



MARIANA PRÓSPERI DE OLIVEIRA PAULA

**SELEÇÃO DE CEPAS DO GRUPO *Bacillus subtilis* PARA
PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES COM POTENCIAL
ANTIMICROBIANO**

LAVRAS – MG

2020

MARIANA PRÓSPERI DE OLIVEIRA PAULA

**SELEÇÃO DE CEPAS DO GRUPO *Bacillus subtilis* PARA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Profa. Dr. Cristina Ferreira Silva e Batista

LAVRAS – MG

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Paula, Mariana Prósperi de Oliveira.

Seleção de cepas do grupo *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactantes com potencial antimicrobiano / Mariana Prósperi de Oliveira Paula. - 2020.

65 p.

Orientador(a): Cristina Ferreira Silva e Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Biossurfactantes. 2. Potencial antimicrobiano. 3. Resíduo agroindustrial. I. Silva e Batista, Cristina Ferreira. II. Título.

MARIANA PRÓSPERI DE OLIVEIRA PAULA

**SELEÇÃO DE CEPAS DO GRUPO *Bacillus subtilis* PARA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTES COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

**SELECTION OF STRAINS OF THE *Bacillus subtilis* GROUP FOR THE
PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS WITH ANTIMICROBIAL POTENTIAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 14 de outubro de 2020.

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Profa. Dra. Maria Gabriela da Cruz Pedrozo Miguel	UFLA
Profa. Dra. Patrícia Nirlane da Costa Souza	IECT/ UFVJM

Orientadora

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

LAVRAS - MG

2020

Dedico à minha família, que sempre incentivou o saber científico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, que sempre me apoiou em minhas escolhas e me motivou a construir minha carreira acadêmica. Amo vocês. À Profa. Dra. Cristina, que além de me orientar neste trabalho, me auxiliou nas dificuldades encontradas e nas adaptações que foram necessárias ao longo do trabalho. À Juliete, minha grande amiga e doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, por ter atuado na idealização deste trabalho e por ter me ajudado muito no laboratório. Aos colegas de mestrado e amigos Luciano e Ana Luiza, pelo companheirismo e pela amizade. Ao pessoal do Núcleo de Estudos em Microbiologia Ambiental e Industrial (NEMAI), por toda ajuda durante os experimentos. Aos técnicos Dirceu e Cidinha e à Profa. Angélica, pela prestatividade e simpatia. Aos membros da banca, pelas contribuições no dia da defesa. Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, com destaque à secretária Rose, por sempre ajudar os discentes pacientemente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADA.

RESUMO

O Brasil possui economia fortemente ligada à agricultura e isso tem como consequência a grande produção de resíduos agroindustriais. O reaproveitamento desses resíduos como fontes nutricionais em bioprocessos contribui para a diminuição de danos ambientais, bem como reduz os custos de produção de metabólitos de alto valor agregado, como os biossurfactantes. De forma a tornar a produção microbiana de biossurfactantes menos onerosa e mais sustentável, é oportuno utilizar o glicerol residual da produção de biodiesel como substrato para microrganismos. Os biossurfactantes, moléculas anfipáticas sintetizadas por plantas e microrganismos, possuem diversas aplicabilidades na agroindústria, nas indústrias farmacêutica, alimentícia, petrolífera, além de seus potenciais na biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos. Objetivou-se produzir biossurfactantes pelo grupo *Bacillus subtilis* em glicerol residual e verificar o potencial antimicrobiano e a fitotoxicidade desses bioprodutos. Os testes de Índice de Emulsificação (E₂₄), Ensaio de espalhamento da gota e Cromatografia de Camada Delgada indicaram a produção de biossurfactantes lipopeptídicos pelas cepas testadas e, dentre essas, *Bacillus subtilis* grupo CCMA 0087 se destacou pela atividade antibacteriana e bactericida contra *E. coli*. Além disso, foi verificado que o biossurfactante bruto da cepa *Bacillus subtilis* grupo, isolada do alperujo e codificada como BAL 0081, apresentou as maiores taxas de inibição contra as espécies de *Fusarium* e de *Aspergillus* dentre as cepas de *Bacillus* testadas. Ademais, os extratos brutos de *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 0087 não se mostraram fitotóxicos à *Lactuca sativa* var. “Veronica” na concentração de 50mg/mL. Esses resultados demonstraram que os biossurfactantes brutos de *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 0087 exerceram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, fungos fitopatogênicos e não foram fitotóxicos na concentração de 50mg/mL, o que indica o potencial desses metabólitos como agentes de biocontrole.

Palavras-chave: Biossurfactantes. Resíduo agroindustrial. Potencial antimicrobiano.

ABSTRACT

Brazil has an economy strongly attributed to agriculture and this results in the large production of agro-industrial waste. The reuse of these residues as nutritional sources in bioprocesses contributes to the reduction of environmental damage, as well as reducing the costs of producing high added value metabolites, such as biosurfactants. In order to make the microbial production of biosurfactants less costly and more sustainable, it is appropriate to use the residual glycerol from biodiesel production as a substrate for microorganisms. Biosurfactants, amphipathic molecules synthesized by plants and microorganisms, have several applications in the agro-industry, in the pharmaceutical, food and oil industries, in addition to their potential in the bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons. The objective of this study was to produce biosurfactants by the *Bacillus subtilis* group in residual glycerol and to verify the antimicrobial potential and phytotoxicity of these bioproducts. The tests of Emulsification Index (E_{24}), Oil spreading assay and Thin Layer Chromatography indicated the production of lipopeptide biosurfactants by the strains tested and, among these, *Bacillus subtilis* group CCMA 87 stood out for its antibacterial and bactericidal activity against *E.coli*. In addition, it was verified that the crude biosurfactant of the strain *Bacillus subtilis* group BAL 0081 presented the highest inhibition rates against the species of *Fusarium* and *Aspergillus* among the tested *Bacillus* strains. Furthermore, the crude extracts of *Bacillus subtilis* group BAL 0081 and CCMA 0087 were not phytotoxic to *Lactuca sativa* var. "Veronica" at a concentration of 50mg/mL. These results demonstrated that the crude biosurfactants of *Bacillus subtilis* group BAL 0081 and 0087 exerted antimicrobial activity against pathogenic bacteria, phytopathogenic fungi and were not phytotoxic at a concentration of 50mg/mL, which indicates the potential of these metabolites as biocontrol agents.

Keywords: Biosurfactants. Agro-industrial waste. Antimicrobial potential.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 – Síntese do peptídeo não ribossômico (NRP)..... 15
- Figura 2 – Principais estruturas químicas da surfactina (C15), iturina (C13) e fengicina (C16)..... 18

Capítulo 2

- Figura 1 – Teste de hemólise em Ágar sangue com indicação de beta-hemólise..... 49
- Figura 2 – Teste de espalhamento da gota e representação do Índice de emulsificação (E₂₄)..... 50
- Figura 3 – CCD realizada para verificação da presença de lipopeptídeos..... 52
- Figura 4 – Inibição do crescimento de *F. paranaense* CML 1830 quando exposto ao extrato bruto de CCMA 81..... 55
- Figura 5 – Medidas do comprimento das raízes em cm de *Lactuca sativa* var. *Verônica*, após tratamento das sementes com os extratos brutos de CCMA 81 e 87..... 59
- Figura 6 – Porcentagem de germinação das sementes de *Lactuca sativa* var. *Verônica*, submetidas ao tratamento com os extratos brutos de CCMA 81 e 87..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seleção das cepas potenciais produtoras de biossurfactante através do teste de beta-hemólise em ágar-sangue.....	49
Tabela 2 – Avaliação da produção de biossurfactantes por meio do Índice de Emulsificação (EI24) e diâmetro do halo do teste de espalhamento da gota de azeite de oliva frente aos sobrenadantes.....	50
Tabela 3 – Porcentagens de inibição de crescimento bacteriano obtidas com o biossurfactante bruto em concentrações diferentes (mg /mL).....	53
Tabela 4 – Atividade antifúngica do biossurfactante produzido pelas cepas CCMA 51,81,87 e 658.....	55
Tabela 5 – Porcentagens de inibição de crescimento fúngico obtidas com o biossurfactante bruto em concentrações diferentes (mg/mL).....	57

SUMÁRIO

Capítulo 1	
1	INTRODUÇÃO..... 12
2	REFERENCIAL TEÓRICO 13
2.1	Biossurfactantes..... 13
2.1.2	Biossurfactantes lipopeptídicos..... 15
2.1.2.1	Fatores influentes na produção de biossurfactantes lipopeptídicos..... 19
2.1.3	Resíduos agroindustriais como substratos na produção de biossurfactantes... 20
2.1.3.1	Glicerol como fonte de carbono na produção de biossurfactantes..... 20
2.1.4	Ação biológica dos biossurfactantes..... 22
2.1.4.1	Biossurfactantes ativos na agricultura..... 22
2.1.4.1.1	Lipopeptídeos antifúngicos..... 24
2.1.4.2	Lipopeptídeos ativos em patógenos bacterianos..... 26
2.1.4.3	Ação dos lipopeptídeos nas células microbianas..... 27
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31
Capítulo 2	
	RESUMO..... 39
1	INTRODUÇÃO..... 40
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 41
2.1	Reagentes empregados..... 41
2.2	Microorganismos..... 41
2.3	Seleção das cepas 42
2.4	Produção de biossurfactante..... 43
2.5	Avaliação da produção de biossurfactante..... 43

2.5.1	Índice de Emulsificação (E_{24}).....	43
2.5.2	Ensaio de espalhamento de óleo.....	43
2.6	Recuperação do Biosurfactante.....	44
2.7	Atividade antibacteriana do biosurfactante.....	44
2.8	Atividade antifúngica do biosurfactante.....	45
2.9	Análise de fitotoxicidade.....	47
2.10	Cromatografia em Camada Delgada.....	47
2.11	Análise Estatística.....	48
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
3.1	Seleção de cepas pelo teste de Beta-hemólise.....	48
3.2	Avaliação da produção de biosurfactante.....	49
3.3	Detecção de lipopeptídeos.....	51
3.4	Inibição de patógenos bacterianos.....	52
3.5	Potencial da atividade antifúngica.....	54
3.6	Análise de Fitotoxicidade.....	58
4	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A diversidade microbiana existente é uma importante fonte de recursos para o avanço da biotecnologia. Nesse âmbito, produtos naturais sintetizados por bactérias vêm sendo aplicados em diversos ramos da indústria. Os membros do grupo *Bacillus subtilis* são conhecidos pela síntese de uma variedade de metabólitos secundários, incluindo policetídeos, terpenos, sideróforos e peptídeos sintetizados ribossomalmente e não ribossomalmente (HARWOOD *et al.*, 2018).

Nesse contexto, metabólitos podem atuar como biossurfactantes, compostos anfífilos capazes de estabilizar emulsões e aumentar a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meio aquoso (CHRZANOWSKI *et al.*, 2012). Características como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta especificidade em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade tornam esses agentes bioativos interessantes para os mais diversos ramos da indústria (ABDELHAFIZ *et al.*, 2017).

O crescente surgimento de patógenos microbianos resistentes a medicamentos e o progressivo consumo de pesticidas na agricultura apontam a necessidade de investigar novos medicamentos e alternativas ambientalmente viáveis para o controle de doenças (HAWKINS; FRAAIJE, 2018; LING *et al.*, 2015).

Com o intuito de reverter fontes renováveis em matérias-primas úteis para a elaboração de produtos, o cultivo do grupo *B. subtilis* tem sido praticado em meios de cultura formulados com resíduos industriais. Tal iniciativa é capaz de reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado do resíduo na natureza e diminuir o custo de produção de bioprodutos (JIMOH; LIN, 2019).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi selecionar cepas do grupo *B. subtilis* potencialmente produtoras de biossurfactantes, obtê-los via fermentação e recuperá-los do caldo de fermentação. Por fim, testes de fitotoxicidade, atividade antimicrobiana contra patógenos bacterianos e fitopatógenos fúngicos foram realizados com os biossurfactantes brutos das cepas selecionadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas de origem microbiana e vegetal, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre dois líquidos. Foram inicialmente estudados na década de 60, na qual um biossurfactante denominado surfactina, sintetizado por *B. subtilis*, foi caracterizado e purificado (ARIMA; KAKINUMA; TAMURA, 1968). A ação tensoativa desses bioprodutos é descrita por Attwood e Florence (2003). Segundo os autores, os biossurfactantes em meio aquoso são alinhados à superfície, de forma que a parte hidrofóbica se posiciona para fora do meio e a hidrofílica, para dentro do meio, que é solvatado por interação íon-dipolo ou dipolo-dipolo. As moléculas iniciam o processo de associação, formando agregados. Assim, depois de completar a monocamada devido ao aumento da concentração, ocorre um estado de equilíbrio dinâmico entre a camada superficial e as micelas formadas, de modo que a área de contato entre a cadeia apolar e o meio aquoso é diminuída, reduzindo as tensões superficial e interfacial. Micelas são estruturas globulares com a parte hidrofóbica de cada molécula voltada para o interior e a hidrofílica localizada na parte externa. A concentração em que é iniciada a formação dessas é denominada concentração micelar crítica (CMC), propriedade intrínseca e característica dos surfactantes em temperatura e concentração eletrolítica específicas.

No que se refere aos biossurfactantes produzidos por microrganismos, são compostos sintetizados por uma ampla faixa de espécies, sendo essas pertencentes a gêneros como *Acinetobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Saccharomyces*, *Thiobacillus* e *Ustilago* (LI et al., 2016; SHEKHAR et al., 2015). Quanto à natureza bioquímica, os biossurfactantes podem ser fosfolipídios, glicolipídios, lipopeptídios, ácidos graxos, lipídeos neutros, dentre outros, possuindo alto ou baixo peso molecular (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

Biossurfactantes microbianos são produzidos por bioprocessos, oferecendo menor dano ambiental em comparação aos processos químicos tradicionais da produção de surfactantes. Após a obtenção desses metabólitos via fermentação, os métodos de isolamento comumente utilizados são extração com solvente, precipitação com sulfato de amônio, precipitação ácida, ultrafiltração e diálise (MUNUSAMY et al., 2020). O método da precipitação ácida é comumente utilizado em escala laboratorial e consiste na acidificação do caldo de fermentação

com um ácido, como o HCl, até o alcance do pH 2. Posteriormente a essa etapa, é feita centrifugação da amostra e, logo após, o sobrenadante é descartado e o precipitado é solubilizado em água ou solventes orgânicos, como metanol e o etanol. Apesar da simplicidade do método, há desvantagens como o tempo gasto para precipitação do biossurfactante bruto e a necessidade de subseqüentes operações unitárias para atingir maior pureza da biomolécula (SILVA *et al.*, 2015).

Surfactantes biológicos têm aplicabilidade em diversos setores industriais: na indústria farmacêutica, podem ser inseridos na fórmula de cosméticos e de medicamentos antimicrobianos; na alimentícia, podem ser ingredientes estabilizantes de emulsões e, na lavanderia industrial, podem agir como detergentes menos tóxicos que os sintetizados quimicamente. Além disso, biossurfactantes são bons biorremediadores de solos degradados por agentes como metais pesados, hidrocarbonetos e pesticidas (DRAKONTIS; AMIN, 2020). Contudo, o atual setor de destaque desses bioprodutos é a indústria do petróleo. Nesse setor, os biossurfactantes podem ser empregados desde a extração até o refino, assim como na limpeza de óleo em tanques de armazenamento e na recuperação melhorada de petróleo (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Em relação aos surfactantes químicos, os biossurfactantes têm grande biodegradabilidade, baixa toxicidade, resistência a condições extremas de pH, temperatura e salinidade, além de exercerem um papel fisiológico no aumento da biodisponibilidade e solubilidade de substâncias hidrofóbicas. Tais características induziram o interesse mundial nesses produtos, apesar do custo de produção do biossurfactante ainda ser maior que o do concorrente químico (ABDELHAFIZ *et al.*, 2017; MULLIGAN, 2009; PEREIRA *et al.*, 2013). A etapa de purificação do biossurfactante representa em torno de 60% dos custos totais de produção. A fim de tornar esse bioproduto mais competitivo, a aplicação do biossurfactante bruto em processos de biorremediação de solos e na indústria petrolífera tem sido estudada, já que especificações de menor pureza são exigidas para tais aplicações (SARUBBO *et al.*, 2015).

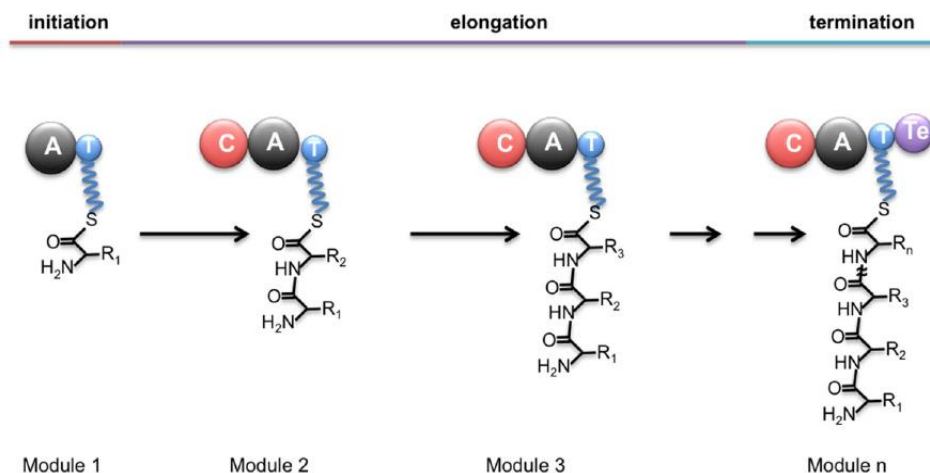
Segundo Plaza *et al.* (2015), a produção de biossurfactantes pode ser detectada por métodos dependentes da cultura como ensaio de atividade hemolítica, método de placa de ágar azul, ensaio de óleo atomizado, por métodos que analisam a atividade superficial e emulsionante, hidrofobicidade superficial, tensões superficiais e interfaciais e, por fim, métodos de identificação química como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e ressonância magnética nuclear (NMR).

