

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Letícia Moura Pestana

Luiza de Sousa Lomba



FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE AÇÚCAR VHP
EMPREGANDO LINHAGEM DE *BACILLUS SUBTILIS*: EFEITO
DO SUPRIMENTO DE OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO E
PROPRIEDADES DO BIOSURFACTANTE

RIO DE JANEIRO

2023

Letícia Moura Pestana

Luiza de Sousa Lomba

FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE AÇÚCAR VHP EMPREGANDO
LINHAGEM DE *BACILLUS SUBTILIS*: EFEITO DO SUPRIMENTO DE OXIGÊNIO
NA PRODUÇÃO E PROPRIEDADES DO BISSURFACTANTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico e Engenheiro de Bioprocessos.

Orientador(es): Prof^ª. Dr^ª. Eliana Flávia Camporese Sérvulo
Prof. Dr. Vitor da Silva Liduino

Rio de Janeiro

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

L839f

Lomba, Luiza de Sousa; Pestana, Letícia Moura
FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE AÇÚCAR VHP
EMPREGANDO LINHAGEM DE BACILLUS SUBTILIS:EFEITO DO
SUPRIMENTO DE OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO E PROPRIEDADES
DO BIODISSURFACTANTE / Letícia Moura Pestana, Luiza de
Sousa Lomba. -- Rio de Janeiro, 2023.
80 f.

Orientadora: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Coorientador: Vítor da Silva Liduino.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia de Bioprocessos,
2023.

1. Bioprocessos. 2. Bioproduto. 3. Oxigênio
dissolvido. 4. Surfactante biológico. 5. Tensoativo. I.
Sérvulo, Eliana Flávia Camporese, orient. II. Liduino,
Vítor da Silva, 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.

Letícia Moura Pestana

Luiza de Sousa Lomba


FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE AÇÚCAR VHP EMPREGANDO
LINHAGEM DE *BACILLUS SUBTILIS*: EFEITO DO SUPRIMENTO DE OXIGÊNIO
NA PRODUÇÃO E PROPRIEDADES DO BIOSSURFACTANTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Química da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro
Químico e Engenheiro de Bioprocessos.


Aprovado em 21 de julho de 2023.




Prof^a. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc, UFRJ



Prof. Vitor da Silva Liduino, D. Sc, UFRJ

Documento assinado digitalmente
 VICTOR RAFAEL LEAL DE OLIVEIRA
Data: 26/07/2023 19:40:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Victor Rafael Leal Oliveira, D. Sc, UFRJ

Documento assinado digitalmente
 DOUGLAS GUEDES FERREIRA
Data: 26/07/2023 19:29:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Douglas Guedes Ferreira, D. Sc, UFRJ

Rio de Janeiro
2023

RESUMO

PESTANA, Letícia Moura; LOMBA, Luiza de Sousa. **Fermentação submersa a partir de açúcar VHP empregando linhagem de *Bacillus subtilis*: efeito do suprimento de oxigênio na produção e propriedades do biossurfactante**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Os biossurfactantes são moléculas biológicas de caráter anfifílico produzidos por microrganismos e que, assim como os surfactantes químicos, apresentam propriedades como redução da tensão superficial, capacidade de formação de espuma, emulsificação, capacidade de estabilizar emulsões, solubilidade e detergência. Essa variedade de propriedades permite que os biossurfactantes apresentem uma ampla possibilidade de aplicações, como na área alimentícia, biomédica, farmacêutica, de cosméticos, entre outros. O presente trabalho propôs a síntese de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em biorreatores operando a 30°C e pH 7,0, com velocidade de agitação e taxa de aeração variáveis (0 a 250 rpm e 0 a 2 vvm, respectivamente). A fim de verificar a influência da taxa de oxigênio dissolvido no processo, o biossurfactante produzido foi analisado de acordo com as seguintes propriedades: tensão superficial, índice de emulsificação, estabilidade de espuma e molhabilidade. Os maiores teores de oxigênio dissolvido estão relacionados aos meios que receberam aeração e agitação simultaneamente. Entretanto, considerando que a propriedade tensoativa de um biossurfactante está ligada à capacidade de reduzir a tensão superficial do meio para valores menores que 35 mN/m, foi possível verificar que todas as condições testadas produziram um bioproduto com ótima característica tensoativa, visto que a tensão superficial foi reduzida para valores entre 27 e 30 mN/m. Contudo, o mesmo produto não apresentou um bom desempenho emulsificante, visto que após 24 horas de repouso os índices de emulsificação ficaram abaixo de 50%, valor mínimo para sua classificação como bom emulsificante. A exceção foi emulsão formada pelo mosto fermentado e petróleo bruto. Além disso, todos os biossurfactantes demonstraram grande formação de espuma e boa característica de molhabilidade, com destaque para o experimento conduzido apenas com agitação. Assim, os resultados obtidos permitem verificar que os ensaios realizados com ausência de aeração promoveram a síntese de um biossurfactante com propriedades semelhantes daqueles obtidos em meios aerados, o que permite concluir que a taxa de aeração não é uma variável imprescindível ao processo. Isso se traduz em uma vantagem econômica, visto que esse parâmetro representa até 25% do custo total dos bioprocessos industriais.

