

EDUARDO RAFAEL PALMIER ANDRADE

PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE DE *Bacillus velezensis* H2O-1 E SUA  
APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

DEZEMBRO / 2024

**Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Mateus Gomes de Godoy e co-orientação de Thiago Silva de Oliveira.**

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

A565p Andrade, Eduardo Rafael Palmier  
PRODUÇÃO DO BIOSSURFACTANTE DE *Bacillus*  
*velezensis* H2O-1 E SUA APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA  
DO PETRÓLEO / Eduardo Rafael Palmier Andrade. -- Rio  
de Janeiro, 2024.  
76 f.

Orientador: Mateus Gomes de Godoy.  
Coorientador: Thiago Silva de Oliveira.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. biotecnologia. 2. biossurfactante. 3.  
surfactina. 4. biocorrosão. 5. meio de baixo custo.  
I. Godoy, Mateus Gomes de, orient. II. Oliveira,  
Thiago Silva de, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE  
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS  
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**ALUNO(A): EDUARDO RAFAEL PALMIER ANDRADE DRE: 121069329**

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente da Banca)  
 Lívia Vieira Araújo de Castilho (Membro da Banca)  
 Athayde Neves Junior (Membro da Banca)  
 Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

**Título da Monografia: "PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE DE *Bacillus velezensis*  
 H2O-1 E SUA APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA DO  
 PETRÓLEO"**

**Local: Sala Vermelha – I03 no IMPG, UFRJ**

**Data e hora de início: 04 de dezembro de 2024 às 13:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 04 de dezembro de 2024.

**NOTA:**

**Banca Examinadora:**

10

Ana Maria M de Almeida

Prof. Ana Maria Mazotto de Almeida (Presidente)

10

Livia V de Castilho

Livia Vieira Araújo de Castilho

10

Athayde Neves Junior

Athayde Neves Junior

Prof. Diogo de Azevedo Jurelevicius (Suplente)

Eduardo R Palmier Andrade

Eduardo Rafael Palmier Andrade

**Aluno(a):**

**Orientador(a)  
(e coorientador):**

Mateus Gomes de Godoy

Prof. Mateus Gomes de Godoy

Thiago Silva de Oliveira

Thiago Silva de Oliveira

**Coordenadora de**

**TCC:**

Marinella Silva Laport

Profa. Marinella Silva Laport

## AGRADECIMENTO

Primeiramente à minha mãe, Beatriz, a quem devo tudo nessa vida, especialmente minhas oportunidades e senso de dedicação. Obrigado por nunca deixar que nada faltasse em casa, por ser meu maior apoio e guia durante minha educação, por fazer de mim a sua maior prioridade e por me aceitar e amar incondicionalmente. Agradeço pelo privilégio de ser seu filho e espero que se orgulhe de mim. Amo você!

Aos meus amigos de fora da UFRJ, que mesmo sem ter no dia a dia acham um espaço em suas vidas para mim e meus surtos com a faculdade. Em especial, quero agradecer à Marcella, que me atura a mais tempo e tem propriedade para dizer o quanto mudei e o quanto ainda sou o mesmo menino do 9º ano. À Maria Fernanda, meu refúgio mensal do resto do mundo, sempre com a casa aberta e uma série pronta na TV. Por último, mas não menos importante, à Letícia, quem, desde o ensino médio, me ajuda a pôr os problemas em perspectiva com um bom vinho. A amizade de vocês eu continuo segurando no fundo do coração!

Quero agradecer aos meus amigos da graduação, principalmente aos integrantes do grupo “cota LGBT”. Nada é mais motivador do que chegar no Fundão e implicar com vocês o dia todo. À Ana Clara, a maior pequena fofqueira de poucas palavras. Ao Gonçalo, que veio lá do Amapá só para me irritar aqui no IMPG, mas sempre prepara uma comida gostosa em compensação. E, claro, à minha irmã de escolha, Bianca, com quem pareço ter estabelecido uma conexão telepática em algum momento desses últimos quatro anos. Bianca, você é minha rocha e eu sou a sua, é como dizem por aí: “*The blind leading the blind*”! Que as horas entre o trabalho e a vida adulta sejam sempre nossas!

Aos meus amigos ICs do LABEM, todos os dias compartilhando o estresse e as fofocas enquanto bebemos um cafezinho na copa. Especialmente aos meus ICs Júnios, Ana Beatriz e Matheus, a quem tive prazer (e paciência) de ensinar os básicos do laboratório e com quem também aprendi muito. Obrigado pela contribuição de vocês para este trabalho e pelo companheirismo dentro e fora do LABEM!

Agradeço também ao LABEM – Godoy, sempre apoiando uns aos outros e recebendo novos integrantes e elogios durante apresentações. Principalmente ao Thiago, sempre disposto e animado para ajudar (apenas não durante as manhãs) e pronto para uma *rave*, e ao Lucas, incansavelmente metódico na bancada e ocasionalmente com um comentário sarcástico que me faz rir alto até demais. Obrigado por aturarem aqueles fatídicos finais de semana de alimentação de biorreator!

Ao meu orientador Mateus Godoy, constantemente me desafiando com algo novo e me concedendo oportunidades. Obrigado pela sua orientação, confiança e suporte desde meu primeiro dia no LABEM. Espero continuar testando sua paciência com meu chamado: “Professor Mateus...”!

Ao meu padrinho, Luiz, minha maior fonte de inspiração. Ele pode não saber o quanto contribuiu para minha formação, mas agradeço a ele por ser o meu Norte, minha luz guia.

Ao meu parceiro, porto seguro e namorado, Geraldo. Quem me ensinou que o desempenho acadêmico não precisa vir às custas da minha saúde psicológica e quem aturou os piores dos meus surtos. Aprendi o valor de priorizar na minha vida e hoje minha prioridade é você. Obrigado por me amar nos meus dias bons e nos meus dias ruins. Te amo!

À Prof. Lucy Seldin, por ter cedido a cepa produtora do biossurfactante utilizado neste estudo.

Ao LGM e sua equipe, por, como um caridoso laboratório irmão mais velho, emprestar de tudo, partindo de reagentes à capela de exaustão.

Ao Polo de Xistoquímica da UFRJ e ao BioInovar, especialmente ao Athayde, por permitir o uso de goniômetros que contribuíram para este trabalho.

Ao LaBiM e toda a sua equipe, especialmente a Prof. Elisa, por tornar a montagem dos biorreatores possível.

À UniMicro e ao CENABIO, especialmente ao Jefferson, por toda a ajuda nas microscopias apresentadas neste estudo.

Aos órgãos de fomento CNPq e Fundação COPPETEC pelo apoio financeiro.

À educação pública, principalmente ao Instituto Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Microbiologia desta Universidade por fazerem de mim um verdadeiro cientista.

*“They became what they’d aspired to be since their first year — aloof, brilliant, and fatigued to the bone. They were miserable. (...) They adored it.”*

*– R. F. Kuang*

## RESUMO

**EDUARDO RAFAEL PALMIER ANDRADE**

### **PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE DE *Bacillus velezensis* H2O-1 E SUA APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

**Orientador: MATEUS GOMES DE GODOY**

**Coorientador: THIAGO SILVA DE OLIVEIRA**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A biocorrosão em dutos da indústria do petróleo é controlada por biocidas e surfactantes químicos, que são tóxicos e não biodegradáveis. Como alternativas, surgem os biossurfactantes, moléculas com propriedades tensoativas produzidas por microrganismos. A surfactina é considerada o biossurfactante mais potente, sendo capaz de levar a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m. Dentre os microrganismos produtores de surfactina, destaca-se a cepa *Bacillus velezensis* H2O-1, cujo biossurfactante é marcado por alta eficiência mesmo em baixas concentrações. No entanto, a produção dessas moléculas enfrenta altos custos, especialmente devido aos meios de cultivo necessários. Dessa forma, este estudo busca avaliar um meio de cultivo composto por uma fonte de carbono alternativa: o melaço, resíduo agroindustrial de baixo valor agregado. Os objetivos do projeto incluem: (1) Avaliar a cinética de crescimento da cepa no meio alternativo; (2) Extrair e quantificar a surfactina produzida nas condições de cultivo propostas; (3) Investigar as propriedades tensoativas do sobrenadante de cultivo de meio alternativo; (4) Determinar o potencial de aplicação da surfactina produzida no meio alternativo como agente de biocontrole da biocorrosão. A cinética de crescimento de *B. velezensis* H2O-1 em meio alternativo confirma a capacidade deste meio de promover o crescimento do microrganismo, cuja fase exponencial ocorre no período entre a 15<sup>a</sup> e a 35<sup>a</sup> horas de incubação. A quantificação dos biossurfactantes foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência após uma etapa de extração de lipopeptídeos do sobrenadante bruto de cultivo, que acusou concentrações de surfactina de 294,26 mg/L em meio convencional e 220,02 mg/L em alternativo. Por fim, a caracterização das propriedades tensoativas do biossurfactante produzido incluiu índice de emulsificação, capacidade de dispersão de óleo e avaliação da tensão superficial, realizada através de um goniômetro Krüss DSA30, pelo método da gota pendente. Os testes de dispersão do óleo e de índice de emulsificação sugerem que o meio alternativo promoveu a produção de biossurfactantes e que o seu sobrenadante apresenta capacidade emulsificante. Em relação à tensão superficial, o meio alternativo testado atingiu valores de 26,68 mN/m, em relação aos 72 mN/m da água ultrapura ou aos 24,28 mN/m do meio convencional. Quanto a aplicabilidade no biocontrole da biocorrosão, o sobrenadante produzido apresentou capacidade retardante da formação de biofilme e da corrosão em superfícies metálicas. Conclui-se que o meio alternativo proposto se mostra promissor como estratégia para reduzir os custos de produção da surfactina, mantendo propriedades análogas às observadas em meio convencional.

**Palavras chaves:** Biotecnologia; biossurfactante; surfactina; biocorrosão; melaço.

**ABSTRACT****EDUARDO RAFAEL PALMIER ANDRADE****PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE DE *Bacillus velezensis* H2O-1 E SUA APLICABILIDADE NA INDÚSTRIA DO PETRÓLEO****Orientador: MATEUS GOMES DE GODOY****Coorientador: THIAGO SILVA DE OLIVEIRA**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Biocorrosion in oil industry pipelines is controlled by biocides and chemical surfactants, which are toxic and non-biodegradable. As alternatives, biosurfactants are emerging molecules with tensioactive properties produced by microorganisms. Surfactin is considered the most potent biosurfactant, capable of reducing water's surface tension from 72 mN/m to 27 mN/m. Among surfactin-producing microorganisms, the *Bacillus velezensis* H2O-1 strain stands out for its biosurfactant, which is highly effective even at low concentrations. However, producing these molecules is costly, primarily due to the required culture media. Therefore, this study aims to evaluate a culture medium composed of an alternative carbon source: molasses, a low-value byproduct of the agro-industrial sector. The project objectives are: (1) to evaluate the growth kinetics of the strain in the alternative medium; (2) to extract and quantify the surfactin produced under the proposed conditions; (3) to investigate the tensioactive properties of the alternative medium's culture supernatant; and (4) to determine the potential application of surfactin produced in the alternative medium as a biocontrol agent for biocorrosion. The growth kinetics of *B. velezensis* H2O-1 in the alternative medium confirm its ability to support microorganism growth, with the exponential phase occurring between the 15th and 35th hours of incubation. Biosurfactant quantification was performed by High-Performance Liquid Chromatography after lipopeptide extraction from the raw culture supernatant, yielding surfactin concentrations of 294.26 mg/L in conventional medium and 220.02 mg/L in the alternative medium. Finally, the tensioactive characterization of the biosurfactant produced included measurements of emulsification index, oil dispersion capacity, and surface tension, using a Krüss DSA30 goniometer and the pendant drop method. Oil dispersion and emulsification index tests suggest that the alternative medium promoted biosurfactant production and that its supernatant has emulsifying capability. Regarding surface tension, the alternative medium tested reached values of 26.68 mN/m, compared to 72 mN/m for ultrapure water and 24.28 mN/m for the conventional medium. Regarding its applicability on biocontrol of biocorrosion, the supernatant produced was able to retard biofilm formation and corrosion on metal surfaces. In conclusion, the proposed alternative medium shows promise as a strategy to reduce surfactin production costs while maintaining both productivity and properties comparable to those observed in the conventional medium.

**Key-words:** Biotechnology; biosurfactant; surfactin; biocorrosion; molasses.

## RESUMO PARA LEIGOS

**EDUARDO RAFAEL PALMIER ANDRADE**

### **PRODUÇÃO DE UM “DETERGENTE VERDE” A PARTIR DE BACTÉRIAS E MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A INDÚSTRIA DO PETRÓLEO**

**Orientador: MATEUS GOMES DE GODOY**

**Coorientador: THIAGO SILVA DE OLIVEIRA**

**Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Dentre os muitos desafios enfrentados pela indústria do petróleo, tem-se a corrosão de suas encanações. Tal desgaste está frequentemente relacionado a presença de bactérias que se estabelecem nessas superfícies de aço, formando uma estrutura complexa chamada de biofilme que é capaz de atacar o metal. Essa perfuração dos dutos de petróleo é controlada pelo uso de compostos químicos com propriedades de detergentes (conhecidas como propriedades tensoativas) que costumam ser tóxicos e não biodegradáveis. Assim, vem ganhando força o apelo pelo uso de compostos mais biodegradáveis, menos tóxicos e com propriedades similares. Uma promissora alternativa são os biossurfactantes, moléculas com propriedades de detergentes de origem biológica. Dentre os organismos capazes de produzir esses compostos, destaca-se a bactéria *Bacillus velezensis* H2O-1, cujo biossurfactante é altamente eficiente. No entanto, a produção dessas moléculas enfrenta altos custos, especialmente devido aos meios de cultivo necessários, que empregam produtos sintéticos caros. Dessa forma, este estudo busca avaliar um meio de cultivo contendo melaço, um resíduo agroindustrial de baixo valor agregado. Os testes realizados confirmaram que *B. velezensis* H2O-1 é capaz de crescer e produzir biossurfactante em melaço. Além disso, observou-se que a quantidade do produto produzida na presença do melaço foi similar à observada no meio convencional sintético. Similarmente, ao avaliar as propriedades tensoativas do biossurfactante produzido em melaço, notou-se que elas são equiparáveis às propriedades do biossurfactante produzido em meio sintético. Quanto a aplicabilidade no biocontrole da biocorrosão, o sobrenadante produzido apresentou capacidade retardante da formação de biofilme e da corrosão em superfícies metálicas. Conclui-se que o uso de melaço na produção do biossurfactante de *B. velezensis* H2O-1 se apresenta como uma promissora estratégia para redução de custos, mantendo ambos produtividade e propriedades análogas às observadas em meio convencional. Com isso, espera-se tornar a aplicação dessas moléculas alternativas sustentáveis mais viável para o controle da corrosão na indústria do petróleo.

**Palavras chaves:** Biotecnologia; biossurfactante; surfactina; biocorrosão; melaço.

## ÍNDICE

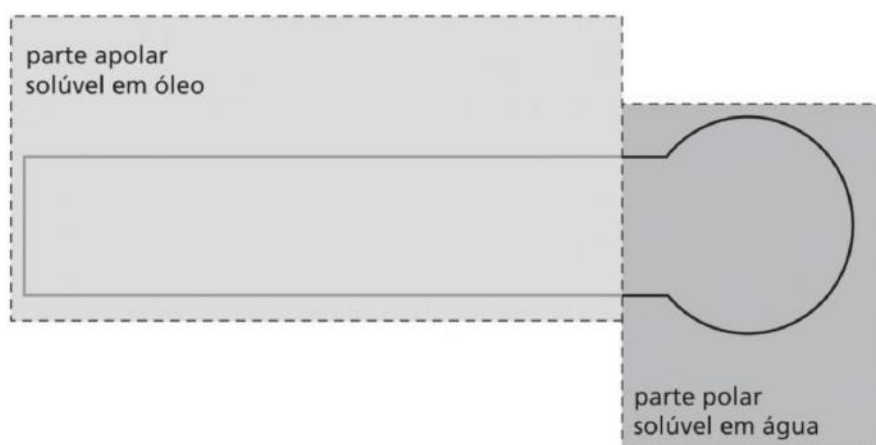
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Moléculas com propriedades tensoativas .....	1
1.2 Surfactantes em solução.....	3
1.3 Biossurfactantes .....	4
1.3.1 Lipopeptídeos .....	7
1.3.2 Aplicações industriais.....	7
1.3.3 Surfactina.....	9
1.4 Agentes tensoativos na indústria do petróleo .....	10
1.4.1 Biocorrosão na indústria do petróleo.....	11
1.4.2 Surfactina de <i>Bacillus velezensis</i> H20-1 como agente anticorrosivo .....	13
1.4.3 Viabilidade econômica da aplicação tecnológica de biossurfactantes.....	14
2. JUSTIFICATIVA .....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos gerais .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
4.1 Produção da Surfactina .....	19
4.1.1 Microrganismo.....	19
4.1.2 Meios de cultivo .....	19
4.1.3 Processo de produção da surfactina.....	19
4.1.4 Cinética de crescimento.....	20
4.2 Extração e quantificação da surfactina .....	20
4.3 Avaliação das atividades tensoativas da surfactina produzida em meio alternativo..	21
4.3.1 Índice de emulsificação .....	21
4.3.2 Estabilidade da emulsão .....	22
4.3.3 Dispersão do óleo .....	22
4.3.4 Tensão Superficial .....	23
4.3.5 Concentração Micelar Crítica.....	23
4.4 Estabilidade a longo prazo da surfactina .....	23
4.4.1 Conservação mediante congelamento .....	23
4.4.2 Conservação mediante liofilização.....	23
4.5 Potencial de aplicação da surfactina no controle da biocorrosão .....	24
4.5.1 Montagem dos biorreatores .....	24
4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	25
4.5.1 Análise da atividade antibiofilme .....	25

4.5.2	Análise da atividade anticorrosiva.....	26
5.	RESULTADOS.....	27
5.1	Cinética de crescimento.....	27
5.2	Quantificação da Surfactina.....	28
5.3	Caracterização físico-química.....	29
5.3.1	Índice de emulsificação (IE).....	29
5.3.2	Estabilidade da emulsão.....	29
5.3.3	Dispersão do óleo.....	30
5.3.4	Tensão Superficial.....	31
5.3.5	Concentração Micelar Crítica.....	31
5.4	Estabilidade a longo prazo da surfactina.....	33
5.5	Potencial de aplicação da surfactina no controle da biocorrosão.....	34
5.5.1	Análise da formação de biofilme.....	35
5.5.1	Análise da biocorrosão.....	37
6.	DISCUSSÃO.....	40
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
	ANEXOS.....	63
	Anexo 1.....	63
	Anexo 2.....	63
	Anexo 3.....	64
	Anexo 4.....	64
	Anexo 5.....	65
	Anexo 6.....	65

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Moléculas com propriedades tensoativas

Surfactante é o nome dado a uma classe de moléculas, também conhecidas como tensoativos, caracterizada por sua capacidade de reduzir a tensão superficial entre fases imiscíveis (Otzen, 2017; Shaban, Kang e Kim, 2020). Essas moléculas têm caráter anfipático, sendo estruturalmente marcadas pela presença de um grupamento polar, formado por átomos com concentração de carga (aniônico, catiônico, anfótero) ou não iônico, ligado a um grupamento apolar, geralmente uma cadeia carbônica (Figura 1) (Desai e Banat, 1997; Alam *et al.*, 2019).



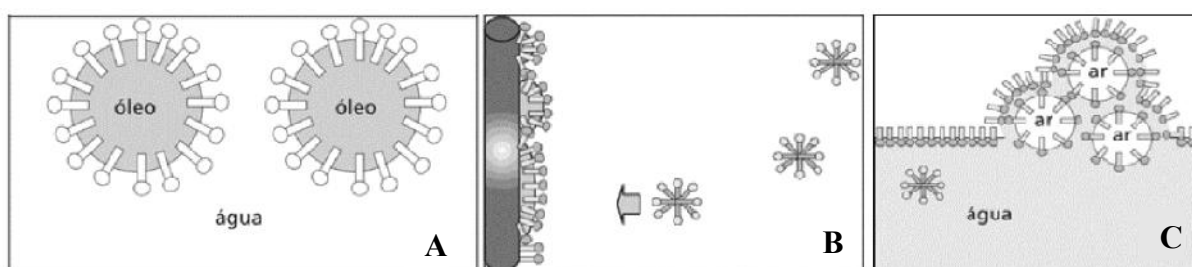
**Figura 1** - Representação esquemática de uma molécula de surfactante (Daltin, 2011).

No interior de um líquido, as moléculas do tensoativo sofrem atração umas das outras, de forma que estão submetidas às mesmas forças de atração em todas as direções, configurando uma soma vetorial resultante nula. Contudo, sabendo que as moléculas da superfície não estão rodeadas de outras moléculas do líquido em todas as direções, entende-se que a ausência de moléculas acima delas e a presença de moléculas abaixo delas gera uma força resultante de atração perpendicular à superfície, voltada para o centro do líquido. Essa força perpendicular à superfície, resultante do não balanceamento da atração das moléculas, recebe o nome de tensão superficial (Daltin, 2011; Shaban, Kang e Kim, 2020).

Além da redução da tensão superficial, os surfactantes estão associados a três outras propriedades: formação de emulsões, capacidade de detergência e formação de espuma (Figura 2). Estas propriedades se devem ao caráter anfipático dos tensoativos permite que estas moléculas se acumulem na superfície de gotículas de um líquido imiscível. Dessa forma as gotículas são estabilizadas e forma-se uma mistura desses líquidos, conhecida como emulsão (Figura 2 - A) (Salager, 1999; Zembyla, Murray e Sarkar, 2020).

O efeito de detergência é resultado do recobrimento de uma sujeira apolar sobre uma superfície por moléculas de surfactante. Com isso, esses compostos promovem a deformação da sujeira e o seu desprendimento da superfície, gerando uma mistura estável entre a água de enxague e a sujeira apolar (Figura 2 - B) (Salager, 1988; Inès *et al.*, 2023; Phaodee e Weston, 2023).

Por fim, a formação de espuma deriva da agitação de uma solução contendo tensoativo. Assim, há o acúmulo de moléculas do surfactante na superfície líquido-ar das bolhas geradas pela agitação (Figura 2 - C) (Pugh, 1996; Petkova *et al.*, 2020; Deotale *et al.*, 2023).



**Figura 2** – Esquema sobre as propriedades dos surfactantes **A.** Representação da formação de uma emulsão, com gotículas de óleo recobertas de moléculas de tensoativo em água. **B.** Representação da retirada de sujeira apolar do substrato. **C.** Representação da formação de espuma a partir da formação de bolhas de ar em solução. (Daltin, 2011, modificado).

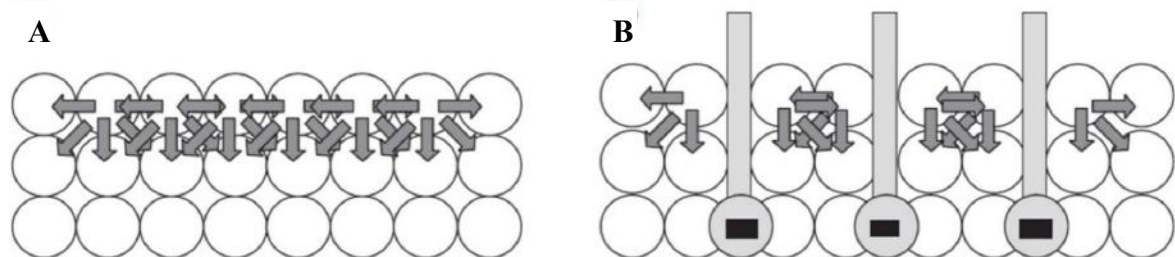
As propriedades dos tensoativos (redução da tensão interfacial e superficial, emulsionamento, detergência e formação de espuma) os tornam compostos versáteis no que diz respeito às suas aplicabilidades industriais. Assim, entende-se que uma vasta gama de processos industriais envolve o uso de surfactantes, sendo essas moléculas participantes de processos produtivos das indústrias de cosméticos, alimentícia, têxtil, petroleira, dentre outras (Shaban, Kang e Kim, 2020).

Na indústria de alimentos os surfactantes estabilizam: espumas alimentícias (mousses, sorvetes e cremes), sistemas de gorduras com água (leite, chocolates e margarinas) e emulsões de alimentos industrializados polifásicos (maionese) (Ribeiro, Guerra e Sarubbo, 2020). Na indústria têxtil os tensoativos são aplicados em diferentes etapas da produção, seja por sua capacidade de detergência durante os diversos processos de lavagem, ou por sua ação emulsificante, durante processos de lubrificação ou acabamento das fibras têxteis (Daltin, 2011; Yadav *et al.*, 2023). Na indústria de cosméticos os surfactantes são parte da formulação do produto final ou participantes do processo produtivo, agindo como emulsificantes de outros compostos das formulações ou promovendo detergência (Schramm, Stasiuk e Marangoni, 2003; Venkataramani, Tsulaia e Amin, 2020).

## 1.2 Surfactantes em solução

Em líquidos polares, como a água, o grupamento polar (ou hidrofílico) de uma molécula de surfactante contribui para a solubilização, ao passo que o grupamento apolar (ou hidrofóbico) reduz a solubilidade. Sendo assim, moléculas de tensoativo nunca apresentam total estabilidade quando dissolvidos. Em busca de maior estabilidade, esses compostos anfipáticos se acumulam na superfície líquido-ar, de forma que a porção hidrofílica fica em contato com o líquido polar e a porção hidrofóbica em contato com o ar. Quando a área da superfície líquido-ar é completamente preenchida por moléculas de surfactante, moléculas excedentes migram para as superfícies líquido-sólido. Dessa forma, a porção hidrofóbica é posicionada diretamente em contato com as paredes do recipiente que contém o líquido. Uma vez que as superfícies líquido-sólido estão completamente ocupadas, as moléculas de surfactante restantes ficam livres em solução; ou, em uma dada uma concentração, organizam-se em estruturas tridimensionais, conhecidas como micelas, que lhes conferem maior estabilidade. Em uma micela, as porções polares das moléculas de tensoativo estão expostas ao líquido polar, enquanto as porções apolares estão em contato umas com as outras, devido à afinidade entre si (Salager e Fernández, 1993; Holmberg *et al.*, 2002; Ghosh, Ray e Pramanik, 2020).