2.1.2 Biossurfactantes lipopeptídicos

Os peptídeos, moléculas versáteis que possuem significativa importância industrial, são sintetizados por fungos filamentosos, bactérias gram-positivas e em menor extensão, gram-negativas, podendo ser sintetizados pela via ribossomal e não-ribossomal (MORAES, 2010). No que concerne à síntese ribossomal, os ribossomos direcionam a formação de pontes peptídicas e o RNAm tem a função de molde, determinando a sequência de aminoácidos do produto (HANCOCK; CHAPLE, 1999; MORAES, 2010).

A síntese não-ribossomal da porção peptídica ocorre a partir de um complexo de subunidades enzimáticas chamadas multienzimas. Geralmente, essas sintetases são organizadas em módulos, subdivididos em domínios. Cada módulo permite a incorporação de um aminoácido na porção peptídica e cada domínio tem uma função específica que leva à incorporação do aminoácido. Tais módulos são classificados como: de carregamento, de alongamento e de liberação. Em relação aos domínios, existem 4, cujas funções variam em adenilação (A), que permite o reconhecimento do aminoácido específico e sua ativação por uma reação de adenilação e hidrólise de ATP; em tioilação (T), que permite a fixação do aminoácido na sintetase através de ligação tioéster; em condensação (C), que induz a ligação peptídica entre dois aminoácidos; e o domínio da tioesterase (Te), que libera a peptídeos formados (Figura 1) (MNIF; GHRIBI, 2015a).

Figura 1 – Síntese do peptídeo não ribossômico (NRP) envolvendo os domínios A (adenilação), C (condensação) T, (proteína transportadora de peptídeo), Te, (domínio de rescisão com atividade de tioesterase) (DONADIO; MONCIARDINI; SOSIO, 2007;



Biossurfactantes possuem porções hidrofílicas e hidrofóbicas. A cabeça hidrofílica consiste em carboidratos, aminoácidos e grupos fosfato e cauda hidrofóbica é composta de uma

cadeia de ácidos graxos. A biossíntese das porções ocorre de forma independente. No caso dos biossurfactantes lipopeptídicos, a síntese da porção lipídica é feita por módulos consecutivos que possibilitam o acoplamento, a ativação e a ligação dos ácidos graxos formados à parte peptídica. Na fase de acoplamento, o domínio Acil CoA-ligase (AL) faz a ligação entre uma coenzima A e um ácido graxo (dependente de ATP). Esse ácido é transferido para o cofator 4-fosfopanteteína do primeiro domínio de proteína transportadora de acil (ACP1) (DUITMAN *et al.*, 1999; MNIF; GHRIBI, 2015a). Um malonil-CoA é fixado ao domínio proteína carregadora de acil (ACP2). A condensação dos malonil e aciltioésteres, catalisados pelo domínio β -cetoacil da sintetase (KS), leva à formação de um β -cetoacil tioéster. O β -cetoacil tioéster é convertido em um ácido graxo β -amino por transaminação. O ácido graxo β -amino pode ser transferido para o domínio de tioração pelo domínio de condensação, como pode ser acoplado ao aminoácido fixado no primeiro módulo da biossíntese da fração peptídica por uma aminotransferase. Terminada a biossíntese, o lipopeptídeo é submetido a modificações como glicosilação ou halogenação, realizadas por enzimas específicas associadas às sintetases (DUITMAN *et al.*, 1999; MNIF; GHRIBI, 2015a).

Lipopeptídeos são compostos cíclicos que resultam da condensação entre ácido graxo e oligopeptídeo. Esses estão compreendidos entre a variedade de antibióticos produzidos por diferentes gêneros bacterianos como *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Muitos lipopeptídeos com poder antibiótico apresentam atividade biossurfactante, como as surfactinas, iturinas e fengicinas, descritas a seguir (WANG *et al.*, 2015).

As surfactinas, lipopeptídeos de síntese não-ribossomal, são sintetizadas e excretadas por difusão passiva pela membrana plasmática das bactérias. Essa família contém 20 compostos descritos, tais como esperina, liquenisina, pumilacidina e surfactinas. Em uma concentração de 20 μ M, algumas surfactinas diminuem a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, reduzindo também a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43mN/m para valores inferiores a 25,27 mN/m (HARWOOD *et al.*, 2018; STEIN, 2005). Além do alto poder emulsificante, esses lipopeptídeos são conhecidos por possuírem atividades antibacterianas, antivirais e antimicoplasma (STEIN, 2005). A estrutura química das surfactinas compreende uma alça peptídica de sete aminoácidos (L-asparagina, L-leucina, L-glutamato, L-leucina, L-valina e duas D-leucinas), ligados a uma cadeia de ácido graxo (Figura 2a). Os aminoácidos exatos e ácidos graxos presentes na estrutura da biomolécula dependem da cepa bacteriana e das condições de cultura (MNIF; GHRIBI, 2015b).

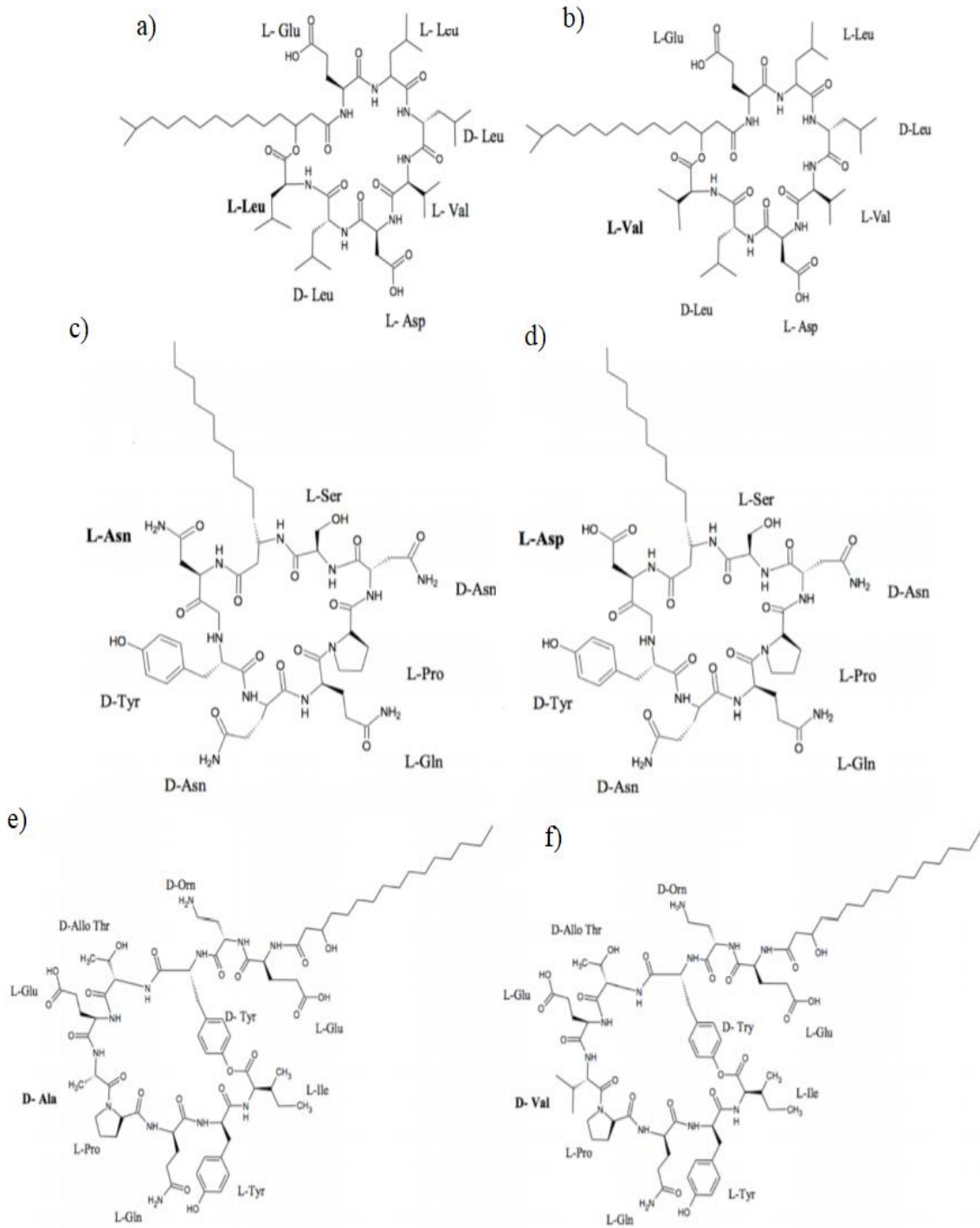
Esses lipopeptídeos têm eficácia em processos de biorremediação, como a recuperação microbiana aprimorada de óleo, devido à sua alta atividade superficial. Os autores Kiran *et al.*

(2010) identificaram um tipo de surfactina sintetizado por *B. aureum* e comprovaram a função dessa biomolécula na recuperação de óleo em ambientes marinhos. Além disso, a surfactina também exibe capacidade antibacteriana, sendo capaz de gerar canais catiônicos seletivos em bicamadas lipídicas planares, o que facilita o transporte de cátions através das membranas. Tal característica justifica a atividade antibacteriana e a possível aplicação na administração de medicamentos (LIU, *et al.*, 2019)

A família da iturinas (Figura 2 c e d) é representada por iturinas A, C, D e E, bacilomicina D, F, L, bacilopeptina e micosubtilina, heptapeptídeos com um ácido graxo β -amino que possui notável atividade antifúngica (DUITMAN *et al.* 1999; ROMERO *et al.* 2007). A eficácia antifúngica da iturina A contra vários fungos fitopatogênicos e leveduras é similar a dos pesticidas químicos disponíveis no mercado, entretanto, sua atividade antibacteriana é limitada e não foi reportada atividade antiviral até o momento. Esses lipopeptídeos possuem baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, baixa alergenicidade em humanos e outros animais, além de um amplo espectro como antibiótico. (PHAE *et al.*, 1992; ZHAO *et al.*, 2014).

A fengicina, também conhecida como plipastatina, é um lipopeptídeo sintetizado por muitas cepas de *B. subtilis*, apresentando atividade antifúngica contra fungos filamentosos e baixa atividade hemolítica em comparação à surfactina. A estrutura da fengicina compreende um ácido graxo β -hidroxi, que pode possuir de 13 a 19 átomos de carbono nas formas n, iso e anteiso, sendo insaturado ou saturado. O ácido é ligado a uma parte peptídica, que abrange 10 aminoácidos e 8 deles estão organizados em uma estrutura cíclica (Figura 2 e, f). Esses lipopeptídeos diferem da iturina e da surfactina pela presença de aminoácidos como ornitina e alo-treonina (DELEU; PAQUOT; NYLANDER, 2008).

Figura 2 – Principais estruturas químicas da surfactina (C15), iturina (C13) e fengicina (C16). (a) corresponde à surfactina A, (b) surfactina B, (c) iturina A, (d), iturina C, (e) fengicina A e (f), fengicina B (QUINTELA, 2018).



2.1.2.1 Fatores que influenciam na produção de biossurfactantes lipopeptídicos

Inúmeros fatores relacionados à natureza da fonte de carbono, à concentração de íons N, P, Na, Mg, Fe, Zn e Mn no meio e às condições ambientais exercem influência na produção de biossurfactantes por espécies de *Bacillus* (DESAI; BANAT, 1997). A presença de 1 mM de $ZnSO_4$, 1 mM de $FeCl_3$ e 0,1 mM de $MnSO_4$ foi capaz de aumentar a produção de surfactina por *B. subtilis* BS5 no estudo de Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Abdel-Haleem (2008). Já no estudo de Lin *et al.* (2007), a adição de doses de cátions divalentes Fe^{2+} e Mg^{2+} demonstrou estimular a produção de iturina por *Bacillus amyloliquefaciens* B128.

Além disso, condições de crescimento como temperatura, agitação, oxigênio disponível e pH afetam a produção de biossurfactantes, pois exercem efeitos sobre atividade e crescimento celular (CHEN; JUANG; WEI, 2015). De acordo com o estudo de Sen e Swaminathan (2005), *B. subtilis* é produtora de lipopeptídeos na faixa de temperatura de 25 a 40 °C. Para *B. subtilis* RB14, as temperaturas ótimas de produção de iturina e surfactina foram de, respectivamente, 25°C e 37°C pela mesma cepa (OHNO; ANO; SHODA, 1995)

A velocidade de agitação também é um fator que afeta a produção desses metabólitos. No estudo de Yeh *et al.* (2005), foram obtidos rendimentos maiores de biossurfactante considerando velocidades de agitação de 200 rpm e 250 rpm. Segundo Davis, Lynch e Varley (1999), velocidades de agitação maiores que 350 rpm geram acúmulo de espuma, o que diminui a aeração, além de gerar queda na produção de biomassa e de surfactina.

Segundo Zhang, Zhang e Cui (2015), o pH pode causar mudanças na permeabilidade e carga elétrica da membrana, o que afeta atividade de enzimas envolvidas no crescimento e reprodução microbiana. No estudo de Sen e Swaminathan (1997), valores de pH entre 6 e 9 foram testados na produção de surfactina e os resultados associaram o pH 6,75 com a maior produção do produto. No mesmo trabalho, o efeito das condições de cultivo indicou a mais alta produção nas condições de pH 6,75, 37,4°C e 140 rpm, que puderam ser identificadas através de otimização utilizando metodologia de superfície de resposta.

2.1.3 Resíduos agroindustriais como substratos na produção de biossurfactantes

A biotecnologia industrial está cada vez mais alinhada a produção sustentável, o que justifica o crescimento de estudos e aplicações de resíduos agroindustriais como substratos em bioprocessos. Diferentes resíduos têm sido utilizados como substrato para a produção de enzimas e outros biocompostos por microrganismos, o que pode ser uma solução para problemas de gestão de resíduos industriais. Além disso, a utilização de resíduos como substratos para microrganismos pode diminuir os custos de bioprocessos. A escolha do resíduo como matéria-prima deve abranger seu custo, disponibilidade e necessidades nutricionais do microrganismo (MAKKAR; CAMEOTRA, 1998).

Alguns resíduos agroindustriais têm em sua composição açúcares, fibras, proteínas e minerais, o que os tornam fontes alternativas de nitrogênio e carboidratos, podendo substituir fontes sintéticas empregadas na indústria (PANESAR *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018). O grupo *B. subtilis* abrange microrganismos quimioheterotróficos, capazes de produzir diversas enzimas degradativas que permitem o uso de mono-, di- e oligossacarídeos pela bactéria para obtenção da energia, que pode ser obtida através de diversos resíduos como fontes nutricionais (DEUTSCHER; GALINIER; MARTIN-VERSTRAETE, 2002).

Os pesquisadores Paraszkievicz *et al.* (2018) identificaram e caracterizaram biossurfactantes lipopeptídicos produzidos pela estirpe de *B. subtilis* KP7, cultivada em vários meios preparados a partir de recursos naturais renováveis. Duas águas residuais de cervejaria diferentes, melão de beterraba, extratos de cascas de maçã e cenoura foram utilizados como fontes nutricionais nos meios de cultura testados. Os autores concluíram que houve produção de biossurfactantes em todos os meios compostos de resíduos e, no extrato de casca de cenoura, a produção de surfactina e iturina superou a produção observada no caldo Luria-Bertani, tomado como controle. Resultados como esse indicam o uso promissor de resíduos agroindustriais na produção mais econômica de tensoativos biológicos.

2.1.3.1 Glicerol como fonte de carbono na produção de biossurfactantes

O processo de transesterificação para obtenção de biodiesel tem como produto final uma mistura de duas fases imiscíveis, sendo uma o biodiesel e a outra, uma composição de álcool, glicerol, catalisador, monoglicerídeos e diglicerídeos. O glicerol residual de biodiesel é um substrato de alta assimilação por microrganismos como bactérias e leveduras, oferecendo

nutrientes como magnésio, cálcio, enxofre, fósforo, sódio e nitrogênio, elementos essenciais para o crescimento de microrganismos (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999).

A primeira etapa da utilização do glicerol por microrganismos ocorre por meio do transporte através de sua membrana celular, podendo acontecer de forma passiva ou ativa. Em bactérias, o transporte passivo abrange a difusão simples por permeação não específica e a difusão facilitada mediada por proteínas (permeases) situadas na membrana plasmática. Uma vez no citoplasma, o glicerol pode seguir por diferentes rotas metabólicas. No caso de *B. Subtilis*, a principal rota envolve fosforilação catalisada pela enzima glicerol quinase, formando glicerol-3-fosfato, intermediário da via glicolítica (RIVALDI; SARROUH; FIORILO, 2007).