Palavras-chave: 1. Bioprocessos. 2. Bioproduto. 3. Oxigênio dissolvido. 4. Surfactante biológico. 5. Tensoativo.

ABSTRACT

PESTANA, Letícia Moura; LOMBA, Luiza de Sousa. **Fermentação submersa a partir de açúcar VHP empregando linhagem de *Bacillus subtilis*: efeito do suprimento de oxigênio na produção e propriedades do biossurfactante**. Rio de Janeiro, 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química e Engenharia de Bioprocessos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Biosurfactants are biological molecules of amphiphilic character produced by microorganisms and which, like chemical surfactants, have properties such as surface tension reduction, foaming capacity, emulsification, ability to stabilize emulsions, solubility, and detergency. This variety of properties allows biosurfactants to present various applications, such as in the food, biomedical, pharmaceutical, and cosmetic industries. The present work proposed biosurfactant synthesis by *Bacillus subtilis* in bioreactors operating at 30°C and pH 7.0, with variable agitation speed and aeration rate (0 to 250 rpm and 0 to 2 vvm, respectively). To verify the influence of dissolved oxygen rate on the bioprocess, the produced biosurfactants were analyzed following surface tension, emulsification index, foam stability, and wettability properties. The highest dissolved oxygen contents are related to the media that received simultaneous aeration and agitation. However, considering that a good biosurfactant can reduce the surface tension to values lower than 35 mN/m, it was possible to verify that all the conditions tested produced prosperous bioproducts since the surface tensions of the media were reduced to values between 27 and 30 mN/m. Despite that, it is highlighted that satisfactory emulsifying indexes (EI₂₄) were not achieved. The exception was the index obtained using biosurfactant and crude oil. In addition, all bioproducts showed excellent foaming and good wettability characteristics. Thus, it was possible to verify that the tests carried out without aeration resulted in a biosurfactant with properties similar to aerated media. This result allows us to conclude that the aeration rate is not an essential variable in this bioprocess. It may be an economic advantage since aeration represents up to 25% of the total cost of industrial bioprocesses.

Keywords: 1. Bioprocesses. 2. Bioproduct. 3. Dissolved oxygen. 4. Biological surfactant. 5. Tensioactive.