Os surfactantes reduzem a tensão superficial e interfacial ao acumularem-se na superfície líquido-ar ou líquido-líquido, respectivamente. Desta forma, esses agentes tensoativos promovem uma separação parcial entre as moléculas do líquido, que exercem forças de atração entre si (Figura 3 - A). A separação dessas moléculas resulta em uma diminuição das forças de atração entre elas, o que, por sua vez, reduz a força resultante do não balanceamento dessa atração, reduzindo a tensão superficial e interfacial (Figura 3 - B) (Daltin, 2011; Shaban, Kang e Kim, 2020).



**Figura 3** - Esquema sobre as forças de atração em uma interação intermolecular. **A.** Representação das forças de atração entre as moléculas de um líquido na superfície. **B.** Representação da redução dessas forças mediante a separação das moléculas da superfície por moléculas de surfactante. (Daltin, 2011).

Dentre os principais fatores limitantes da capacidade redutora da tensão superficial de um surfactante, destacam-se o atingimento do limite máximo de moléculas que podem ocupar a superfície líquido-ar da solução. Essa barreira de concentração corresponde à quantidade de

tensoativo em solução a partir da qual começa a formação de micelas, e é conhecida como concentração micelar crítica (CMC) (Barbosa *et al.*, 2022). Em outras palavras, a tensão superficial do líquido diminui à medida que aumenta a concentração de tensoativo, até atingir a CMC. Além desse ponto, a adição de mais moléculas de surfactante resulta na formação de micelas, ao invés de um aumento na quantidade de surfactante nas superfícies da solução (Mulligan, 2005; La Mesa e Risuleo, 2021).

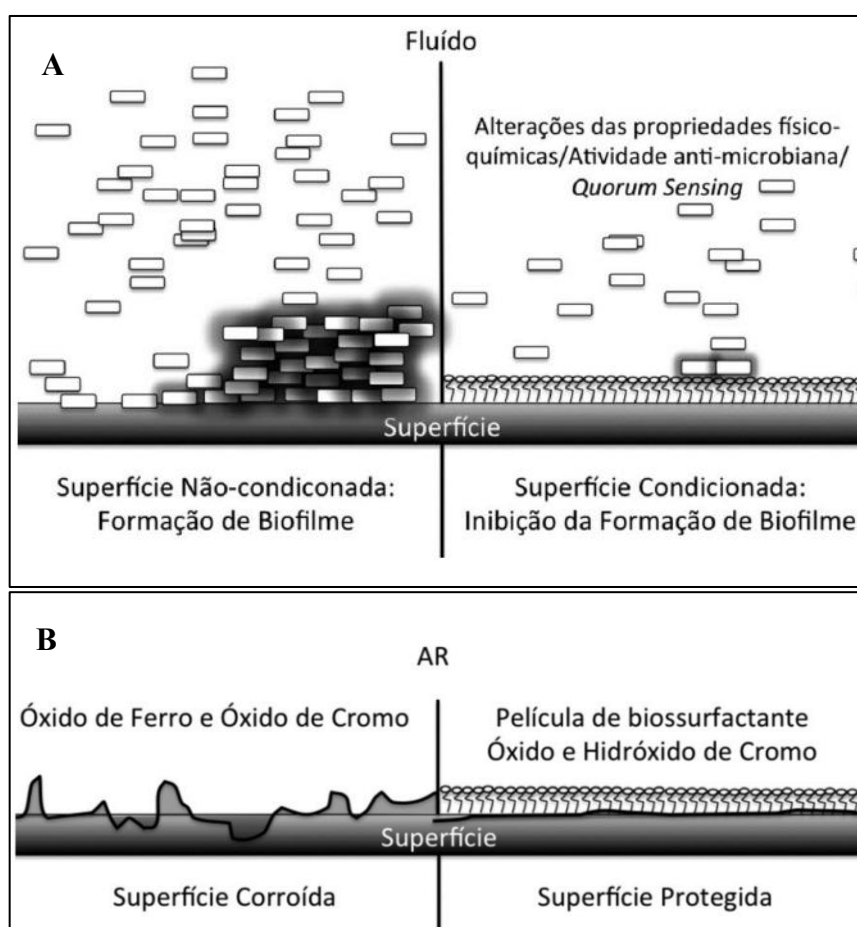
### 1.3 Biossurfactantes

Biossurfactantes são moléculas de origem biológica com propriedades tensoativas, alguns dos quais são produzidos por microrganismos, geralmente sintetizados como uma mistura complexa de homólogos (Karlupudi *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2019). Nessas substâncias, a porção hidrofóbica é formada por um ou mais ácidos graxos, sejam eles saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados. Por outro lado, a porção hidrofílica pode apresentar natureza anfotérica, neutra, carregada positivamente ou negativamente. Esse grupamento polar pode ser formado por grupos como éster, hidroxila, fosfato, carboxilato, carboidrato, dentre outros (Silva *et al.*, 2014; Jahan *et al.*, 2020).

Biossurfactantes podem ser divididos em diferentes classes, as quais se distinguem de acordo com o grupamento hidrofílico da molécula, são elas: glicolípídeos, lipopeptídeos, fosfolípídeos, ácidos graxos, surfactantes particulados e surfactantes poliméricos (Otzen, 2017; Atta *et al.*, 2021). Adicionalmente, há uma classificação de acordo com a massa molecular do biossurfactante em compostos de baixa massa molecular e compostos de alta massa molecular (Pessoa *et al.*, 2019). Os biossurfactantes de baixa massa molecular mais conhecidos e estudados são os glicolípídeos, cuja porção solúvel em água são carboidratos, e os lipopeptídeos, com porção hidrofílica de caráter peptídico (Guimarães, 2019).

O equilíbrio único entre as partes hidrofílica e hidrofóbica resultante da biossíntese dessas moléculas lhes conferem propriedades específicas, que vão além das capacidades dos tensoativos sintéticos já mencionadas (redução da tensão superficial, emulsão, detergência e formação de espuma) (Jahan *et al.*, 2020). Dentre as propriedades únicas dos biossurfactantes, podemos destacar a menor toxicidade, maior biodegradabilidade e maior estabilidade sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade. Adicionalmente, as funções fisiológicas dos biossurfactantes já descritas incluem atividade antimicrobiana, adesão celular, motilidade, interação com biofilme, ação antiadesiva e capacidade anticorrosiva (Couto *et al.*, 2016; Jahan *et al.*, 2020; Badmus *et al.*, 2021).

A capacidade dos biossurfactantes de inibir a formação de biofilme, ou seja, a sua capacidade antiadesiva, é resultado da mudança de hidrofobicidade de uma dada superfície quando condicionada por um biossurfactante. Esse processo leva a uma diminuição das interações eletrostáticas entre a superfície celular e a superfície condicionada (Figura 4 - A) (Araujo *et al.*, 2016). A atividade anticorrosiva, também se dá através do condicionamento da superfície a ser protegida. Nesse caso ocorre a formação de um filme protetor que age como barreira inibitória contra os íons  $H^+$  e  $O_2$ , evitando assim a corrosão (Figura 4 - B) (Araujo, Freire e Nitschke, 2013; Płaza e Achal, 2020).



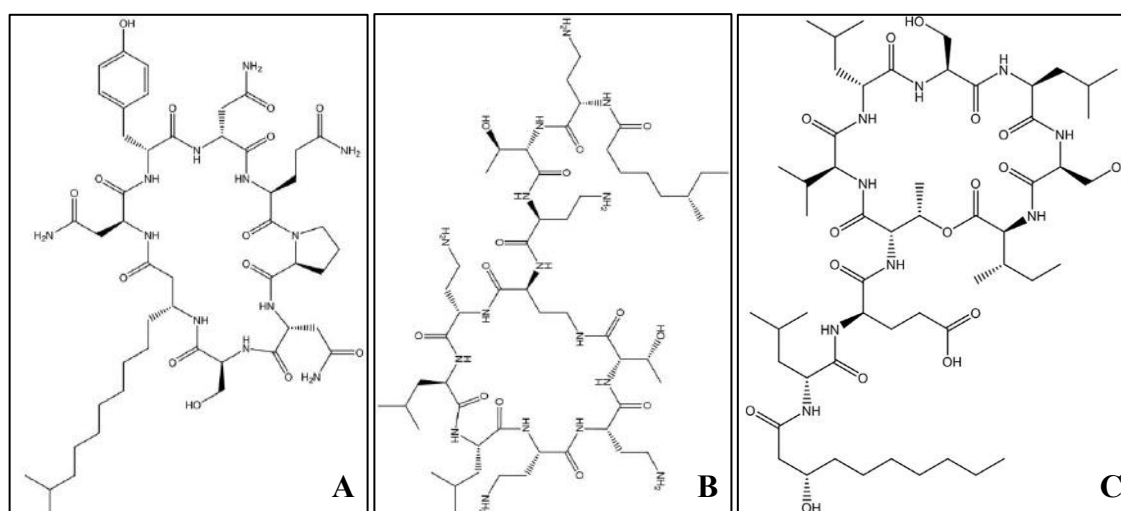
**Figura 4** - Esquema sobre as atividades antibiofilme e anticorrosiva. **A.** Representação do efeito inibitório da formação de biofilmes. **B.** Representação do efeito inibitório da corrosão, mediante o condicionamento da superfície (Araujo, Freire e Nitschke, 2013, modificado).

A ação antimicrobiana dos biossurfactantes é uma das suas propriedades mais bem descritas, tratando-se de uma das principais funções fisiológicas desses compostos. Nesse contexto, o grupo da surfactina, pertencente a classe dos lipopeptídeos, é o surfactante mais estudado. A surfactina age como um desestabilizador de membranas, devido a sua estrutura cíclica. Esse lipopeptídeo é capaz de penetrar a membrana através de interações hidrofóbicas,

levando assim a perturbações na estrutura da bicamada lipídica (Jacques, 2011; Płaza e Achal, 2020).

Comparativamente, em contextos industriais, essas moléculas biológicas são potenciais substitutos das suas contrapartes químicas. Esses tensoativos de origem biológica podem ser aplicados em diferentes ramos, tais como o ambiental, cosmético, alimentício, da agricultura, farmacêutico, biomédico e do petróleo. Biossurfactantes podem ser usados diretamente em processos de lubrificação, umectação, fixação de corantes, emulsificação, produção de dispersões estabilizantes, espumante, antiespumante, aditivação de alimentos e biorremediação (Barbosa *et al.*, 2022).

Diversos microrganismos são capazes de sintetizar biossurfactantes, e o tensoativo produzido tende a ser espécie específico. Biossurfactantes da classe dos glicolipídeos, podem ser produzidos, dentre outros microrganismos, pelas espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Starmerella bombicola* e *Rhodococcus* sp., as quais sintetizam os grupos ramnolipídeos, soforolipídeos e trealolipídeos, respectivamente (Farias *et al.*, 2021). Comparativamente, os biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos são amplamente produzidos por espécies de *Bacillus* (Ndlovu *et al.*, 2017). De acordo com Geissler e colaboradores (2019), estes tensoativos podem ainda ser classificados de acordo com sua origem, sejam produzidos por *Bacillus* spp. ou por *non-Bacillus*. Dentre os lipopeptídeos de *Bacillus* spp., tem-se a iturina sintetizada por *Bacillus subtilis* (Figura 5 - A), enquanto que representantes de lipopeptídeos *non-Bacillus* incluem a polimixina E de *Paenibacillus polymyxa* (Figura 5 - B) e a viscosina sintetizada por *Pseudomonas fluorescens* (Figura 5 - C) (Geissler *et al.*, 2019).



**Figura 5** - Esquema das estruturas químicas de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* spp. ou por *non-Bacillus*. **A.** Iturina de *B. subtilis*. **B.** Polimixina E de *P. polymyxa*. **C.** Viscosina de *P. fluorescens* (Geissler *et al.*, 2019).

### 1.3.1 Lipopeptídeos

A classe dos lipopeptídeos abriga alguns dos biossurfactantes mais eficientes, sendo aqueles produzidos por espécies de *Bacillus* os mais estudados e caracterizados (Slivinski *et al.*, 2012). Estruturalmente, esses tensoativos são compostos por uma porção peptídica e outra porção de ácidos graxos. Em geral, a parte peptídica é proveniente de biossíntese não ribossomal, além de ser cíclica e composta por sete (para a surfactina e a iturina) ou dez (para a fengicina) aminoácidos. Por sua vez, as porções lipídicas de ácidos graxos podem apresentar variações de comprimento, as quais diferem entre as classes de biossurfactantes. A surfactina pode possuir uma cadeia que varia de C12 a C16, enquanto para a iturina a variação é de C14 a C17, já a fengicina varia de C14 a C18 (Jacques, 2011; Yang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2020; Sharma, Sundar e Srivastava, 2021).

Cada um desses biossurfactantes possui diferentes homólogos que variam quanto a composição de aminoácidos da porção peptídica e quanto ao comprimento da cadeia carbônica da porção lipídica (Jacques, 2011). A proporção de cada homólogo de um dado biossurfactante varia de acordo com o microrganismo produtor e, por se tratar de metabólitos secundários, com as condições de cultivo às quais o organismo é submetido (Jacques, 2011; Jahan *et al.*, 2020).

O biossurfactante da classe dos lipopeptídeos mais bem caracterizado é a surfactina, originalmente identificada a partir de uma cultura de *B. subtilis*. Esse tensoativo se destaca devido à sua capacidade de reduzir significativamente a tensão superficial da água em pequenas concentrações, o que inspirou o nome que recebeu: “surfactina” (Bartal *et al.*, 2018).

### 1.3.2 Aplicações industriais

As propriedades físico-químicas dos lipopeptídeos os tornam produtos de interesse para numerosos setores industriais, incluindo as indústrias de cosméticos, a agrícola, a farmacêutica, a alimentícia e a petroquímica. Dentre os principais fatores que contribuem para as suas aplicabilidades nessas diversas áreas, destacam-se a capacidade promotora do crescimento de plantas, atividade antimicrobiana, elevada capacidade redutora da tensão superficial mesmo a baixas concentrações (Geissler *et al.*, 2019).

Nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos, os lipopeptídeos chamam atenção por serem capazes de formar nano-emulsões. Tratam-se de emulsões com tamanho de gota na escala nanométrica, que permitem a incorporação de moléculas pouco solúveis e instáveis, mas com propriedades benéficas à saúde, como vitaminas (Kale e Deore, 2017; Geissler *et al.*, 2019). Nesse contexto, a iturina se destaca pela sua capacidade de resistência à floculação. Já a fengicina foi o lipopeptídeo mais estável contra a quebra das emulsões. Por fim,

a surfactina foi relatada como a mais eficaz em relação ao tempo necessário para atingir o equilíbrio na interface óleo/água e à tensão interfacial final (Deleu *et al.*, 1999).

Além disso, foi observado que as nano-emulsões de surfactina chamam atenção por apresentarem propriedades antimicrobianas não encontradas em surfactantes químicos. Joe e colaboradores (2012) utilizando a surfactina, estabilizaram uma nano-emulsão à base de óleo de girassol e observaram alta atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Na indústria alimentícia, lipopeptídeos podem ser aplicados no controle de populações patogênicas durante o processamento de alimentos e da formação de biofilme desses patógenos em equipamentos da indústria. Araujo e colaboradores (2016) observaram que, mediante adsorção, a surfactina produzida por *B. subtilis* ATCC 21332 reduziu a adesão e a formação de biofilme de *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*. Outro estudo, envolvendo lipopeptídeos de *Bacillus* spp., atestou que a presença desses biossurfactantes durante o processo de vinificação reduziu a população de *Aspergillus carbonarius* e, conseqüentemente, a concentração da sua micotoxina cancerígena: ocratoxina A (Jiang *et al.*, 2017).

No ramo da agricultura, microrganismos produtores de biossurfactantes podem ser utilizados na composição de bioinoculantes. As bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, e os distintos integrantes da família dos lipopeptídeos produzidos por esses procaríotos contribuem de diferentes formas para a sua interação com plantas. Esses biossurfactantes estão associados a diversos fatores como (i) promoção da formação e espalhamento do biofilme rizosférico, (ii) processos de sinalização de estresse biótico, (iii) propriedades antibacterianas e antifúngicas, dentre outros (Geissler *et al.*, 2019).

Dimkić e colaboradores (2017) avaliaram a capacidade antimicrobiana de diferentes lipopeptídeos contra *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* e *L. monocytogenes*. Dentre os biossurfactantes avaliados, a iturina foi determinada como antimicrobiano mais eficaz, embora tenha sido observada uma dependência das proporções de homólogos produzidos com a bioatividade inibitória descrita. Quanto a surfactina, outro estudo demonstrou que este lipopeptídeo estimula as vias de sinalização dependentes do ácido salicílico e do ácido jasmônico, importantes para as defesas das plantas contra estresses bióticos (Le Mire *et al.*, 2018).

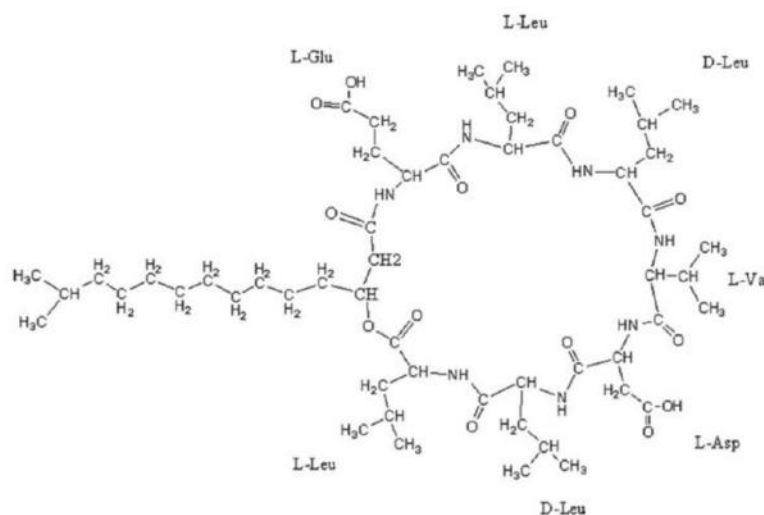
Adicionalmente, lipopeptídeos se destacam por apresentarem CMCs mais baixas, de forma que quantidades menores deles são necessárias em comparação com os demais

biossurfactantes e com os tensoativos derivados de petroquímicos. Essa propriedade torna os lipopeptídeos especialmente atrativos para aplicações que requerem menor pureza do produto, tais como biorremediação ou recuperação aprimorada de petróleo (Geissler *et al.*, 2019).

### 1.3.3 Surfactina

Atualmente, a surfactina é considerada um dos biossurfactantes mais potentes, sendo capaz de levar a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m (Chen, Juang e Wei, 2015; Schmidt *et al.*, 2023). Trata-se de um lipopeptídeo aniônico estável em uma faixa de pH entre 7 e 9, resistente a altas temperaturas e que mantém suas atividades biocidas e antibiofilme quando exposto à fervura (100°C) e à autoclavagem (121°C) (Guimarães, 2019; Singh e Sharma, 2020).

Estruturalmente, a porção lipídica da surfactina é composta por uma cadeia de ácido graxo, que pode variar de 12 a 16 átomos de carbono (Yang *et al.*, 2015; Schmidt *et al.*, 2023). Já a porção peptídica é um heptapeptídeo, havendo quatro homólogos que variam quanto a composição de aminoácidos do anel peptídico. O principal homólogo de surfactina apresenta a seguinte sequência de resíduos de aminoácidos: L-Glu1-L-Leu2-D-Leu3-L-Val4-L-Asp5-D-Leu6-L-Leu7 (Figura 6) (Qi *et al.*, 2023).



**Figura 6** - Representação estrutural da surfactina (Barros *et al.*, 2007).

Diferentes microrganismos são capazes de sintetizar a surfactina, tais como: *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. tequilensis* e *B. vallismortis* (Kisil *et al.*, 2023). Dentre as espécies produtoras, *Bacillus velezensis* vem ganhando destaque na comunidade científica por sua capacidade de sintetizar uma variedade de metabólitos secundários com aplicabilidades em numerosas áreas, como a agropecuária e biorremediação (Ye *et al.*, 2018).

A espécie *B. velezensis* foi primeiramente descrita por Ruiz-Garcia e colaboradores (2005) em um projeto de seleção de novos microrganismos produtores de lipopeptídeos de isolados ambientais. Análises genéticas subsequentes identificaram grupos de genes em diferentes cepas relacionados à biossíntese de metabólitos secundários associados a supressão de patógenos, a indução de resistência sistêmica e a promoção do crescimento das plantas (Rabbee *et al.*, 2019). Outro estudo, trabalhando com a cepa *B. velezensis* AB, observou que a bactéria, ao sintetizar uma enzima azoredutase, foi capaz de degradar o corante Direct Red 28 (DR28), pertencente à família de corantes azo, conhecidamente tóxicos e cancerígenos (Adeniji, Loots e Babalola, 2019).

Além disso, cepas de *B. velezensis* se destacam pela produção de surfactina com alta capacidade redutora da tensão superficial. Liu e colaboradores (2010) isolaram a cepa *B. velezensis* H3 de amostras de lodo marinho e atestaram sua capacidade de reduzir a tensão superficial da solução salina tamponada com fosfato (PBS) de 71,8 mN/m para 24,8 mN/m. Simultaneamente, a cepa *B. velezensis* H2O-1 distingue-se por produzir uma surfactina com a mesma sequência de resíduos de aminoácidos da surfactina produzida por *B. subtilis*. Além disso, a surfactina produzida apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias redutoras de sulfato (BRS) (Korenblum *et al.*, 2012).

*Bacillus velezensis* H2O-1 foi originalmente identificada e isolada de poços de petróleo do reservatório de Marlim, no Brasil, por Korenblum e colaboradores (2005; 2012) como *Bacillus* sp. H2O-1. Posteriormente, *Bacillus* sp. H2O-1 foi identificado como *B. velezensis* H2O-1 por Guimarães e colaboradores (2019). Estes pesquisadores também avaliaram as propriedades da surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 e observaram que o tensoativo apresenta excelente capacidade emulsificante e estabilidade frente a variações de temperatura, pH e força iônica. Adicionalmente, Guimarães e colaboradores (2019) atestaram que o biossurfactante dessa cepa mantém as suas atividades superficiais em condições extremas de temperatura, pressão e salinidade encontradas nas camadas pós-sal e pré-sal.

#### **1.4 Agentes tensoativos na indústria do petróleo**

A indústria do petróleo destaca-se dentre as indústrias que, de forma amplamente diversa, mais aplicam os tensoativos em seus processos. Dentre os principais surfactantes sintéticos empregados nessa área pode-se ressaltar: dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB), cloreto de dodeciltrimetilamônio (DTAC) e tergitol 1-S-12 (Tg12). Esses compostos são utilizados, nesse contexto, na formulação utilizada para o processo de perfuração de poços (que gera o

subproduto chamado lama de perfuração) e de óleos lubrificantes, na remediação e dispersão de derramamentos de óleo, na redução e mobilização de resíduos de óleos em tanques de estocagem e na recuperação melhorada do petróleo (*Enhanced Oil Recovery* - EOR) (Daltin, 2011; Almeida *et al.*, 2016; Massarweh e Abushaikha, 2020).

No que diz respeito aos biossurfactantes, a indústria petrolífera representa o maior mercado para a sua aplicação tecnológica. Eles podem ser utilizados em diversas etapas da cadeia produtiva, como na extração e transporte do petróleo, na limpeza de tanques de armazenamento, no tratamento de resíduos de óleo e na recuperação melhorada de petróleo por microrganismos (*Microbial Enhanced Oil Recovery* - MEOR) (Almeida *et al.*, 2016; Jahan *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2022). Dentre os principais fatores que contribuem para o amplo uso desses compostos na indústria do petróleo destaca-se a viabilidade de aplicação na forma “bruta”. Esse fator elimina a necessidade de etapas de purificação do produto, as quais estão associadas a aproximadamente 60% dos custos de produção desses tensoativos (Sarubbo, Lunaa e Rufinoa, 2015; Guimarães, 2019).

#### **1.4.1 Biocorrosão na indústria do petróleo**

Diferentes técnicas podem ser aplicadas para a recuperação do petróleo, sendo a injeção de água pressurizada a técnica mais utilizada na etapa de recuperação secundária de petróleo. Essa metodologia promove o desalojamento do óleo residual retido na rocha reservatório até o poço produtor (Firozjaini e Saghafi, 2020; McLaughlin *et al.*, 2020). No reservatório, a água de injeção se mistura com a água residual do próprio poço (água de formação), onde a junção resultante recebe o nome de água de produção (Olajire, 2020).