Há muitos relatos de produção de biossurfactantes utilizando o glicerol como fonte nutricional para microrganismos. No estudo de Sousa e colaboradores (2012), surfactina foi produzida por cepas de *B. subtilis* em um meio contendo glicerol como fonte de carbono. O biossurfactante produzido foi capaz de formar emulsões estáveis com os hidrocarbonetos de óleo de soja e querosene. Análises realizadas com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostraram que o produto obtido foi compatível com os produtos comercialmente disponíveis no padrão de surfactina.

França *et al.* (2015) testou resíduos agroindustriais (glicerol, óleo de girassol, soro de queijo e suco de caju) como substratos alternativos para a produção de biossurfactantes por *B. subtilis* ICA56. Dentre as fontes renováveis testadas, o glicerol em grau analítico apresentou melhores resultados em relação ao volume produzido e às propriedades tensoativas, produzindo 1290 mg L^{-1} de biossurfactante bruto, cuja CMC foi de 25 mg L^{-1} e, nessa concentração, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN m^{-1} . Além disso, o biossurfactante apresentou estabilidade em uma ampla faixa de pH, temperatura e salinidade.

Glicerol bruto, obtido de uma usina de biodiesel, foi utilizado como única fonte de carbono para a produção de surfactina por *B. subtilis* LSFM-05 no estudo de Faria *et al.* (2011). Nesse, a produção do biossurfactante foi realizada em um fermentador de bancada de 15 L e o biossurfactante foi obtido a partir da espuma produzida, possuindo eficiência de emulsificação após 24 h de 67,6% em relação ao óleo cru.

Há pesquisas que indicam a necessidade do uso de glicerol isento de metanol como fonte de carbono para microrganismos. No trabalho de Andrade *et al.* (2017), em que *B. subtilis* Lb2b produziu biossurfactante em glicerol de grau analítico e bruto, a bactéria demonstrou sensibilidade ao metanol presente no glicerol bruto, gerando baixa produção de biossurfactante em comparação ao uso de glicerol de grau analítico como fonte de carbono.

2.1.4 Ação biológica dos biossurfactantes

Os surfactantes biológicos, além de possuírem aceitabilidade ecológica, podem ser bioativos em inúmeros processos vinculados à agroindústria, indústria alimentícia, farmacêutica e petrolífera. Dentre as possíveis ações biológicas desses produtos, as atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral, a capacidade anti-adesiva contra patógenos e a natureza probiótica são de grande relevância para aplicações no ramo da saúde (GUDIÑA *et al.*, 2013).

Além dessas aplicações, biossurfactantes têm efeitos em células cancerosas: Cao *et al* (2010) apontou a surfactina como indutora de apoptose em células de câncer de mama e, no trabalho de Zhao *et al.* (2000), um glicolípido produzido por leveduras inibiu a proliferação celular de melanoma em ratos. Ademais, têm-se estudado surfactantes biológicos como sistemas de liberação de fármacos, em razão de suas propriedades ativas de superfície. Abruzzo *et al.* (2018) realizaram a preparação de vesículas mistas compostas de biossurfactante de *Lactobacillus gasseri* BC9 e econazol, com o intuito de avaliar o potencial destas em inibir *Candida albicans*. Além da inibição bem-sucedida do patógeno, o sistema se mostrou promissor na liberação de econazol, uma vez que garantiu não apenas a mucoadesividade à mucina, mas também a liberação prolongada do medicamento.

Na agricultura, o potencial antimicrobiano dos biossurfactantes é vasto. Um exemplo de fungicida e bactericida comercial cuja ação é relacionada à produção de lipopeptídeos de *B. subtilis* é o Serenade®, da Agraquest (SOARES; DRUZIAN; LOBATO, 2018). Além disso, o uso de surfactantes biológicos na indústria alimentícia como agentes de biocontrole é promissor: Chittepu (2019) demonstrou ação antimicrobiana de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus pseudomycoides* contra patógenos causadores de infecções alimentares, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

2.1.4.1 Biossurfactantes ativos na agricultura

As taxas crescentes de aplicação de pesticidas, inseticidas e herbicidas pelos agricultores estão associadas a riscos na saúde humana como câncer, Parkinson, Alzheimer, bem como a vários distúrbios do trato respiratório e reprodutivo (SABARWAL; KUMAR; SINGH, 2018). Além disso, o uso indiscriminado de agentes químicos para controle de fitopatógenos e pragas nas lavouras tem ocasionado a resistência desses a inseticidas, fungicidas e herbicidas (BASS *et al.*, 2015; LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015; POWLES; YU, 2010). Nesse contexto, o

controle biológico apresenta-se como um regulador do ecossistema fornecido pela biodiversidade, sendo assim uma opção inteligente para a diminuição no uso de agroquímicos (RUSCH; BOMMARCO; EKBOM, 2017).

Bactérias da rizosfera exercem efeito antagônico aos fitopatógenos através da síntese de metabólitos antimicrobianos, antibióticos, hormônios, enzimas e toxinas. Como essas auxiliam na saúde e crescimento da planta, foram denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP). Dentre as bactérias citadas, há representantes do gênero *Bacillus* que são capazes de contribuir no processo de indução de resistência sistêmica de plantas, além de neutralizar fitopatógenos de importância agrícola. Tais capacidades são relacionadas à produção de metabólitos de natureza polipeptídica por essas espécies (ONGENA *et al.*, 2007).

A atividade antimicrobiana dos biosurfactantes é atribuída principalmente à despolarização potencial das membranas bacterianas e fúngicas. Esse processo pode levar a múltiplos defeitos na célula, como a dissipação do potencial transmembranar e impedimento da formação de ATP, levando a morte celular (MUNUSAMY *et al.*, 2020).

Muitas cepas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. circulans* inibem o crescimento de microrganismos fitopatogênicos, em virtude da síntese dos lipopeptídeos cíclicos surfactina, iturina e fengicina. Esses compostos são produzidos em uma diversidade de isoformas que possibilitam atividades biológicas distintas, sendo assim estudados como biopesticidas mais ecológicos que os fungicidas sintéticos. Ademais, a co-produção de distintas famílias de lipopeptídeos ou isoformas variantes da mesma família por uma única cepa bacteriana aumenta sua eficácia como candidata à agente de biocontrole contra diversos fitopatógenos (CALDEIRA *et al.*, 2011; GONG *et al.*, 2015; JI *et al.*, 2013; KAUR *et al.*, 2016).

Um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens*, inoculado na rizosfera de alfaces infectadas pelo fungo *Rhizoctonia solani*, coproduziu surfactina, fengicina e iturina. Os autores do estudo concluíram, a partir de um ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), que a coprodução dos três lipopeptídeos mediou a expressão do gene de defesa da planta em relação ao patógeno *R. solani*, o que aprimorou as respostas de defesa, além de gerar efeito antagônico ao *R. solani* (CHOWDHURY *et al.*, 2015).

Lipopeptídeos também inibem o crescimento de fitopatógenos bacterianos: no estudo de Bais, Fall e Vivanco (2004), *Bacillus subtilis* 6051 formou um biofilme produtor de surfactina que foi capaz de neutralizar a infecção da raiz de *Arabidopsis* por *P. syringaea*, diminuindo a mortalidade da planta *in vivo* e *in vitro*. Outro estudo que testou *B. subtilis* como agente de controle biológico contra bactérias foi o de Zerriouh *et al.* (2011), no qual as iturinas

sintetizadas por duas linhagens de *B. subtilis* foram capazes de atingir doenças bacterianas de cucurbitáceas causadas por *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*.

2.1.4.1.1 Lipopeptídeos antifúngicos

O uso de fungicidas químicos na agricultura gera desenvolvimento de resistência nos fungos alvo, assim como prejudica a sobrevivência de outras populações microbianas não direcionadas como as bactérias rizosféricas, levando à perda da qualidade do solo. Desse modo, é promissor investigar agentes antifúngicos biológicos que possam ser utilizados na agroindústria como modo de evitar danos econômicos e ambientais (HAWKINS; FRAAIJE, 2018; YANG *et al.*, 2011). Segundo Raaijmakers *et al.* (2010), a perturbação da integridade das membranas pelos lipopeptídeos leva à lise celular de vários estágios da vida fúngica, como micélios, conídios ou zoósporos no caso dos oomicetos.

O estudo realizado por Jin *et al.* (2020) demonstrou que a bacilomicina D, pertencente à família das iturinas, pode danificar a parede celular e membrana citoplasmática das hifas e esporos de *Colletotrichum gloeosporioides*. Isso ocasiona extravasamento de citoplasma e organelas das células fúngicas alvo e, assim, alcança o efeito de inibição. Blacutt *et al.* (2016), através de anotação e sequenciamento de genoma, avaliaram genes de metabolismo secundário de *B. mojavensis* relevantes para o biocontrole, identificando as fengicinas como a principal classe de metabólitos secundários responsáveis pela atividade antifúngica *in vitro* contra *Fusarium verticillioides*, um dos principais fitopatógenos micotoxigênicos que acometem o milho. Além disso, notou-se que o antagonismo da fengicina é caracterizado principalmente pela inibição do crescimento do fungo. Análises bioquímicas e microscópicas constataram que os sintomas de antagonismo em *F. verticillioides* envolveram edema hifal e lise explosiva.

No trabalho de Hussain e Khan (2020), foi conduzido um experimento para avaliar a eficácia da cepa de *B. subtilis* Hussain T-AMU contra a pinta-preta da batata causada por *Rhizoctonia solani* *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, a espécie de *Bacillus* inibiu significativamente o crescimento do fungo em um co-cultivo. *In vivo*, tubérculos de sementes de batata afetados pela doença fúngica foram selecionados e tratados com filtrado e suspensão da bactéria, sendo posteriormente plantados em vasos. Os autores concluíram que o filtrado da cultura bacteriana inibiu significativamente o crescimento do fitopatógeno, assim como foi capaz de aumentar o rendimento de tubérculos e o crescimento das plantas. A molécula que foi responsável pela

inibição do fungo é da família das surfactinas e foi identificada pela técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).

Biossurfactantes lipopeptídicos podem também inibir o crescimento de fungos toxigênicos causando perturbação em suas membranas. Tal ação ocasiona distúrbios metabólicos, o que suprime a biossíntese de micotoxinas (HU *et al.*, 2009). As micotoxinas, metabólitos fúngicos secundários tóxicos em animais e humanos, podem ser encontradas em grãos enquanto esses estão no campo, no armazenamento, transporte e processamento. Esses compostos químicos persistem durante as operações de processamento de alimentos, como moagem, culinária, panificação e extrusão (VOSS; SNOOK, 2010; WAN *et al.*, 2019).

De acordo com Veras *et al.* (2016), condições do clima, associadas às práticas agrícolas inadequadas podem influenciar na ocorrência de espécies de fungos e no tipo de micotoxinas produzidas. Dentre essas espécies, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* estão entre os fungos toxigênicos mais importantes, sendo frequentemente relatados na literatura em razão da ocorrência em alimentos e ao potencial de produção de micotoxinas. No que concerne às micotoxinas produzidas, destacam-se a aflatoxina B1 (AFB1) e a ocratoxina A (OTA), caracterizadas pela alta toxicidade e pelas propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (DE RUYCK *et al.*, 2015).

Pereyra *et al.* (2018) isolaram do solo cepas de *Bacillus* capazes de inibir o crescimento de *A. parasiticus*, fungo produtor da aflatoxina B1 e um dos principais contaminantes de culturas armazenadas, alimentos e rações. Também foi verificado, a partir de testes com os biossurfactantes isolados da cultura de cepas bacterianas, que esses inibiram o crescimento do fungo em questão, bem como diminuiram a concentração de aflatoxina B1 acumulada no meio de cultura.

Jiang *et al.* (2017), em um estudo sobre o uso de lipopeptídeos bacterianos no controle fúngico da produção de vinho, constataram que os lipopeptídeos de *B. subtilis* inibiram significativamente a contaminação por *Aspergillus carbonarius* e a produção de ocratoxinas durante a vinificação. Além disso, os biossurfactantes obtiveram maior eficiência na inibição do fungo quando comparados ao controle químico realizado através de dióxido de enxofre.

Segundo Hu *et al.* (2009), iturinas e fengicinas têm a capacidade de interferir em processos intracelulares em patógenos fúngicos de plantas, levando à inibição da formação de toxinas. Nesse mesmo estudo, a cepa de *B. subtilis* B-FS01 produziu fengicinas capazes de inibir o crescimento de *Fusarium verticillioides* e de interferir na síntese de fumonisina B1 (FB1), micotoxina associada a doenças causadas em humanos e animais. Através de um ensaio quantitativo baseado em RT-PCR, verificou-se que no tratamento contendo micélio exposto à

fengicina, a expressão dos genes FUM1 e FUM8, relacionados à síntese da micotoxina, foi significativamente reduzida. Além disso, em uma análise realizada em CLAE, foi observado que a massa micelial tratada com o biossurfactante diminuiu sua produção de micotoxina em 28% quando comparada ao controle não tratado.

2.1.4.2 Lipopeptídeos ativos em patógenos bacterianos

Infecções bacterianas eram uma das principais causas de morte antes da descoberta dos antibióticos no século XX. Com o surgimento crescente de patógenos resistentes a esses medicamentos, torna-se evidente a necessidade de novos antibióticos disponíveis no mercado (LING *et al.*, 2015). Segundo Rice (2008), *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* estão relacionadas a infecções graves, que podem ser adquiridas pela ingestão de água ou alimentos contaminados.

Estudos que investigam o potencial de peptídeos antimicrobianos contra uma ampla gama de bactérias patogênicas têm sido realizados e demonstram que essas biomoléculas interagem com as biomembranas, rompendo-as e causando morte celular (BALLEZA; ALESSANDRINI; GARCÍA, 2019). Peptídeos antimicrobianos têm modos de ação bactericidas baseados no rompimento das membranas citoplasmáticas e na redução da incidência de resistência, o que os tornam diferentes dos antibióticos convencionais que atuam na inibição da síntese proteica (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

No estudo de Li *et al.* (2020), lipopeptídeos cíclicos foram capazes de inibir bactérias gram-negativas que acometem plantas e animais, como *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanaceae*, *E. coli* ET8, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Tais moléculas bioativas, descritas como relacidinas, tiveram um valor de CIM próximo ao da polimixina B, antibiótico peptídico amplamente utilizado para tratar infecções causadas por múltiplos patógenos resistentes (Velkov *et al.*, 2013). Tal similaridade no espectro de inibição pode estar relacionada com o fato de que polimixina B e relacidina possuem um fragmento linear catiônico em suas estruturas, que, segundo Ntwasa (2012), é importante para a ligação da molécula bioativa aos lipossacarídeos de membrana.

Com base em resultados de experimentos de Microdiluição em caldo, o extrato lipopeptídico de *B. velezensis* FZ06, isolado das folhas de *Camellia sinensis* var *assamica*, inibiu o crescimento das cepas referência *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*. Dados genômicos dessa espécie de *Bacillus* e a análise do bioproduto em

Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas demonstraram que surfactina, fengicina e iturina estavam envolvidas no processo de inibição das cinco bactérias patogênicas alimentares deletérias (LI *et al.*, 2020).

Gudiña *et al.* (2010) realizaram um estudo no qual *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20 produziu biosurfactante, que, em seu estado bruto, exerceu atividade antibacteriana contra os patógenos *Candida albicans*, *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus agalactiae*. Além disso, o biosurfactante produzido mostrou atividade anti-aderente contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. agalactiae*.

Devido a inibição de um amplo espectro de espécies bacterianas e atividades bactericidas, os peptídeos antimicrobianos podem ser alternativas terapêuticas de sucesso no combate às bactérias multirresistentes, apesar de muitos apresentarem limitações como a anulação do efeito antibiótico por cátions divalentes como Mg^{+2} e Ca^{+2} , alto custo de produção, deficiente estabilidade físico-química e curta meia-vida plasmática circulante (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; FOX, 2013). Os estudos sobre a superação de tais desvantagens estão sendo realizados e trazem estratégias como o design molecular, em que modificações químicas em sequências de ocorrência natural são realizadas. Em tal abordagem, há o uso de aminoácidos não naturais, ácidos graxos e hibridização de diferentes peptídeos antimicrobianos (LEE *et al.*, 2019).

Embora a resistência bacteriana a peptídeos antimicrobianos seja rara, alguns patógenos foram reconhecidos por diminuir a atividade dos peptídeos antimicrobianos por modificação da superfície bacteriana ou secreção de enzimas (NIZET, 2006). Segundo Fox (2013), uma possível estratégia para sanar tais deficiências é o desenvolvimento de peptídeos sintéticos miméticos projetados *de novo*, os quais replicam características biofísicas essenciais como carga positiva e hidrofobicidade, além da capacidade de automontagem.