SUMÁRIO

1	Introdução	14
2	Objetivo	17
3	Revisão Bibliográfica	18
3.1	Biossurfactantes/Bioemulsificantes	18
3.1.2	Propriedades dos Biossurfactantes	22
3.2	Classificação dos Biossurfactantes	27
3.3	Microrganismos produtores de Biossurfactantes	33
3.4	Fatores que afetam a produção de surfactina	36
3.4.1	Fatores Nutricionais	36
3.4.2	Fatores Ambientais	40
3.5	Levantamento científico da produção de surfactina	42
3.6	Aplicações da surfactina	42
4	Materiais e Métodos	43
4.1	Microrganismo	43
4.2	Manutenção e ativação da cultura	44
4.3	Meio de cultura	45
4.3.1	Meio de crescimento	45
4.3.2	Meio de produção	45
4.4	Preparo do inóculo	46
4.5	Produção do Biossurfactante	47
4.5.1	Reator DASbox	47
4.5.6	Reator CSTR	50
4.5	Recuperação do BS	51
4.6	Métodos Analíticos	52
4.6.1	Tensão Superficial	52
4.6.2	Índice de Emulsificação	54
4.6.3	Estabilidade da Espuma	54
4.6.4	Ângulo de Contato	55
4.6.5	pH	55

4.6.6 Oxigênio Dissolvido	55
5 Resultados e Discussão.....	56
5.1 Produção de Biossurfactante	56
5.1.1 Reator Sistema DasBOX.....	59
5.1.2 Biorreator CSTR.....	61
6 Conclusões.....	74
7 Referências Bibliográficas	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da molécula com regiões apolares (hidrofóbicas) e polares (hidrófilas). Fonte: Santos, 2016.	19
Figura 2: Formação de micelas. Fonte: Dave e Joshi, 2017.....	21
Figura 3: Regiões em que ocorre a formação de micelas (concentração micelar crítica). Fonte: Santos, 2016.	22
Figura 4: Representação das forças intermoleculares: (A) tensão superficial (fases líquido- ar) e (B) Tensão interfacial (líquidos imiscíveis). Fonte: Clegg, 2009.....	24
Figura 5: Representação da molhabilidade em função do ângulo de contato. Fonte: Adaptado de Schramm, 2003.....	25
Figura 6: Principais tipos de biossurfactantes. Fonte: Adaptada de Lou et al, 2021.	27
Figura 7: Principais lipopeptídeos com ação tensoativa. Fonte: Mongkolthanaruk, 2012...	29
Figura 8: Estruturas químicas de surfactinas. Fonte: Hu, Liu e Li, 2019.	31
Figura 9: Diferentes tipos de biossurfactantes e potenciais grupos microbianos empregados para sua produção. Fonte: Marinho et al., 2022.	34
Figura 10: Morfologia microscópica de preparação de <i>Bacillus subtilis</i> coradas pela técnica de coloração diferencial de Gram, onde se evidencia a presença de esporângios (a). Fonte: Sohail et al., 2019.	36
Figura 11: Açúcar VHP. Fonte: Usina Granelli.	39
Figura 12: Setores de aplicação e propriedades exploradas da surfactina. Fontes: Adaptação de Jacques, 2010; Meena e Kanwar, 2015.....	43
Figura 13: Morfologia macroscópica da linhagem <i>Bacillus subtilis</i> LFB 732 utilizada no experimento. Fonte: Autoria própria	44
Figura 14: Modelo esquemático de um reator DASbox. Fonte: Eppendorf.....	48
Figura 15: Aspecto visual do meio fermentado em tubo Falcon, antes (esquerda) e depois (direita) de centrifugado a 10.000 rpm e 4 °C, por 10 min. Fonte: Autoria Própria.	52
Figura 16: Equipamento utilizado para determinar a tensão superficial pelo método da Placa de Wilhelmy. Fonte Autoria Própria.	53
Figura 17: Desenho esquemático do método da Placa de Wilhelmy. Fonte: Burin e Sturn, 2014.	53
Figura 18: Imagem ilustrativa do medidor de oxigênio MO 920, utilizado no experimento. Fonte: Itest.	56
Figura 19: Produção de BS por linhagem de <i>B.subtilis</i> LFB362, conduzida em sistema DASbox decorridas 24 horas de fermentação: experimento 1 (esquerda) e experimento 3 (direita) conforme primeira matriz de planejamento experimental. Fonte: Autoria Própria.	60

