

ROSENBERG, M. & ROSENBERG, E. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Journal of Bacteriology*, 148: 51-57, 1981.

SALIHU, A.; ABDULKADIR, I.; ALMUSTAPHA, M. N. An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 4: 111-117, 2009.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J. A.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 307: 246-253, 2007.

SANTA ANNA, L. M. M.; SORIANO, A. U.; GOMES, A. C.; MENEZES, E. P.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; PEREIRA JR. N. Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, 82: 687-691, 2007.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V; MENEZES, E. P; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A. S.; PEREIRA JR. N.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactans from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environmental. *Brazilian Journal Chemistry Engineering*. 19: 159-166, 2002.

SANTOS, D. K.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(401): 31, 2016.

SANTOS, D. K.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(401): 31, 2016.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bio-emulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28(4): 436-450, 2010.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Progress in Energy and Combustion Science*, 24: 714-724, 2008.

SEYDLOVA G. & SVOBODOVA J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Central European Journal of Medicine*. 3: 123-133, 2008.

SHAKERI FARD, P. *Production and purification of biosurfactants and study of their influence on surface properties of stainless steel and Teflon*. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia de Funções Biológicas) - Laboratório ProBioGEM, UPRES-EA 1026 Polytech'Lille.

SHALIGRAM, N. S. & SINGHAL, R. S. Surfactin - a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48: 119, 2010.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S.; CHAUHAN, N.; PROCHA, S.; LAL, S. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *Springer Plus*, 4(1): 1-14, 2015.

SHIN, K. H.; KIM, K. W. AND SEAGREN, E. A. Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 336-343, 2004.

SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3: 132-139, 2014.

SINGH, A. K.; RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus sp* strain AR2. *Microbial Cell Factories*, 13: 67, 2014.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1): 99-121, 2007.

SINGH, P. & CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnology*, 22: 142-146, 2004.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.I. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, ed. TIMMIS, K. N. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 3706-3723, 2010.

SNOOK, M. E.; MITCHELL, T.; HINTON, D. M.; BACON, C. W. Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4287-4292, 2009.

SOARES, DARLANE WELLEN FREITAS. Estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará - Brasil). 2014. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. & MAIER, R. M. Biosurfactants: a General Overview. In: Soberón-Chávez G., editor. Biosurfactants, *Springer-Verlag*; Berlin, Germany: 1-11, 2011.

SOUSA, M.; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus sp.* using glycerine from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35: 897-906, 2012.

SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; GRACEROSEPAT, R.; SRISAKTHI, K.; GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85: 174-181, 2011.

STELLER, S. & VATER, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. *Journal of Chromatography*, 737: 267-275, 2000.

TANG, J.-S.; ZHAO, F.; GAO, H.; DAI, Y.; YAO, Z.-H.; HONG, K.; LI, J.; YE, W.-C.; YAO, X. -S. Characterization and online detection of surfactin isomers based on HPLC-MSn analyses and their inhibitory effects on the overproduction of nitric oxide and the release of TNF- α and IL-6 in LPS-induced macrophages. *Marine Drugs*, 8: 2605-2618, 2010.

TARDOS, T. Adsorption of Surfactants at the Air/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces Applied Surfactants: Principles and Applications. *Weinheim: Wiley VCH*, 85: 112, 2005.

THAVASI, R.; SHARMA, S.; JAYALAKSHMI, S. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, S1: 001, 2011.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J. & RAHMAN, P. K. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6: 245, 2015.

VAN BOGAERT, I. N. A.; ZHANG, J.; SOETAERT, W. Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochemistry*, 46: 821-833, 2011.

VAN HAESENDONCK, I. P. H. & VANZEVEEREN, E. C. A. Rhamnolipids in bakery products. US 2006/0233935 A1, *International Application Patent (PCT)*, Washington, DC., USA, 2004.

VAN HAMME, J. D. & URBAN, J. Biosurfactants in bioremediation. In: SINGH, A.; KUHAD, R.C.; WARD, O.P. Cap 4. *Advances in applied bioremediation. Springer*, 378, 2009.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin – A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Journal of Antibiotics*, 39(7): 888-901, 1986.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 6210-6219, 2002.

VAZ, D. A.; GUDIÑA, E. J.; ALAMEDA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89: 167-174, 2012.

VOLLENBROICH, D.; ÖZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 25: 289-297, 1997.