2.1.4.3 Ação dos lipopeptídeos nas células microbianas

A ação dos lipopeptídeos cíclicos na interface das membranas lipídicas ocorre, inicialmente, através de interações eletrostáticas que permitem a adsorção da molécula através dos folhetos da bicamada de maneira dose-dependente. Tal adsorção causa uma perturbação dos potenciais de superfície e dipolo, ocasionando pressões de superfície. Considerando que esses efeitos dependem da concentração do lipopeptídeo, altas doses favorecem a formação de poros hidrofílicos permeáveis a íons pequenos, moléculas, osmólitos e proteínas. A formação desses poros leva a um desequilíbrio osmótico e à morte celular (BALLEZA;

ALESSANDRINI; GARCÍA, 2019; FALARDEAUET *et al.*, 2013). Características como o tamanho, carga, composição de aminoácidos e anfipaticidade definem a capacidade dos lipopeptídeos em inserir suas caudas hidrofóbicas em biomembranas, induzindo os poros transmembranares por diferentes mecanismos moleculares (FUERTES *et al.*, 2011).

A estrutura anfifílica dos lipopetídeos permite a interação desses com membranas bacterianas carregadas negativamente e, até então, um alto potencial antibacteriano dessas moléculas já foi relatado, especialmente contra Gram-positivas. Segundo Hamouda e Baker (2000), a menor atividade contra bactérias Gram-negativas é provavelmente devido às diferenças na composição das bicamadas lipídicas de Gram-positivas e Gram-negativas. A membrana externa das células Gram-negativas é altamente hidrofílica e carregada negativamente. Portanto, são maiores as chances de essa estabelecer ligação às moléculas catiônicas como os lipopeptídeos, impedindo o transporte dessas moléculas anfipáticas em direção à membrana citoplasmática interna. Ademais, a membrana externa das Gram-negativas é rica em lipopolissacarídeos (LPS). Como trata-se de um componente da membrana com carga negativa, esse pode se ligar a AMPs catiônicos, impedindo-os de atingir a membrana citoplasmática.

No estudo de Han *et al.*, (2020), a microscopia eletrônica de varredura mostrou que a superfície de *Clostridium difficile* ATCC 9689 foi danificada após o tratamento com lipopeptídeo de *Bacillus amyloliquefaciens*. Parede celular e a membrana celular foram danificadas. A destruição da célula bacteriana se deu pela formação de canais condutores de íons na membrana, modo de ação que reduz drasticamente a chance de desenvolvimento de resistência microbiana.

Com o intuito de estudar a interação entre lipopeptídeos e sistemas vivos, tem-se utilizado membranas modelo como lipossomas, monocamadas e bicamadas lipídicas. Nesses estudos, propriedades mecânicas, termodinâmicas, viscoelásticas, assim como a curvatura intrínseca das membranas são características que são analisadas ao estudar a interação entre lipopeptídeo e membranas (BALLEZA; ALESSANDRINI; GARCÍA, 2019).

Para compreender como a fengicina age na membrana fúngica, González-Jaramillo *et al.* (2017) realizaram um estudo biofísico em que uma isoforma de fengicina C foi colocada em contato com um modelo de monocamada fosfolipídica contendo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Através da calorimetria de varredura diferencial, notou-se que a fengicina C alterou as transições de fase termotrópicas da DPPC e foi lateralmente segregada nos domínios de formação da bicamada lipídica. Também foi apontada uma forte desidratação na região polar

da DPPC. Esses resultados auxiliam na compreensão da ação danosa na membrana pela fengicina, que é relacionada à sua atividade antifúngica.

O mecanismo descrito sobre a atividade da fengicina nas bicamadas lipídicas engloba a interação dessa com o esterol e as moléculas fosfolipídicas das membranas, o que altera a estrutura e permeabilidade da membrana celular. Concentrações altas de fengicina podem levar à formação de poros, pois as grandes seções peptídicas das fengicinas, quando congregadas, são capazes de aumentar a curvatura positiva de ambos os folhetos da membrana. Se a concentração do lipopeptídeo for suficientemente alta, há uma completa solubilização da membrana em micelas (DELEU *et al*, 2008).

Segundo Zhao *et al.* (2014), o mecanismo antifúngico da iturina é baseado na inserção de suas caudas hidrofóbicas na membrana plasmática das células. As caudas são capazes de formar um canal iônico, causando um desequilíbrio eletroquímico entre os meios intra e extracelular e o consequente vazamento de citoplasma. A iturina A pode também aumentar a condutividade elétrica e a permeabilidade da membrana celular, causando efeitos de tensão superficial nessa e inibindo a formação de esporos patogênicos. Tais atividades são sensíveis a vários fatores eletrostáticos e mecânicos, com destaque para o comprimento da cadeia acila do lipopeptídeo cíclico e a curvatura intrínseca da membrana alvo (BALLEZA; ALESSANDRINI; GARCÍA, 2019).

A surfactina inibe uma ampla gama de microrganismos em razão da sua capacidade de se inserir na parede celular e criar poros iônicos. O mecanismo de ação das surfactinas nas bicamadas lipídicas é descrito em estágios por Buchoux *et al.* (2008): primeiro, há uma penetração do lipopeptídeo na bicamada lipídica devido a uma interação hidrofóbica favorável entre a surfactina e a membrana. Ocorrem repulsões de carga entre as cargas negativas da surfactina e as cargas negativas do grupamento lipídico, o que leva a um aumento na curvatura da membrana. Por fim, ocorre uma desestabilização completa da membrana planar. Enquanto a integridade química do lipídeo é mantida, a morfologia da membrana é alterada, o que ocasiona um vazamento do conteúdo celular. O tamanho diminuto desse lipopeptídeo favorece uma distribuição assimétrica entre folhetos internos e externos, o que leva à desorganização lipídica, favorecendo assim a permeabilidade (BALLEZA; ALESSANDRINI; GARCÍA, 2019)

Há outros tipos de peptídeos cuja ação difere da disrupção de membranas celulares e consequente lise celular. No estudo de Li *et al.* (2020), foi descrito o modo de ação de dois lipopeptídeos circulares nomeados relacidinas na célula microbiana. Segundo os autores, as relacidinas se ligam aos lipopolissacarídeos exógenos (LPS) assim como surfactinas, iturinas e fengicinas, mas não formam poros na membrana celular. É discutido que esses lipopeptídeos

não afetam a formação de peptidoglicanos e RNA, porém, afetam a fosforilação oxidativa das células, interrompendo a biossíntese do ATP. Os mecanismos das relacidasinas que afetam a fosforilação oxidativa ainda estão sendo elucidados.

Outro modo de ação que difere das surfactinas, iturinas e fengicinas é o da daptomicina. Esse lipopeptídeo cíclico aniônico, primeiramente isolado de *Streptomyces roseosporus*, pode ser capaz de induzir estímulos de estresse da parede celular das células Gram-positivas. Tal hipótese é sustentada por estudos proteômicos que encontraram indução de proteínas de resposta ao estresse da parede celular em *B. subtilis* e *S. aureus* (GRAY; WENZEL, 2020).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A biotecnologia industrial é uma ferramenta essencial na mudança de uma base econômica de produtos de síntese química para uma abordagem cada vez mais direcionada aos produtos que ofereçam menos risco ao meio ambiente, gerados por sistemas biológicos. A fim de reduzir os custos de produção dos biossurfactantes microbianos, o uso de resíduos no meio de cultura dos microrganismos é uma boa alternativa, visto que milhões de toneladas de resíduos são gerados pela agroindústria. Dessa forma, a utilização dos mesmos em bioprocessos é uma alternativa plausível para que a produtividade seja mais econômica. Quanto à atividade antimicrobiana dos biossurfactantes, pesquisas futuras serão necessárias para a investigação das fontes de atividade antimicrobiana dos lipopeptídeos, à otimização da produção dessas moléculas bioativas e, em última análise, para o desenvolvimento de antibióticos e agentes de biocontrole seguros e mais eficazes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAFIZ, Y.A., et al. Draft Genome Sequence of a Biosurfactant-Producing *Bacillus subtilis* UMX-103 Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil in Terengganu, Malaysia. **Current. Microbiology**, New York, v. 74, p. 803–805, 2017.
- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAFI, M.M.; ABDEL-HALEEM, H.N. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, n. 3, p.305–325,2008.
- ABRUZZO, A.; et al. Novel mixed vesicles containing lactobacilli biosurfactant for vaginal delivery of an anti-Candida agent. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.112, n. 15, p. 95–101, 2018.
- ALMEIDA, D.G. de.; SILVA, R.C.F. S. da.; LUNA, J. M.; RUFINO, R.D., SANTOS, V.A.; BANAT, I. M.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 1718, 2016.
- ANDRADE, Cristiano José de., et al. Comparative study: bench-scale surfactin production from *Bacillus subtilis* using analytical grade and concentrated glycerol from the biodiesel industry. **International Journal of Scientific World**, v. 5, p. 28-37, 2017.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin , a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 31, n.3, p. 488-494, 1968.
- ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo-SP: Edusp, 2003. Capítulos 6 e 7.
- BAIS, H.P.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v.134, n.1, p. 307-319, 2004.
- BALLEZA, D.; ALESSANDRINI, A.; GARCÍA, M.J.B. Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides. **The Journal of Membrane Biology**, v. 252, p. 131-157. 2019.
- BANAT, L.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial Commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.53, p.4955-508, 2000.
- BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p.78-87, 2015.
- BLACUTT, A.A.; et al. *Bacillus mojavensis* RRC101 Lipopeptides Provoke Physiological and Metabolic Changes During Antagonism Against *Fusarium verticillioides*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 29, n. 9, p. 713-723, 2016.

CALDEIRA, A. T.; ARTEIRO, J. M.S.; COELHO, A. V.; ROSEIRO, J. C. Combined use of LCeESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyoliquefaciens* CCM1 1051. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p.1738 -1746, 2011.

CAO, X.H. et al. Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/ caspase pathway. **Chemico-Biological Interactions**, v.183, p.357–362, 2010.

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

CHITTEPU, O.R. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from groundnut oil cake dumping site for the control of foodborne pathogens. **Grain and Oil Science and Technology**, v.2, n.1, p. 15-20, 2019.

CHOWDHURY, S.P.; et al. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyoliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the Lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, p. 984–995, 2015.

CHRZANOWSKI, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 401–419, 2012.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme Microbiology Technology**, v.25, p. 322-329, 1999.

DE RUYCK, K.; et al. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: short review. **Mutation Research**, v.766, p.32–41, 2015.

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

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

DEUTSCHER, J.; GALINIER, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. Carbohydrate uptake and metabolism. In: SONENSHEIN, A.L.; HOCH, J.A.; LOSICK, R. **Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cell**. Washington: ASM, 2002.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; SOSIO, M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. **Natural Product Reports**, London, v. 24, p. 1073–109, 2007.

DRAKONTIS, C. E.; AMIN, S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 48, p. 77-90, 2020.

DUITMAN, E. H.; The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, 23, p. 13294-13299, 1999.

FARIA, A. F. de; et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v.46, p. 1951- 1957, 2011.

FRANÇA, I. W. L. de; et al. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, v. 255, p. 10-15, 2015.

GONG, A. D.; LI, H. P.; YUAN, Q. S.; SONG, X. S.; YAO, W.; HE, W. J.; et al. Antagonistic mechanism of iturin a and plipastatin a from *Bacillus amyloliquefaciens* S76e3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1-18, 2015.

GRAY, A.; WENZEL, M. More Than a Pore: A Current Perspective on the In Vivo Mode of Action of the Lipopeptide. Antibiotic Daptomycin. **Antibiotics**, v. 9, n. 1, 17, 2020.

GUDIÑA, E.L., ROCHA, V., TEIXEIRA, J.A. RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p. 419-424, 2010.

GUDIÑA, J.G.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667-675, 2013.

HAMOUDA, T., BAKER, J.R. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 397 - 403, 2000.

HANCOCK, R.E.W., CHAPLE, D.S. Peptide antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1317-1323, 1999.

HARWOOD, C.R., *et al.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 6, p.721–738, 2018.

HAWKINS, N.J.; FRAAIJE, B.A. Fitness Penalties in the Evolution of Fungicide Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 339-360, 2018.

HU, L.B.; et al. Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. *Lett Appl Microbiol*, v. 48, n.1, p. 84-89, 2009.

HUSSAIN, T.; KHAN, A.A. *Bacillus subtilis* HussainT-AMU and its Antifungal activity against Potato Black scurf caused by *Rhizoctonia solani* on seed tubers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, 101443, 2020.

JI, S. H.; PAUL, N. C.; DENG, J. X. KIM, Y. S.; YUN, B. S.; YU, S. H. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.

JIANG, C.; et al. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* have potential application in the winemaking process: inhibiting fungal and ochratoxin A contamination and enhancing esters and acids biosynthesis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 23, n. 3, p. 350 - 358, 2017.

JIMOH, A.A.; LIN, J. Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. **Ecological and Environmental Safety**, v.184, 109607,2019.

JIN, P.; et al. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 102 – 107, 2020.

KAUR, P.K.; JOSHI, N.; SINGH, I.P.; SAINI, H. S. Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, p. 139-152,2016

KIRAN, G.S., et al. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2389-2396, 2010.

LI, J.; et al. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 112, p. 72-79,2016.

LI, Z.; CHAKRABORTY, P., REINDER, H. de. V.; SONG, C.; ZHAO, X.; ROELFES, G.; SCHEFFERS, D-J, KUIPERS, O.P. Characterization of two relacidines belonging to a novel class of circular lipopeptides that act against Gram-negative bacterial pathogens. *Environmental microbiology*, v.22, n.6, 2020.

LIN, H-Y.; et al. Ferrous ion Enhanced Lipopeptide Antibiotic Iturin A Production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128. **International Journal of Applied Sciences and Engineering**, v.5, n.2, p.123–132, 2007.

LING, L.L.; et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, 2015, v.517, n. 7536, p.455-459. 2015.

LIU, K.; et al. Rational design, properties and applications of biosurfactants: a short review of recente advances. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.45, p. 57 -67, 2020.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Advances in Applied Microbiology**, v. 90, p. 29– 92, 2015.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA,S.S. Production of biosurfactant at mesophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J.Ind. Microbiol Biotechnol.*, v.20, p.48-52, 1998.

MNIF, I.; GHRIBI D. Lipopeptide surfactants: Production, Recovery and Pore Forming Capacity. **Peptides**, v. 71, p. 100-112, 2015^a

MNIF, I., GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Journal of Peptide Science**, v.104, n. 3, p. 129-147, 2015b

MORAES, D. T. de. Produção do lipopeptídeo surfactina a partir de uma cepa de *Bacillus subtilis* com o operon *srfA* sob controle do promotor regulado P_{grac}. 2010. 90 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 14, n. 5, p. 372–378, 2009.

MUNUSAMY, S.; et al. Biophysical approaches for exploring lipopeptide-lipid interactions. **Biochimie**, v. 170, p. 173-202, 2020.

NGUYEN, L.T.; HANEY, E.F.; VOGEL, H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 464–472, 2011.

NIZET, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 8, p. 11–26, 2006.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 5, p. 517–519, 1995.

ONGENA, M., et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**. v. 9, p.1084–1090, 2007.

PANESAR, P.S et al. Bio-processing of agro-industrial wastes for production of food-grade enzymes: progress and prospects. **Appl Food Biotechnol**, v. 3, n.4, p. 208-227, 2016.

PARASZKIEWICZ, K. et al. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. **Journal of Environmental Management**, v. 209, p. 65-70, 2018.

PEREIRA, J.F. et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.

PEREYRA, M.L.G.; et al. Antifungal and aflatoxin-reducing activity of extracellular compounds produced by soil *Bacillus* strains with potential application in agriculture. **Food Control**, v. 85, p. 392 - 399, 2018.

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

PHAE, C.G., SHODA, M., and KITA, N. Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 58, p.329–339, 1992.

PLAZA, G. A. et al. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 1023-1034, 2015.

POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317– 347, 2010.

QUINTELA, Bárbara Cibelle Soares Farias. **Biotecnologia aplicada à recuperação avançada de petróleo: injeção de biosurfactante**. 2018. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

RAAIJMAKERS, J.M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.50, p. 403– 424, 2012.

RICE, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**, v.197, p.1079-1081, 2008.

RIVALDI, J, D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R. Glicerol de biodiesel – Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel, **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 37, p. 44 – 51, 2007.

ROMERO, D.; et al. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 430–440, 2007.

RUSCH, A.; BOMMARCO, R.; EKBOM, B. Conservation Biological Control in Agricultural Landscapes. In: FRENDO, P.; MASSON-BOIVIN, C. *Advances in Botanical Research*. London: Academic Press, 2017, p. 333- 360.

SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH,R.P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.63, p. 103-114, 2018

SANTOS, P. S. dos, et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.4, n.2, 2018.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D. Application of a biosurfactant produced in low-cost substrates in the removal of hydrophobic contaminants. **Chemical Engineering Transactions**, v. 43, p. 295–300, 2015.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.47, p. 358-363, 1997.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2953-2958, 2005.

SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2015.

SILVA, M. T. SANTOS et al. Integral production and concentration of surfactin from *Bacillus* sp. ITP-001 by semi-batch foam fractionation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p.91-97, 2015.

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J. I.; LOBATO, A.K. de C. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do *Bacillus subtilis* em bioprocessos. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, p.295-303, 2018

SOUSA, M. et al. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.35, p. 897–906, 2012

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845 - 857, 2005.

VERAS, F.F.; et al. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 23-32, 2016.

VOSS, K.A.; SNOOK, M.E. Stability of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) during the production of flour-based foods and wheat flake cereal. **Food Additives and Contaminants: Part A**. v. 27, n. 12, p. 1674 - 1700, 2010.

WAN, J.; et al. Enhancement of antifungal and mycotoxin inhibitory activities of food-grade thyme oil nanoemulsions with natural emulsifiers. **Food Control**, v. 106, 106709, 2019.