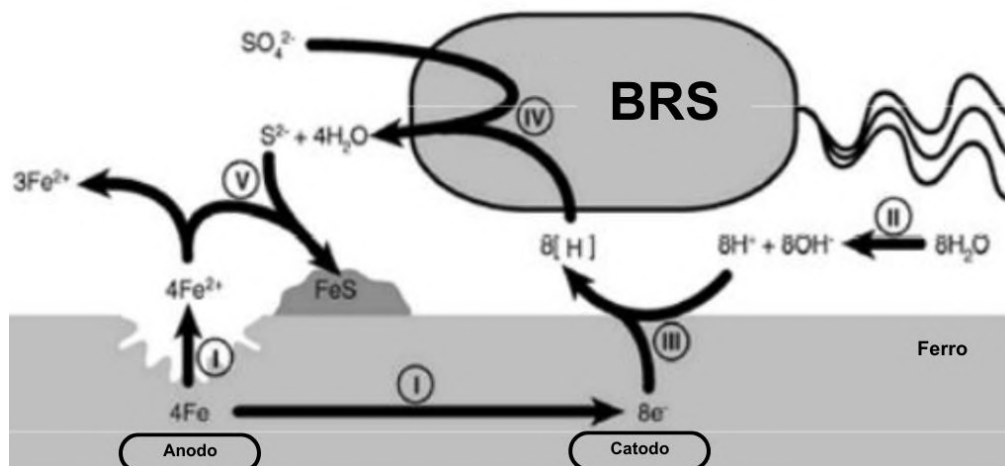
A presença de diferentes microrganismos, especialmente as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS), na água de produção pode levar a formação indesejada de biofilme (Płaza e Achal, 2020; Khan, Hussain e Djavanroodi, 2021). Biofilmes são colônias microbianas, com camadas de microrganismos de uma ou mais espécies, envoltas por matriz polimérica extracelular. Essa matriz é principalmente composta por exopolissacarídeos (EPS) que estão aderidos a uma superfície (Procópio, 2022; Sauer *et al.*, 2022; Flemming *et al.*, 2023). O crescimento microbiano sobre a superfície depende do desenvolvimento de um comportamento multicelular, o qual é resultante de mecanismos de comunicação entre os microrganismos, dentre os quais se destaca o chamado *Quorum sensing* (Zhou *et al.*, 2020).

Evolutivamente, a formação de biofilme está associada a vantagens como maior proteção em ambientes hostis e contrafatores ambientais, bem como o aumento na aquisição de nutrientes (Sauer *et al.*, 2022). Entretanto, na indústria do petróleo a formação de biofilme sobre

superfícies metálicas de tubulações e tanques de armazenamento costuma estar associada a incidência do fenômeno chamado corrosão induzida por microrganismos (CIM) ou biocorrosão (Procópio, 2022).

Define-se como corrosão o processo de deterioração de um material por ação química ou eletroquímica, podendo ou não estar associada a ação mecânica (Kadhim *et al.*, 2021). Quando a corrosão é provocada ou acelerada pela presença de microrganismos ou seus produtos é denominada biocorrosão, processo que representa cerca de 40% de toda a corrosão interna de dutos na indústria do petróleo (Gentil, 2011; Muthukumar, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Guimarães, 2019). A formação de biofilmes contribui para esse processo ao permitir a fixação dos microrganismos na superfície metálica. Além disso, a formação de biofilme permite o estabelecimento de um gradiente de concentração de diferentes espécies químicas, bem como a alteração das condições eletroquímicas dentro da matriz do biofilme (Khan, Hussain e Djavanroodi, 2021).

No contexto da indústria do petróleo, as BRS se destacam por sua notória participação na biocorrosão de tanques de armazenamento, encanações e maquinário de bombeamento (Khan, Hussain e Djavanroodi, 2021). Essas bactérias contribuem para a CIM, principalmente, ao utilizarem  $\text{SO}_4^{2-}$  como acceptor terminal de elétrons. Nesse processo há a geração do  $\text{H}_2\text{S}$ , o qual reage com a superfície metálica, formando assim  $\text{FeS}$  a partir da oxidação do ferro à  $\text{Fe}^{2+}$  (Figura 7) (Tran *et al.*, 2021; Procópio, 2022).



**Figura 7** - Representação do processo de CIM por BRS (Khan, Hussain e Djavanroodi, 2021, modificado).

As BRS estão associadas à corrosão puntiforme localizada, conhecida como “*pitting corrosion*”. Essa corrosão é marcada pela deposição de sulfetos de ferro de cor negra característica, que preenchem os buracos, defeitos e depressões resultantes da corrosão (Tsarovtceva *et al.*, 2023). Vale ressaltar que diversos fatores interferem na taxa de corrosão,

tais como as espécies microbianas envolvidas, fonte de carbono, tipo de metal, a biomassa total aderida à superfície metálica e o estado metabólico das células (Guimarães, 2019).

Em 2013, o custo global de fenômenos corrosivos indesejados foi estimado em torno de 2,5 trilhões de dólares, equivalente a 3,4% do PIB mundial da época (NACE International, 2016). Na indústria petroquímica, a corrosão, está associada a perda de produto, paradas do processo produtivo (*shutdowns*) e vazamentos. Vazamentos, por sua vez, causam perda de óleo e permitem infiltração de água e lodo, o que aumenta os danos na superfície metálica. Dessa forma, vazamentos decorrentes de processos corrosivos nessa indústria se configuram como um risco ambiental e à saúde humana (Prabha *et al.*, 2014; Groysman, 2017; Al-Moubaraki e Obot, 2021). Durante o processo produtivo (*upstream*), a corrosão está associada a um custo anual de 1,4 bilhões de dólares para a indústria do petróleo (Chilingar, Mourhatch e Al-Qahtani, 2013).

#### **1.4.2 Surfactina de *Bacillus velezensis* H20-1 como agente anticorrosivo**

Para o controle da biocorrosão, a indústria petroleira utiliza biocidas químicos e surfactantes sintéticos. A aplicação dessas substâncias visa a inibição da adesão e das atividades metabólicas dos microrganismos associados à corrosão, e, conseqüentemente, do crescimento dessas espécies (El-Monem *et al.*, 2020). Entretanto, o emprego de biocidas está associado a impactos tóxicos ao meio ambiente, podendo até mesmo levar a formação de mecanismos de resistência (Jurelevicius *et al.*, 2008). Simultaneamente, os surfactantes químicos são, em sua maioria, não biodegradáveis e tóxicos para diferentes microrganismos, plantas e sistemas aquáticos (Rebello *et al.*, 2014; Fernandes, Simões e Dias, 2023).

Na última década foram implementadas mudanças regulamentares referentes às questões ambientais. Paralelamente, o apelo pela utilização de tecnologias da química verde vem ganhando espaço no mercado consumidor. Esses fatores, em conjunto, aumentaram a busca da indústria petroquímica por alternativas menos nocivas do ponto de vista ambiental, dentre as quais incluem-se alternativas aos surfactantes sintéticos e biocidas químicos (Ingham *et al.*, 2023). Nesse contexto, muitos trabalhos vêm sendo realizados, especialmente por indústrias europeias e estadunidenses, em busca de novas opções menos tóxicas e de maior eficácia para o controle da proliferação de microrganismos causadores da biocorrosão (El-Monem *et al.*, 2020; Verma *et al.*, 2023a).

Uma alternativa promissora aos surfactantes sintéticos e biocidas químicos que vem atraindo a atenção da indústria petroquímica são os biosurfactantes (Ingham *et al.*, 2023). Tais compostos são especialmente atraentes devido a sua menor toxicidade, maior

biodegradabilidade e maior estabilidade perante condições extremas de temperatura, pH e salinidade (Verma *et al.*, 2023a).

Achados anteriores de Korenblum *et al.*, (2012), atestam que a surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 possui atividade antimicrobiana contra a cepa *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491, considerada uma BRS. Assim, levando em consideração o impacto de BRS na ocorrência de biocorrosão na indústria do petróleo, a surfactina de *B. velezensis* H2O-1 tem grande potencial de aplicação como agente inibidor dos microrganismos causadores da biocorrosão presentes em água de produção.

Guimarães (2019) avaliou a formação de biofilme e a consequente biocorrosão em cupons de aço carbono condicionados com surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 e então expostos a água de produção em um biorreator. No estudo, os cupons não condicionados apresentaram estruturas compatíveis com as de um biofilme maduro e áreas de corrosão. Comparativamente, nos cupons condicionados com surfactina foram observadas apenas algumas células aderidas e sujidades sobre a superfície. Vale ressaltar que as áreas de corrosão observadas nos cupons condicionados foram significativamente menores do que as áreas de corrosão dos cupons não condicionados.

### **1.4.3 Viabilidade econômica da aplicação tecnológica de biossurfactantes**

O mercado global de biossurfactantes é impulsionado pela crescente conscientização dos consumidores sobre alternativas de produtos ecologicamente corretos e sustentáveis, e pelo aumento da demanda das indústrias de uso final. Assim, espera-se que até 2029 este mercado atinja um valor de 5,99 bilhões de dólares (US\$), em relação aos US\$ 3,73 bilhões registrados em 2020 (Exactitude Consultancy, 2023).

Contudo, os altos custos de fabricação de biossurfactantes são um dos principais fatores que limitam o crescimento do mercado. No caso da indústria do petróleo, a não necessidade de etapas de purificação do produto, responsáveis por cerca de 60% das despesas de produção, amenizam essa limitação (Sarubbo, Lunaa e Rufinoa, 2015; Guimarães, 2019). Mesmo assim, estratégias para a redução dos custos de produção vêm sendo desenvolvidas e avaliadas. Dentre elas tem-se a otimização das condições de cultivo (agitação, temperatura e tempo de fermentação e formulação dos meios de cultivo) ou técnicas de bioengenharia que visam aumentar a síntese de biossurfactante ou alterar os substratos demandados para tanto (Banat *et al.*, 2014; Sundaram *et al.*, 2024).

Nos casos em que etapas de purificação do produto são dispensáveis, a composição de meios de cultivo para o crescimento dos microrganismos produtores desses tensoativos é

responsável por até 50% dos investimentos totais de produção (Almeida *et al.*, 2016; Nazareth *et al.*, 2021). Com isso, visando reduzir essas despesas, a aplicação de resíduos agroindustriais, incluindo farelos, melaço de beterraba e de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo, mandioca, farinha de mandioca, palha de arroz, casca de soja, dentre outros, vem sendo estudada (Banat *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2021; Nazareth *et al.*, 2021; Gaur *et al.*, 2022).

O melaço de cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos do refinamento do açúcar, onde cerca de 0,38 toneladas de melaço são geradas para cada tonelada de açúcar bruto fabricada (Chauhan *et al.*, 2011; Zhang, Wang e Jiang, 2021). Sendo assim, 55 milhões de toneladas de melaço são produzidas por ano globalmente (Núñez-Caraballo *et al.*, 2019). Esse resíduo se caracteriza como um xarope concentrado de alto teor de açúcares, contendo principalmente sacarose (45% m/v), glicose (5% m/v) e frutose (5% m/v) (Li *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2017). Além disso, esse subproduto é composto também por metais pesados, compostos nitrogenados, outros carboidratos, aminoácidos, proteínas e vitaminas (Zhuang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017).

Quando comparado a glicose e outras fontes de carbono, o melaço é uma promissora matéria prima de baixo custo para o crescimento microbiano, bem como para a síntese de bioprodutos como etanol, ácidos orgânicos, enzimas e biossurfactantes (Fadel *et al.*, 2013; Banat *et al.*, 2014; Rocky-Salimi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Sundaram *et al.*, 2024). Tal aplicação desse subproduto agroindustrial evita o seu simples descarte ou uso na produção de ração de baixo valor, contribuindo para a redução da poluição ambiental e do desperdício de recursos, bem como a geração de produtos biológicos de interesse industrial (Zhang, Wang e Jiang, 2021). Contudo, metais pesados, pigmentos e outros materiais em suspensão no melaço podem ter efeitos adversos no crescimento microbiano e no acúmulo de alguns bioprodutos, demandando processos de clarificação ou pré-tratamento nesses casos (Zhang, Wang e Jiang, 2021).

Apesar disso, diferentes estudos vêm observando resultados positivos aplicando melaço para a biossíntese de biossurfactantes, mesmo sem etapas prévias de clarificação ou pré-tratamento. Rokni e colaboradores (2022) produziram ramnolipídeos provenientes da cepa *Pseudomonas putida* KT2440 e observaram que o maior rendimento (5,4 g/L) foi obtido em meio contendo melaço, quando comparado à meios contendo glicose, azeite ou glicerol como fontes de carbono. Em outro trabalho, altas concentrações de surfactina (12,34 g/L) foram

observadas no cultivo da cepa *Bacillus subtilis* RSL-2, utilizando melão de cana-de-açúcar como única fonte de nutrientes (Verma *et al.*, 2020).

Na indústria petroquímica, o uso de biossurfactantes produzidos em meio contendo melão como agentes de biocontrole da CIM dispensa processos adicionais de purificação do tensoativo e de clarificação ou pré-tratamento do melão. Dessa forma, a formulação de um meio de cultivo contendo melão se configura como uma promissora estratégia para a redução dos custos de produção de surfactina por *B. velezensis* H2O-1 visando a sua aplicação na indústria petroquímica como agente inibidor da biocorrosão por BRS.

## 2. JUSTIFICATIVA

A crescente demanda por soluções industriais ambientalmente sustentáveis destaca a importância de substituir substâncias tóxicas e não biodegradáveis por alternativas ecológicas (El-Monem *et al.*, 2020; Ingham *et al.*, 2023;). No contexto da indústria do petróleo, os desafios relacionados à biocorrosão de dutos e tanques têm tradicionalmente sido abordados com o uso de biocidas químicos e surfactantes sintéticos. No entanto, esses compostos apresentam alta toxicidade e impactos ambientais significativos, além de custos crescentes devido a regulamentações mais rígidas (Muthukumar, 2014; Guimarães, 2019; Verma *et al.*, 2023a).

Nesse contexto, os biossurfactantes, em especial a surfactina, têm ganhado destaque, e surgem como uma alternativa promissora devido a sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e estabilidade perante faixas de temperatura, salinidade e pressão característicos de reservatórios de petróleo (Guimarães, 2019; Jahan *et al.*, 2020; Badmus *et al.*, 2021). A cepa *Bacillus velezensis* H2O-1, isolada de poços de petróleo do reservatório de Marlim, no Brasil, é um promissor microrganismo para a produção em larga escala de surfactina (Korenblum *et al.*, 2005, 2012). Isso se deve a sua comprovada capacidade antimicrobiana, potencial anticorrosivo e alta eficiência mesmo em baixas concentrações (Guimarães, 2019).

Apesar de seu potencial, o uso desses biossurfactantes ainda não foi implementado em larga escala, o que se deve, em parte aos elevados custos do meio de cultivo convencional, baseado em glicose (Almeida *et al.*, 2016; Nazareth *et al.*, 2021). Neste cenário, o uso de resíduos agroindustriais, como o melaço de cana-de-açúcar, representa uma solução inovadora e sustentável para reduzir os custos de produção, mantendo a eficácia e as propriedades do biossurfactante (Verma *et al.*, 2020; Rokni *et al.*, 2022). Além disso, a utilização de melaço promove o reaproveitamento de um resíduo industrial abundante, alinhando-se aos princípios da economia circular (Núñez-Caraballo *et al.*, 2019).

Portanto, este estudo se justifica pela necessidade de viabilizar economicamente a produção de surfactina, utilizando um meio alternativo baseado em melaço, e de explorar sua aplicação como agente anticorrosivo sustentável na indústria do petróleo. Esta abordagem atende às demandas por inovação tecnológica sustentável, contribuindo para a redução de impactos ambientais e fortalecendo o uso de tecnologias verdes no setor industrial.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

O projeto busca avaliar o cultivo de *Bacillus velezensis* H2O-1, bem como a produção de surfactina, em um meio de cultivo alternativo que contém melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, visando a redução dos custos em relação ao meio de cultivo convencional contendo glicose como fonte de carbono. Adicionalmente, pretende-se caracterizar as propriedades físico-químicas, antiaderentes e anticorrosivas dos tensoativos produzidos no novo meio proposto.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a capacidade do meio alternativo proposto de promover o crescimento de *B. velezensis* H2O-1;
2. Avaliar a cinética de crescimento da cepa no meio alternativo;
3. Extrair e quantificar a surfactina produzida nas condições de cultivo propostas;
4. Investigar as propriedades tensoativas da surfactina produzida em meio alternativo;
5. Avaliar a estabilidade a longo prazo do biossurfactante mediante métodos de preservação e armazenamento;
6. Determinar o potencial inibitório da formação de biofilme de BRS em aço da surfactina produzida;
7. Investigar a capacidade do biossurfactante de inibir em superfície de aço carbono a corrosão induzida por microrganismos;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Produção da Surfactina

#### 4.1.1 Microrganismo

A produção da surfactina, neste estudo, se deu através do cultivo da cepa de *Bacillus velezensis* H2O-1 isolada de um poço de petróleo de Marlim, Brasil (Korenblum *et al.*, 2005). O isolado foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Genética Microbiana do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), coordenado pela Prof. Lucy Seldin. O microrganismo foi criopreservado a -80°C em caldo Luria Bertani Miller (LB), adicionado de 20% de glicerol (Guimarães, 2015; 2019).

A bactéria preservada em tubo criogênico foi reativada em placa de Petri, transferida a um Erlenmeyer contendo caldo LB e incubada em agitador orbital durante 24 horas a 30°C e 170 rpm. Após esse período de incubação, foi adicionado 20% de glicerol ao caldo LB, e o meio contendo *Bacillus velezensis* H2O-1 foi armazenado em 10 novos tubos criogênicos de 2 mL. Os novos tubos criogênicos foram armazenados em freezer a -20°C para a realização dos ensaios posteriores.

#### 4.1.2 Meios de cultivo

O meio alternativo proposto e avaliado neste estudo, de composição (% m/v) melão 2,0, NaCl 1,0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,944, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2, MgSO<sub>4</sub> 0,02, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2; é um meio mineral cuja fonte de carbono é o melão de cana-de-açúcar. Comparativamente, há o meio convencional, de composição (% m/v) glicose 1,0, NaCl 1,0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2, MgSO<sub>4</sub> 0,02, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2; trata-se de um meio mineral cuja fonte de carbono é a glicose (Guimarães *et al.*, 2021).

#### 4.1.3 Processo de produção da surfactina

Para a produção da surfactina, conforme descrito por Guimarães *et al.*, (2021), a cepa de *Bacillus velezensis* H2O-1 foi reativada em placa de Petri contendo meio LB e então transferida à um meio de pré-inóculo (Anexo 1). O pré-inóculo foi incubado em agitador orbital a 30°C e 170 rpm durante 14 horas. Concluído o período de incubação do pré-inóculo, uma alíquota desse cultivo foi retirada e centrifugada a 12.500 xg durante 10 minutos (min) para a deposição das células de *B. velezensis* H2O-1. O precipitado celular foi ressuspensão em água ultrapura e então levado ao espectrofotômetro para a medição da densidade óptica (DO) a 600 nm. Uma vez obtida a DO do pré-inóculo, foi possível realizar um cálculo para a inoculação de

0,032 Abs (absorbância), valor de DO que equivalente a 20 mg/L de células no meio de cultivo, seja ele convencional ou alternativo (Equação 1). Essa concentração celular se baseia em uma curva padrão que relaciona a absorbância de *B. velezensis* H2O-1 suspensas em água e a massa seca de células, obtido em trabalhos anteriores do grupo (Anexo 2).

**Equação 1:**  $\text{Absorbância}_{\text{pré-inóculo}} \times \text{Volume}_{\text{pipetado}} = 0,032 \text{ Abs} \times \text{Volume}_{\text{meio de produção}}$

Uma vez inoculadas 20 mg/L de células no meio de produção de surfactina, este foi incubado em agitador orbital a 30°C e 170 rpm durante 72 horas. Cada batelada foi cultivada em triplicata. Concluído o período de incubação, o cultivo de *B. velezensis* H2O-1 foi levado a centrífuga a 12.500 xg durante 15 min a 4°C, para a obtenção do sobrenadante contendo a surfactina produzida pela bactéria. O sobrenadante foi mantido sob refrigeração a 4 °C até a realização dos ensaios posteriores.

#### 4.1.4 Cinética de crescimento

A cepa de *B. velezensis* H2O-1 foi cultivada sob agitação a 30°C e 170 rpm. Aliquotas de cultivo foram obtidas em intervalos de 2 horas do período de 0 horas a 83 horas de cultivo. Após a coleta, as amostras foram então centrifugadas a 12.500 xg durante 10 min para a deposição das células e o precipitado celular foi ressuspensão em água destilada. O crescimento celular, acompanhado com base nos valores de DO<sub>600nm</sub>, foi expresso em massa seca (Anexo 2). O experimento foi realizado em triplicata biológica (experimental).

Além disso, alíquotas de cultivo foram obtidas em intervalos de 12 horas do período de 0 horas a 72 horas. As alíquotas foram submetidas a diluições seriadas na base 10 (Anexo 3). Em seguida, 100 µL de cada alíquota foi inoculada pelo método de espalhamento em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski em meio LB. Após o período de incubação de 24 horas à 30°C, as placas de Petri foram retiradas da estufa e realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

#### 4.2 Extração e quantificação da surfactina

A cepa de *B. velezensis* H2O-1 foi cultivada nas condições de cultivos descritas no item 4.1.3 em um período de 48 horas de cultivo. O referido tempo de crescimento foi escolhido em vista que é o período de cultivo, em meio convencional, ideal para a obtenção de surfactina observado em trabalhos anteriores (Guimarães, 2015). Após a incubação, o sobrenadante livre de células (obtido conforme descrito no item 4.1.3) foi submetido a uma etapa de extração líquido-líquido.

Inicialmente, 100 mL do sobrenadante foram submetidos a uma precipitação ácida em pH 2,0, ajustado com a adição de HCl 3M, como descrito por Verma *et al.*, (2020). A solução resultante foi deixada em repouso durante 12 horas (*overnight*) em geladeira, para a precipitação dos lipopeptídeos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 12.500 xg por 15 min a 4°C. O precipitado (biossurfactante bruto) foi ressuspense em 8 mL de água ultrapura e a solução resultante levada a um frasco do tipo Erlenmeyer. Em seguida, foram adicionados 16 mL de uma solução de acetato de etila e metanol na proporção 4:1 (v/v) (Verma *et al.*, 2020). O Erlenmeyer foi submetido a 180 rpm de agitação em shaker durante 4 horas. Posteriormente a solução foi transferida a um balão de separação. Após um período de repouso de 1h a temperatura ambiente, a fase orgânica obtida foi recolhida e mantida à temperatura ambiente até a evaporação total do solvente. Em seguida, as amostras foram ressuspensas metanol e filtradas através de filtros de seringa de 0,22 µm (nylon) (Pereira *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2020; Guimarães *et al.*, 2021).

A quantificação da surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 se deu através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HPLC - Agilent Technologies 1260 Infinity II, CA, EUA). Dessa forma, 20 µL da amostra foram levados ao CLAE, nas condições cromatográficas descritas na Tabela 1. Adicionalmente, para a obtenção do perfil cromatográfico do tensoativo (Anexo 4), foram realizadas análises com um padrão de surfactina de *Bacillus subtilis* de 600 mg/L (Sigma-Aldrich) (Pereira *et al.*, 2013; Guimarães *et al.*, 2021).

**Tabela 1** - Descreve as condições que serão utilizadas para quantificação da surfactina por CLAE.

Coluna	C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm x 5 µm)
Detector	UV - DAD
Fase Móvel	20% TFA* (3,8 mM) e 80% acetonitrila
Fluxo	1 mL/min
Absorbância	210 nm
Temperatura	30 °C
Tempo	25 min

\* ácido trifluoroacético

### 4.3 Avaliação das atividades tensoativas da surfactina produzida em meio alternativo

#### 4.3.1 Índice de emulsificação

Os índices de emulsificação (IE) de amostras dos períodos de 24, 48 e 72 horas de cultivo foram obtidos através da adição de 1,5 mL de óleo de soja e 1,5 mL do sobrenadante

livre de células em tubos de ensaio. Em seguida, as amostras foram agitadas em um agitador do tipo vórtex durante 2 min (Cooper e Goldenberg, 1987). Após um período de 24 horas de repouso, a altura total de líquido no tubo de ensaio e a altura da camada emulsificada formada foram medidas com um paquímetro. Obtém-se o IE através da razão da altura da camada emulsificada pela altura total de líquido no tubo de ensaio (Equação 2). O controle negativo desses ensaios foi água destilada, enquanto o controle positivo foi uma solução do surfactante químico dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (Cooper e Goldenberg, 1987). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste t ( $p \leq 0,05$ ).

**Equação 2:** 
$$\text{IE (\%)} = \frac{\text{altura da camada emulsificada}}{\text{altura total de líquido}} \times 100$$

#### 4.3.2 Estabilidade da emulsão

Uma vez obtidos os valores de IE, os tubos de ensaio foram mantidos em repouso durante mais 168 horas. Em seguida, a altura total de líquido no tubo de ensaio e a altura da camada emulsificada formada foram novamente medidas. Dessa forma, foi obtido o IE após 7 dias de repouso, o que permitiu a determinação da estabilidade da emulsão gerada conforme expressa a Equação 3.

**Equação 3:** 
$$\text{Estabilidade (\%)} = \frac{\text{IE}_{24}}{\text{IE}_{168}} \times 100$$

#### 4.3.3 Dispersão do óleo

A presença de capacidade redutora da tensão superficial nos sobrenadantes de cultivo dos períodos de 24, 48 e 72 horas foi determinada através da técnica da dispersão do óleo descrita por Morikawa, Hirata e Imanaka, (2000). Nesse ensaio, 20 mL de água destilada foram adicionados em placas de Petri. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  de óleo bruto foram depositados sobre a superfície da água. Posteriormente, 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante livre de células contendo a surfactina foram adicionados à superfície do óleo. No caso de resultados positivos, halos de dispersão foram gerados, cujos diâmetros foram medidos, em mm, com auxílio de um paquímetro. O controle negativo deste experimento foi água destilada, enquanto o controle positivo foi SDS 10% (Morikawa, Hirata e Imanaka, 2000). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste t ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.3.4 Tensão Superficial**

A tensão superficial de amostras após 48 horas de cultivo de *B. velezensis* H2O-1 foi determinada utilizando goniômetro Krüss DSA30 por meio do método da gota pendente. Nesse método o sistema de processamento de imagem do goniômetro acoplado ao computador mede cada gota pendente na ponta de uma agulha. Essa análise se dá a partir do volume de injeção e da curvatura do perfil da gota, obtendo-se a tensão superficial e interfacial da amostra. Os resultados foram expressos calculando a média de 10 gotas pendentes (Song e Springer, 1996). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste t ( $p \leq 0,05$ ).