Figura 20: Produção de BS por linhagem de B.subtilis LFB362, conduzida em sistema DASbox decorridas 24 horas de fermentação, onde se evidencia o vazamento de meio pelos filtros de ar. Fonte: Autoria Própria.....	60
Figura 21: Gráfico com os valores de Tensão Superficial obtidos durante os 30 minutos de análise. Fonte: Autoria Própria.....	63
Figura 22: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Hexadecano como hidrocarboneto. Fonte: Autoria Própria.....	65
Figura 23: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Petróleo como hidrocarboneto. Fonte: Autoria Própria.....	66
Figura 24: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Óleo Mineral como hidrocarboneto. Fonte: Autoria Própria.....	67
Figura 25: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Óleo Vegetal como hidrocarboneto. Fonte: Autoria Própria.....	67
Figura 26: Aspecto da espuma de cada produto logo após a agitação. Fonte: Autoria Própria.....	68
Figura 27: Aspecto da espuma de cada produto 1 hora após a agitação. Fonte: Autoria Própria.....	69
Figura 28: Aspecto da espuma de cada produto 2 horas após a agitação. Fonte: Autoria Própria.....	69
Figura 29: Aspecto da espuma de cada produto 3 horas após a agitação. Fonte: Autoria Própria.....	70
Figura 30: Aspecto da espuma de cada produto 24 horas após a agitação. Fonte: Autoria Própria.....	70
Figura 31: Gráfico altura de espuma versus tempo de cada experimento. Fonte: Autoria Própria.....	71
Figura 32: Imagem do experimento 1 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.....	73
Figura 33: Imagem do experimento 2 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.....	73
Figura 34: Imagem do experimento 3 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.....	73
Figura 35: Imagem do experimento 4 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.....	74
Figura 36: Imagem do experimento 5 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição do meio de crescimento.....	45
Quadro 2: Composição do meio de produção.....	46
Quadro 3: Composição da solução tampão Sörensen $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 6,643)	46
Quadro 4: Matriz do planejamento experimental	49
Quadro 5: Segunda Matriz do planejamento experimental	50
Quadro 6: Experimentos conduzido em reator CSTR para avaliar o efeito do teor inicial de OD.	51
Quadro 7: Valores de oxigênio dissolvido determinados nos meios fermentados para as condições testadas de aeração/agitação.....	61
Quadro 8: Altura (cm) da espuma medida nos respectivos tempos de repouso.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Valores de tensão superficial para distintas condições de aeração e agitação testadas.....	63
Tabela 2:Valor obtido para o ângulo de contato para cada amostra.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BS	Biossurfactantes
BE	Bioemulsificantes
CMC	Concentração Micelar Crítica
LP	Lipopeptídeo
TS	Tensão Superficial
TI	Tensão Interfacial
aa	aminoácidos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
C	carbono
t	toneladas
a/a	Ao ano
OD	Oxigênio dissolvido
T	Temperatura
IE	Índice de emulsificação
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio
CSTR	<i>Continuous Stirred-Tank Reactor</i>

1 Introdução

Desde fins da década de 70, quando surgiram as primeiras publicações a respeito dos tensoativos de origem microbiana, denominados biossurfactantes, vêm crescendo o número de pesquisas sobre o tema (SOBERÓN-CHÁVEZ; HAUSMANN, DEZIEL 2021; TATO et al, 2021 BACCILE; POIRIER, 2022; ERAS-MUÑOZ et al, 2022). De acordo com Soberón-Chávez, Hausmann e Déziel (2021), em 2020 foram publicados 344 artigos científicos, enquanto em 2000 foram menos de 20 publicações indexadas na PubMed, base de dados de busca de livre acesso de citações e resumos de artigos de investigação.

Os biossurfactantes (BS), tal qual seus análogos químicos, são substâncias anfifílicas, ou seja, apresentam em sua estrutura uma região hidrofílica ou polar (solúvel em meio aquoso) e outra hidrofóbica ou apolar, que devido à capacidade de promover a redução das tensões superficiais e interfaciais entre fluidos imiscíveis pode ser empregada em uma variada gama de aplicações (ERAS-MUÑOZ et al, 2022). Adicionalmente, foi demonstrado que algumas destas biomoléculas apresentam alta atividade emulsificante, caracterizando-as como bioemulsificantes (BE). Assim, tanto os biossurfactantes quanto os bioemulsificantes são considerados compostos tensoativos pela capacidade de ambos de modificar superfícies (ARAUJO et al, 2022).