WANG, T.; LIANG, Y.; WU, M.; CHEN, Z.; LIN, J.; YANG, L. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. **Chinese Journal of chemical Engineering**. v.22, n. 7, p.744-754, 2015.

YANG, C.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; GAN, Y. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. 1-8, 2011.

YEH, M.S.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnol. Prog.**, v.21, p. 1329-1334, 2005.

ZERIOUH, H.; ROMERO, D.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, L.; CAZORLA, F. M.; VICENTE, A. de; PÉREZ-GARCÍA, A. The Iturin-like Lipopeptides Are Essential Components in the

Biological Control Arsenal of *Bacillus subtilis* Against Bacterial Diseases of Cucurbits. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 12, p. 1540–1552, 2011.

ZHANG, W.; ZHAN, X.; CUI, H. Isolation, fermentation optimization and performance studies of a novel biosurfactant producing strain *Bacillus amyloliquefaciens*. **Chem Biochem Eng**, v. 29, n.3, p.447-456, 2015.

ZHAO, X. et al. Treatment of mouse melanoma cells with phorbol 12-myristate 13-acetate counteracts mannosylerythritol lipid-induced growth arrest and apoptosis. **Cytotechnology**, v. 33, p. 123–130, 2000

ZHAO, X.; et al. Optimization of Antifungal Lipopeptide Production from *Bacillus* sp. BH072 by Response Surface Methodology. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 324-332, 2014.

CAPÍTULO 2

Artigo

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO BIOSURFACTANTE BRUTO DE *BACILLUS SUBTILIS* GRUPO PRODUZIDO EM GLICEROL RESIDUAL

Resumo

Biossurfactantes são metabólitos microbianos que possuem alta aplicabilidade em diversos ramos da indústria. Atualmente, esses não são competem economicamente com surfactantes químicos, em virtude dos altos custos de purificação e do uso de substratos dispendiosos. Para tornar os bioprocessos mais viáveis economicamente, o uso de resíduos agroindustriais como fontes nutricionais microbianas tem sido cada vez mais explorado. Assim, esse trabalho objetivou selecionar cepas de *Bacillus subtilis* produtoras de biossurfactantes e obtê-los via fermentação, utilizando glicerol residual da produção de biodiesel como fonte de carbono. Posteriormente, esses metabólitos foram testados quanto à atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos, micotoxigênicos e bactérias patogênicas. Quatro cepas do grupo *B. subtilis* foram selecionadas para fermentação de acordo com as suas capacidades beta-hemolíticas e, para avaliação da produção dos biossurfactantes, foram feitos os testes de Índice de Emulsificação (E24), Ensaio de espalhamento de óleo e Cromatografia de Camada Delgada. Testes da atividade antimicrobiana dos biossurfactantes foram aplicados contra *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Houve produção de biossurfactante pelas cepas selecionadas e o bioproduto de *Bacillus subtilis* grupo CCMA 0087 se destacou pela atividade antibacteriana e bactericida contra *E. coli*. Além disso, foi verificado que o biossurfactante bruto da cepa *B. subtilis* grupo BAL 0081 apresentou maiores taxas de inibição contra as espécies de *Fusarium* e de *Aspergillus*. Ademais, os extratos brutos de *B. subtilis* grupo CCMA 0087 e BAL 0081 não se mostraram fitotóxicos quando aplicados em sementes de *Lactuca sativa* var. “Veronica”, na concentração de 50 mg/mL. Esses resultados indicam que os biossurfactantes brutos de *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 87 exercem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, fungos fitopatogênicos e micotoxigênicos, além de não apresentarem fitotoxicidade na concentração testada, o que indica o potencial desses biossurfactantes como agentes de biocontrole.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Glicerol residual. Fermentação Submersa. Biossurfactantes.

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas ainda configuram uma grande ameaça à saúde humana, ocasionando milhões de mortes em todo o mundo anualmente e atingindo principalmente países e regiões menos desenvolvidas. Tal situação é agravada pela prevalência de microrganismos resistentes aos medicamentos atualmente disponíveis (SPELLBERG *et al.*, 2008; VENTOLA, 2015). Na agricultura, taxas crescentes do controle químico de fitopatógenos e pragas podem levar à resistência desses inseticidas, fungicidas e herbicidas, além do uso extensivo de defensivos agrícolas estar associado a riscos na saúde humana, causando doenças como câncer, Parkinson, Alzheimer e distúrbios do trato respiratório e reprodutivo (BASS *et al.*, 2015; LUCAS; HAWKINS; FRAAIJE, 2015; SABARWAL; KUMAR; SINGH, 2018). Em função disso, a bioprospeção de novos antimicrobianos de amplo espectro é de grande importância para assegurar saúde e segurança alimentar à população.

Um grande número de metabólitos bioativos de fontes naturais foi descoberto nas últimas décadas e, nesse cenário, o estudo do gênero *Bacillus* como fonte promissora desses compostos vem adquirindo destaque na busca por novos antibióticos e agentes de biocontrole ecologicamente corretos (KOEHN, CARTER, 2005; STEIN, 2005). Dentre essas moléculas, peptídeos não-ribossômicos são parte de um grupo versátil de metabólitos secundários ativos como antibióticos, sideróforos, pigmentos, imunossupressores, moléculas antitumorais e surfactantes (WANG *et al.*, 2014).

Os biosurfactantes, compostos anfifílicos sintetizados por plantas e microrganismos, estabilizam emulsões e aumentam a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meio aquoso (CHRZANOWSKI *et al.*, 2012). A fonte microbiana desses produtos é vasta e abrange gêneros como *Acinetobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Saccharomyces*, *Thiobacillus* e *Ustilago* (SHEKHAR *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016). Características como alta biodegradabilidade, alta especificidade em ampla faixa de pH, temperatura, salinidade e baixa toxicidade classificam esses agentes bioativos, como interessantes para diversas aplicações no setor industrial (ABDELHAFIZ *et al.*, 2017).

Embora existam muitas vantagens e potencial aplicabilidade dos biosurfactantes, o custo de produção desses produtos frente aos surfactantes químicos ainda é alto. As fontes nutricionais consumidas pelos microrganismos representam até 50% dos custos de produção de produtos de base biológica. Assim, a fim de diminuí-los, o uso de resíduos agroindustriais como fontes nutricionais para os microrganismos torna o bioprocessamento menos oneroso e mais

ecológico (RUFFINO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). Nesse sentido, o resíduo glicerol da produção de biodiesel pode ser empregado como fonte de carbono para microrganismos.

A produção mundial de biodiesel por transesterificação cresce continuamente e, conseqüentemente, há aumento na produção de seu principal co-produto, o glicerol bruto. É estimado que aproximadamente 10 m³ de glicerol bruto são gerados para cada 90 m³ de biodiesel obtido por essa reação (THOMPSON; HE, 2006). Favoravelmente, esse co-produto é metabolizado por muitos microrganismos, além de ser uma fonte de carbono convertida em produtos de alto valor, como biossurfactantes (CÂMARA; SOUSA; BARROS NETO, 2020; FARIA *et al.*, 2011; RAIMONDI *et al.*, 2014).

Considerando o caráter ecológico e a ampla aplicabilidade biotecnológica desses metabólitos, esse trabalho objetivou selecionar cepas do grupo *Bacillus subtilis* potenciais produtoras de biossurfactantes, produzi-los em meio contendo glicerol residual de biodiesel como fonte de carbono e, por fim, avaliar o potencial antibacteriano, antifúngico e a fitotoxicidade dos biossurfactantes produzidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes empregados

O glicerol bruto isento de metanol usado no experimento foi cedido pelo Laboratório de Óleos, gorduras e biodiesel da UFLA, situado na cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil. HCl empregado para precipitação ácida do biossurfactante e Ágar Mueller-Hinton foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Ágar Triptona de Soja, Extrato de Levedura, Extrato de Carne, Peptona, (NH₄)₂SO₄, Na₂HPO₄.7H₂O, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O e MnSO₄.H₂O foram adquiridos da Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil). Extrato de malte foi obtido da Himedia (Guarulhos, SP, Brasil).

2.2 Microrganismos

As dez cepas submetidas à seleção do potencial de síntese de biossurfactantes pertencem ao grupo *B. subtilis*. Nove foram disponibilizadas pela Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Brasil, e foram isoladas do caxiri, fermentação via úmida de café, fermentação via seca de café, chicha de arroz, fermentação de cacau, café despolpado, água de fermentação do café e fruto do cerrado Annona.

Uma das cepas, codificada como *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081, foi isolada do alperujo e está atualmente em processo de depósito na coleção citada anteriormente.

Como controle, foi utilizada a cepa *B. subtilis* LBBMA 155, pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil). Essa cepa, isolada de sedimento de mangue contaminado por petróleo, foi documentada como produtora de biossurfactante no trabalho de Lima *et al.* (2011).

As cepas *S. enterica* sorotipo Enteritidis S64, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), a cepa referência de *Escherichia Coli* enteropatogênica INCQS 00181 (CDC 055) e a cepa referência *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923) foram utilizadas para os testes antibacterianos.

As cepas *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* CML 1875, isolada do tomate e potencial fitopatógeno dessa espécie (JANGIR *et al.*, 2018), *Fusarium verticillioides* CML 2743, isolada do sorgo e potencial produtora de fumonisina (DEEPA, NAGARAJA, SREENIVASA, 2016) e *Fusarium paranaense* CML 1830, representante de espécie indutora de sintomas de Podridão Vermelha da Raiz em soja no Brasil (COSTA *et al.*, 2016) foram utilizadas para os testes antifúngicos. Tais espécies foram cedidas pela Coleção Micológica de Lavras – CML (Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, Brasil).

Além dessas, outras cepas fúngicas potencialmente produtoras de ocratoxina A em uvas, vinhos e café foram testadas (DACHERY *et al.*, 2019; REZENDE *et al.*, 2013). *Aspergillus westerdijkiae* CCDCA 11469, *Aspergillus carbonarius* CCDCA 10507 e *Aspergillus ochraceus* CCDCA 10490 foram cedidos pela Coleção de Culturas de Microrganismos CCDCA/UFLA (Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Brasil).

2.3 Seleção das cepas potencialmente produtoras de biossurfactante

Cepas do grupo *B. subtilis* BAL 0081, CCMA 0051, 0054, 0087, 0136, 0401, 0658, 1228, 1287 e 1340, padronizadas a 10^8 UFC/mL em solução de NaCl 0,9%, foram inoculadas sobre a superfície de placas de Ágar Triptona de Soja (TSA) com 5% de sangue de carneiro desfibrilado. Posteriormente, incubou-se a 37°C , por 24 h. A verificação da zona clara formada ao redor da colônia é um método qualitativo usado como um indicador da produção de biossurfactante (RODRIGUES *et al.*, 2006).

2.4 Produção de biossurfactante

As cepas de *B. subtilis* grupo selecionadas conforme item 2.3 foram cultivadas em Ágar Nutriente por 24h a 30°C e posteriormente, foram inoculadas em Erlemeyers de 250 mL com 50 mL de meio de crescimento como descrito no estudo de Morán *et al.* (2000), suplementado com glicerol 3% (v/v). Após o ajuste de pH 6,7, esses frascos foram incubados a 180 rpm e a 37°C por 24 h. Em seguida, uma alíquota de inóculo (10% v/v), padronizado a 10⁸ UFC/mL, foi transferida para cada frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 300 mL do meio Morán de fermentação, suplementado com glicerol 3% (v/v). O ensaio foi realizado nas condições de cultivo de 200 rpm, 37°C e pH 7 por 96h (MEENA *et al.*, 2020). A composição do meio de inóculo e do meio de fermentação foi, em g/L, 1,0 (NH₄)₂SO₄, 7,2 Na₂HPO₄.7H₂O, 3,0 KH₂PO₄, 2,7 NaCl, 0,6 MgSO₄.7H₂O, 0,015 FeSO₄.7H₂O e 0,002 MnSO₄.H₂O. Após o processo fermentativo, os substratos foram centrifugados a 9.000 rpm por 15 min e 4 °C para eliminação das células.

2.5 Avaliação da produção de biossurfactante

2.5.1 Índice de Emulsificação (IE₂₄)

O Índice de Emulsificação (IE₂₄) foi determinado usando o método descrito por Mouafi, Elsoud e Moharam (2016). Cerca de 2 mL dos óleos diesel e de soja e 2 mL de caldo de fermentação isento de células foram inoculados num tubo de ensaio e homogeneizados por meio de vórtice a alta velocidade durante 2 min. Após 24 h, a capacidade de emulsificação foi calculada usando a equação 1 (COOPER; GOLDENBERG, 1987).

$$(IE_{24})\% = \left[\left(\frac{\text{Altura da camada emulsionada}}{\text{Altura da camada líquida}} \right) \right] \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

2.5.2 Ensaio de espalhamento de óleo

Inicialmente, foram inseridos trinta mL de água deionizada em placas de Petri e, em seguida, cada placa recebeu 1 mL de azeite de oliva sobre a água. Vinte µl de caldo de cultura livre de células foram então adicionados à superfície do azeite. Na presença de biossurfactante no caldo de cultura livre de células, o óleo é deslocado através de um halo livre de óleo. O

diâmetro dessa zona de compensação indica a atividade do biosurfactante (ASHITA; RADHAKRISHNAN, JYOTHIS, 2020).

2.6 Recuperação do Biosurfactante

Após o processo fermentativo, o meio fermentado de todas as cepas foi centrifugado a 9.000 rpm por 15 min e 4 °C para eliminação das células. O pH do caldo de fermentação livre de células foi ajustado para 2,0 com adição de HCl 6 M (GROVER *et al.*, 2010). Os biosurfactantes precipitados com ácido foram recuperados por centrifugação (12.000 rpm por 15 min a 4 °C). Posteriormente, o precipitado foi redissolvido em água deionizada e ajustado para pH 7 com subsequente liofilização. O extrato foi ressuscitado em água deionizada, em Tampão fosfato salino (pH 7) e em metanol para os testes de fitotoxicidade, ação antimicrobiana e cromatografia de camada delgada, respectivamente. Para todos os testes, o extrato foi filtrado em filtro para seringa K18-230 com tamanho de poro 0,22 µm (KASVI, Brasil) (GARG, PRIYANKA, 2018).

2.7 Atividade antibacteriana do biosurfactante

A atividade antibacteriana dos biosurfactantes produzidos por BAL 0081, CCMA 0051, 0087 e 0658 contra *S. Enteritidis* S64, *E. Coli* (EPEC 055) e *S. aureus* (ATCC 25923) foi examinada utilizando o método de microdiluição em caldo conforme Fernandes *et al.* (2020), com adaptações. As cepas foram inoculadas em ágar Mueller-Hinton (MH) e incubadas por 24h a 37°C. Posteriormente, os inóculos de cada cepa foram preparados em solução de NaCl 0,9% e ajustados a uma concentração de 10⁸UFC/mL, que corresponde a 0,50 na escala McFarland.

O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços com tampa (Orange Scientific, Bélgica). Os 96 poços da placa foram preenchidos com 100 µL de caldo Triptona de soja estéril (TSB) (KASVI, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Após essa etapa, 100 µL de solução de biosurfactante preparada a uma concentração de 100 mg/mL, utilizando tampão fosfato salino (pH 7) foram adicionados à primeira coluna e homogeneizados com o meio. Subsequentemente, foram homogeneizados e retirados 100 µL de cada poço da coluna 1 para a coluna 2, e assim de forma sucessiva até a última coluna (12), na qual foram retirados 100 µL para obtenção de mesmo volume em todos os poços.

Posteriormente, 10 µL do inóculo foram inseridos nos poços de controle positivo e nos poços relativos ao teste de inibição. Controle positivo de crescimento bacteriano e controles

negativos da solução de biossurfactante e do caldo TSB foram aplicados para verificar a ausência de contaminação. As microplacas foram cobertas com tampa e incubadas a 37 ° C durante 24h. Após a incubação, a absorbância foi registrada em 600 nm para cada poço usando um leitor de microplaca (Thermo Scientific). Porcentagens de inibição de crescimento em diferentes concentrações de biossurfactante para cada microrganismo foram calculados através da Equação 2, proposta por Gudinã *et al.* (2010):

$$\% \text{ Inibição do crescimento} = \left[1 - \left(\frac{A_c}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Em que A_c representa a absorbância do poço contendo a concentração c de biossurfactante e A_0 , a absorbância do controle positivo, em que a bactéria cresceu em meio sem a presença de biossurfactante. De acordo com Gudinã *et al.* (2010), a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para cada cepa como a menor concentração de biossurfactante capaz de inibir completamente o crescimento mensurável ($A_{600} = 0$). Para estabelecer a Concentração Bactericida Mínima (CBM), 10 μL de cada poço foram inseridos em placas de ágar MH, incubadas a 37°C por 24h. A CBM foi definida a como a menor concentração da solução de biossurfactante causadora da morte do inóculo (BONA *et al.*, 2014).

2.8 Atividade antifúngica do biossurfactante

A preparação do inóculo e o teste antifúngico de microdiluição em caldo foram baseados no estudo de Sen *et al.* (2020), com adaptações. As cepas fúngicas foram cultivadas em placas de Ágar extrato de malte (MEA) por 168h. As suspensões de inóculo de cada cepa foram obtidas cobrindo as colônias fúngicas com água deionizada estéril, raspando suavemente a superfície das colônias com o auxílio de uma Alça de Drigalski e transferindo suavemente a suspensão de conídios para tubos estéreis. As suspensões de conídios foram ajustadas a 10^5 esporos/mL usando método de contagem em Câmara de Neubauer.