#### **4.3.5 Concentração Micelar Crítica**

A concentração micelar crítica (CMC) foi determinada através da razão da concentração de surfactina pela diluição micelar crítica (DMC) do seu respectivo sobrenadante, de acordo com Guimarães (2019). A DMC foi determinada através da obtenção dos valores de tensão superficial de diluições seriadas da amostra de sobrenadante em água destilada (FD2; FD5; FD10; FD20; FD50; FD100; FD200; FD500; FD1000) com o auxílio de goniômetro Krüss DSA30 (conforme descrito no item 4.3.4). Com isso, foram gerados gráficos de perfil exponencial relacionando a tensão superficial com a diluição da amostra. Uma vez gerados esses gráficos, foram obtidas as linhas de tendência, as quais permitirão a determinação da (DMC) das amostras. A concentração de surfactina foi determinada através de CLAE (conforme descrito no item 4.2).

### **4.4 Estabilidade a longo prazo da surfactina**

#### **4.4.1 Conservação mediante congelamento**

A estabilidade da surfactina produzida deve ser avaliada tendo em vista a intenção de aplicá-la em larga escala pela indústria petroquímica. Nesse cenário, triplicatas de amostras dos sobrenadantes autoclavados contendo o biossurfactante foram submetidas a conservação através de armazenamento à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A estabilidade do biossurfactante foi avaliada através da medição da tensão superficial do sobrenadante com o auxílio de goniômetro Krüss DSA30. A princípio, medições foram feitas após 0, 1 e 5 dias de armazenamento, seguidas por medições após 40, 135 e 165 dias.

#### **4.4.2 Conservação mediante liofilização**

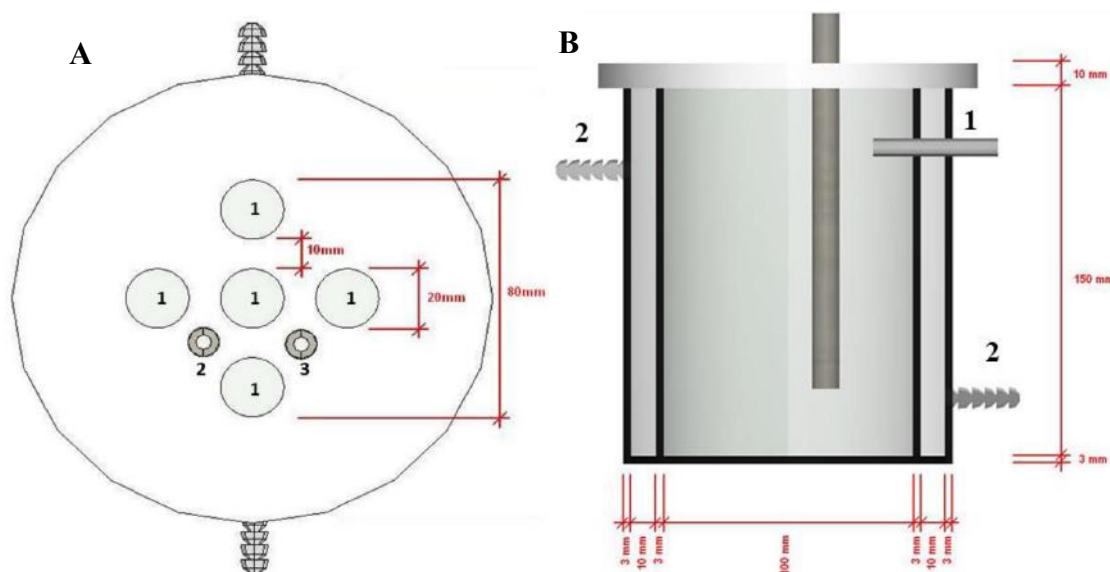
Adicionalmente, duplicatas de sobrenadante autoclavado de meio alternativo foram congeladas durante 24h e em seguida submetidas a liofilização. As amostras submetidas foram

armazenadas à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A estabilidade do biossurfactante também foi mensurada através da obtenção da tensão superficial das amostras liofilizadas, ressuspensas ao seu volume original em água destilada. A princípio, medições foram feitas após 0 e 7 dias de armazenamento, seguidas por medições após 75, 90 e 140 dias.

#### 4.5 Potencial de aplicação da surfactina no controle da biocorrosão

##### 4.5.1 Montagem dos biorreatores

Biorreatores de vidro com um descarte de líquidos e um sistema de encamisamento para refrigeração, contando ainda com sete orifícios na parte superior (tampa), foram montados como descrito por Guimarães (2019) (Figura 8). Na tampa, um orifício foi designado para a entrada de gás nitrogênio e um outro para a saída de gases (conectada a um lavador de gases). Dos cinco orifícios restantes na parte superior, quatro receberam uma haste cada, para a fixação de cupons de aço carbono e um foi destinado à adição de caldo nutritivo (Figura 8 - A). Na parte inferior, o sistema de encamisamento foi ligado a um banho de recirculação para controle da temperatura do experimento através da passagem de água (Figura 8 - B).



**Figura 8** – Esquema dos biorreatores utilizados neste estudo. **A.** Representação da tampa do reator, com **1.** quatro hastes para fixação dos cupons de aço e um para a adição de caldo nutritivo, **2.** um orifício para entrada de gás nitrogênio e **3.** um orifício para saída de gás conectado a um lavador de gases. **B.** Representação do corpo de vidro do reator, com **1.** descarte de líquidos e **2.** passagem de água para o controle da temperatura (Guimarães, 2019).

No ensaio, foram incubados três reatores com agitação de 60 rpm a  $30^{\circ}\text{C}$ , contendo água de produção cedida pela Petrobras. Os reatores foram mantidos sob purga contínua de nitrogênio, para a manutenção da anaerobiose. A incubação foi durante um total de 25 dias. A cada 24h, os reatores foram alimentados com solução nutritiva para BRS potencialmente

presentes na água de produção, de composição (% m/v) extrato de levedura 0,10, glicose 0,025, tioglicolato de sódio 0,0124, e 0,40 mL de lactato de sódio (70%) (Guimarães, 2019).

Um dos reatores foi classificado como Reator Controle (RC), contendo apenas água de produção e 20 cupons de aço carbono. Outro reator foi nomeado Reator com Solução de Surfactina (RSS), o qual recebeu água de produção, 20 cupons de aço carbono e 2% (v/v) de sobrenadante de meio alternativo (220,02 mg/L de surfactina). O reator restante foi classificado como Reator com Cupons Condicionados com Surfactina (RCS) que, além da água de produção, conteve 20 cupons de aço carbono previamente condicionados por imersão durante 24 horas em sobrenadante de meio convencional.

A higienização dos cupons de aço carbono se deu por imersão em etanol 99% (v/v) em banho ultrassônico por 10 min. Em seguida, após uma lavagem com água destilada, os cupons foram submersos em solução aquosa com 2% (v/v) de detergente comercial em banho ultrassônico durante mais 10 min. Por fim, os cupons foram novamente lavados com água destilada e levados a estufa a 50°C por 20 min para secagem.

Os cupons higienizados destinados ao reator RCS foram ainda condicionados em solução aquosa contendo surfactina por imersão durante 24 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, os cupons foram submetidos a uma lavagem com água destilada e deixados para secar em temperatura ambiente.

Amostragens em triplicata de cupons de aço foram feitas no 13° e no 25° dias de incubação, de forma que um total de 36 cupons foram retirados dos reatores, 12 cupons de cada um, 6 para cada período de amostragem. Depois da amostragem do 13° dia mais 2% (v/v) da solução aquosa contendo surfactina foram adicionados ao reator RSS. Os cupons de cada reator e de cada período foram reservados para a microscopia eletrônica de varredura, metade deles para a análise da biocorrosão e os restantes para avaliação da formação de biofilme.

## **4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

### **4.5.1 Análise da atividade antibiofilme**

A microscopia eletrônica para avaliação da formação de biofilme foi realizada como descrita por Guimarães (2019), em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular e Magnetotaxia da UFRJ. As amostras foram fixadas imediatamente após a sua coleta, com a finalidade de avaliar as estruturas do biofilme presente na superfície de aço carbono de 18 cupons (3 de cada reator e de cada um dos dois períodos de amostragem). A fixação se deu em solução de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 4%, em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2)

por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a 3 lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M, seguida por desidratação em gradiente de etanol e secagem por hexametildisilazano. Por fim, o material foi coberto por uma camada de, aproximadamente, 5 nm de ouro. O material foi aderido com fita dupla face de carbono em suporte de alumínio e levado ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO MA10 disponível no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem da UFRJ (CENABIO).

#### **4.5.2 Análise da atividade anticorrosiva**

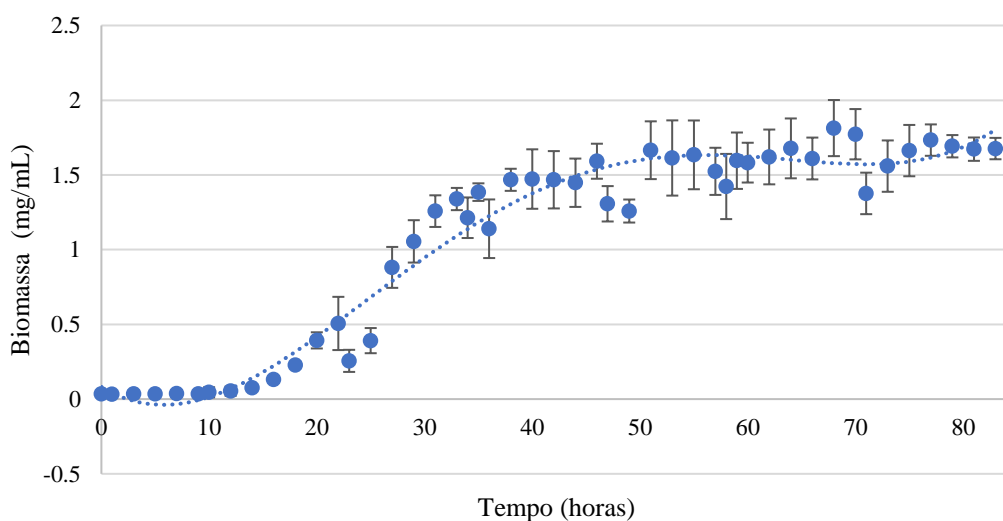
A MEV também foi a técnica utilizada para análise da biocorrosão. Os cupons de aço carbono designados para esse experimento foram submetidos a uma lavagem ácida. O processo consiste na limpeza dos cupons, que foram banhados em solução de ácido clorídrico 18% (v/v) durante 5 segundos. Em seguida, o material foi neutralizado em solução saturada de bicarbonato de sódio por mais 5 segundos e então lavados com água destilada. Posteriormente, os cupons foram submersos em acetona (P.A.) durante 5 segundos e deixados para secar em temperatura ambiente até atingirem peso constante. As amostras foram então aderidas a uma fita dupla face de carbono utilizando um suporte de alumínio e então levadas ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO MA10 disponível no CENABIO.

## 5. RESULTADOS

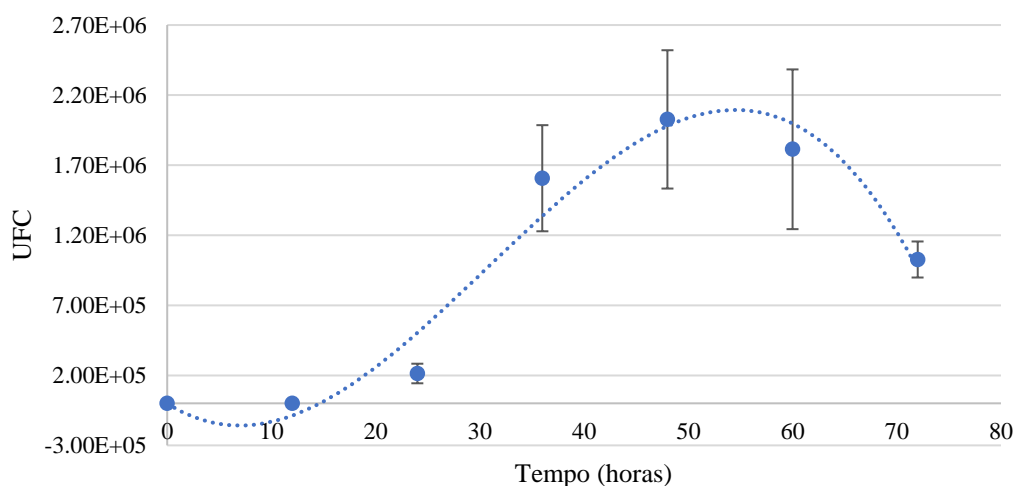
### 5.1 Cinética de crescimento

Trabalhos anteriores do grupo permitiram a obtenção de um coeficiente de conversão da DO para massa seca de células de *B. velezensis* H2O-1, equivalente a 0,4337 (Guimarães, 2015). Dessa forma, torna-se possível acompanhar a cinética de crescimento bacteriano em meio alternativo. Mediante a conversão dos valores de absorbância obtidos no espectrofotômetro ao valor equivalente a massa seca de *B. velezensis* H2O-1, nota-se que o meio alternativo foi capaz de promover o crescimento de *B. velezensis* (Figura 9). Vale ressaltar ainda que a fase exponencial do crescimento microbiano ocorre por volta da 20ª hora de crescimento, enquanto que a fase estacionária inicia-se aproximadamente a partir da 35ª hora de cultivo.

Adicionalmente, foi avaliada cinética de crescimento celular da cepa *B. velezensis* H2O-1 por meio da contagem de UFC (Figura 10). Essa metodologia traz a vantagem de permitir a contabilização apenas de células viáveis. Os resultados observados neste experimento estão em consonância com o ensaio anterior de cinética de crescimento, indicando que o período correspondente à fase exponencial de crescimento da bactéria neste meio é, aproximadamente, da 20ª à 35ª hora. Diferente do método espectrofotométrico, na metodologia de contagem de UFC foi possível identificar a fase de decaimento do crescimento de *B. velezensis* em meio alternativo, a qual se inicia por volta da 55ª hora de cultivo.



**Figura 9** - Cinética de crescimento de *B. velezensis* em meio alternativo, relacionando a massa seca de células (mg/mL) (convertida da D.O. a 600nm) ao tempo de cultivo.

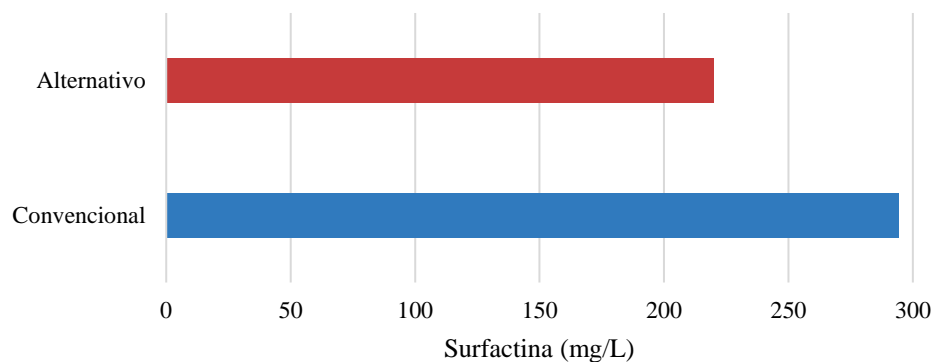


**Figura 10** - Cinética de crescimento de *B. velezensis* em meio alternativo, relacionando o número de UFC ao tempo de cultivo.

## 5.2 Quantificação da Surfactina

Posterior a extração de lipopeptídeos, foi possível quantificar a surfactina dos sobrenadantes livres de célula através de CLAE. Sendo assim, tendo como base o perfil cromatográfico expresso no cromatograma resultante da corrida do padrão de surfactina, confirma-se a presença do tensoativo tanto no sobrenadante de meio convencional quanto no sobrenadante de meio alternativo (Anexo 4).

Adicionalmente, conhecendo os picos característicos do perfil cromatográfico da surfactina, pode-se calcular a área dos picos equivalentes nos cromatogramas das amostras de sobrenadante do meio alternativo contendo melão, bem como do meio convencional (controle), para que se obtenha a concentração de biosurfactante nessas amostras (Figura 11). O sobrenadante do meio alternativo conteve 220,02 mg/L do tensoativo, concentração relativamente menor à encontrada no meio convencional, que conteve 294,26 mg/L de surfactina.

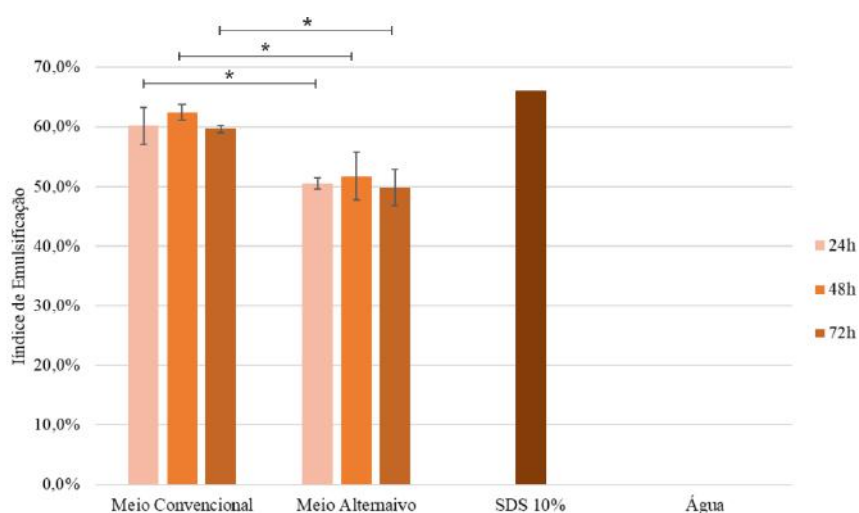


**Figura 11** - Concentrações (mg/L) da surfactina produzida em meio convencional e em meio alternativo.

### 5.3 Caracterização físico-química

#### 5.3.1 Índice de emulsificação (IE)

Os valores de IE em óleo de soja dos sobrenadantes contendo surfactina obtidos a partir do cultivo de *B. velezensis* H2O-1 em meio alternativo e em meio convencional foram determinados nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Figura 12). Os valores de IE dos diferentes períodos de cada sobrenadantes tenderam a se manter constantes. Além disso, foi possível notar que os valores de IE do sobrenadante de meio alternativo foram levemente menores do que os valores do sobrenadante de meio convencional. Por fim, para ambos os sobrenadantes, o período associado aos maiores IEs foi o de 48 horas, tendo as amostras atingindo IE médios de 51,7% e 62,5%, quando derivadas de meio alternativo e de meio convencional, respectivamente.



**Figura 12** – Valores dos IEs em óleo de soja nos períodos de 24, 48 e 72 horas do meio convencional e do meio alternativo. Como controle positivo foi utilizado SDS 10% e água destilada foi utilizada como controle negativo. Colunas marcadas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes entre si pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ).

#### 5.3.2 Estabilidade da emulsão

Após a obtenção dos valores de IE foi possível avaliar a estabilidade das emulsões referentes a cada sobrenadante, as quais são expostas na Tabela 2. Os maiores valores de estabilidade nas emulsões dos sobrenadantes foram obtidos nos ensaios do meio convencional em relação aos dados observados nos ensaios com a surfactina oriunda do meio alternativo.

As emulsões menos estáveis foram geradas a partir dos sobrenadantes obtidos após 24 horas de cultivo. Paralelamente, o período de 72 horas foi o que apresentou emulsões mais estáveis, tendo o sobrenadante de meio alternativo atingindo, em média, 76,3% de estabilidade nesse período. Dessa forma, foi possível notar uma tendência ao crescimento da estabilidade

conforme se aumenta o tempo de cultivo de *B. velezensis*. No mesmo período de 72 horas, o sobrenadante de meio alternativo obteve uma média de estabilidade equivalente a 76,3%, enquanto que a estabilidade do SDS 10% foi de 99,5%.

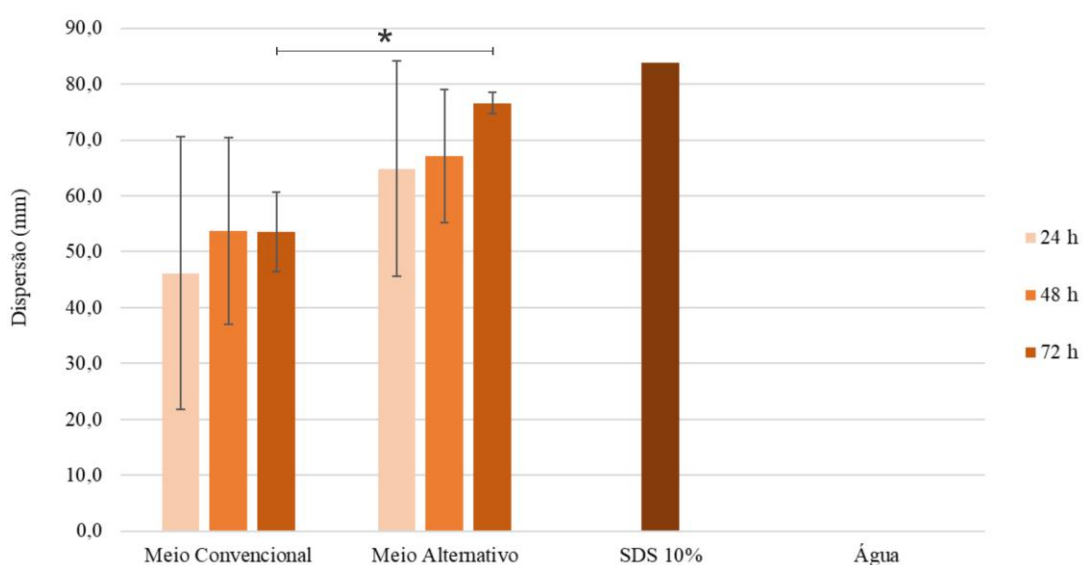
**Tabela 2** – Valores da estabilidade das emulsões dos sobrenadantes de meio convencional e de meio alternativo nos períodos de 24, 48, e 72 horas. Uma solução de SDS 10%, foi utilizada como do controle positivo.

Sobrenadante	24 horas	48 horas	72 horas	SDS 10%
Meio Convencional	85,7%	94,6%	95,1%	99,5%
Meio Alternativo	56,2%	54,4%	76,3%	

### 5.3.3 Dispersão do óleo

A capacidade de dispersão de óleo bruto dos sobrenadantes contendo surfactina obtidos do cultivo de *B. velezensis* H2O-1 em meio alternativo e em meio convencional foi avaliada nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Figura 13). Em relação ao sobrenadante do meio alternativo os halos com maiores diâmetros de dispersão alcançaram, em média, 53,8 mm após 48 horas de cultivo. Por outro lado, os halos resultantes do sobrenadante do meio convencional, apresentaram, em média, diâmetros 67,1 mm no mesmo período.

Vale ainda ressaltar a tendência crescente dos diâmetros de dispersão do óleo conforme se aumenta o tempo de cultivo bacteriano, independente do meio de cultivo avaliado. Contudo, comparando amostras do mesmo período dos diferentes sobrenadantes, somente as amostras de 72 horas de cultivo foram significativamente diferentes entre si.

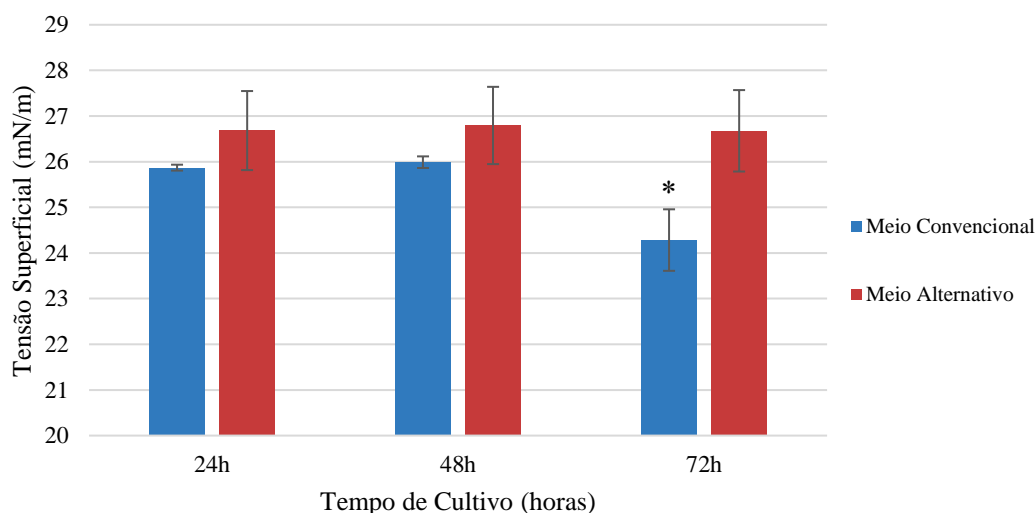


**Figura 13** - Valores de dispersão de óleo bruto (mm), nos períodos de 24, 48 e 72 horas do meio convencional e do meio alternativo. Uma solução de SDS10%, foi utilizada como do controle positivo e água destilada foi utilizada como controle negativo. Colunas marcadas pelo asterisco (\*) são diferentes entre si pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.3.4 Tensão Superficial

Os dados de tensão superficial permitem a avaliação comparativa da ação tensoativa dos sobrenadantes contendo surfactina obtidos a partir do cultivo de *B. velezensis* H2O-1 em meio convencional e em meio alternativo nos períodos de 24, 48 e 72 horas (Figura 14). Nos ensaios, todas as amostras apresentaram valores de tensão superficial inferiores ao valor da água ultrapura ( $\cong 72$  mN/m).

Os valores de tensão superficial derivados do sobrenadante de meio alternativo equivaleram, em média, a 26,7 mN/m, se mantendo constante em todos os períodos avaliados. Comparativamente, a tensão superficial dos sobrenadantes de meio convencional se mantiveram, em média, por volta dos 25,9 mN/m após 24 e 48 horas de cultivo. Não houve diferença significativa entre os valores de tensão superficial dentre os sobrenadantes de meio convencional e os de meio alternativo dos tempos de 24 e 48 horas de cultivo. Entretanto, os menores valores de tensão superficial dentre os sobrenadantes de meio convencional foram obtidos no período de 72 horas, os quais equivaleram, em média, a 24,3 mN/m.