WALTER, V.; SYLDATK, C. E HAUSMANN, R. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *Landes Bioscience*, 1-14, 2008.

WALTER, V.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672: 1-13, 2010.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VAN DER VOORT, M.; POGLIANO, K. P.; GROSS, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of living microbial colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 109: 10150-10151, 2012.

WANG, J.; LIU, J.; WANG, X.; YAO, J.; YU, Z. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology* 39: 98-102, 2004.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; WRAY, V.; FREDRICKSON, H. L. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied Environmental Microbiology*, 61: 1706-1713, 1995.

YANG J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *Journal of Natural Products*, 76: 1686 – 1699, 2013.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnology Progress*, 21(4): 1329-1334, 2005.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; MC INERNEY, M. J. Comparasion of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganism. *Journal of Microbiology Methods*, 56: 339-347, 2004.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry*, 34: 955-963, 2002.

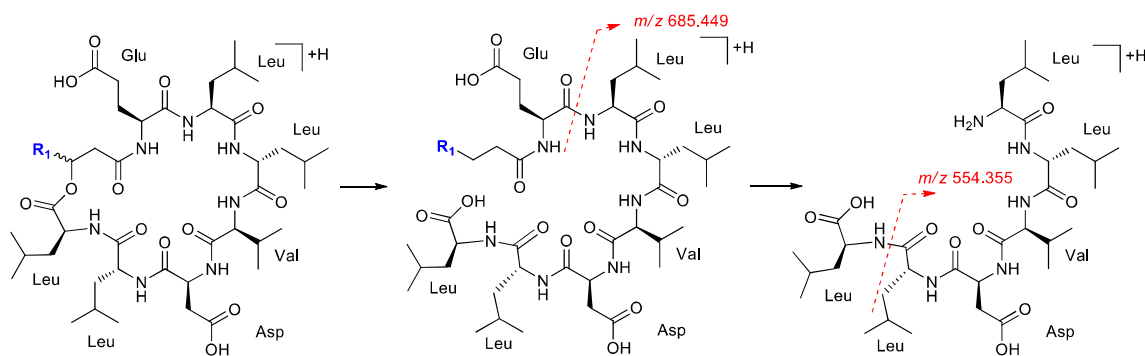
ZAJIC, J. E. & SEFFENS, W. Biosurfactants. *Critical Review in Biotechnology*, 1: 87-107, 1984.

ZHANG, J.; LEE, S.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. Surface Properties of Emulsan- Analogs. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74: 759-765, 1999.

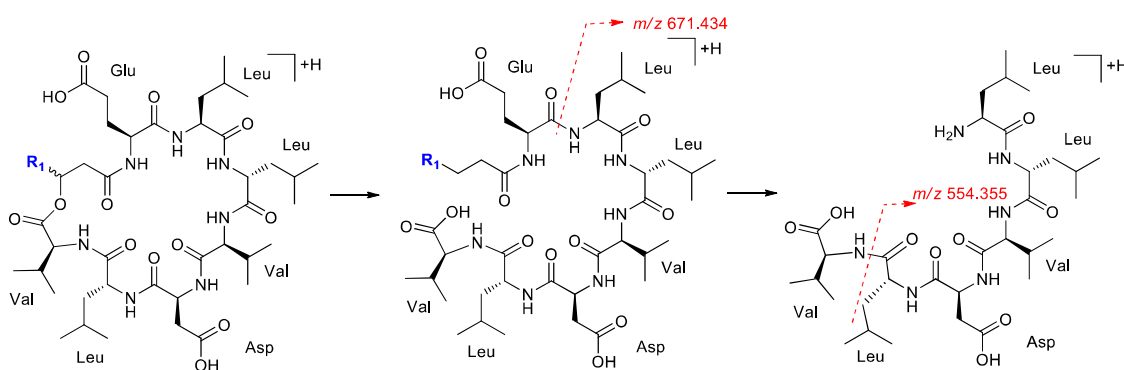
ZHANG, X., XU, D., ZHU, C., LUNDAA, T. & SCHERR, K.E. Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Chemical Engineering Journal*, 209: 138-146, 2012.

ZHANG, Y. & MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3276-3282, 1992.