Os poços das microplacas de poliestireno de 96 poços foram preenchidos com 100 μL de caldo Extrato de Malte (20g/L). Após essa etapa, 100 μL de solução de biossurfactante preparada utilizando tampão fosfato salino (pH 7) a uma concentração de 100 mg/mL foram adicionados à primeira coluna e homogeneizados com o meio. Subsequentemente, foram homogeneizados e retirados 100 μL de cada poço da coluna 1 para a coluna 2 de forma sucessiva até a última coluna, onde foram retirados 100 mL. 20 μL do inóculo foram inseridos nos poços de controle positivo e nos poços relativos ao teste de inibição. Controle positivo de

crescimento fúngico e controles negativos da solução de biossurfactante e do caldo Extrato de Malte foram aplicados. As microplacas foram cobertas com tampa e incubadas a 28 ° C durante 72h. Após a incubação, a absorbância foi registrada em 600 nm para cada poço usando um leitor de microplaca (Thermo Scientific). Porcentagens de inibição de crescimento em diferentes concentrações de biossurfactante para cada microrganismo foram calculados através da Equação 3, de acordo com Sen *et al* (2020).

$$\% \text{ Inibição do crescimento} = \left[\left(\frac{\text{DO controle} - \text{DO tratamento}}{\text{DO controle}} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

Em que a densidade óptica (DO) controle representa a absorbância do controle positivo e DO tratamento, a absorbância do poço contendo a concentração a ser testada de biossurfactante. Para avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), foi realizado um teste semelhante ao aplicado para CBM, conforme item 2.7. 10 µL de cada poço foram inseridos em placas de MEA, incubadas a 28°C por 120h. A CFM foi definida a como a menor concentração da solução de biossurfactante causadora da morte do inóculo (BONA *et al.*, 2014).

O teste de difusão em ágar também foi realizado para o estudo da inibição fúngica. Para isso, os extratos brutos liofilizados de biossurfactante foram dissolvidos em Tampão Fosfato de Sódio a 50 mg/ mL e 200µL da solução do biossurfactante foram pipetados sob a superfície de placas de Petri com MEA. Após, com o auxílio de uma Alça de Drigalski, a gota da solução foi espalhada e foi aguardado o tempo de secagem. Posteriormente, 10 µL dos fungos testados foram inseridos no centro de cada placa e essas foram incubadas por 168h. A porcentagem de inibição do crescimento dos fungos inoculados foi calculada de acordo com a equação 4 (CAKIR *et al.*, 2004).

$$I\% = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (\text{Eq.4})$$

I é a porcentagem de inibição do crescimento micelial, ou seja, a redução do crescimento em relação ao controle, C equivale ao crescimento radial do fungo na amostra controle (cm) e T representa o crescimento radial do fungo na placa onde foi aplicada a solução de biossurfactante. Os halos foram medidos com o auxílio de um Paquímetro.

2.9 Análise de fitotoxicidade

Foi avaliada a fitotoxicidade do biossurfactante através de um teste baseado na germinação de sementes e alongamento de raízes de *Lactuca sativa* var. “Verônica”, seguindo a metodologia empregada nos trabalhos de Tiquia *et al.* (1996) e Santos *et al.* (2017), com adaptações. Uma solução do biossurfactante bruto a 50mg/mL foi preparada em água deionizada. Após essa etapa, a toxicidade foi determinada em caixas gerbox contendo duas camadas de papel mata borrão. Os papéis foram previamente umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa dos papéis e 25 sementes foram inseridas de forma espaçada em cada caixa gerbox, conforme Brasil (2009). 5 mL da solução de biossurfactante foram inseridos em cada caixa. As caixas foram incubadas em B.O.D com fotoperíodo (Eletrolab, São Paulo, SP) a 20°C por 168h. Água deionizada foi utilizada como controle. Após esse período de incubação, a germinação das sementes e o alongamento das raízes foram mensurados.

$$\text{Germinação relativa de sementes (\%)} = \frac{\text{SGE}}{\text{SGC}} \times 100 \quad (\text{Eq.5})$$

Em que SGE representa o número de sementes germinadas no extrato bruto e SGC, o número de sementes germinadas no controle.

$$\text{Comprimento relativo de raízes (\%)} = \frac{\text{comprimento médio da raiz no extrato}}{\text{comprimento médio da raiz no controle}} \times 100 \quad (\text{Eq.6})$$

$$\text{Índice de germinação (\%)} = \frac{(\%) \text{ de germinação de sementes}}{(\%) \text{ de alongamento de raízes}} \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

2.10 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia qualitativa em camada delgada (CCD) foi executada para detecção de peptídeos. Para isso, 100 mg de biossurfactante bruto foi dissolvido em 1 mL de metanol e foi aplicado em placa de sílica gel 20 x 20 cm (Merck, Alemanha) usando tubo capilar pontiagudo. A fase móvel utilizada foi composta de clorofórmio/metanol/ácido acético (25: 24: 1) (QAZI *et al.*, 2014). Quando os spots se aproximaram do topo da placa, essa foi retirada da cuba e seca ao ar. A fim de detectar a presença de porções lipídicas associadas a proteínas, a placa de CCD foi pulverizada de forma uniforme com água deionizada e, para detecção dos aminoácidos e

peptídeos, a placa foi pulverizada com a nihidrina (0,25% p/v em etanol) (MEENA et al., 2020). Os valores de Rf do teste foram calculados usando a seguinte fórmula:

$$Rf = \frac{\text{distância percorrida pelo soluto da origem (cm)}}{\text{distância percorrida pelo solvente da origem (cm)}} \text{ (Eq.8)}$$

2.11 Análise Estatística

Os testes de seleção de cepas produtoras de biossurfactantes, atividade antibacteriana, antifúngica foram realizados em triplicata e foram expressos em médias, acompanhadas de seus respectivos desvios-padrão. A análise de variância (ANOVA) foi realizada por meio do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2014) e os gráficos da análise de fitotoxicidade foram gerados no software GraphPad Prism 8.4.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de cepas pelo teste de Beta-hemólise

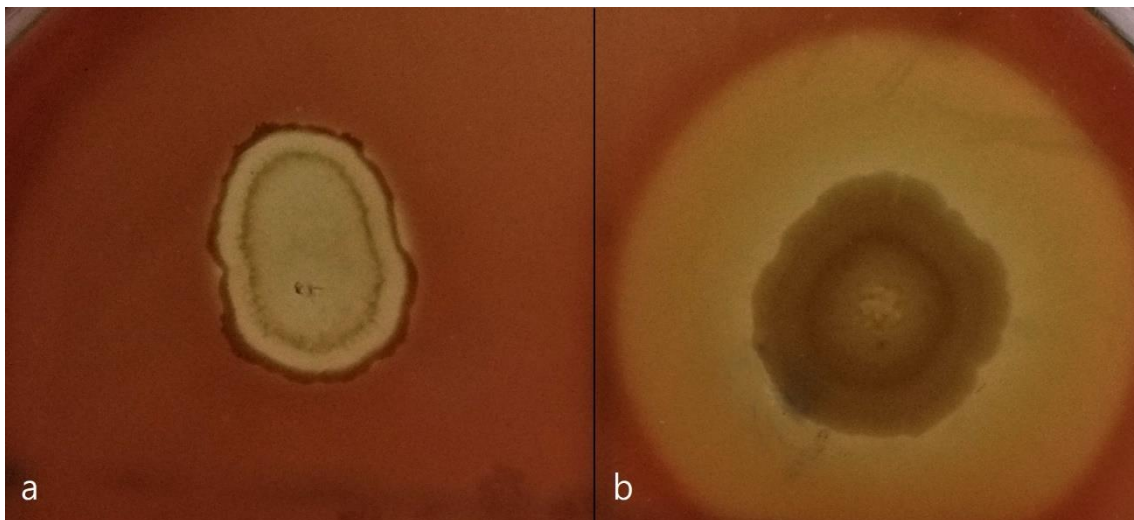
Dentre as cepas testadas, quatro apresentaram halos β -hemolíticos cujos diâmetros variaram de 2 a 5 cm. A figura 1b demonstra o halo formado por *Bacillus subtilis* grupo CCMA 0087 a figura 1a, a ausência desse em *Bacillus subtilis* grupo CCMA 1340, indicando beta e gama-hemólise respectivamente. Na tabela 1, constam as cepas selecionadas de acordo com a presença de β -hemólise. No teste de hemólise em Ágar-sangue, comumente aplicado para seleção de cepas potencialmente produtoras de biossurfactante, uma zona de compensação amarela clara ou transparente em torno das colônias bacterianas indica β ou hemólise completa das células sanguíneas (SOLTANIGHIAS et al.,2019).

Tabela 1 – Seleção das cepas potenciais produtoras de biossurfactante através do teste de beta-hemólise em ágar-sangue

Cepa <i>B. subtilis</i>	Beta-hemólise
CCMA 0051	(+)
CCMA 0054	(-)
BAL 0081	(+)
CCMA 0087	(+)
CCMA 0136	(-)
CCMA 0401	(-)
CCMA 0658	(+)
CCMA 1228	(-)
CCMA 1287	(-)
CCMA 1340	(-)

(+) apresentou halo de β -hemólise (-) não apresentou halo de β -hemólise

Figura 1 – Teste de hemólise em Ágar sangue



- (a) Ausência de β -hemólise pela cepa do grupo *B. subtilis* CCMA 1340.
 (b) Halo de β -hemólise formado pela cepa do grupo *B. subtilis* CCMA 0087

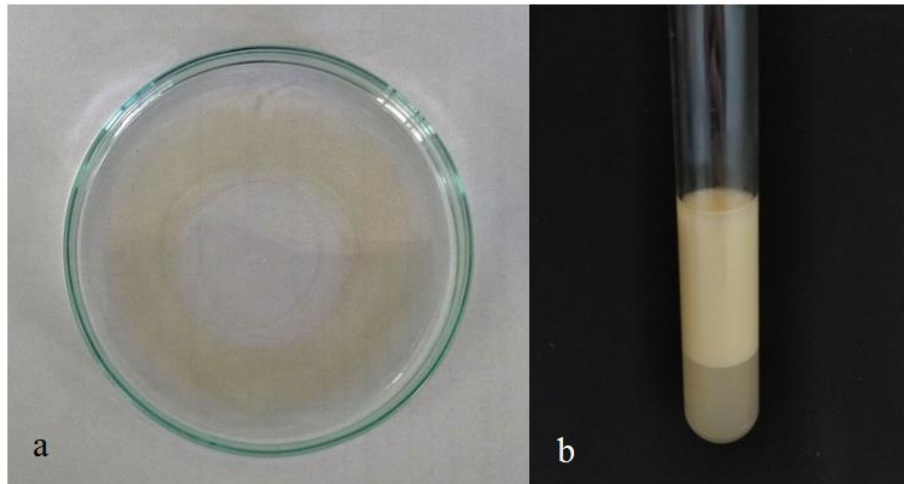
Fonte: Do autor, 2020

3.2 Avaliação da produção de biossurfactante

No ensaio de espalhamento de óleo, todos os caldos de fermentação de *Bacillus subtilis* grupo foram capazes de formar halos quando inseridos sobre as gotas de óleo. Além disso, os diâmetros de abertura medidos se encontram na faixa apresentada por Ashita, Radhakrishnan e Mathew (2020), em que o caldo fermentado de *Burkholderia sp.* WYAT7

formou halos que variaram de 34 a 52mm, a depender da fonte de carbono utilizada durante a fermentação. Dentre as bactérias testadas, o caldo livre de células da cepa *Bacillus subtilis* grupo CCMA 0087 gerou o halo de maior diâmetro (43,7 mm). A figura 2a exibe o ensaio de espalhamento de óleo realizado com a cepa *Bacillus subtilis* grupo CCMA 0087.

Figura 2 – Teste de espalhamento da gota e representação do Índice de Emulsificação (E₂₄)



- (a) Halo formado em azeite de oliva pelo biossurfactante de CCMA 0087.
 (b) Camada de emulsão formada pelo biossurfactante de BAL 0081 em biodiesel. Fonte: Do autor, 2020.

Tabela 2 – Avaliação da produção de biossurfactantes por meio do Índice de Emulsificação (EI₂₄) e pelo teste de espalhamento da gota de azeite de oliva.

Sobrenadante das cepas de <i>B. subtilis</i> grupo	Índice de emulsificação (EI ₂₄)		Teste de espalhamento da gota de azeite Diâmetro (mm)
	Óleo de soja	Óleo diesel	
CCMA 0051	36,77% ± 0,002	SE	26,30 ± 0,16
BAL 0081	40,33% ± 0,006	60,79% ± 0,007	34,7 ± 0,06
CCMA 0087	40,15% ± 0,002	54,85% ± 0,003	43,7 ± 0,12
CCMA 0658	35,92% ± 0,001	53,17% ± 0,003	30,0 ± 0,10
LBBMA 155 (Controle)	32,78% ± 0,007	52,69% ± 0,003	34,3 ± 0,40

(SE) Sem emulsificação

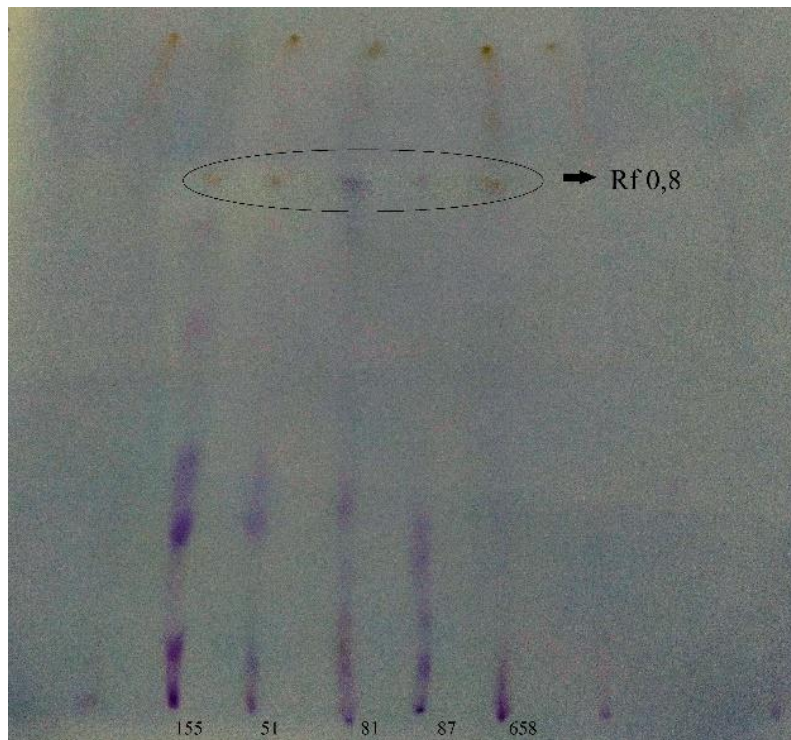
Segundo Bosch *et al.* (1988), índices de emulsificação maiores que 40% indicam a formação de emulsões estáveis. Nesse contexto, os caldos de fermentação das cepas *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 87 obtiveram os maiores IE₂₄ em óleo de soja e óleo diesel dentre as cepas testadas, apresentando índices maiores em relação à emulsificação do óleo diesel (Tabela 2). A figura 2b mostra a emulsão formada em tubo com caldo de fermentação da cepa *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081 e biodiesel. O IE₂₄ da cepa BAL 0081 atingiu valor muito próximo ao documentado por Ashita, Radhakrishnan e Mathew (2020), em que o caldo de de *Burkholderia sp.* WYAT7 atingiu 60% de emulsificação em querosene.

De acordo com Sifour *et al.* (2007), os surfactantes biológicos podem facilitar o crescimento de microrganismos em substratos imiscíveis na medida em que tornam maior a área de interface entre água e hidrocarbonetos, o que aumenta a biodisponibilidade desses compostos. Os biosurfactantes emulsionam óleos, levando ao aumento da solubilidade desses em água por meio da diminuição das tensões superficial e interfacial. Nessa perspectiva, a capacidade de formar e estabilizar emulsões é um parâmetro significativo na avaliação da presença e qualidade de um agente tensoativo. Além disso, segundo Morikawa, Hirata e Imanaka (2000), o ensaio de espalhamento de óleo é um teste capaz de medir a atividade do tensoativo biológico mesmo quando esse se encontra em baixas concentrações no caldo.

3.3 Detecção de Lipopeptídeos

A Cromatografia em Camada Delgada foi realizada com o intuito de verificar a presença de compostos lipopeptídicos no extrato bruto em metanol. A figura 3 exhibe spots obtidos no presente trabalho, cuja coloração e R_f se aproximaram dos resultados obtidos por Meena *et al.* (2020) e Li *et al.* (2020) em relação à presença de lipopeptídeos. R_fs próximos a 0,8 e 0,75 foram mensurados quando a placa de CCD foi pulverizada com Ninidrina e água, respectivamente, o que confirma a natureza lipopeptídica dos biosurfactantes presentes nas amostras. De acordo com Meena *et al.*, (2020), ao analisar a presença de tensoativos de natureza lipopeptídica, manchas violetas ou azuladas indicam a presença de aminoácidos e, na presença de porção lipídica, manchas esbranquiçadas se formam quando água é pulverizada.