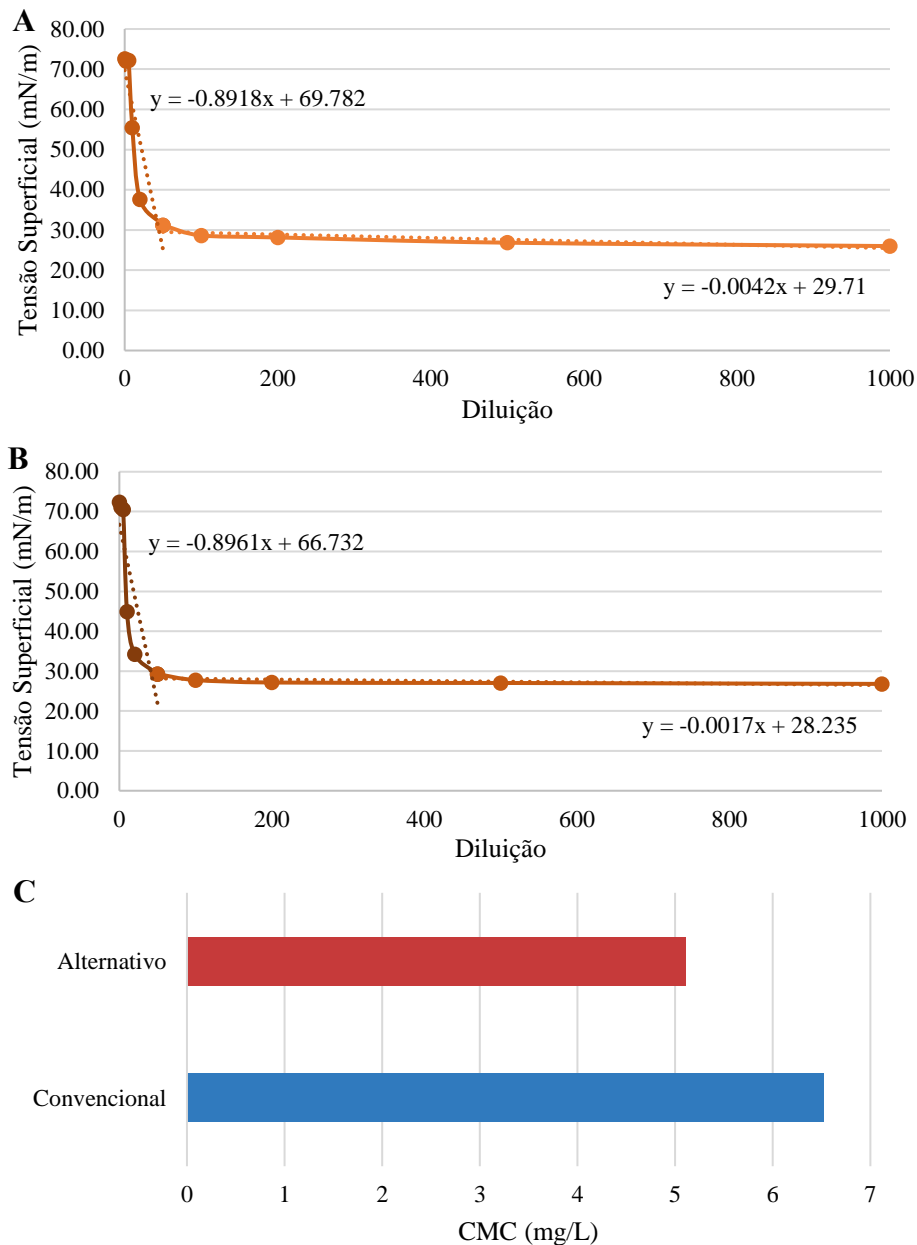
**Figura 14** - Valores de tensão superficial (mN/m) obtidos dos sobrenadantes de meio alternativo e meio convencional após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A coluna marcada pelo asterisco (\*) é diferente pelo teste t ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.3.5 Concentração Micelar Crítica

A análise da tensão superficial das amostras diluídas dos sobrenadantes viabilizam a elaboração de curvas de DMC, expostas na Figura 15 - A e 15 - B. Mediante a obtenção das equações das linhas de tendência dessas curvas, foi possível a determinação da DMC dos sobrenadantes de cultivo avaliados. No que diz respeito ao sobrenadante de meio alternativo,

foi obtido uma DMC de 43,04 vezes. Em relação ao meio convencional, as equações das linhas de tendência apontam para DMC equivalente a 45,15 vezes.

Uma vez obtidos as concentrações de surfactina e os valores de DMC dos sobrenadantes, foi possível determinar a CMC de cada uma das amostras (Figura 15 - C). O sobrenadante de meio convencional atingiu CMC de 6,52 mg/L. Comparativamente, a CMC do sobrenadante de meio alternativo equivaleu a 5,11 mg/L.

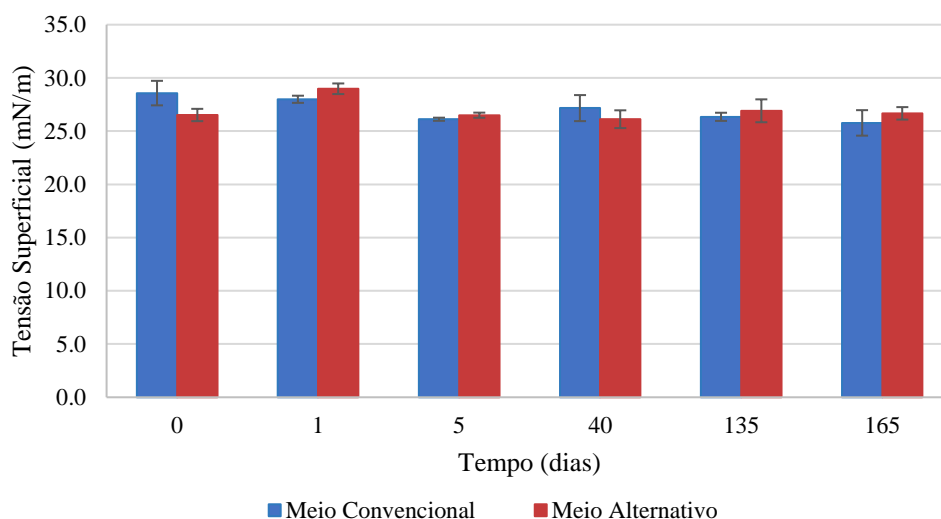


**Figura 15** - Gráficos de DMC e CMC dos sobrenadantes de cultivo. **A.** Curva de DMC, com linhas de tendência e equações de linhas de tendência do sobrenadante de meio convencional. **B.** Curva de DMC, com linhas de tendência e equações de linhas de tendência do sobrenadante de meio alternativo. **C.** Representação gráfica das CMCs de sobrenadantes de meio convencional e de meio alternativo.

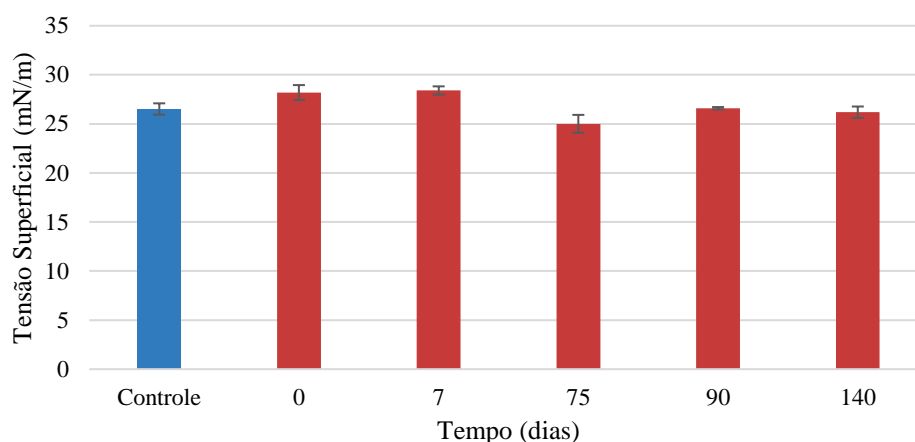
#### 5.4 Estabilidade a longo prazo da surfactina

As tensões superficiais de sobrenadantes autoclavados contendo surfactina derivada tanto do crescimento em meio convencional quanto em meio alternativo foram obtidas para avaliar a estabilidade do lipopeptídeo após 0, 1, 5, 40, 135 e 165 dias de armazenamento à -20 °C (Figura 16). Observa-se que as tensões superficiais de ambos os sobrenadantes tendem a permanecer constantes, sem diferenças significativas entre as amostras, independentemente do meio de origem ou do período de armazenamento. Os maiores valores derivados de meio convencional e de meio alternativo, respectivamente, foram de 28,6 ( $\pm 1,15$ ) e 29,0 ( $\pm 0,50$ ) mN/m, enquanto que os menores valores foram de 25,8 ( $\pm 1,20$ ) e 26,1 ( $\pm 0,83$ ).

Similarmente, as tensões superficiais do sobrenadante liofilizado de meio alternativo contendo surfactina foram analisadas para avaliar a estabilidade do lipopeptídeo após 0, 7, 75, 90 e 140 dias de armazenamento à -20 °C (Figura 17). As amostras mantiveram sua capacidade de reduzir a tensão superficial praticamente constante, com valores próximos aos do sobrenadante não liofilizado (controle). O maior valor foi de 28,4 ( $\pm 0,42$ ) mN/m e o menor valor foi de 25,0 ( $\pm 0,91$ ) mN/m, enquanto que o controle se manteve em torno de 26,5 ( $\pm 1,15$ ) mN/m.



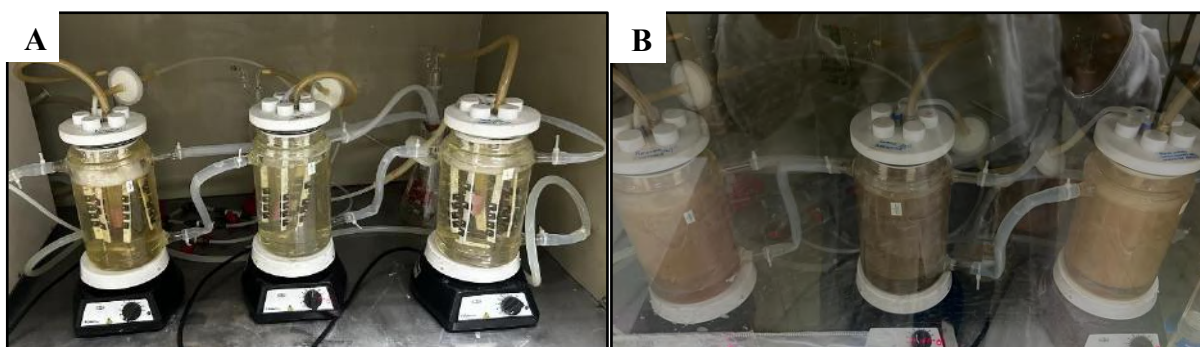
**Figura 16** – Estabilidade da tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes de meio convencional e de meio alternativo contendo surfactina mediante armazenamento à -20°C



**Figura 17** – Estabilidade da atividade tensoativa surfactina do sobrenadantes de meio alternativo mediante liofilização e armazenamento à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Como controle foi utilizado o sobrenadante não congelado.

### 5.5 Potencial de aplicação da surfactina no controle da biocorrosão

Por fim, para avaliar o potencial de aplicação da surfactina no controle da biocorrosão, foi realizado um experimento utilizando biorreatores, como descrito por Guimarães (2019). Ao longo do período de incubação dos reatores, ocorreram mudanças de turbidez e de coloração visualmente perceptíveis, tendo uma inicial translúcida e quase incolor (Figura 18 - A). Nas primeiras 24 horas do experimento, observou-se um aumento significativo da turbidez e o desenvolvimento de uma coloração alaranjada em todos os biorreatores. A partir do terceiro dia, as mudanças na turbidez dos reatores tornaram-se imperceptíveis. Quanto a coloração, observou-se que os reatores RC e RCS adquiriram um tom alaranjado mais pronunciado, que se manteve até o final do experimento. Já o reator RSS apresentou uma transição gradual para uma coloração marrom escura que permaneceu até o fim da incubação (Figura 18 - B).



**Figura 18** - Reatores para avaliar potencial de aplicação da surfactina no controle da biocorrosão. Reator Controle (RC), Reator com Solução de Surfactina (RSS) e Reator com Cupons Condicionados com Surfactina (RCS), da esquerda para a direita, **A**, no primeiro dia de experimento e **B**, após quatro dias de experimento.

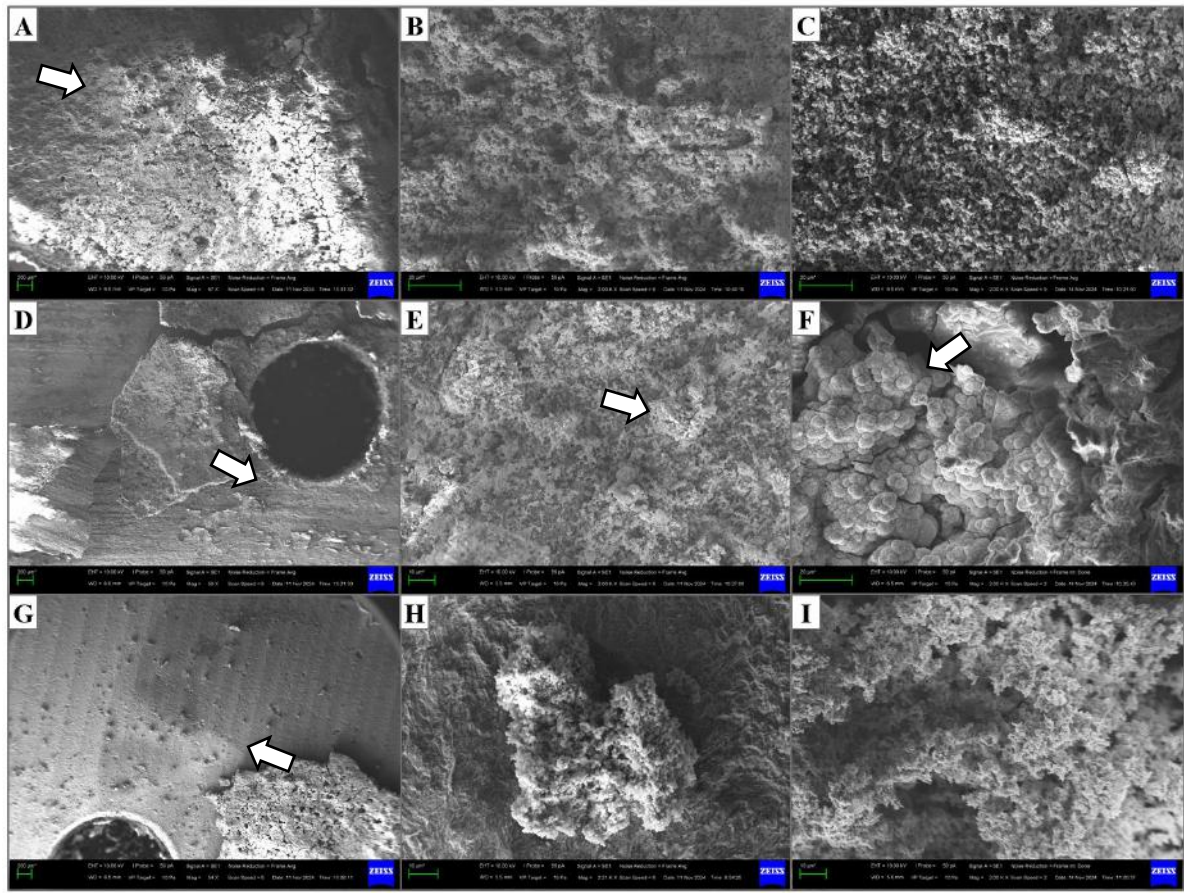
### 5.5.1 Análise da formação de biofilme

As superfícies dos cupons de aço carbono mantidos nos biorreatores foram observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a formação de biofilme pelos microrganismos presentes na água de produção. Os cupons foram analisados sob a aproximação de 57 vezes para a verificação da área de superfície de aço coberta de biofilme. Adicionalmente, para visualização da estrutura do biofilme, os cupons foram ainda observados sob a aproximação de duas mil vezes.

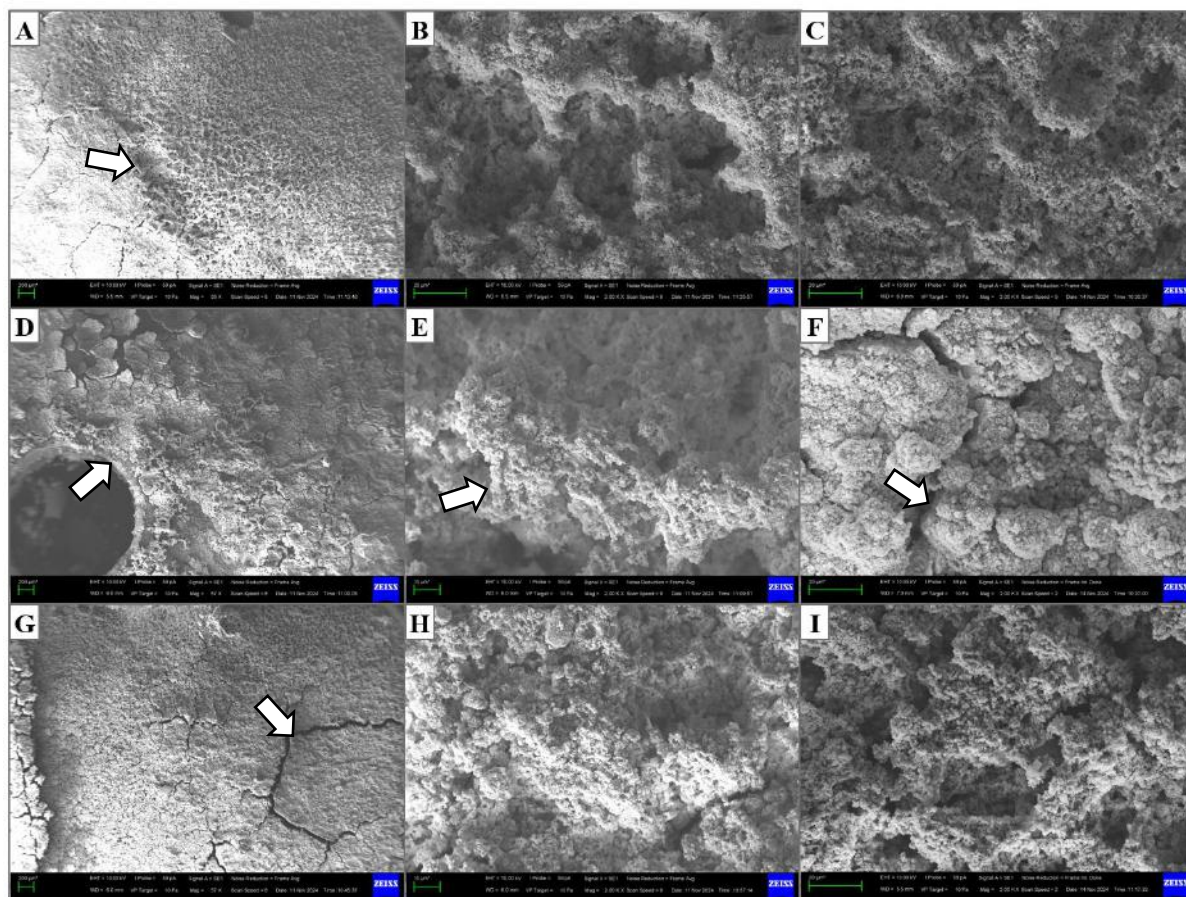
Inicialmente foi observado que, após 13 dias de incubação, cupons de aço de todos os reatores apresentaram estruturas características de biofilme maduro (Figura 18). Entretanto, as diferentes intervenções parecem ter afetado a aderência das células, uma vez que as superfícies de aço provenientes de RSS (Figura 19 – D, E e F) e RCS (Figura 19 – G, H e I) apresentaram menor cobertura de biofilme quando comparados ao RC (Figura 19 – A, B e C). A adesão aos cupons parece ter sido especialmente inibida no Reator SS.

A adição de 2% (v/v) de sobrenadante de meio alternativo contendo surfactina parece viabilizar o desenvolvimento de biofilmes com morfologias distintas entre cupons do mesmo reator. Houve cupons do Reator SS que apresentaram biofilme com morfologias similares às observadas nas superfícies de aço dos outros reatores (Figura 19 – E). Simultaneamente, diferentes cupons de RSS exibiram estruturas de biofilme diferentes das observadas nas demais superfícies de aço desse experimento (Figura 19 – F).

Após 25 dias de incubação, os cupons de aço de todos os reatores apresentaram estruturas características de biofilme maduro (Figura 20). Em contraste ao observado na amostragem anterior, as superfícies de aço apresentaram coberturas de biofilme semelhantes, independentemente da intervenção aplicada nos reatores. Adicionalmente, houve cupons do Reator SS que apresentaram biofilme estruturalmente similares às outras superfícies de aço dos outros reatores (Figura 20 – E), enquanto outros exibiram biofilmes com morfologias distintas das observadas nas demais superfícies de aço deste experimento (Figura 20 – F).



**Figura 19** - Micrografias eletrônicas de varredura da primeira amostragem (13 dias) mostrando: **A.** superfície de aço carbono proveniente do Reator Controle, a seta indica a cobertura total da superfície por biofilme (57x); **B.** e **C.** biofilme maduro sobre a superfície de cupons do Reator Controle (2.000x); **D.** superfície de aço carbono proveniente do Reator SS, a seta indica locais da superfície sem cobertura por biofilme (57x); **E.** e **F.** biofilme maduro sobre a superfície de cupons do Reator SS, as setas destacam as morfologias distintas dos biofilmes de cada cupom de aço visualizado (2.000x); **G.** superfície de aço carbono proveniente do Reator CS, a seta indica locais da superfície sem cobertura por biofilme (57x); **H.** e **I.** biofilme maduro sobre a superfície de cupons do Reator RSS (2.000x).



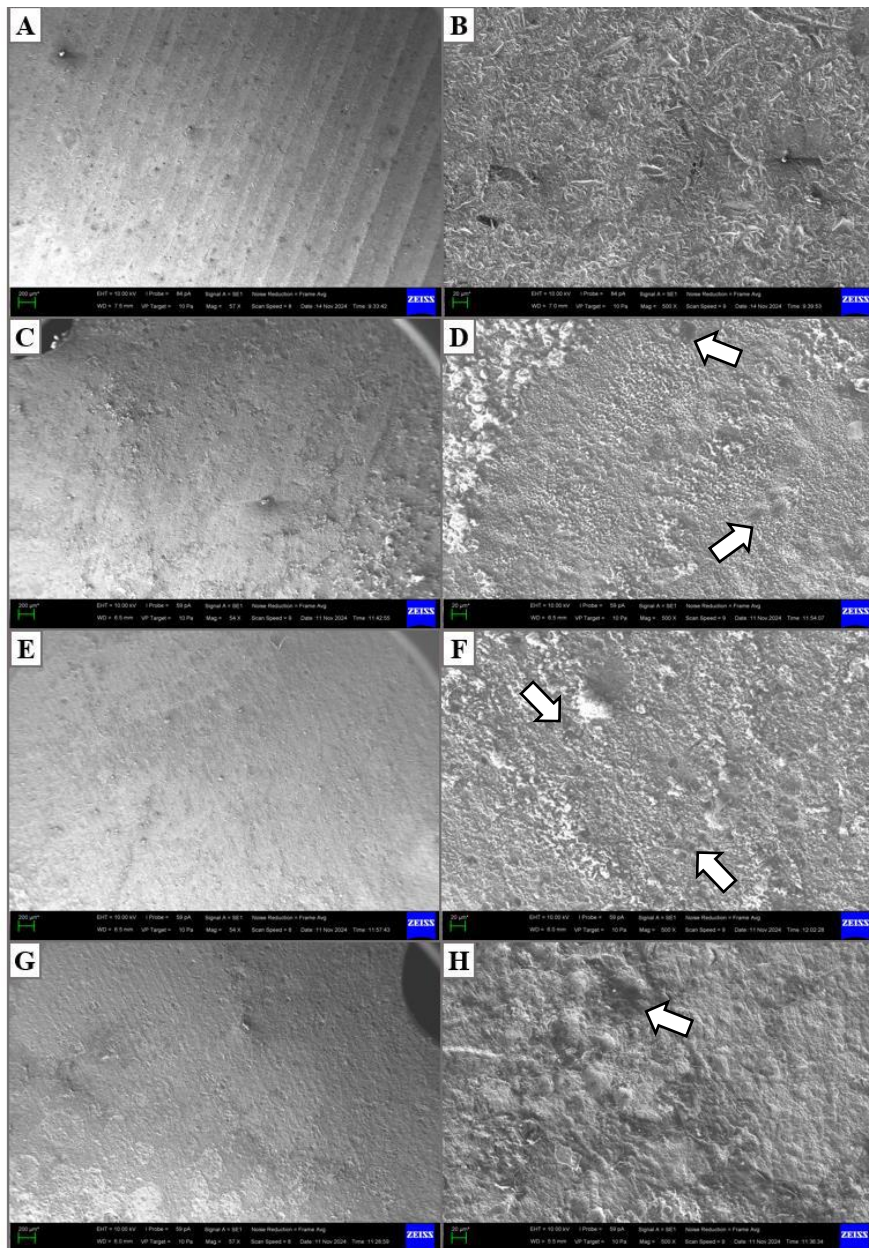
**Figura 20** - Micrografias eletrônicas de varredura da segunda amostragem (25 dias) mostrando: **A.** superfície de aço carbono proveniente do Reator Controle, a seta indica a cobertura total da superfície por biofilme (57x); **B.** e **C.** biofilme maduro sobre a superfície de cupons do Reator Controle (2000x); **D.** superfície de aço carbono proveniente do Reator SS, a seta indica a cobertura total da superfície por biofilme (57x); **E.** e **F.** biofilme maduro sobre a superfície de cupons do Reator SS, as setas destacam as morfologias distintas dos biofilmes de cada cupom de aço visualizado (2000x); **G.** superfície de aço carbono proveniente do Reator CS, a seta indica a cobertura total da superfície por biofilme (57x); **H.** e **I.** biofilme maduro sobre a superfície de cupons do Reator RSS (2000x).