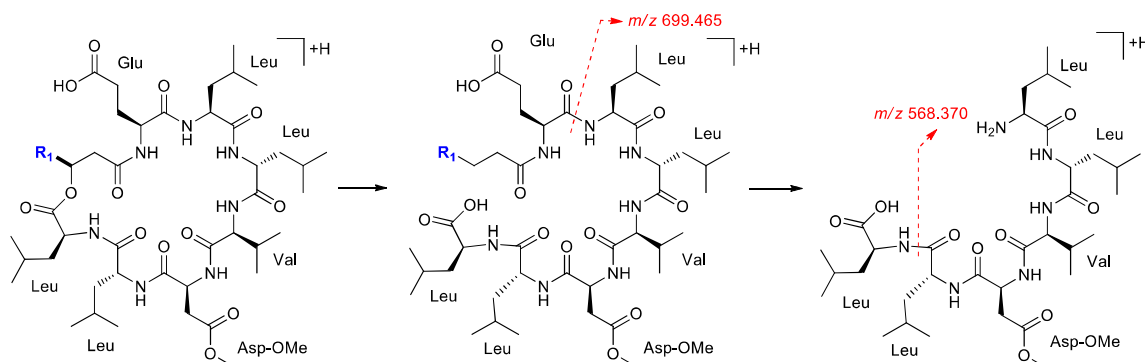
8. APÊNDICE



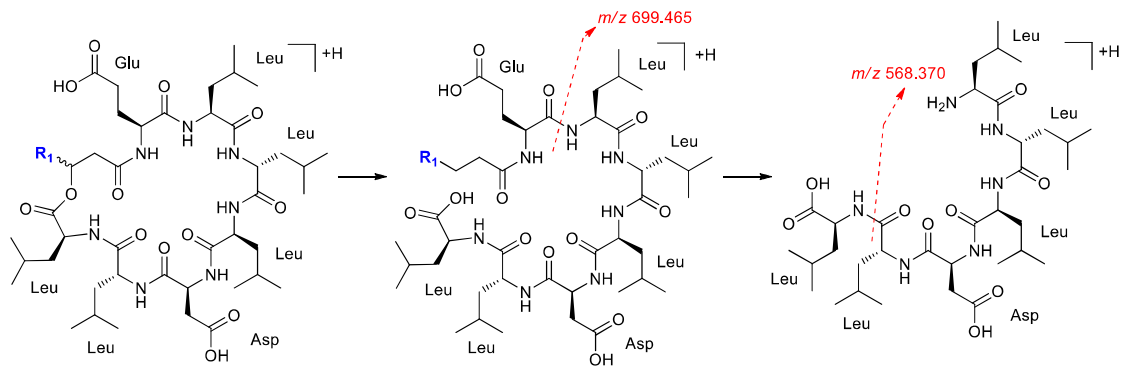
Apêndice 1. Padrão de fragmentação das surfactinas A.



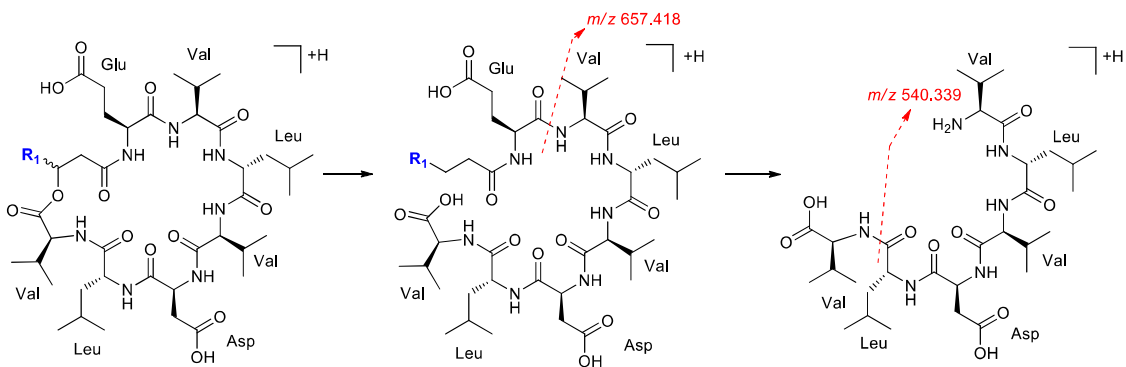
Apêndice 2. Padrão de fragmentação das surfactinas B.



Apêndice 3. Padrão de fragmentação das surfactina monometil éster.



Apêndice 4. Padrão de fragmentação das surfactina [Leu4].



Apêndice 5. Padrão de fragmentação das novas isoformas de surfactinas.