Figura 3 – CCD realizada para verificação da presença de lipopeptídeos



Os spots relativos aos extratos brutos de LBBMA155, CCMA 0051, BAL 0081, CCMA 0087 e CCMA 0658 estão posicionados nesta ordem na fotografia. Fonte: Do autor, 2020.

3.4 Inibição de patógenos bacterianos

Para avaliar as atividades antibacterianas dos biossurfactantes brutos obtidos das cepas BAL 0081, CCMA 0051, 0087 e 0658 contra *S. Enteritidis* S64, *E. Coli* (EPEC 055) e *S. aureus* (ATCC 25923), foram analisadas as porcentagens de inibição geradas por diferentes concentrações do extrato bruto, que variaram de 50mg/mL a 0,02 mg/mL. A tabela 3 mostra as médias e seus respectivos desvios-padrão dos valores obtidos através da equação 2. Concentrações abaixo de 0,78 mg/mL dos quatro extratos, frente às três bactérias, geraram porcentagens de inibição inferiores a 20% e por isso não foram acrescentadas na tabela. O extrato bruto da cepa CCMA 0087 foi o único dentre os extratos testados capaz de alcançar uma CIM (25mg/mL) e uma CBM (25mg/mL) da Gram-negativa *E.coli* EPEC 055.

Tabela 3 – Porcentagens de inibição de crescimento bacteriano obtidas com o biossurfactante bruto em concentrações diferentes (mg /mL).

Cepa produtora	Microrganismo	Concentrações do extrato bruto (mg/ mL)						
		50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78
CCMA 51	<i>E. coli</i>	28,73 ± 1,55	26,97 ± 2,31	27,05 ± 2,04	26,68 ± 3,98	25,29 ± 3,50	25,66 ± 0,96	24,93 ± 1,34
	<i>S. Enteritidis</i>	62,59 ± 2,51	34,75 ± 3,18	18,11 ± 1,20	SI	SI	SI	SI
	<i>S. aureus</i>	65,25 ± 1,80	51,27 ± 1,20	50,85 ± 0,60	48,31 ± 1,80	38,42 ± 1,36	27,82 ± 2,13	23,31 ± 1,53
BAL 0081	<i>E. coli</i>	13,97 ± 0,83	13,85 ± 0,66	11,38 ± 0,83	8,92 ± 1,33	5,71 ± 3,42	1,17 ± 1,83	SI
	<i>S. Enteritidis</i>	49,12 ± 2,67	23,46 ± 0,93	22,08 ± 1,66	SI	SI	SI	SI
	<i>S. aureus</i>	36,11 ± 2,13	18,67 ± 0,96	9,86 ± 1,91	SI	SI	SI	SI
CCMA 0087	<i>E. coli</i>	99,77 ± 0,41	99,45* ± 0,59	32,67 ± 2,48	27,48 ± 1,96	27,95 ± 0,98	21,08 ± 1,54	17,10 ± 3,64
	<i>S. Enteritidis</i>	86,55 ± 0,21	38,39 ± 1,77	27,14 ± 2,02	2,50 ± 3,73	SI	SI	SI
	<i>S. aureus</i>	20,89 ± 2,08	18,63± 1,87	SI	SI	SI	SI	SI
CCMA 0658	<i>E. coli</i>	21,83 ± 1,00	19,48 ± 3,78	19,25 ± 2,45	19,41 ± 1,43	17,76 ± 1,16	16,98 ± 1,41	15,96 1,31
	<i>S. Enteritidis</i>	78,46 ± 1,60	42,52 ± 0,80	18,82 ± 0,64	SI	SI	SI	SI
	<i>S. aureus</i>	58,23± 3,19	57,52 ± 1,60	10,41± 0,64	8,86 ± 3,35	6,61 ± 0,88	SI	SI

*Indica a CBM e a CIM. Concentrações que não foram capazes de inibir o crescimento (SI).

Os extratos de BAL 0081, CCMA 0051 e CCMA 0658 não obtiveram valores relativos à CIM e CBM para as três bactérias testadas, como pode ser verificado na tabela 3. Porém, todos os biossurfactantes brutos mostraram porcentagens de inibição em que foi possível perceber limitação do crescimento em relação ao valor obtido pelos controles positivos dos três patógenos. O fato do teste ter sido executado utilizando um extrato bruto ao invés de um produto purificado parcialmente pode ter interferido na não ocorrência de CIM e CBM, em razão das menores concentrações de biossurfactante contidas no extrato. Garg, Priyanka e

Chatterjee (2018), ao testarem o biossurfactante bruto de *Candida parapsilosis* em uma faixa de concentração que variou de 50 a 5 mg/mL, constataram atividade antibacteriana contra cepa de *E. coli* e *S. aureus* na faixa de 25 a 50 mg ml/L, valores que se assemelham à inibição de *E.coli* demonstrada neste trabalho.

Peptídeos antimicrobianos têm potencial contra uma ampla gama de bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas. Tal potencial inclui bactérias resistentes aos antibióticos tradicionais e isso se deve ao modo de ação baseado na ruptura de membranas (PARK; PARK; HAHM, 2011). Essas biomoléculas estabelecem interação com as biomembranas das células alvo, ocasionando lise e morte celular (Clausell *et al.*, 2007). Em membranas bacterianas de *E. coli*, polimixina B, um lipopeptídeo cíclico catiônico, ocasiona permeabilização das membranas externas e despolarização das membranas citoplasmáticas, levando à dissipação dos gradientes iônicos (Daugelavičius *et al.*, 2000). Simulações de Dinâmica Molecular sugerem que esse lipopeptídeo se insere de forma profunda na membrana interna, levando a um aumento das taxas de hidratação, o que causa a permeabilidade da membrana bacteriana (Berglund *et al.* 2015).

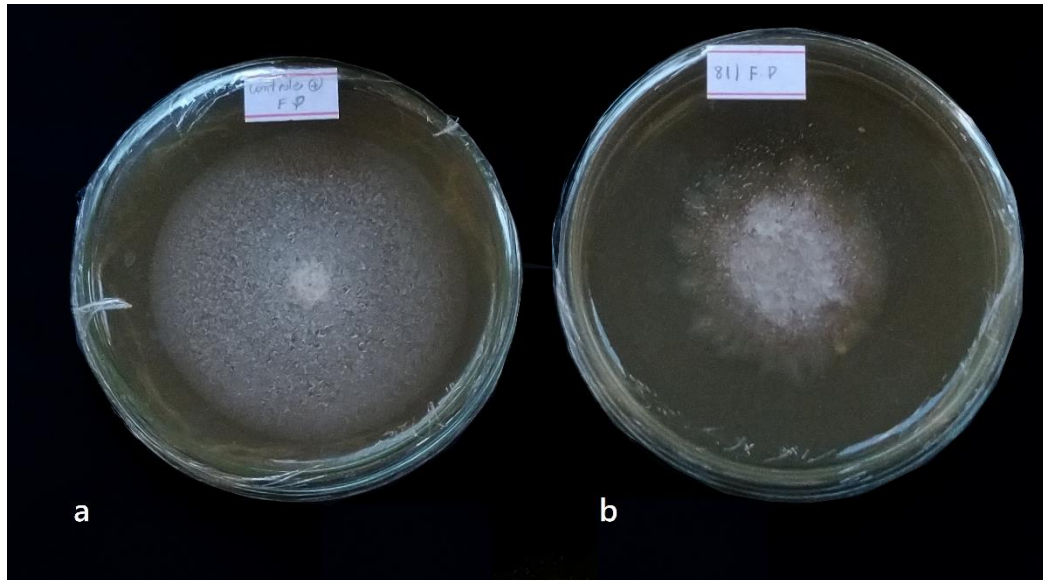
Altos potenciais antibacterianos de biossurfactantes peptídicos catiônicos foram relatados até então, principalmente contra Gram-positivas. A menor atividade inibitória desses compostos contra Gram-negativas é atribuída à carga negativa da membrana externa dessas bactérias, que, quando ligada ao peptídeo catiônico, pode impedir o transporte desse em direção à membrana citoplasmática interna (HAMOUDA; BAKER, 2000). Entretanto, há descrição de mecanismo baseado em interações eletrostáticas que enfraquecem a membrana externa e possibilitam acesso à membrana interna, exercidos por lipopeptídeos como as polimixinas (DERIS *et al.*, 2014).

3.5 Potencial da atividade antifúngica

Para avaliar o potencial antifúngico dos extratos brutos de BAL 0081 e CCMA 0051,0087 e 0658 contra *F. oxysporum* CML 1875, *F. verticillioides* CML 2743, *F. paranaense* CML 1830, *A. westerdijkiae* CCDCA 11469, *A. carbonarius* CCDCA 10507 e *A. ochraceus* CCDCA 10490, foram realizados os testes de difusão em ágar e microdiluição em caldo. No primeiro, foi verificado através da equação 4 que os biossurfactantes brutos de *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 0087 apresentaram maiores taxas de inibição contra as espécies de *Fusarium* e de *Aspergillus*. Nas espécies de *Fusarium*, a maior inibição foi notada na cepa *F. paranaense* CML 1830, quando exposta ao extrato bruto de *Bacillus subtilis* grupo BAL 0081

(figura 4). Em relação aos *Aspergillus*, *A. ochraceus* CCDCA 10490 foi a cepa cujo crescimento teve maior limitação por BAL 0081, como pode ser conferido na tabela 5.

Figura 4 – Inibição do crescimento de *F. paranaense* CML 1830 quando exposto ao extrato bruto de BAL 0081.



(a) Crescimento do fungo não tratado com biossurfactante (controle)
(b) Fungo cujo crescimento foi inibido em 35,53%. Fonte: Do autor, 2020

Tabela 4 – Atividade antifúngica do biossurfactante produzido pelas cepas CCMA 51,81,87 e 658, obtida pelo teste de difusão em ágar.

Cepas do grupo <i>B. subtilis</i>	Inibição do crescimento fúngico (%)					
	FO	FV	FP	AW	AC	AO
CCMA 0051	1,73 Cc ±1,50	1,67 Cc ±1,91	2,63 Bc ±2,28	15,65Ba ±2,36	12,42Ca ±1,13	7,14 Bb ±2,38
BAL 0081	24,67Ac ±2,60	23,33Ac ±2,89	35,53Aa ±2,30	23,40Ac ±1,19	27,45Ab ±3,40	27,78Ab ±1,37
CCMA 0087	20,78Bb ±2,25	25,00Aa ±1,25	8,77 Bc ±1,51	19,52Bb ±2,36	20,26Bb ±1,36	26,98Aa ±2,75
CCMA 0658	2,60 Cb ±1,30	5,83 Bb ±0,72	3,50 Bb ±0,75	9,52 Ca ±2,35	11,11Ca ±2,26	3,96 Bb ±1,37

As médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem umas das outras pelo teste de Skott-knott ($p \leq 0,05$). FO: *F. oxysporum* CML 1875; FV: *F. verticillioides* CML 2743; FP: *F. paranaense* CML 1830; AW: *A. westerdijkiae* CCDCA 11469; AC: *A. carbonarius* CCDCA 10507; AO: *A. ochraceus* CCDCA 10490

Em relação ao teste de microdiluição em caldo, não foram obtidos valores capazes de representar completa inibição de acordo com a equação 3 (SEN; BORAH; DEKA, 2020). Assim, para a possível obtenção de valores correspondentes à CIM, a aplicação de concentrações mais altas de extrato bruto ou a extração desses com solventes seriam requeridas.

No estudo de Zouari et al (2016), o precipitado ácido contendo lipopeptídeos de *Bacillus amyloliquefaciens* CEIZ-11 foi extraído três vezes com metanol antes de ser utilizado no testes de inibição antifúngica de microdiluição em caldo. Os autores documentaram valores de CIM de 156 a 9,8 µg/mL contra *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger*.

Contudo, diferentes porcentagens de inibição do crescimento foram notadas neste trabalho. Na concentração de 50mg/mL, o extrato bruto da cepa BAL 0081 exibiu maior porcentagem de atividade contra as três espécies de *Fusarium* testadas, com destaque para *F. panaense*, que teve seu crescimento inibido em 50,54% em relação ao controle positivo. *Fusarium panaense* sp. nov. é membro do complexo de espécies de *Fusarium solani*, causadoras de infecções em raízes de soja [*Glycine max* (L.) Merr]. Costa et al., (2015) descreveram *Fusarium panaense* sp. nov e associaram a espécie à podridão radicular da soja em diferentes regiões de produção no Brasil. O presente trabalho é o primeiro a realizar teste antimicrobiano *in vitro* contra *Fusarium panaense* sp. nov, utilizando um biossurfactante bruto capaz de limitar o crescimento do fitopatógeno nos testes de difusão em ágar e microdiluição em caldo.

Em relação às espécies de *Aspergillus*, as maiores porcentagens de inibição foram notadas em *A. ochraceus* pelos extratos brutos de *B. subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 0087, correspondendo a 55,14% e 65,24%, respectivamente (Tabela 5). Biossurfactantes lipopeptídicos podem inibir o crescimento de fungos toxigênicos causando danos em suas membranas. Tais danos podem ocasionar distúrbios metabólicos que suprimem a biossíntese de micotoxinas (HU et al., 2009). Em Jiang et al. (2017)., lipopeptídeos de *B. subtilis* exibiram potencial inibitório no crescimento de *Aspergillus carbonarius* e na produção de ocratoxinas por esse fungo durante o processo de vinificação. Além disso, os biossurfactantes foram mais eficientes em inibir esse fungo, quando comparados ao controle químico feito com dióxido de enxofre. Estudos como esse indicam a alta aplicabilidade de peptídeos antimicrobianos como agentes de biocontrole na indústria alimentícia.

Tabela 5 – Porcentagens de inibição de crescimento fúngico obtidas com o biossurfactante bruto em concentrações diferentes (mg/mL).

Cepa produtora	Microrganismo	Concentrações do extrato bruto (mg/mL)						
		50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78
CCMA 0051	<i>A. carbonarius</i>	27,96 ±0,32	23,41 ±2,41	17,13 ±0,90	14,00 ±0,88	12,17 ±1,48	8,41 ±0,47	7,27 ±0,30
	<i>A. ochraceus</i>	40,10 ±1,49	35,60 ±0,60	30,17 ±0,82	29,53 ±0,70	25,83 ±1,60	24,44 ±1,29	19,65 ±2,14
	<i>A. westerdijkiae</i>	28,04 ±0,26	27,38 ±0,40	26,82 ±2,62	20,84 ±2,51	19,56 ±3,30	18,82 ±3,29	15,51 ±4,21
	<i>F. oxysporum</i>	33,69 ±3,18	13,05 ±1,77	10,25 ±2,78	6,78 ±0,59	3,52 ±2,93	2,89 ±1,38	SI
	<i>F. paranaense</i>	21,66 ±0,71	11,23 ±1,05	SI	SI	SI	SI	SI
	<i>F. verticillioides</i>	22,97 ±2,05	10,56 ±5,72	2,88 ±2,36	0,96 ±1,07	SI	SI	SI
BAL 0081	<i>A. carbonarius</i>	48,71 ±0,33	34,76 ±0,47	34,99 ±0,79	29,30 ±0,33	21,57 ±2,15	11,42 ±2,30	5,15 ±1,21
	<i>A. ochraceus</i>	55,14 ±2,17	49,23 ±0,62	46,48 ±0,53	42,11 ±1,27	36,56 ±0,72	34,40 ±0,75	31,01 ±0,69
	<i>A. westerdijkiae</i>	52,97 ±1,44	35,63 ±1,75	20,34 ±1,95	20,00 ±0,50	12,09 ±1,60	1,89 ±1,59	SI
	<i>F. oxysporum</i>	41,20 ±0,51	25,48 ±1,63	14,76 ±1,37	4,61 ±0,86	4,03 ±1,00	4,37 ±0,73	3,75 ±0,76
	<i>F. paranaense</i>	50,54 ±0,08	26,75 ±1,88	15,10 ±1,23	5,25 ±2,32	2,38 ±1,05	1,81 ±0,15	1,63 ±0,96
	<i>F. verticillioides</i>	45,50 ±0,60	20,56 ±1,71	18,97 ±0,84	16,98 ±1,39	16,58 ±1,55	16,47 ±3,59	16,24 ±1,45
CCMA 0087	<i>A. carbonarius</i>	57,54 ±0,24	47,40 ±0,28	35,36 ±1,01	32,12 ±0,24	8,88 ±0,88	SI	SI
	<i>A. ochraceus</i>	65,24 ±0,70	57,25 ±0,31	47,15 ±0,31	42,91 ±0,56	41,97 ±0,25	30,56 ±0,21	16,95 ±0,55
	<i>A. westerdijkiae</i>	50,36 ±0,63	40,55 ±0,83	37,00 ±1,10	36,88 ±0,45	34,78 ±1,23	20,40 ±3,08	SI

	<i>F. oxysporum</i>	28,20 ±1,02	28,67 ±1,88	28,62 ±1,33	21,44 ±0,87	21,17 ±0,95	19,55 ±2,82	13,31 ±1,79
	<i>F. paranaense</i>	26,63 ±1,03	17,00 ±0,36	9,39 ±0,48	7,30 ±0,79	6,47 ±0,60	5,56 ±0,12	SI
	<i>F. verticillioides</i>	43,61 ±0,92	24,56 ±1,71	23,39 ±3,50	20,56 ±2,08	16,78 ±1,29	13,00 ±2,09	10,94 ±2,15
	<i>A. carbonarius</i>	15,86 ±0,42	8,43 ±1,17	4,69 ±0,73	3,22 ±0,38	1,52 ±0,49	SI	SI
CCMA 0658	<i>A. ochraceus</i>	25,23 ±2,48	16,34 ±0,92	12,63 ±0,65	9,94 ±2,21	7,16 ±0,38	6,12 ±0,82	6,01 ±0,44
	<i>A. westerdijkiae</i>	32,15 ±0,57	28,33 ±2,65	25,10 ±0,86	24,24 ±0,91	24,64 ±1,29	23,72 ±2,40	21,34 ±1,62
	<i>F. oxysporum</i>	25,28 ±0,72	22,28 ±1,64	15,06 ±1,66	11,79 ±1,73	8,43 ±1,32	6,35 ±2,31	4,51 ±1,25
	<i>F. paranaense</i>	37,15 ±0,86	19,49 ±1,26	16,59 ±1,32	15,91 ±1,70	16,62 ±1,94	14,43 ±1,81	12,09 ±2,21
	<i>F. verticillioides</i>	14,99 ±2,64	5,00 ±1,16	SI	SI	SI	SI	SI

Concentrações que não foram capazes de inibir o crescimento (SI).