### 5.5.1 Análise da biocorrosão

As superfícies dos cupons de aço carbono mantidos nos biorreatores foram observadas por MEV após remoção do biofilme bacteriano para verificar o processo de corrosão induzida pelos microrganismos presentes na água de produção. Um cupom novo, que não foi levado a qualquer dos reatores, foi lavado em etanol e em água com detergente com o auxílio de um banho ultrassônico (como descrito no item 4.5.1) para que pudesse ser analisado como controle negativo. Os cupons foram observados sob a aproximação de 57 e 500 vezes para a avaliação da corrosão da superfície de aço.

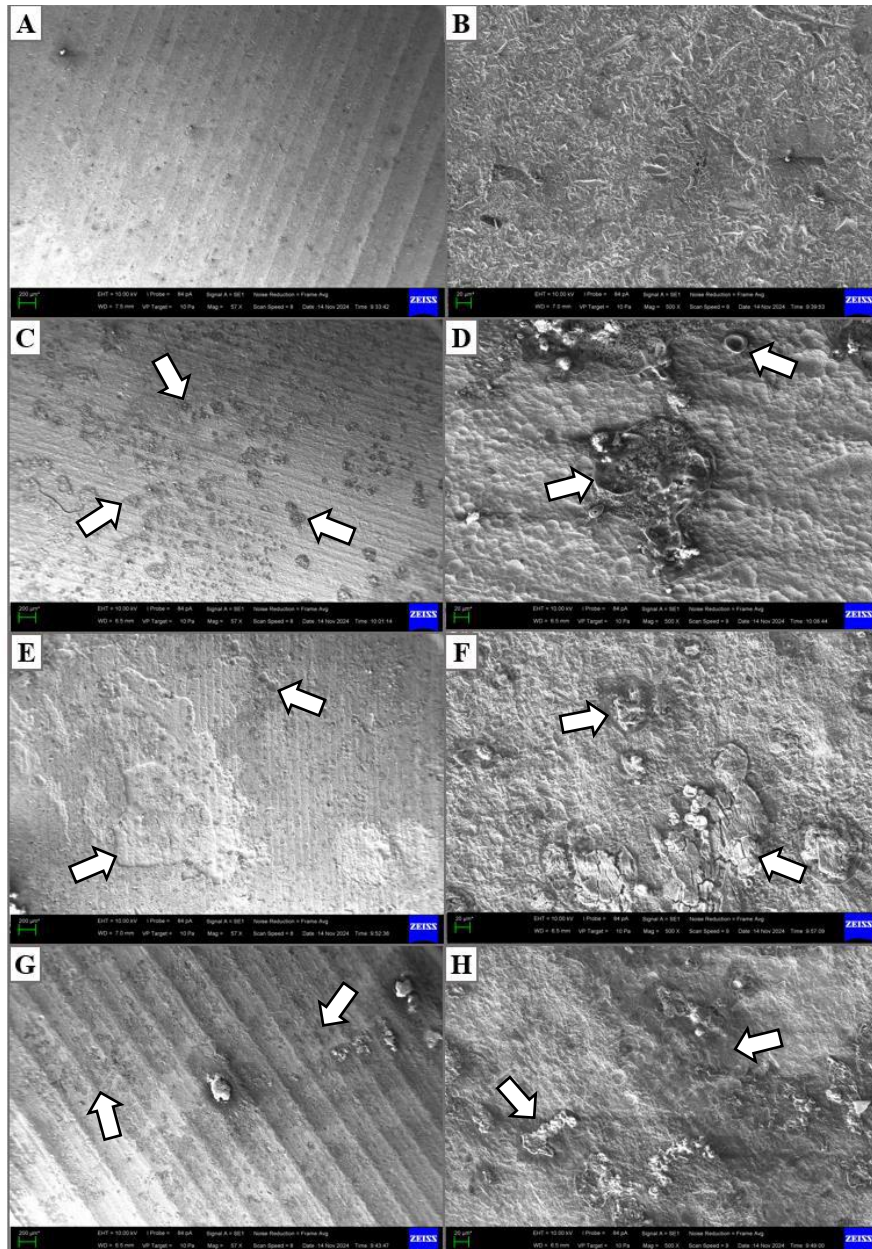
Após 13 dias de incubação, cupons de aço de todos os reatores apresentaram algum grau de corrosão quando comparados ao controle (Figura 21). As intervenções aplicadas nos reatores SS (Figura 21 – E e F) e CS (Figura 21 – G e H) inibiram a CIM em seus cupons, tendo as suas superfícies sofrido visivelmente menos desgaste quando comparados as superfícies de aço do

RC (Figura 21 – C e D). Com a análise das imagens foi observado que o processo de biocorrosão parece ter sido especialmente inibido no Reator CS.



**Figura 21** - Micrografias eletrônicas de varredura da primeira amostragem (13 dias) mostrando: superfície controle de aço carbono sob aproximação de 57x (A.) e 500x (B.); Observação da corrosão da superfície de aço carbono proveniente do Reator Controle sob aproximação de 57x (C.) e 500x, as setas indicam locais de formação de pites (D.); Visualização da corrosão da superfície de aço carbono proveniente do Reator SS sob aproximação de 57x (E.) 500x, as setas indicam locais de formação de pites (F.); Observação da corrosão da superfície de aço carbono proveniente do Reator CS sob aproximação de 57x (G.) e 500x, a seta indica local de desgaste da superfície metálica (H.).

Posterior a 25 dias de incubação, os cupons de aço de todos os reatores sofreram um visível desgaste em comparação ao controle (Figura 22). Contudo, os cupons mais acometidos pela CIM foram os do Reator Controle (Figura 22 – A e B), apresentando maior número de pontos de *pitting corrosion*, isso é, houve a formação de formação de pites (buracos). Além disso, uma grande quantidade de restos celulares foi identificada nesses pontos presentes nas superfícies de aço do RC (Anexo 5).



**Figura 22** - Micrografias eletrônicas de varredura da segunda amostragem (25 dias) mostrando: superfície controle de aço carbono sob aproximação de 57x (A.) e 500x (B.); Observação da corrosão da superfície de aço carbono proveniente do Reator Controle sob aproximação de 57x (C.) e 500x (D.), as setas indicam locais de formação de pites ou desgaste da superfície; Visualização da corrosão da superfície de aço carbono proveniente do Reator SS sob aproximação de 57x (E.) 500x (F.), as setas indicam locais de formação de pites ou desgaste da superfície; Observação da corrosão da superfície de aço carbono proveniente do Reator CS sob aproximação de 57x (G.) e 500x (H.), as setas indicam locais de formação de pites ou desgaste da superfície.

## 6. DISCUSSÃO

Tendo em vista o intuito deste trabalho de propor um meio de cultivo alternativo de menor custo para a produção de surfactina por *Bacillus velezensis* H2O-1, é de vital importância determinar a viabilidade do crescimento do microrganismo neste meio. As condições de cultivo utilizadas foram previamente estabelecidas como ideais para a biossíntese do tensoativo em meio convencional por Guimarães (2015).

Guimarães (2015) também obteve o perfil cinético de produção de surfactina e de biomassa por *B. velezensis* H2O-1, e seus resultados foram utilizados como padrão de comparação entre o meio convencional e o meio alternativo proposto neste trabalho (Anexo 6). Foi observado que há significativa produção de surfactina durante o período entre 24 e 48 horas de cultivo em meio convencional, corroborando a produção do tensoativo durante as fases exponencial e estacionária do crescimento bacteriano. Vale ainda ressaltar que a fase exponencial do crescimento do procaríoto em meio convencional tem início por volta da 10<sup>o</sup> hora de cultivo, e vai até aproximadamente a 20<sup>o</sup> hora.

A cinética de crescimento de *B. velezensis* H2O-1, exposta nas Figuras 9 e 10, confirmam a viabilidade do cultivo em meio alternativo a base de melaço, uma vez que houve a produção de biomassa celular detectável tanto pelo método espectrofotométrico, quanto pela contagem de UFC. Em relação ao método de D.O., notam-se valores de crescimento celular no meio alternativo superiores aos observados em meio convencional, que se mantiveram por volta dos 0,87 mg/mL de biomassa (Guimarães, 2019). Esses dados sugerem maiores quantidades de biomassa neste meio, o que pode ser resultado de uma maior disponibilidade ou diversidade de substratos para o metabolismo celular. O melaço, utilizado no meio alternativo, constitui uma fonte de carbono mais complexa em comparação com a glicose, utilizada no meio convencional. Essa maior complexidade se traduz em uma maior diversidade e de moléculas, potencialmente, em uma disponibilidade ampla de compostos que podem atuar como fontes de carbono.

Durante a cinética de crescimento microbiano, percebe-se que a fase Lag é mais duradoura em meio alternativo (até a 20<sup>o</sup> hora) do que em meio convencional (até a 10<sup>o</sup> hora). Uma possível causa para a maior fase Lag é o processo de transição metabólica necessário quando há uma brusca alteração na fonte de carbono do meio de cultivo (Basan *et al.*, 2020). Essa transição torna-se especialmente desafiadora quando se leva em consideração a necessidade da bactéria de degradar a sacarose (principal fonte de carbono do melaço) para liberar glicose e frutose para o seu uso (Reid e Abratt, 2005; Wu *et al.*, 2017). Rodrigues e colaboradores (2017), ao avaliar o uso de estaquiase, rafinose, sacarose e glicose por *P.*

*aeruginosa* ATCC 10145 para a produção de biossurfactante, observaram que o consumo de sacarose foi de 37,21%. Simultaneamente, o consumo de glicose não pôde ser quantificado, pois foi produzida pela quebra da sacarose e consumida pela cultura microbiana, permanecendo quase constante durante o processo de fermentação. Dessa forma, para limitar a duração da transição metabólica, resultante da transição de *B. velezensis* ao ser levada do meio pré-inóculo contendo glicose ao meio alternativo contendo melaço, deve-se rever a composição do pré-inóculo, de forma que tenha composição similar à do meio de cultivo alternativo.

Vale ainda ressaltar que uma fase Lag mais duradoura é sinônimo de uma fase exponencial mais tardia, o que tem impacto direto na produção de surfactina pela bactéria. Isso se deve ao fato de os biossurfactantes serem metabólitos secundários e, conseqüentemente, sintetizados durante as fases exponencial e estacionária do crescimento microbiano (Jacques, 2011; Sousa *et al.*, 2012; Jahan *et al.*, 2020). Conclui-se, portanto, que a produção de surfactina por *B. velezensis* tem início mais tarde em meio alternativo do que em meio convencional. Assim, a produção tardia de biossurfactante em meio alternativo pode ser contornada mediante a formulação de um pré-inóculo de composição mais similar à do meio alternativo, bem como através da otimização deste meio pelo uso de ferramentas de planejamento sequenciais de experimentos.

Adicionalmente, é importante levar em consideração a maior duração da fase exponencial do crescimento de *B. velezensis* em meio alternativo (15 horas) quando comparada a sua duração em meio convencional (10 horas). Considerando que a produção do biossurfactante se dá na fase estacionária do crescimento bacteriano, o pico da produção do tensoativo se daria ainda mais tarde do que o observado em meio convencional.

Em contrapartida, Sousa e colaboradores 2012, quando testaram a produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo por *B. subtilis* LAMI009, esta teve início durante a fase exponencial da curva de crescimento. Adicionalmente, sabe-se que o meio e as condições de cultivo influenciam a cinética de produção dos biossurfactantes, podendo afetar o momento no qual se inicia a biossíntese pelo microrganismo (Oliveira *et al.*, 2013). Ou seja, é possível que a fase exponencial mais longa no meio melaço não esteja associada a um início tardio da biossíntese de surfactina por *B. velezensis* H2O-1, o que contribuiria para a eficiência da produção do tensoativo mediante o uso do meio alternativo.

Inegavelmente, a cinética de crescimento é de grande impacto na biossíntese da surfactina, especialmente quando se considera a possibilidade de cultivar o microrganismo de forma a estender sua fase estacionária. Verma e colaboradores (2023b) foram capazes de

estender a fase exponencial do crescimento da cepa *Bacillus subtilis* RSL2 em um meio contendo melaço (5% m/v) até a duração de 18 dias lançando mão de um sistema semicontínuo. Os pesquisadores observaram um aumento de 1,5 vezes do rendimento da produção de biossurfactante. A cinética de crescimento de *B. velezensis* obtida sugere que esta bactéria é uma boa candidata para um sistema de produção de surfactina similar ao elaborado por Verma e colaboradores (2023b).

Ademais, determinação da concentração de surfactina nos sobrenadantes de cultivo de ambos os meios testados demonstrou que, quando cultivada em meio alternativo, a cepa de *B. velezensis* H2O-1 sintetiza menores quantidades de surfactina (220,02 mg/L) do que quando cultivada em meio convencional (294,26 mg/L) (Figura 11). Em contrapartida, a menor concentração de tensoativo no sobrenadante de meio melaço se dá apesar da maior produção de biomassa neste meio.

Na literatura, a concentração de biossurfactante produzida por *Bacillus* spp. pode variar de acordo com as condições de cultivo. Zhou e colaboradores (2019), ao cultivar *Bacillus velezensis* BS-37 durante 36 horas, obtiveram concentrações de 350 mg/L de surfactina em meio mineral contendo sacarose. Contudo, ao substituir essa fonte de carbono por glicerol, a concentração de biossurfactante aumentou para 1000 mg/L. Outro estudo, buscando avaliar a produção de tensoativo por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 em meio contendo melaço, obteve concentrações de 199,45 mg/L de surfactina após 24 horas de cultivo (Rocha *et al.*, 2021). Já Verma e colaboradores (2023b), em seu sistema semicontínuo, obtiveram um rendimento de 13.920 mg/L de biossurfactante após 21 dias de incubação.

É importante considerar que esse experimento foi realizado com amostras obtidas após 48 horas de incubação do microrganismo. Levando em consideração as diferentes cinéticas de crescimento e, conseqüentemente, os perfis cinéticos de produção de surfactina por *B. velezensis* H2O-1 em meio alternativo e em meio convencional, é possível que a menor concentração do biossurfactante no sobrenadante de meio alternativo seja resultado do período de amostragem. Isto é, para garantir que o experimento não está subestimando a capacidade de produção de surfactina por *B. velezensis* H2O-1 em meio alternativo, seria necessário avaliar a cinética de produção de surfactina nessas condições.

Alternativamente, a menor concentração de surfactina em meio alternativo pode estar associada a relação C/N do meio. Afinal, a própria bactéria é capaz de consumir o biossurfactante que anteriormente produziu como fonte de nitrogênio, quando essa se esgota no meio (Guimarães, 2015). Ou seja, é importante avaliar o impacto da relação C/N do meio

alternativo de forma que se possa assegurar que o fornecimento de nitrogênio não é um fator limitante da síntese de surfactina por *B. velezensis* nesse meio.

No que diz respeito as propriedades físico-químicas dos surfactantes, a capacidade emulsificante é o nome dado a habilidade dos tensoativos de promover a interação entre dois líquidos imiscíveis, ou seja, de estabilizar emulsões. Isso é possível mediante a formação de gotículas de um líquido imiscível em outro, as quais são recobertas por moléculas do tensoativo. Um biosurfactante é considerado um eficiente agente emulsificante quando gera valores de IE superiores a 40% (Youssef *et al.*, 2004).

Nesse contexto, a determinação do IE pode ser utilizada para a detecção de biosurfactante em solução. Entretanto, essa estratégia não é sempre confiável, tratando-se de um método de detecção dito indireto, uma vez que a capacidade emulsificante não é uma propriedade inerente de todo tensoativo e varia de acordo com o óleo utilizado (Daltin, 2011).

A quebra de emulsões, por sua vez, é resultado do processo de coalescência, descrita como a união de gotículas da fase dispersa em gotas maiores (Daltin, 2011). Durante esse processo, há o encontro de duas gotículas, formando uma bolsa entre elas, nessa bolsa inicia-se a drenagem da película de surfactante que recobre ambas as gotículas, quando essa película é suficientemente depletada há a união das gotículas.

A coalescência pode ser evitada através da redução da tensão interfacial entre as fases, o que diminui a energia necessária para a formação e manutenção de gotículas da fase dispersa na fase contínua. Ou seja, quanto maior a capacidade redutora da tensão interfacial do agente emulsificante, mais estável é a emulsão gerada (Daltin, 2011).

Lamilla e colaboradores (2018) observaram que a composição do meio de cultivo no qual um tensoativo é produzido afeta sua capacidade emulsificante. O estudo avaliou o potencial da cepa *Streptomyces luridus* So3.2 como produtora de bioemulsificante. Dentre os experimentos avaliados, foram realizados testes de índice de emulsificação envolvendo sobrenadantes de meios cultivo distintos, contendo diferentes fontes de carbono. Os autores observaram diferenças nas capacidades emulsificantes dos biosurfactantes dependendo do meio a partir dos quais foram obtidos.

Estudos anteriores atestaram que a cepa *Bacillus velezensis* KLP2016 produz, em meio LB, homólogos de surfactina que geraram IEs variando de 52,3% a 65,7% em diferentes óleos (Meena *et al.*, 2021). Rocha e colaboradores (2021) observaram que *B. subtilis* UFPEDA 438 incubada durante 24 horas em meio contendo melaço sintetizou biosurfactante com valor de IE de 62,1% em querosene. Também em meio contendo melaço, a cepa *B. subtilis* RSL2

produziu surfactina capaz de gerar os valores de IE de 72% em óleo mineral, 37% em tolueno e 13% em hexadecano (Verma *et al.*, 2023b).

Nesse cenário, a proximidade dos valores de IE do sobrenadante de meio convencional em relação aos valores obtidos para o controle positivo reafirmam a eficiência da surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 como agente emulsificante (Figura 12). Adicionalmente, sabendo que o poder emulsificante de um composto está atrelado à sua estrutura (McClements *et al.*, 2016), a diferença nos valores de IE entre os sobrenadantes de meio alternativo e o convencional sugere a produção de proporções distintas de homólogos de surfactina. Isso poderia explicar porque o sobrenadante de meio alternativo teria menor capacidade de formar emulsões.

Tendo em vista as possíveis variações de capacidade emulsificante derivadas da produção de diferentes homólogos, a avaliação da capacidade emulsificante possui relevância comparativa entre a produção no meio alternativo e no convencional. Tais variações são de grande interesse no que diz respeito às possíveis aplicabilidades do biossurfactante na indústria do petróleo (Singh, Van Hamme e Ward, 2007; Guimarães, 2019). Alternativamente, o tensoativo pode ser aplicado como agente emulsificante no preparo de fluido de perfuração para a manutenção do bom funcionamento da broca e do poço de petróleo e pode ser utilizado em soluções ácidas para o aumento da porosidade de rochas e da percolação de óleo (Daltin, 2011). Além disso, biossurfactantes tem potencial aplicabilidade como agentes emulsificantes nas indústrias têxtil, de couros, alimentícia, de cosméticos, de produtos de limpeza e de *metalworking* (Daltin, 2011).

No experimento realizado, os elevados valores de estabilidade de emulsão derivados do sobrenadante de meio alternativo são promissores após 72 horas de cultivo para a sua aplicabilidade em contextos industriais (Tabela 2). Isso se deve aos melhores desempenhos observados nos sobrenadantes deste meio conforme se aumentava o tempo de incubação, sendo a amostra de 72 horas de cultivo a que apresentou maior estabilidade. Comparativamente, as estabilidades das emulsões de sobrenadantes de meio convencional foram superiores em todos os períodos avaliados.

A maior estabilidade das emulsões derivadas de sobrenadante de meio convencional corrobora a hipótese de que este meio induz a produção de proporções distintas de homólogos de surfactina. Com isso, a surfactina produzida em meio convencional poderia ter uma maior capacidade redutora da tensão interfacial, de forma que o sobrenadante de meio alternativo gerou emulsões de menor estabilidade.

Por sua vez, os ensaios de dispersão do óleo permitem determinar se a molécula em análise promove, ou não, a redução da tensão superficial. Assim sendo, essa metodologia é amplamente utilizada para a detecção de biossurfactante em solução, especialmente por sua simplicidade de execução. Assim, como a capacidade dispersante está relacionada a redução da tensão superficial, a metodologia é considerada como técnica de detecção direta de biossurfactantes, mesmo que esses ensaios não avaliem quantitativamente a capacidade redutora da tensão superficial (Daltin, 2011). Dito isso, pode-se conferir um caráter semiquantitativo à análise mediante a obtenção dos diâmetros dos halos de dispersão do óleo gerados. Além disso, testes de dispersão de óleo podem oferecer informações importantes quando avaliando diferentes meios de cultivo para a produção de biossurfactantes, uma vez que diferentes halos de dispersão podem ser gerados por sobrenadantes de cultivo de um mesmo microrganismo cultivado em meios distintos (Lamilla *et al.*, 2018).

No experimento, a formação de halos de dispersão das amostras de meio convencional (em média 51,1 mm) comprova a produção de tensoativos por *B. velezensis* H2O-1 neste meio. O mesmo é verdade para as amostras de meio alternativo, as quais tenderam a superar os diâmetros dos halos formados pelas amostras de meio convencional (em média 69,5 mm) (Figura 13).

O melhor desempenho dos sobrenadantes de meio alternativo nesta metodologia aponta para a biossíntese de homólogos de surfactina em proporções distintas, de forma que o sobrenadante de meio convencional teria menor capacidade de dispersar o óleo bruto. Essa observação, por sua vez, sugere que os homólogos de biossurfactante de meio alternativo tendem a apresentar maior capacidade redutora da tensão superficial. Tal hipótese poderia ser confirmada mediante a caracterização e quantificação dos diferentes homólogos presentes através de Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (Perez *et al.*, 2017).

Vale ressaltar que a surfactina produzida em meio alternativo gerou halos de dispersão relativamente maiores do que o observado para *Bacillus* spp. utilizando o mesmo óleo na literatura. Um isolado de *Bacillus subtilis* MG495086 produziu lipopeptídeos capazes de promover a formação de halos de 66 mm de diâmetro (Datta, Tiwari e Pandey, 2018). Já Verma e colaboradores (2023b), ao produzir surfactina de *B. subtilis* RSL2 em meio contendo melão obteve diâmetros médios em torno de 21 mm.

Adicionalmente, nota-se uma tendência da amostra de 72 horas de cultivo em meio alternativo de gerar halos de dispersão de maior diâmetro do que as demais amostras do mesmo meio de cultivo em diferentes períodos. Isso pode ser explicado pelo início tardio da fase

estacionária de *B. velezensis* em meio alternativo, o que, sendo a fase do crescimento bacteriano onde ocorre a produção de biossurfactante, afetaria a capacidade dispersante da amostra (Sheppard e Mulligan, 1987; Jacques, 2011; Sousa *et al.*, 2012; Jahan *et al.*, 2020). Ou seja, como a síntese de surfactina ocorre mais tarde quando *B. velezensis* é cultivada em meio alternativo, é provável que haja um acúmulo maior de biossurfactante na amostra de 72 horas de cultivo, o que potencializaria a sua capacidade dispersante.

Similarmente, o melhor desempenho de amostras de 72 horas de cultivo pode estar atrelado à cinética de crescimento de *B. velezensis* em meio alternativo, caracterizada por uma fase exponencial tardia, de forma que o maior período de incubação teria permitido o acúmulo de maiores concentrações de surfactina (Jacques, 2011; Sousa *et al.*, 2012; Jahan *et al.*, 2020).

Os dados obtidos corroboram a viabilidade da produção de surfactina por *B. velezensis* H2O-1 em ambos os meios avaliados, havendo todos os sobrenadantes apresentado valores de tensão superficial inferiores ao da água ultrapura ( $\cong 72$  mN/m). Além disso, não há diferença significativa entre os valores de tensão superficial entre os sobrenadantes de meio convencional e os de meio alternativo dos tempos de 24 e 48 horas de cultivo, como visto na figura 14.

No período de 72 horas de incubação, o sobrenadante de meio convencional apresenta menores valores de tensão superficial em relação ao sobrenadante de meio alternativo no mesmo período. Isso ocorre apesar da maior produção de biomassa observada em meio alternativo e contrapondo os achados semiquantitativos do teste de dispersão do óleo. A tendência dos sobrenadantes de meio alternativo de apresentar maiores valores de tensão superficial pode estar relacionada à produção de proporções distintas de homólogos de surfactina em comparação ao meio convencional (Sun *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2023b).

Os valores de tensão superficial obtidos de ambos os meios deste estudo foram inferiores aos observados em outros trabalhos focados na avaliação da produção de surfactina de *Bacillus* spp.. Esses achados já foram observados tanto em meios com fontes sintéticas quanto fontes alternativas de carbono. Moshtagh e colaboradores (2019) utilizaram resíduos de cervejaria para o crescimento de *B. subtilis* N3-1P, gerando sobrenadante com tensão superficial de 27,3 mN/m. Goswami e Deka (2019), observaram tensões de 32,3 mN/m ao cultivar *B. altitudinis* MS16 em meio sintético contendo glucose. Singh e Sharma (2020) ao inocular *B. tequilensis* SDS21 em um meio sintético contendo sacarose obtiveram sobrenadante com tensão superficial de 30 mN/m. Por sua vez, Meena e colaboradores (2021) produziram surfactina de *B. velezensis* KLP2016 em meio LB capaz de levar a tensão superficial à 40 mN/m.