A síntese de biomoléculas anfifílicas por diferentes microrganismos foi comprovada por vários pesquisadores. Estes também constataram ser a estrutura molecular das diferentes moléculas biossintetizadas dependente da linhagem microbiana e das condições de cultivo. Por esta razão, é possível obter diversas propriedades físico-químicas e papéis fisiológicos e, por conseguinte, podem atuar com distintas funções específicas nos ambientes onde os microrganismos produtores se encontram ou serem empregados para atender variadas aplicações industriais. (ABBASI et al, 2012; DAS; YANG; MA, 2014; SINGH; RAUTELA; CAMEOTRA, 2014; PARDHI et al, 2022).

A crescente atenção que vem sendo dada aos BS se deve às várias vantagens sobre os surfactantes sintéticos, como baixa toxicidade, menor concentração micelar crítica (CMC), que é definida como a concentração mínima de surfactante relacionada com a menor tensão superficial, biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019), o que possibilitaria a substituição dos surfactantes químicos, cuja maioria é

reconhecidamente tóxica para os seres vivos e recalcitrante. Entretanto, mais recentemente, outras propriedades específicas já foram reportadas para os BS, tais como atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral, anti-adesão e inibidor da formação de biofilmes. Ademais, são reportados como importantes para inibição da patogênese bacteriana vinculadas a instrumentos biomédicos, além de favorecer a dissolução de compostos insolúveis em água, complexação com metais pesados, e dessorção de contaminantes de superfícies (UZOIGWE et al, 2015; GAUR et al, 2019; JAHAN et al, 2020; HOSSEINI; TAHMASEBI, 2020; BJERCK et al, 2021; CERESA et al, 2021; GIUGLIANO et al, 2021; KIM et al, 2021; KUMARI et al, 2021; MANGA et al, 2021; PUELLES et al, 2021; BARBOSA et al, 2022; SILVA; SARUBBO, 2022). A capacidade multifuncional e propriedades ambientalmente seguras e sustentáveis, posicionam os BS e BE como as moléculas “verdes” do século XXI, como apontam Mujumdar, Joshi e Karve (2019).

O emprego dos surfactantes químicos é fundamental para a produção industrial de detergentes, têxteis, tintas, polímeros, fármacos, pesticidas, papel, produtos de higiene pessoal, entre outros (REBELLO et al, 2013; 2014; JISHA, 2014; BADMUS et al, 2021). Um levantamento realizado no ano de 2021, indicou que o mercado global dos surfactantes químicos equivalia em torno de 42 bilhões de dólares, com estimativa de ultrapassar 52 bilhões de dólares até 2025 (BADMUS et al, 2021). Além disso, segundo estes autores, essa perspectiva está longe da realidade uma vez que não contempla o aumento da produção global desses surfactantes pelo intenso uso destes produtos após a pandemia da COVID-19. Onde a necessidade de substituí-los por substâncias que sejam igualmente eficazes, mas não agridam o ambiente, tampouco causem toxicidade para os seres vivos.

Dentre os BS, os lipopeptídeos (LP), definidos como moléculas de baixa massa molecular, formadas por peptídeos curtos ligados a um anel com cauda lipídica ou outra molécula lipofílica, despertam grande interesse biotecnológico devido às propriedades já mencionadas, englobando ação emulsificante, antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ; BENAUD; FERRARI, 2021). A estrutura destas biomoléculas garante versatilidade para aplicação em vários setores industriais, abrangendo o processamento de alimentos, cosméticos, fármacos, produtos agrícolas,

tratamento de efluentes para remoção de metais pesados, biorremediação de hidrocarbonetos e para prevenir a formação de biofilmes, como anteriormente referendado.