De acordo com Raaijmakers *et al.* (2010), a perturbação da integridade das membranas celulares por peptídeos antimicrobianos leva à lise celular de vários estágios da vida fúngica, como micélios, conídios ou zoósporos. Os mecanismos acerca da atividade antifúngica ainda estão sendo estabelecidos, porém, acredita-se que os surfactantes biológicos estabeleçam interação com os constituintes lipídicos das membranas, alterando a permeabilidade e a integridade dessas, através da formação de poros e canais iônicos. (MNIF *et al.*, 2015).

3.6 Análise de Fitotoxicidade

A fim de testar a fitotoxicidade dos biossurfactantes brutos de *B. subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 0087, bioprodutos que apresentaram maior atividade contra os fungos fitopatogênicos testados, o teste de índice de germinação proposto por Tiquia *et al.* (1996) e

Santos et al. (2017) foi aplicado. As figuras 5 e 6 mostram as medições obtidas a partir da Germinação Relativa de sementes (Eq. 5) e Comprimento relativo de raízes (Eq. 6). O Índice de germinação das sementes tratadas com extrato bruto de CCMA 0087 foi de 98,90%, enquanto obteve-se, a partir do extrato bruto de BAL 0081, 110% de Índice de Germinação (Eq. 7).

Figura 5 – Medidas do comprimento das raízes em cm de *Lactuca sativa* var. *Verônica*, após tratamento das sementes com os extratos brutos de BAL 0081 e CCMA 87.

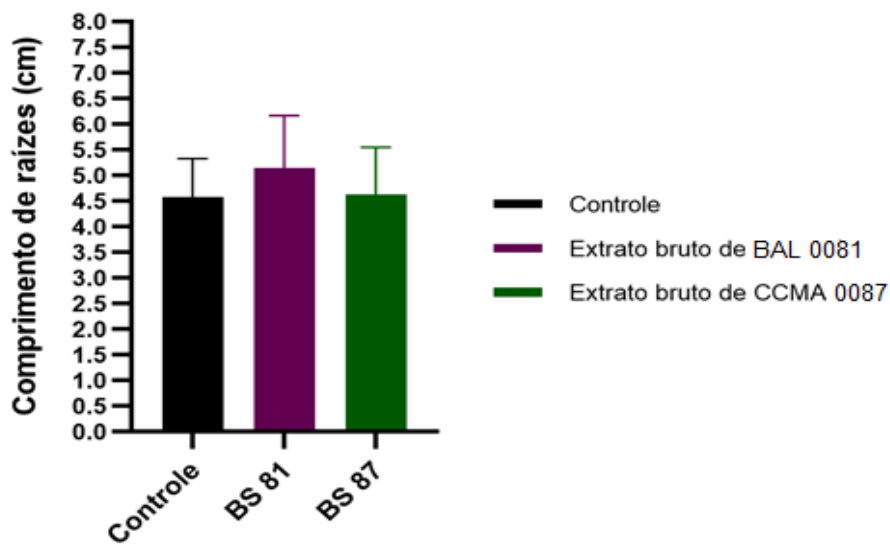
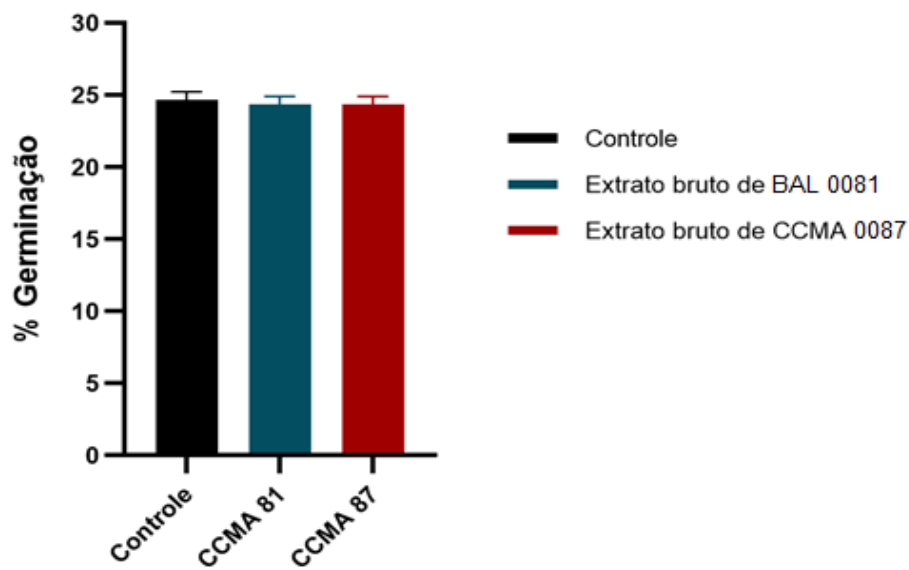


Figura 6 – Porcentagem de germinação das sementes de *Lactuca sativa* var. *Verônica*, submetidas ao tratamento com os extratos brutos de BAL 0081 e CCMA 87.



A natureza fitotóxica de muitos compostos pode ser testada avaliando a inibição de germinação de sementes e o alongamento de raízes. De acordo com Munzuroglu e Geckil (2002), a avaliação desses parâmetros configura um teste de fitotoxicidade aguda rápido e amplamente utilizado, cujas vantagens são a sensibilidade, simplicidade, baixo custo e adequação para produtos químicos e outros tipos de amostras. Nesse contexto, a *Lactuca sativa* L. (alface) é um dos organismos-teste mais empregados para avaliação a fitotoxicidade e a citogenotoxicidade de produtos químicos e biológicos (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010). Das e Kumar (2019) apresentam resultados semelhantes no que tange à ausência de fitotoxicidade em sementes. A germinação de sementes de trigo foi superior a 80% em concentrações crescentes de biossurfactante bruto de *Bacillus safensis* J2.

Considerando que um Índice de Germinação de 80% foi utilizado como indicador de ausência de fitotoxicidade por Tiquia, Tam e Hodgkiss (1996), os resultados deste trabalho demonstram que os extratos brutos de *B. subtilis* grupo BAL 0081 e CCMA 87 não exerceram efeitos inibitórios na germinação das sementes na concentração de 50mg/mL.

4 CONCLUSÃO

As cepas BAL 0081 e CCMA 0087 produziram biossurfactantes em glicerol residual, substrato de baixo custo e abundante na indústria do óleo diesel. Os extratos brutos desses biossurfactantes, obtidos a partir de uma única operação unitária, exibiram atividade antibacteriana, bactericida e antifúngica contra bactérias patogênicas e fungos fitopatogênicos. Além disso os biotensoativos, quando submetidos ao teste de fitotoxicidade na concentração testada, não inibiram a germinação do organismo-teste na concentração aplicada.

Dessa maneira, verifica-se o potencial desses bioprodutos como antimicrobianos de amplo espectro ecológicos e de baixo custo, que poderiam ser aplicados como agentes de biocontrole seguros. Para aprimorar o estudo, a caracterização química dos biossurfactantes produzidos, utilizando ferramentas sensíveis como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Ressonância Magnética Nuclear são desejáveis, o que tornaria possível a determinação da concentração e da natureza da moléculas bioativas. Além disso, é também importante conhecer a identidade dos *Bacillus* produtores dos peptídeos microbianos, traçando o perfil de ácidos graxos desses microorganismos.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAFIZ, Y.A.; et al. Draft Genome Sequence of a Biosurfactant-Producing *Bacillus subtilis* UMX-103 Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil in Terengganu, Malaysia. **Current. Microbiology**, New York, v. 74, p. 803–805, 2017.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotox. Environ. Safe.**, v.73, p.626-31, 2010.
- ASHITA, A.; RADHAKRISHNAN, A.; JYOTHIS, M. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte *Burkholderia* sp. WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials. **J. Biotechnol**, v.313, p.1-10, 2020.
- BASS, C.; et al. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pestic. Biochem. Phys.**, v. 121, p.78-87, 2015.
- BERGLUND, N.A.; et al. Interaction of the antimicrobial peptide polymyxin B1 with both membranes of *E. coli*: a molecular dynamics study. **PLoS Comput Biol**, v.11, n.4, e1004180, 2015.
- BONA, E.A.M. de.; et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 81, n.3, 218-225, 2014.
- BOSCH, M. P. et al. Surface–active compounds on microbial cultures. **Tenside Surfact. Det.**, v. 25, p. 208–211, 1988.
- BRASIL. 2009.Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. Regras para análise de sementes. 395p.
- CAKIR, A.; et al. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour Fragr.J.**, v.19, n.1, p. 62-68, 2004.
- CÂMARA, J.M.D.A.; SOUSA, M.A.S.B.; BARROS NETO, E.L. Modeling of Rhamnolipid Biosurfactant Production: Estimation of Kinetic Parameters by Genetic Algorithm. **J. Surfactants Deterg.** v. 23, n. 2, p. 705- 714, 2020.
- CHRZANOWSKI, Ł.; ŁAWNICZAK, Ł.; CZACZYK, K. Why do microorganisms produce rhamnolipids? **World Journal Microbiololy Biotechnology**, v. 28, p. 401– 419, 2012.
- CLAUSELL, A.; et al. (2007) Gram-negative outer and inner membrane models: insertion of cyclic cationic lipopeptides. **J. Phys. Chem. B**, v. 111, p.551–563, 2007.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 224–229, 1987.

- COSTA, S.C.; et al. *Fusarium paranaense* sp. nov., a member of the *Fusarium solani* species complex causes root rot on soybean in Brazil. **Fungal Biol.**, v. 120, p. 51-60, 2016.
- DACHERY, B.; et al. Effect of *Aspergillus carbonarius* on ochratoxin A levels, volatile profile and antioxidant activity of the grapes and respective wines. **Food Res. Int.**, v. 126, 109687, 2019.
- DAUGELAVIČIUS, R.; BAKIENE, E.; BAMFORD, D.H. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, p. 2969–2978, 2000.
- DAS, A.J., KUMAR, R. Production of biosurfactant from agro-industrial waste by *Bacillus safensis* J2 and exploring its oil recovery efficiency and role in restoration of diesel contaminated soil. **Environ. Technol. Innov.**, v.16, 100450, 2019.
- DEEPA, N.; et al. Prevalence of fumonisin producing *Fusarium verticillioides* associated with cereals grown in Karnataka (India). **Food Sci. Hum. Wellness.**, v.5, n.3, p.156-162, 2016.
- DERIS, Z.Z.; et al. Probing the Penetration of Antimicrobial Polymyxin Lipopeptides into Gram-Negative Bacteria. **Bioconjugate Chem.**, v. 25, n. 4, p.750–760, 2014.
- FARIA, A.F. de.; et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochem.**, v.46, n. 10, p. 1951-1957, 2011.
- FERNANDES, N. de. A.T.; et al. Eco-friendly Biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as Larvicidal and Antimicrobial. **Microbiol. Res.**, v.241, 126571, 2020.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciênc. Agrotec.**, v.38, n.2, p.109-112, 2014.
- GARG, M., PRIYANKA, CHATTERJEE, M. Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. **Biotechnol. Rep.**, v.18, e00251, 2018.
- GROVER, M.; et al. Molecular and Biochemical Approaches for Characterization of Antifungal Trait of a Potent Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* RP24. **Curr. Microbiol.**, v. 60, p. 99–106, 2010.
- GUDIÑA, E.L., ROCHA, V., TEIXEIRA, J.A. RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.50, p. 419-424, 2010.
- HAMOUDA, T., BAKER, J.R. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, p. 397 -403, 2000.
- HU, L.B.; et al. Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. **Lett Appl Microbiol.**, v. 48, n.1, p. 84-89, 2009.
- JANGIR, M.; et al. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, **Biol. Control.**, v.123, p. 60 -70, 2018.

JIANG, C.; et al. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* have potential application in the winemaking process: inhibiting fungal and ochratoxin A contamination and enhancing esters and acids biosynthesis. **Aust. J. Grape Wine R.**, v. 23, n. 3, p. 350 - 358, 2017.

KOEHN, F. E., CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug Discovery. **Nat. Rev. Drug Discovery.**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.

LI, J.; et al. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycooides* BS6 utilizing soybean oil waste. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v. 112, p. 72-79, 2016.

LI, Z.; CHAKRABORTY, P., REINDER, H. de. V.; SONG, C.; ZHAO, X.; ROELFES, G.; SCHEFFERS, D-J, KUIPERS, O.P. Characterization of two relacidines belonging to a novel class of circular lipopeptides that act against Gram-negative bacterial pathogens. **Environ. Microbiol.**, v.22, n.6, 2020.

LIMA, T.M.S.; et al. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 3, p. 2957–2964, 2011.

LUCAS, J. A.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. The evolution of fungicide resistance. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 90, p. 29– 92, 2015.

MEENA, K. R.; et al. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. **J. King Saud Univ. Sci.**, v. 32, p. 337 - 348, 2020.

MNIF, I., GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **J. Pept. Sci.**, v.104, n. 3, p. 129–147, 2015

MORÁN, A.C., et al. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a Biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation**, v. 11, p. 65 – 71, 2000.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochim Biophys Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1488, n. 3, p. 211–218, 2000.

MOUAFI, F. E.; ELDSOUD, M. M. A.; MOHARAM, M. E. (2016). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. **Biotechnol. Rep.**, v. 9, p.31–37, 2016.

MUNZUROGLU, O., GECKIL, H. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.43, p. 203-213, 2002.

PARK, S.C., PARK, Y., HAHM, K.S. (2011). The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, n. 9, p. 5971-5992, 2011.

- QAZI, M.A.; et al. Isolation and Characterization of a Biosurfactant-Producing *Fusarium* sp. BS-8 from Oil Contaminated Soil. **Biotech. Progress.**, v.30, n. 5, p. 1065-1075, 2014.
- RAAIJMAKERS, J.M.; MAZZOLA, M. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. **Annu. Rev.Phytopathol.**, v.50, p. 403– 424, 2012.
- RAIMONDI, S., et al. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freschussii*. **Microb. Cell Fact.**, v.13, n. 83, 2014.
- REZENDE, E. F.; et al. Potencial enzimático e toxigênico de fungos isolados de grãos de café. **Coffee Science**, v. 8, p. 69-77, 2013.
- RODRIGUES, L.R.; et al. Isolation and partial characterization of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophilus*. **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v. 53, p. 105–112, 2006.
- RUFINO, R.D.; et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electron. J. Biotechnol.**, v. 17, p. 34–38, 2014.
- SABARWAL, A.; KUMAR, K.; SINGH, R.P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v.63, p. 103-114, 2018.
- SOLTANIGHIAS, T.; et al. Assessment of biosurfactant-producing bacteria from oil contaminated soils and their hydrocarbon degradation potential. **Environ. Sustain**, v. 2, p. 285-296, 2019.
- SANTOS, D.K.F.; et al. Biosurfactant production from *Candida lipolytica* in bioreactor and evaluation of its toxicity for application as a bioremediation agent. **Process Biochem.**, v. 54, p. 20-27, 2017.
- SEN, S.; et al. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophyticfungi *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Biotechnol. Reports.**, v.27, e00516, 2020.
- SHEKHAR, S.; SUNDARAMANICKAM, A.; BALASUBRAMANIAN, T. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. **Crit. Rev. Env. Sci. Tech.**, v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 2015.
- SIFOUR, M., AL- JILAWI, M.H., AZIZ, G.M. Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 10, p. 1331–1335, 2007.
- SPELLBERG, B., et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** v.46, p. 155–164, 2008.
- STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Mol. Microbiol.**, v. 56, n. 4, p. 845 - 857, 2005.

TIQUIA, S.M., TAM, N.F.Y., HODGKISS, I.J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. **Environ. Pollut.**, v.93, p. 249–256, 1996.

THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Appl. Eng. Agric.**, v.22, p. 261-265, 2006.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T.**, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.

WANG, H., et al. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 111, p. 9259–9264, 2014.

ZOUARI, I.; et al. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. **Biol. Control.**, v. 100, p. 54-62, 2016.