Outros estudos que relataram a síntese de biossurfactantes com maior capacidade de reduzir a tensão superficial, mesmo utilizando fontes alternativas de carbono nos meios de cultivo. Verma e colaboradores (2020), por exemplo, cultivaram *B. subtilis* RSL2 em meio contendo melaço para a produção de surfactina. Foi observado que o sobrenadante resultante teve impressionantes 24,1 mN/m de tensão superficial. Apesar disso, pode-se dizer que a surfactina produzida no meio alternativo proposto neste trabalho se mostra promissora como alternativa a surfactantes químicos, tendo satisfatória capacidade redutora da tensão superficial.

A CMC é considerada a principal característica físico-química de um tensoativo, tratando-se da concentração a partir da qual tem início a formação de micelas de um surfactante em solução (Barbosa *et al.*, 2022). Afinal, assim que ultrapassada a CMC, as moléculas adquirem um novo comportamento, o que está diretamente relacionado com as possíveis aplicações do surfactante (Daltin, 2011; La Mesa e Risuleo, 2021).

Os gráficos de DMC gerados (Figura 15 – A e B) atestam o comportamento de soluções de tensoativos de acordo com a variação de concentração dessas moléculas. Em baixas concentrações, soluções de surfactantes apresentam grandes variações de tensão superficial, a qual decresce rapidamente conforme se aumenta a quantidade de tensoativo. Em concentrações mais altas, que ultrapassam a CMC do surfactante, a tensão superficial da solução mantém-se aproximadamente constante (La Mesa e Risuleo, 2021; Barbosa *et al.*, 2022).

No ensaio realizado, observou-se que a DMC do sobrenadante de meio convencional é superior à do sobrenadante de meio alternativo. De modo geral, podemos dizer que esse resultado era esperado, uma vez que a concentração de surfactina no sobrenadante de meio alternativo foi menor que a concentração em sobrenadante de meio convencional. Dessa forma, este deve ser mais diluído para que atinja a barreira entre concentrações a partir da qual se deixa de observar a formação de micelas.

Uma vez obtidos os valores de CMC das amostras através de suas DMCs e concentrações de biossurfactante em solução, nota-se que o sobrenadante de meio alternativo tem CMC menor do que o sobrenadante de meio convencional (Figura 15 – C). Assim, pode-se afirmar que o meio alternativo gerou proporções de homólogos de surfactina de maior eficiência (5,11 mg/L) do que os gerados por *B. velezensis* H2O-1 em meio convencional (6,52 mg/L). Uma vez que, quanto menor o valor de CMC de um surfactante, maior a sua eficiência, pois uma menor concentração de surfactante é necessária para diminuir a tensão superficial (Mulligan, 2005; La Mesa e Risuleo, 2021).

A estrutura química de um tensoativo em solução tem grande impacto na sua CMC, de forma que os diferentes valores de CMC observados são possíveis devido a biossíntese de diferentes proporções de homólogos de surfactina dependendo do meio de cultivo utilizado. O tamanho da cadeia carbônica é uma das principais variações estruturais que afetam a CMC, havendo decréscimo desta a cada adição de um grupo metila na cadeia (Holmberg *et al.*, 2002; Khalfallah, Kriaa e Hedhli, 2018; Baccile e Poirier, 2022). Assim, sabendo que os diferentes homólogos de surfactina podem variar quanto ao comprimento de sua cadeia de ácido graxo de C<sub>12</sub> a C<sub>16</sub>, gera-se a hipótese de que a menor CMC observada no sobrenadante de meio alternativo está relacionada a indução da biossíntese de homólogos de surfactina de cadeias de ácido graxo maiores por este meio (Yang *et al.*, 2015).

Além disso, em comparação com outras espécies de *Bacillus*, a CMC de *B. velezensis* H2O-1 observada em ambos os meios é significativamente menor. A CMC de *B. subtilis* N3-1P cultivada em meio contendo resíduos de cervejaria é 107 mg/L, a de *B. tequilensis* SDS21 em meio sintético contendo sacarose é de 40 mg/L e a de *B. subtilis* RSL2 em meio contendo melão é 80 mg/L (Moshtagh *et al.*, 2019; Singh e Sharma, 2020; Verma *et al.*, 2020). Entretanto, os achados de Meena e colaboradores (2021) sugerem que uma alta eficiência é uma característica da surfactina produzida por cepas de *B. velezensis*, uma vez que a CMC que obtiveram do cultivo de *B. velezensis* KLP2016 em meio LB foi de impressionantes 17,2 µg/mL.

Visando uma futura aplicação industrial da surfactina sintetizada por *B. velezensis* em meio alternativo, torna-se necessária a análise da estabilidade a longo prazo do biossurfactante. Afinal, a durabilidade do biossurfactante deve ser alta para que a manutenção do produto em estoque seja possível, de forma que esteja prontamente disponível para uso (Marchant e Banat, 2012).

Uma vez atestada a estabilidade da surfactina após 5 dias de armazenamento à -20 °C, períodos mais longos entre análises foram introduzidos. Nota-se que o biossurfactante manteve sua capacidade redutora da tensão superficial constante durante todos os 165 dias do experimento (Figura 16). Similarmente, os valores de tensão superficial das amostras liofilizadas ressuspensas permaneceram constantes durante todos os 140 dias de análise (Figura 17). Tais resultados são especialmente atrativos quando se leva em consideração que não foram feitas quaisquer alterações à formulação dos sobrenadantes brutos para a conservação do lipopeptídeo, como a adição de conservantes.

Avaliando comparativamente o desempenho do congelamento direto e a liofilização dos sobrenadantes autoclavados, tem-se que ambos os métodos conservaram equiparavelmente a surfactina nos períodos testados. Contudo, a liofilização é uma metodologia marcada por vantagens que o congelamento não possui. Tratando-se de uma técnica de remoção à vácuo de 95% a 99.5% da água de um produto congelado, a produtos liofilizados estão associados a maior facilidade de manuseio, transporte e armazenamento facilitados devido à redução do volume e possibilidade do armazenamento à temperatura ambiente, reduzindo gastos com refrigeração (Gaidhani *et al.*, 2015).

Silva e colaboradores (2019) avaliaram a estabilidade a longo prazo do biosurfactante de *Pseudomonas cepacia* CCT6659 mediante diferentes métodos de conservação. Após medições da tensão superficial de amostras de 15, 30, 45, 90, e 120 dias de armazenamento à temperatura ambiente, os pesquisadores concluíram que as técnicas mais apropriadas foram tindalização fracionada e a adição de sorbato de potássio à formulação.

Com isso, mesmo que os resultados obtidos sejam satisfatórios para a aplicabilidade do biosurfactante na indústria do petróleo, outros testes envolvendo diferentes técnicas de conservação da surfactina produzida por *B. velezensis* H20-1 em meio alternativo podem ser realizados. Afinal, determinar a compatibilidade do produto com diferentes técnicas de conservação, viabilizaria o uso da surfactina em outros setores. Similarmente, a avaliação de formulações de biosurfactante com diversos conservantes, como o conservante alimentício sorbato de potássio, abre portas para a aplicação da surfactina em outras indústrias.

A aplicabilidade da surfactina produzida por *B. velezensis* em meio alternativo como agente de biocontrole da biocorrosão no setor petroquímico foi testada. A bioatividade da surfactina produzida foi avaliada com base no seu efeito inibitório do desgaste de superfícies de aço, bem como da formação de biofilme nessas superfícies. Afinal, a CIM é um processo dependente da estruturação de um biofilme maduro e representa cerca de 40% de toda a corrosão interna de dutos na indústria do petróleo (Muthukumar, 2014).

As micrografias eletrônicas de varredura dos biofilmes formados nos cupons de aço mostram que a surfactina derivada de cultivo em meio alternativo interfere no processo de formação de biofilme em comparação ao controle (Figuras 19 e 20). O biosurfactante, tanto quando adicionado diretamente a água de produção (Reator SS), quanto no condicionamento de cupons (Reator CS), promoveu uma menor cobertura de biofilme após 13 dias de incubação. Adicionalmente, houve biofilmes de superfícies do aço de RSS que apresentaram morfologias distintas dos demais.

A menor cobertura de cupons de aço por biofilme notada no Reator SS está de acordo com a coloração distinta percebida neste reator em comparação aos demais (Figura 18). Tais observações podem estar associadas à ação antimicrobiana da surfactina contra bactérias presentes na água de produção, potencialmente incluindo BRS, como indicam os achados de Korenblum *et al.*, (2012) e Guimarães (2019). Dessa forma, a adição direta de lipopeptídeo à água de produção, ao inibir o crescimento de bactérias da água de produção, comprometeria também a capacidade formadora de biofilme da comunidade microbiana do biorreator, levando a cobertura de uma menor área da superfície de aço.

Alternativamente, a menor cobertura das superfícies de aço desse biorreator por biofilme pode ser resultado da modificação hidrofobicidade da superfície metálica, assim como da superfície celular dos microrganismos presentes na água de produção. Esse efeito pode ter sido ocasionado pela surfactina adicionada, como teorizado por Guimarães (2019) ao avaliar a capacidade antibiofilme do biosurfactante produzido em meio convencional. Sendo assim, a adição direta do tensoativo ao reator levaria a alteração da interação da superfície das bactérias presentes na água de produção com a superfície de adesão, comprometendo a formação de biofilme.

As distinções dos biofilmes observados nos cupons de aço do Reator SS também sugerem que a adição direta de lipopeptídeo à água de produção pode levar ao retardo do crescimento de algumas das bactérias da água de produção. Ou seja, com a proliferação comprometida dessas espécies, torna-se possível a formação de biofilmes cuja composição é dominada por outros microrganismos, resultando nas diferentes morfologias observadas nas Figuras 19 – F e 20 – F. Isso ocorre porque a estrutura dos biofilmes é moldada tanto pelas condições ambientais quanto por fatores intrínsecos como as suas composições química e microbiológica (Maukonen *et al.*, 2003; Araujo, Freire e Nitschke, 2013). Para melhor compreender esses resultados, análises filogenéticas das comunidades microbianas são necessárias.

Ao avaliar a inibição da formação de biofilme pela surfactina de *B. velezensis* em meio convencional, Guimarães (2019) também observou coloração distinta no biorreator que recebeu biosurfactante diretamente na água de produção. Também foi observada a formação de biofilme menos espesso em relação ao visualizado no Reator Controle. Esse achado vai ao encontro com as hipóteses da ação antimicrobiana contra bactérias presentes na água de produção quanto capacidade comprometedor da adesão celular da surfactina enquanto agente inibidor da formação de biofilme. Além disso, diferentemente do que foi atestado neste

trabalho, Guimarães (2019) não notou maior cobertura ou espessura do biofilme em amostragens mais tardias. Conclui-se que o sobrenadante de meio alternativo parece apresentar redução em sua capacidade inibitória da formação de biofilmes à medida que o tempo de incubação aumenta. Esse efeito pode ser atribuído da menor concentração de surfactina nesse sobrenadante em comparação ao de meio convencional. Assim, a depleção de biossurfactante no RSS que recebeu sobrenadante de meio alternativo ocorre mais cedo, potencialmente antes da adição de mais surfactina, levando ao comprometimento da sua atividade inibitória da formação de biofilme. Dessa forma, deve-se padronizar a concentração de surfactina adicionada ao Reator SS para que seja a mesma que foi utilizada por Guimarães (2019) quando avaliando o sobrenadante de meio convencional.

Guimarães (2019) também notou que o condicionamento com surfactina sintetizada em meio convencional de superfícies de aço carbono promove a redução da sua hidrofobicidade. Complementarmente, Araujo e colaboradores (2016) atestam que a hidrofobicidade é considerada o principal fator que influencia a formação de biofilme, de forma que a adsorção de biossurfactantes à inibe a formação de biofilme nessa superfície. Com isso, entende-se a redução da área da superfície de aço coberta por biofilme dos cupons do Reator CS em relação ao Reator Controle. Entretanto, diferentemente do que foi observado por Guimarães (2019) com a surfactina sintetizada em meio convencional, a surfactina de meio alternativo adsorvida às superfícies de aço parece perder sua capacidade inibitória da formação de biofilme conforme se aumenta o tempo de incubação. Tal perda pode ser resultado da menor concentração de biossurfactante neste meio, ou ainda das propriedades das proporções de homólogos de surfactina produzidos nele.

As micrografias eletrônicas de varredura das superfícies de aço dos cupons mostram que a surfactina derivada de cultivo em meio alternativo interfere no processo de biocorrosão quando comparadas ao controle (Figuras 21 e 22). O biossurfactante, tanto quando adicionado diretamente a água de produção (Reator SS) quanto no condicionamento de cupons (Reator CS), limitou o desgaste das superfícies de aço em ambos os períodos de amostragem do experimento.

Vale ressaltar que em todos os cupons levados a biorreatores foi observada a formação de pites, corrosão localizada e característica da ação de BRS sobre aço (Tsarovtceva *et al.*, 2023). Tal resultado aponta para a formação de biofilme e, conseqüentemente, corrosão induzida por bactérias da água de produção.

Apesar disso, é importante destacar que as intervenções realizadas nos cupons dos reatores RSS e RCS retardaram o processo de biocorrosão em comparação aos cupons do Reator Controle. Estes últimos apresentaram maior degradação das superfícies de aço e formação de pites mais pronunciados, especialmente na amostragem do 25º dia de incubação, que ainda continha restos celulares nos pontos de corrosão localizada. Tais resultados podem ser explicados pelo comprometimento da formação de biofilme mediante a adição direta de surfactina à água de produção ou até pelo condicionamento dos cupons, seja através da atividade antimicrobiana do biosurfactante contra bactérias presentes na água de produção ou por sua ação redutora da hidrofobicidade e, conseqüentemente, da adesão celular.

Adicionalmente, embora a intervenção do Reator SS tenha sido mais eficaz em comprometer a formação de biofilmes, foi o condicionamento das superfícies de aço levadas ao Reator CS que promoveu o maior retardo da corrosão, com a formação de menos pites. Esse efeito pode ser atribuído a um potencial mecanismo protetor da adsorção de surfactina contra o ataque de  $S^{-2}$  derivado do metabolismo de bactérias da água de produção, possivelmente incluindo BRS, sobre a superfície metálica. Conforme relatado por Araujo, Freire e Nitschke (2013), a formação de uma película de moléculas de biosurfactantes sobre superfícies metálicas confere a elas proteção da interação com íons  $H^{+}$  e  $O_2$ , evitando a corrosão.

Apesar de suas comprovadas propriedades antibiofilme, antimicrobiana e anticorrosiva, a surfactina de *Bacillus velezensis* H2O-1 ainda não é utilizada em larga escala na indústria do petróleo, em parte devido aos elevados custos de produção (Korenblum *et al.*, 2005, 2012; Guimarães, 2019; Nazareth *et al.*, 2021). Nesse contexto, o presente estudo contribuí ao propor um meio alternativo a base de melão de menor custo, demonstrando sua capacidade de promover o crescimento da bactéria e a produção de homólogos de surfactina com propriedades tensoativas satisfatórias. Como perspectiva, é necessária a análise da composição das comunidades microbianas dos biofilmes, o estudo da cinética de produção do biosurfactante nesse meio, a avaliação de outras técnicas de conservação da biomolécula, a otimização do novo meio proposto e a análise econômica do processo para comprovar a redução de custo e viabilidade econômica da aplicação do meio alternativo em escala industrial.

## 7. CONCLUSÕES

- A utilização do melaço como fonte de carbono do meio de cultivo alternativo permitiu o crescimento de *Bacillus velezensis* H2O-1. Ademais, o meio contendo melaço superou o meio alternativo em quantidade de biomassa produzida.
- O cultivo de *B. velezensis* H2O-1 em meio alternativo tem fase Lag mais duradoura e fase exponencial mais longa.
- A concentração de surfactina produzida no meio proposto, embora satisfatória, foi relativamente menor do que a concentração do lipopeptídeo em meio convencional otimizado.
- As propriedades tensoativas dos homólogos produzidos em meio alternativo foram satisfatórias e equiparáveis às observadas nos homólogos sintetizados em meio convencional.
- A surfactina de *B. velezensis* H2O-1 se destaca em relação a sua capacidade redutora da tensão superficial e a menor CMC quando comparada aos biossurfactantes derivados de outras espécies de *Bacillus*.
- O lipopeptídeo produzido é estável a longo prazo mediante conservação a -20 °C.
- A surfactina produzida em meio alternativo apresentou ação antibiofilme e anticorrosiva contra bactérias presentes na água de produção mediante o condicionamento de superfícies de aço ou a adição direta de surfactina à água de produção. Contudo, em comparação aos resultados obtidos pelo biossurfactante sintetizado em meio convencional, as intervenções deste trabalho tiveram efeitos mais amenos.

Os resultados indicam que o meio proposto se mostra promissor como estratégia para possivelmente reduzir os custos de produção da surfactina, mantendo propriedades análogas às observadas em meio convencional. Entretanto, outras análises se fazem necessárias, tais como a análise econômica do processo, a otimização do meio proposto por meio de ferramentas de planejamento sequenciais de experimentos, a elaboração da cinética de produção da surfactina

em meio alternativo, análises filogenéticas das comunidades microbianas dos biofilmes, a avaliação das propriedades antiaderentes e anticorrosivas do biossurfactante mediante padronização da sua concentração para que seja a mesma utilizada por Guimarães (2019), a análise qualiquantitativa dos homólogos de surfactina produzidos mediante Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas e testes envolvendo mais técnicas de conservação do biossurfactante produzido.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeniji, A. A., Loots, D. T., e Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3669-3682.
- Alam, M. S., Siddiq, A. M., Natarajan, D., Kiran, M. S., e Baskar, G. (2019). Physicochemical properties and bioactivity studies of synthesized counterion coupled (COCO) gemini surfactant, 1, 6-bis (N, N-hexadecyldimethylammonium) adipate. *Journal of Molecular Liquids*, 273, 16-26.
- Almeida, D. G., Soares da Silva, R. D. C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M., e Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in microbiology*, 7, 230300.
- Al-Moubaraki, A. H., e Obot, I. B. (2021). Corrosion challenges in petroleum refinery operations: Sources, mechanisms, mitigation, and future outlook. *Journal of Saudi Chemical Society*, 25, 101370.
- Araujo, L. V. D., Freire, D. M. G., e Nitschke, M. (2013). Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova*, 36, 848-858.
- Araujo, L. V., Guimarães, C. R., da Silva Marquita, R. L., Santiago, V. M., Souza, M. P., Nitschke, M., e Freire, D. M. G. (2016). Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*, 63, 171-178.
- Atta, D. Y., Negash, B. M., Yekeen, N., e Habte, A. D. (2021). A state-of-the-art review on the application of natural surfactants in enhanced oil recovery. *Journal of Molecular Liquids*, 321, 114888.
- Baccile, N., e Poirier, A. (2022). Microbial biobased amphiphiles (Biosurfactants): General aspects on CMC, surface tension and phase behaviour. *Biosurfactants*.
- Badmus, S. O., Amusa, H. K., Oyehan, T. A., e Saleh, T. A. (2021). Environmental risks and toxicity of surfactants: overview of analysis, assessment, and remediation techniques. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-20.
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., e Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, 5, 122316.
- Barbosa, F. G., Ribeaux, D. R., Rocha, T., Costa, R. A., Guzman, R. R., Marcelino, P. R., Lacerda, T. M., e Silva, S. S. D. (2022). Biosurfactants: Sustainable and versatile molecules. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33, 870-893.
- Barros, F. F. C., Quadros, C. P. D., Maróstica Júnior, M. R., e Pastore, G. M. (2007). Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*, 30, 409-414.
- Bartal, A., Vigneshwari, A., Bóka, B., Vörös, M., Takács, I., Kredics, L., Manczinger, L., Varga, M., Vágvölgyi, C., e Szekeres, A. (2018). Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain. *Molecules*, 23, 2675.
- Basan, M., Honda, T., Christodoulou, D., Hörl, M., Chang, Y. F., Leoncini, E., Mukherjee, A., Okano, H., Taylor, B. R., Silverman, J. M., Sanchez, C., Williamson, J. R., Paulsson, J., Hwa, T., e Sauer, U. (2020). A universal trade-off between growth and lag in fluctuating environments. *Nature*, 584, 470-474.
- Chauhan, M. K., Chaudhary, S., e Kumar, S. (2011). Life cycle assessment of sugar industry: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 3445-3453.
- Chen, W. C., Juang, R. S., e Wei, Y. H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158-169.
- Chilingar, G. V., Mourhatch, R., e Al-Qahtani, G. D. (2013). *The fundamentals of corrosion and scaling for petroleum & environmental engineers*. Elsevier.
- Cooper, D. G., Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53, 224-229.
- Couto, C. R., de Azevedo Jurelevicius, D., Alvarez, V. M., van Elsas, J. D., e Seldin, L. (2016). Response of the bacterial community in oil-contaminated marine water to the addition of chemical and biological dispersants. *Journal of environmental management*, 184, 473-479.
- Daltin, D. (2011). *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. Editora Edgard Blücher Ltda.

- Datta, P., Tiwari, P., e Pandey, L. M. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource technology*, 270, 439-448.
- Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., e Paquot, M. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152, 3-10.
- Deotale, S. M., Dutta, S., Moses, J. A., e Anandharamkrishnan, C. (2023) Foaming and defoaming—concepts and their significance in food and allied industries: a review. *Discover Chemical Engineering*, 9.
- Desai, J. D., e Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61, 47-64.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., e Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 925.
- El-Monem, M. A., Shaban, M. M., Migahed, M. A., e Khalil, M. M. H. (2020). Synthesis, characterization, and computational chemical study of aliphatic tricationic surfactants as corrosion inhibitors for metallic equipment in oil fields. *ACS omega*, 5, 26626-26639.
- Exactitude Consultancy (2023). Mercado de biossurfactantes por tipo (glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios, poliméricos, outros), aplicação (cuidados pessoais, produtos de limpeza e detergentes industriais, processamento de alimentos, indústria petrolífera, produtos químicos agrícolas, outros) e por região Tendências e previsões globais de 2022 a 2029. Disponível em: <<https://exactitudeconsultancy.com/pt/relat%C3%B3rios/26083/mercado-de-biossurfactantes/#report-details>>. Acesso em 10/11/2024.
- Fadel, M., Keera, A. A., Mouafi, F. E., e Kahil, T. (2013). High level ethanol from sugar cane molasses by a new thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain in industrial scale. *Biotechnology research international*, 2013, 253286.
- Farias, C. B. B., Almeida, F. C., Silva, I. A., Souza, T. C., Meira, H. M., Soares da Silva, R. C. F., Luna, J. M., Santos, V. A., Converti, A., Banat, I. M., e Sarubbo, L. A. (2021). Production of green surfactants: Market prospects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 51, 28-39.
- Fernandes, N. A. T., Simões, L. A., e Dias, D. R. (2023). Comparison of biodegradability, and toxicity effect of biosurfactants with synthetic surfactants. In *Advancements in biosurfactants research* (pp. 117-136). Cham: Springer International Publishing.
- Firozjahi, A. M., e Saghafi, H. R. (2020). Review on chemical enhanced oil recovery using polymer flooding: Fundamentals, experimental and numerical simulation. *Petroleum*, 6, 115-122.
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., e Wuertz, S. (2023). The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology*, 21, 70-86.
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., e Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying—a review. *World J. Pharm. Res*, 4, 516-543.
- Gaur, V. K., Sharma, P., Sirohi, R., Varjani, S., Taherzadeh, M. J., Chang, J. S., Yong Ng, H., Wong, J. W. C., e Kim, S. H. (2022). Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresource technology*, 343, 126059.
- Geissler, M., Heravi, K. M., Henkel, M., e Hausmann, R. (2019). Lipopeptide biosurfactants from *Bacillus* species. Em *Biobased surfactants* (pp. 205-240). AOCs Press.
- Gentil, V. (2011). Corrosão. Em: *Corrosão induzida por microrganismos* Gentil, V., eds. 6. ed. (Rio de Janeiro, LTC)
- Ghosh, S., Ray, A., e Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, 106429.
- Goswami, M., e Deka, S. (2019). Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 285-296.
- Groysman, A. (2017). Corrosion problems and solutions in oil, gas, refining and petrochemical industry. *KOM—Corrosion and Material Protection Journal*, 61, 100-117.