Em geral, os LP são metabólitos secundários produzidos por bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, e fungos, com espécies isoladas dos mais diferentes ambientes (KAUFFMAN; JENSEN; FENICAL, 2007; HERATH et al, 2009; BEKIESCH et al, 2020; GUTIÉRREZ-CHÁVEZ; BENAUD; FERRARI, 2021). São várias as estruturas identificadas, embora basicamente os LP sejam constituídos de um peptídeo cíclico associado a um ácido graxo linear ou ramificado, com diferentes números de átomos de carbono e grau de oxidação (AHIMOU; JACQUES; DELEU, 2008).

O nosso grupo de pesquisa vem estudando a síntese de LP por linhagem de *Bacillus subtilis*, já tendo desenvolvido um meio de cultura de baixo custo, contendo açúcar VHP como fonte de carbono, e concentrações mínimas de nutrientes demandados pela linhagem bacteriana (SANTIAGO, 2019). O açúcar VHP ou *Very High Polarization sugar* é um açúcar bruto com processamento muito semelhante ao açúcar cristal, ou seja, o tratamento do caldo sofre poucas etapas, e não passa pelo processo de sulfitação. Em geral, este tipo de açúcar é exportado para ser refinado ou é utilizado como matéria-prima para outros processos (MACEDO, 2015). Entre 2021 e 2022, o preço deste *commodity* variou de 560 a 580 dólares a tonelada (sugar brazil fob ports indices | commodity3.com).

A escolha da matéria-prima para um processo fermentativo é fundamental visto seu custo poder elevar em 20 a 25% o preço final do bioproduto (FERREIRA; AZZONI; FREITAS, 2018; SAKHUJA et al, 2021; Cuadrado-Osorio et al, 2022; VOOGT et al, 2023). Isto sem contar a necessidade de transporte e respectivo custo, além do requerimento de suplementação para atender às necessidades nutricionais para adequada atividade metabólica do microrganismo produtor.

A produção economicamente vantajosa de um bioproduto também deve considerar outros parâmetros fermentativos. Em particular, a demanda de oxigênio, devido aos altos custos para promover a aeração de processos submersos aerados (HUMBIRDA; DAVIS; MCMILLANB, 20). Alguns BS podem ser produzidos em condições de cultivo aerado e não aerado (DESAI; BANAT, 1997; FAKRUDDIN, 2012; DE et al, 2015; SANTOS et al, 2016;

REIS et al, 2018; ZHAO et al, 2018). Contudo, já foram observadas variações no rendimento e na produtividade do bioprocesso, bem como na diversidade estrutural do BS produzido em função da concentração de oxigênio suprida ao meio reacional (KRONEMBERGER et al, 2007; PATTANATHU; RAHMAN; ZHAO et al, 2018).

Entretanto, as publicações científicas neste tema ainda são escassas. Em trabalho de final de curso (VIANA, 2022) foi constatada a possibilidade de obter surfactina por *B. subtilis* LFB 732 a partir de açúcar VHP com pouca suplementação nutricional indiferentemente da tensão de oxigênio. Viana e colaboradores (2022) observou que houve uma melhora das propriedades da surfactina produzida pelo suprimento de oxigênio, embora uma quantidade similar de surfactina com propriedades semelhantes tenha sido obtida quando o processo fermentativo foi conduzido sob agitação e sem aeração. Como o trabalho foi conduzido em frascos Schott Duran® de 500 mL de capacidade, com e sem aeração com compressores de ar, não foi possível determinar a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no meio de cultivo.