- Guimarães, C. R. (2015). Avaliação da produção de surfactina-like por *Bacillus* sp. H2O-1. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 116 f.
- Guimarães, C. R. (2019). Produção e caracterização do biosurfactante de *Bacillus* sp. H2O-1 e suas diferentes aplicações na indústria do petróleo. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 168 f.
- Guimarães, C. R., Pasqualino, I. P., da Mota, F. F., Godoy, M. G., Seldin, L., Castilho, L. V. A., e Freire, D. M. G. (2019). Surfactin from *Bacillus velezensis* H2O-1: Production and Physicochemical Characterization for Postsalt Applications. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22, 451-462.
- Guimarães, C. R., Pasqualino, I. P., Sousa, J. S., Nogueira, F. C. S., Seldin, L., Castilho, L. V. A. e Freire, D. M. G. (2021). *Bacillus velezensis* H2O-1 surfactin efficiently maintains its interfacial properties in extreme conditions found in post-salt and pre-salt oil reservoirs. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, 208, 112072.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., e Lindman, B. (2002). *Polymers in aqueous solution*. Wiley-Blackwell.
- Inès, M., Mouna, B., Marwa, E., e Dhouha, G. (2023). Biosurfactants as emerging substitutes of their synthetic counterpart in detergent formula: efficiency and environmental friendly. *Journal of Polymers and the Environment*, 31, 2779-2791.
- Ingham, B., Wongsirichot, P., Ets, K., e Winterburn, J. (2023). A comprehensive screening platform of wood-derived sugars for sophorolipid production: Predictive modelling, sterilization methods and analysis of feedstock composition. *Biochemical Engineering Journal*, 197, 108984.
- Jacques, P. (2011). Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp. *Biosurfactants: from genes to applications*, 57-91.
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., e Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in colloid and interface science*, 275, 102061.
- Jiang, C., Chen, X., Lei, S., Zhao, H., Liu, Y., e Shi, J. (2017). 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*, 23, 350-358.
- Joe, M. M., Bradeeba, K., Parthasarathi, R., Sivakumaar, P. K., Chauhan, P. S., Tipayno, S., Benson, A., e Sa, T. (2012). Development of surfactin based nanoemulsion formulation from selected cooking oils: Evaluation for antimicrobial activity against selected food associated microorganisms. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43, 172-180.
- Jurelevicius, D., von der Weid, I., Korenblum, E., Valoni, E., Penna, M., e Seldin, L. (2008). Effect of nitrate injection on the bacterial community in a water-oil tank system analyzed by PCR-DGGE. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 251-255.
- Kadhim, A., Al-Amiery, A. A., Alazawi, R., Al-Ghezi, M. K. S., e Abass, R. H. (2021). Corrosion inhibitors. A review. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 10, 54-67.
- Kale, S. N., e Deore, S. L. (2017). Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 8, 39.
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Ramu Dirisala, V., e Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4, 241-249.
- Khalfallah, A., Kriaa, A., e Hedhli, A. (2018). Influence of the hydro/fluorocarbon chain length on CMC and HLB of surface-active nonionic surfactants containing polyethylene glycol groups. *Tenside Surfactants Detergents*, 55, 246-251.
- Khan, M. A. A., Hussain, M., e Djavanroodi, F. (2021). Microbiologically influenced corrosion in oil and gas industries: A review. *International Journal of Corrosion and Scale Inhibition*, 10, 80-106.
- Kim, J. H., Oh, Y. R., Hwang, J., Kang, J., Kim, H., Jang, Y. A., Lee, S. S., Hwang, S. Y., Park, J., e Eom, G. T. (2021). Valorization of waste-cooking oil into sophorolipids and application of their methyl hydroxyl branched fatty acid derivatives to produce engineering bioplastics. *Waste Management*, 124, 195-202.
- Kisil, O. V., Trefilov, V. S., Sadykova, V. S., Zvereva, M. E., e Kubareva, E. A. (2023). Surfactin: its biological activity and possibility of application in agriculture. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 59, 1-13.

- Korenblum, E., von Der Weid, I., Santos, A. L. S., Rosado, L., Sebastián, G. V., Coutinho, C. M. L. M., Magalhães, F. C. M., Paiva, M. M., e Seldin, L. (2005). Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 667-675.
- Korenblum, E., Araujo, L. V., Guimarães, C. R., De Souza, L. M., Sasaki, G., Abreu, F., Nitschke, M., Lins, U., Freire, D. M. G., Barreto-Bergter, E., e Seldin, L. (2012). Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. *BMC microbiology*, 12, 1-13.
- La Mesa, C., e Risuleo, G. (2021). On Concept of Hybrid in Colloid Sciences. *Colloids and Interfaces*, 5, 33.
- Lamilla, C., Braga, D., Castro, R., Guimarães, C., Castilho, L., Freire, D. M., e Barrientos, L. (2018). *Streptomyces luridus* So3. 2 from Antarctic soil as a novel producer of compounds with bioemulsification potential. *PLoS one*, 13, e0196054.
- Le Mire, G., Siah, A., Brisset, M. N., Gaucher, M., Deleu, M., e Jijakli, M. H. (2018). Surfactin protects wheat against *Zymoseptoria tritici* and activates both salicylic acid-and jasmonic acid-dependent defense responses. *Agriculture*, 8, 11.
- Li, S., Xu, H., Yu, J., Wang, Y., Feng, X., e Ouyang, P. (2013). Enhancing isomaltulose production by recombinant *Escherichia coli* producing sucrose isomerase: culture medium optimization containing agricultural wastes and cell immobilization. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36, 1395-1405.
- Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang, H., Kokare, C. R., Zhou, X., Wang, J., Dai, H., Song, F., Liu, M., Wang, J., Wang, S., e Zhang, L. (2010). Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 1881-1893.
- Marchant, R., e Banat, I. M. (2012). Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in biotechnology*, 30, 558-565.
- Massarweh, O., e Abushaikha, A. S. (2020). The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances. *Energy Reports*, 6, 3150-3178.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., e Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 327-356.
- McClements, D. J., e Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26.
- McLaughlin, M. C., Borch, T., McDevitt, B., Warner, N. R., e Blotvogel, J. (2020). Water quality assessment downstream of oil and gas produced water discharges intended for beneficial reuse in arid regions. *Science of the total environment*, 713, 136607.
- Meena, K. R., Dhiman, R., Singh, K., Kumar, S., Sharma, A., Kanwar, S. S., Mondal, R., Das, S., Franco, O. L., e Mandal, A. K. (2021). Purification and identification of a surfactin biosurfactant and engine oil degradation by *Bacillus velezensis* KLP2016. *Microbial Cell Factories*, 20, 1-12.
- Morikawa, M., Hirata, Y., e Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488, 211-218.
- Moshtagh, B., Hawboldt, K., e Zhang, B. (2019). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental technology*.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133, 183-198.
- Muthukumar, N. (2014). Petroleum products transporting pipeline corrosion—a review. *The Role of colloidal systems in environmental protection*, 527-571.
- NACE International, (2016). The 2016 IMPACT study. Disponível em: <http://impact.nace.org/>. Acesso em 10/11/2024.
- Nazareth, T. C., Zanutto, C. P., Maass, D., de Souza, A. A. U., e Ulson, S. M. D. A. G. (2021). Bioconversion of low-cost brewery waste to biosurfactant: an improvement of surfactin production by culture medium optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108058.

- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J. A., Khan, S., e Khan, W. (2017). Characterization and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*, 7, 1-19.
- Núñez-Caraballo, A., García-García, J. D., Ilyina, A., Flores-Gallegos, A. C., Michelena-Álvarez, L. G., Rodríguez-Cutiño, G., Martínez-Hernández, J. L., e Aguilar, C. N. (2019). Alcoholic beverages: Current situation and generalities of anthropological interest. *Processing and sustainability of beverages*, 37-72.
- Olajire, A. A. (2020). Recent advances on the treatment technology of oil and gas produced water for sustainable energy industry-mechanistic aspects and process chemistry perspectives. *Chemical Engineering Journal Advances*, 4, 100049.
- Oliveira, D. W. F., França, Í. W. L., Félix, A. K. N., Martins, J. J. L., Giro, M. E. A., Melo, V. M. M., e Gonçalves, L. R. B. (2013). Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101, 34-43.
- Otzen, D. E. (2017). Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: same but different?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859, 639-649.
- Pereira, J. F., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A., e Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259-268.
- Perez, K. J., Viana, J. D. S., Lopes, F. C., Pereira, J. Q., Santos, D. M., Oliveira, J. S., Velho, R. V., Crispim, S. M., Nicoli, J. R., Brandelli, A., e Nardi, R. M. (2017). *Bacillus* spp. isolated from puba as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. *Frontiers in microbiology*, 8, 61.
- Pessôa, M. G., Vespermann, K. A., Paulino, B. N., Barcelos, M. C., Pastore, G. M., e Molina, G. (2019). Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnology advances*, 37, 319-339.
- Petkova, B., Tcholakova, S., Chenkova, M., Golemanov, K., Denkov, N., Thorley, D., e Stoyanov, S. (2020). Foamability of aqueous solutions: Role of surfactant type and concentration. *Advances in colloid and interface science*, 276, 102084.
- Phaodee, P., e Weston, J. (2023). Implementing the hydrophilic–lipophilic deviation model when formulating detergents and other surfactant-related applications. *Journal of Surfactants and Detergents*, 26, 277-286.
- Plaza, G., e Achal, V. (2020). Biosurfactants: Eco-friendly and innovative biocides against biocorrosion. *International journal of molecular sciences*, 21, 2152.
- Prabha, S. S., Rathish, R. J., Dorothy, R., Brindha, G., Pandiarajan, M., Al-Hashem, A., e Rajendran, S. (2014). Corrosion problems in petroleum industry and their solution. *Eur. Chem. Bull*, 3, 300-307.
- Procópio, L. (2022). Microbially induced corrosion impacts on the oil industry. *Archives of Microbiology*, 204, 138.
- Pugh, R. J. (1996). Foaming, foam films, antifoaming and defoaming. *Advances in colloid and interface science*, 64, 67-142.
- Qi, X., Liu, W., He, X., e Du, C. (2023). A review on surfactin: molecular regulation of biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 205, 313.
- Rabbee, M. F., Ali, M. S., Choi, J., Hwang, B. S., Jeong, S. C., eye Baek, K. H. (2019). *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 24, 1046.
- Rebello, S., Asok, A. K., Mundayoor, S., e Jisha, M. S. (2014). Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental chemistry letters*, 12, 275-287.
- Reid, S. J., e Abratt, V. R. (2005). Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 312-321.
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., e Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36, e3030.
- Rocha, P. M., Mendes, A. C. S., Oliveira Júnior, S. D., Padilha, C. E. A., Leitão, A. L. O. S., Nogueira, C. C., Macedo, G. R., e Santos, E. S. (2021). Kinetic study and characterization of surfactin production by *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 using sugarcane molasses as carbon source. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51, 300-308.

- Rocky-Salimi, K., Hashemi, M., Safari, M., e Mousivand, M. (2017). Valorisation of untreated cane molasses for enhanced phytase production by *Bacillus subtilis* K46b and its potential role in dephytinisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 222-229.
- Rodrigues, M. S., Moreira, F. S., Cardoso, V. L., e de Resende, M. M. (2017). Soy molasses as a fermentation substrate for the production of biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 18699-18709.
- Rokni, M. S., Halajnia, A., Lakzian, A., e Housaindokht, M. R. (2022). Sugar beet molasses bioconversion into biosurfactant: optimization and comparison with other carbon sources. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I., e Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 191-195.
- Salager, J. L. (1988). Detergencia: fenómenos y mecanismos. Cuaderno FIRP S331-A. Universidad de Los Andes (ULA). Mérida, 1-15.
- Salager, J. L., e Fernández, A. (1993). Surfactantes en solución acuosa. Cuaderno FIRP S201-A. Universidad de Los Andes (ULA). Mérida, 3-16.
- Salager, J. L. (1999). Formulación, Composición y Fabricación de Emulsiones para Obtener las Propiedades deseadas: Estado del Arte. Cuaderno FIRP S747-B. Universidad de Los Andes (ULA). Mérida, 4-21.
- Sarubbo, L. A., Lunaa, J. M., e Rufinoa, R. D. (2015). Application of a biosurfactant produced in low-cost substrates in the removal of hydrophobic contaminants. *Chemical Engineering*, 43, 295-300.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., e Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20, 608-620.
- Schmidt, V. K. O., de Vasconcelos, G. M. D., Vicente, R., de Souza Carvalho, J., Della-Flora, I. K., Degang, L., Oliveira, D., e de Andrade, C. J. (2023). Cassava wastewater valorization for the production of biosurfactants: surfactin, rhamnolipids, and mannosileritritol lipids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39, 65.
- Schramm, L. L., Stasiuk, E. N., e Marangoni, D. G. (2003). 2 Surfactants and their applications. *Annual Reports Section "C"(Physical Chemistry)*, 99, 3-48.
- Shaban, S. M., Kang, J., e Kim, D. H. (2020). Surfactants: Recent advances and their applications. *Composites communications*, 22, 100537.
- Sharma, J., Sundar, D., e Srivastava, P. (2021). Biosurfactants: potential agents for controlling cellular communication, motility, and antagonism. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 727070.
- Sheppard, J. D. e Mulligan, C. N. (1987). The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 110-116.
- Singh, A., Van Hamme, J. D., e Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology advances*, 25, 99-121.
- Singh, A. K., e Sharma, P. (2020). Disinfectant-like activity of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus tequilensis* strain SDS21. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110514.
- Silva, R. D. C. F., Almeida, D. G., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., e Sarubbo, L. A. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International journal of molecular sciences*, 15, 12523-12542.
- Slivinski, C. T., Mallmann, E., Araújo, J. M., Mitchell, D. A., e Krieger, N. (2012). Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process biochemistry*, 47, 1848-1855.
- Silva, R. D. C. F., Almeida, D. G., Brasileiro, P. P. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., e Sarubbo, L. A. (2019). Production, formulation and cost estimation of a commercial biosurfactant. *Biodegradation*, 30, 191-201.
- Song, B., e Springer, J. (1996). Determination of interfacial tension from the profile of a pendant drop using computer-aided image processing: 2. Experimental. *Journal of colloid and interface science*, 184, 77-91.

- Sousa, M., Melo, V. M. M., Rodrigues, S., Sant'Ana, H. B., e Gonçalves, L. R. B. (2012). Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 897-906.
- Sun, D., Liao, J., Sun, L., Wang, Y., Liu, Y., Deng, Q., Ning, Z., Xu, D., Fang, Z., Wang, W., e Gooneratne, R. (2019). Effect of media and fermentation conditions on surfactin and iturin homologues produced by *Bacillus natto* NT-6: LC-MS analysis. *AMB Express*, 9, 1-9.
- Sundaram, T., Govindarajan, R. K., Vinayagam, S., Krishnan, V., Nagarajan, S., Gnanasekaran, G. R., Baek, K. H.e Rajamani Sekar, S. K. (2024). Advancements in biosurfactant production using agro-industrial waste for industrial and environmental applications. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1357302.
- Tran, T. T. T., Kannoopatti, K., Padovan, A., e Thennadil, S. (2021). Effect of pH regulation by sulfate-reducing bacteria on corrosion behaviour of duplex stainless steel 2205 in acidic artificial seawater. *Royal Society open science*, 8, 200639.
- Tsarovtceva, I. M., Bryukhanov, A. L., Vlasov, D. Y., e Maiyoroova, M. A. (2023). Biocorrosion of metal alloys. *Power Technology and Engineering*, 57, 203-208.
- Verma, R., Sharma, S., Kundu, L. M., e Pandey, L. M. (2020). Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101632.
- Verma, C., Hussain, C. M., Quraishi, M. A., e Alfantazi, A. (2023). Green surfactants for corrosion control: Design, performance and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 311, 102822.
- Verma, R., Sharma, S., Kundu, L. M., Maiti, S. K., e Pandey, L. M. (2023). Enhanced production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* RSL2 in semicontinuous bioreactor utilizing molasses as a sole substrate. *Journal of Biotechnology*, 362, 24-35.
- Venkataramani, D., Tsulaia, A., e Amin, S. (2020). Fundamentals and applications of particle stabilized emulsions in cosmetic formulations. *Advances in Colloid and Interface Science*, 283, 102234.
- Wang, Z., Li, H., Feng, J., Zhang, A., Ying, H., He, X., Jiang, M., Chen, K., e Ouyang, P. (2018). Enhanced succinic acid production from polyacrylamide-pretreated cane molasses in microbial electrolysis cells. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93, 855-860.
- Wang, Z. P., Wang, Q. Q., Liu, S., Liu, X. F., Yu, X. J., e Jiang, Y. L. (2019). Efficient conversion of cane molasses towards high-purity isomaltulose and cellular lipid using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain in fed-batch fermentation. *Molecules*, 24(7), 1228.
- Wu, L., Wu, S., Qiu, J., Xu, C., Li, S., e Xu, H. (2017). Green synthesis of isomaltulose from cane molasses by *Bacillus subtilis* WB800-pHA01-pall in a biologic membrane reactor. *Food chemistry*, 229, 761-768.
- Yadav, R., Singh, M., Shekhawat, D., Lee, S. Y., e Park, S. J. (2023). The role of fillers to enhance the mechanical, thermal, and wear characteristics of polymer composite materials: A review. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 175, 107775.
- Yang, H., Li, X., Li, X., Yu, H., e Shen, Z. (2015). Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 2529-2542.
- Yang, R., Lei, S., Xu, X., Jin, H., Sun, H., Zhao, X., Pang, B., e Shi, J. (2020). Key elements and regulation strategies of NRPSs for biosynthesis of lipopeptides by *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8077-8087.
- Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F., e Wang, Z. (2018). Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS chemical biology*, 13, 500-505.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., e McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56, 339-347.
- Zembyla, M., Murray, B. S., e Sarkar, A. (2020). Water-in-oil emulsions stabilized by surfactants, biopolymers and/or particles: A review. *Trends in Food Science e Technology*, 104, 49-59.
- Zhang, S., Wang, J., e Jiang, H. (2021). Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. *Food chemistry*, 346, 128860.

Zhuang, X., Wang, Y., Li, Q., Yan, S., e He, N. (2012). The production of bioflocculants by *Bacillus licheniformis* using molasses and its application in the sugarcane industry. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 1041-1047.

Zhou, D., Hu, F., Lin, J., Wang, W., e Li, S. (2019). Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d-/l-leucine. *MicrobiologyOpen*, 8, e00794.

Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X., e Pan, J. (2020). Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Frontiers in microbiology*, 11, 589640.

## ANEXOS

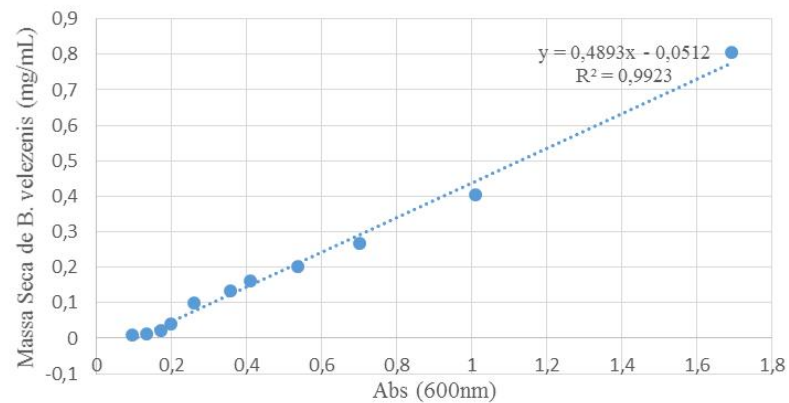
## Anexo 1

## ➤ Meio pré-inóculo

Composição (% m/v)	
Glicose	1,0
NaCl	1,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20
MgSO <sub>4</sub>	0,020
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,10
Extrato de levedura	0,050

## Anexo 2

## ➤ Curva de calibração



**Anexo 1:** Expressa a relação a partir de uma linha de tendência entre a absorvância do meio de cultivo e a sua respectiva massa seca de *B. velezensis* H2O-1 (Guimarães, 2015; 2019).

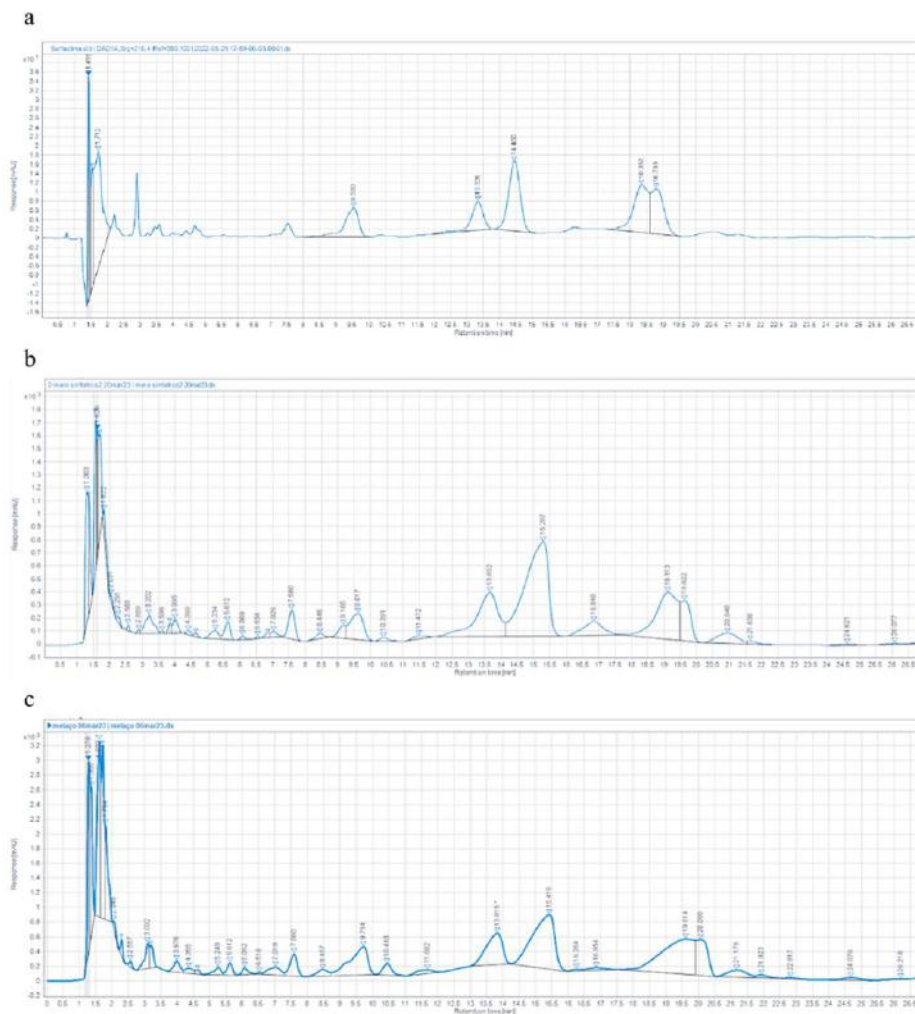
### Anexo 3

- Diluições da cinética de crescimento (UFC)

Tempo (horas)	Diluição
0	$10^0$
12	$10^{-1}$
24	$10^{-4}$
36	$10^{-6}$
48	$10^{-6}$
60	$10^{-6}$
72	$10^{-6}$

### Anexo 4

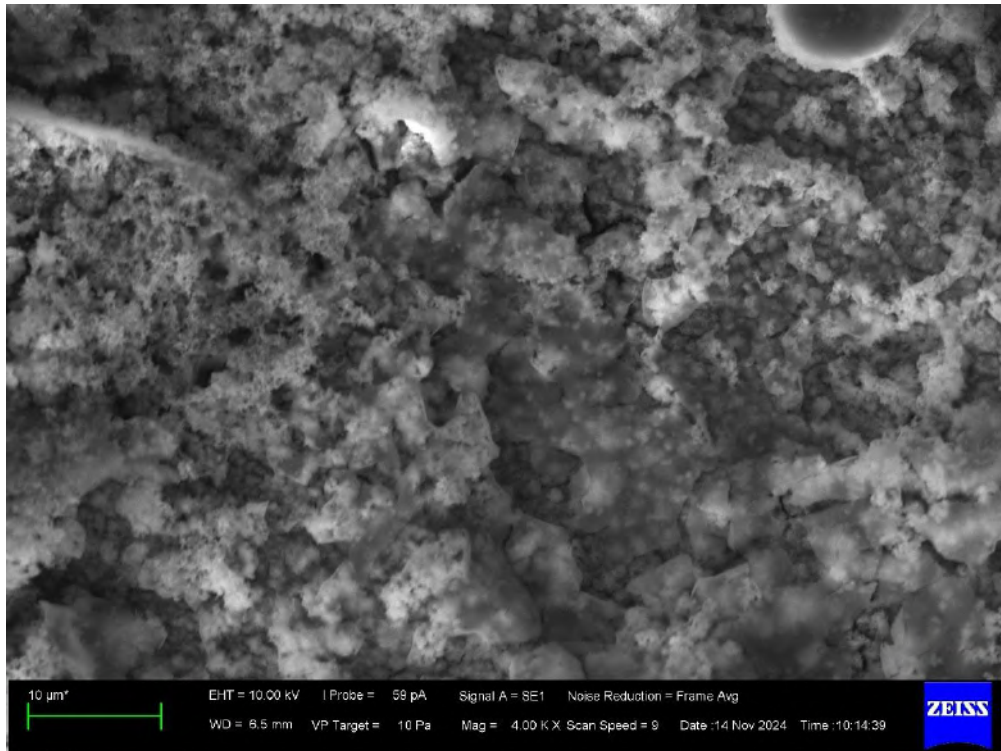
- Cromatogramas de surfactina



**Anexo 4:** A. Perfil cromatográfico da solução padrão de surfactina, apresentando picos característicos. B. Cromatograma da surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 do sobrenadante de meio convencional. C. Cromatograma da surfactina produzida por *B. velezensis* H2O-1 do sobrenadante de meio alternativo.

## Anexo 5

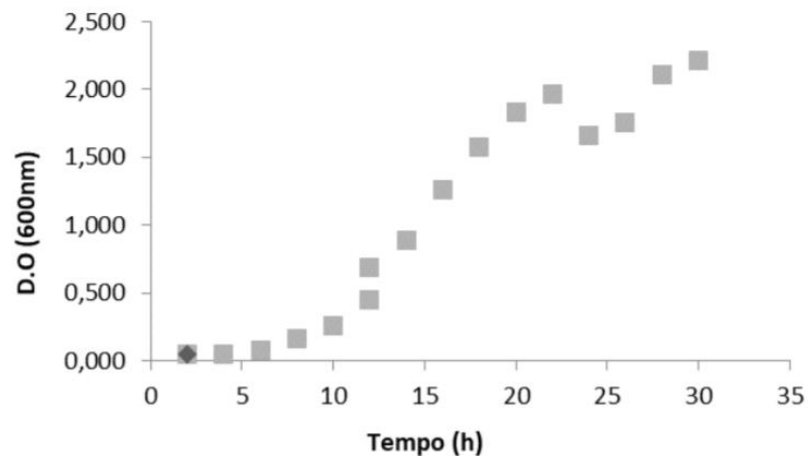
- Restos celulares em ponto de pite



**Anexo 5:** Micrografia eletrônica de varredura de cupom do Reator Controle da segunda amostragem (25 dias) mostrando restos celulares encontrados em um pite (buraco).

## Anexo 6

- Curva de crescimento de *B. velezensis* H2O-1 em meio convencional



**Anexo 6:** Curva de crescimento de *Bacillus velezensis* H2O-1 em meio convencional (Guimarães, 2019).