2 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a produção do biosurfactante lipopeptideo pela linhagem *Bacillus subtilis* LFB 732 a partir de meio à base de açúcar VHP, previamente otimizado para redução de custos, em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Com este propósito, foram contemplados os seguintes objetivos específicos:

- Testar o emprego de diferentes configurações de biorreatores convencionais de bancada tipo tanque agitado e aerado a fim de permitir combinações variadas de vazões de ar e velocidades de agitação;
- Estimar o efeito do oxigênio dissolvido na tensão superficial do meio fermentado;
- Determinar a molhabilidade, pela medição do ângulo de contato, a fim de comparar os mostos fermentados nos diferentes teores de oxigênio dissolvido;
- Avaliar a atividade emulsificante dos biosurfactantes produzidos nas distintas concentrações de oxigênio frente a substâncias orgânicas insolúveis em água;

- Avaliar a estabilidade da espuma de cada meio fermentado produzido nas diferentes condições.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Biossurfactantes/Bioemulsificantes

Os biossurfactantes (BS) são moléculas biológicas produzidas por vegetais, animais e microrganismos que, tal qual os surfactantes de origem química, contêm em sua estrutura conjuntamente regiões hidrofílica e hidrofóbica, como ilustrado na Figura 1. Por conseguinte, são denominadas substâncias anfipáticas ou anfifílicas (BARBOSA et al, 2022). Vários trabalhos já demonstraram o potencial de espécies de bactérias, actinobactérias, leveduras e fungos filamentosos de metabolizar uma variedade de substratos com geração de metabólitos de diferentes estruturas químicas e propriedade tensoativa (PUTRI; HERTADI, 2014; SARAFIN et al, 2014; MENESES et al, 2017; ARIFIANTO et al., 2020; GÜRKÖK; ÖZDAL, 2021; SAIKIA; DEKA; SARMA, 2021; SANCHES et al, 2021; SILVA et al., 2021; STAINSBY; HODAR; VAUGHAN, 2022; DIAS; NITSCHKE, 2023). Embora escassos, estudos já reportaram a capacidade de cianobactérias e microalgas em também produzir biomoléculas anfipáticas (MISHRA; KAVITA; JHA, 2011; de PANIAGUA-MICHEL et at., 2014).

Em geral, na região hidrofílica dos biossurfactantes microbianos tem-se peptídeos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou grupos alcoólicos; enquanto ácidos graxos de cadeia longa, ácidos graxos hidroxilados, ácidos graxos α -alquil- β -hidroxila, entre outros, compõem a parte hidrofóbica (SANTOS et al., 2016; ABBOT et al., 2022). Mesmo assim, vários tipos de estruturas já foram identificados, diferentemente do que ocorre para os surfactantes químicos (KLÜGER et al, 2015). Isto porque a via metabólica de síntese destas biomoléculas é dependente da espécie produtora, mas também pode ser influenciada pelo substrato disponibilizado e condições culturais estabelecidas para o processo (NURFARAHIN; MOHAMED; PHANG, 2018; SANCHES et al, 2021).

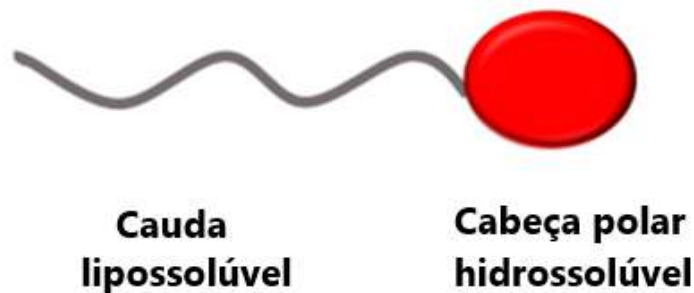


Figura 1: Estrutura da molécula com regiões apolares (hidrofóbicas) e polares (hidrófilas). Fonte: Santos, 2016.

O caráter anfipático confere tanto aos surfactantes quanto aos biosurfactantes alta atividade tensoativa ao acumular entre duas fases (ar-líquido, líquido-líquido e líquido-sólido), levando à redução das tensões superficiais em sistemas ar e água, e interfacial entre fases de diferentes polaridades (PARDHI et al., 2022). Esta capacidade se deve à adsorção do biosurfactante às superfícies de ambas as fases, favorecendo a interação entre elas.

Um biosurfactante é dado como eficaz ao reduzir a tensão da água de 72 para menos de 35 mN/m e a tensão interfacial entre água e n-hexadecano de 40 para 1 mN/m (MULLIGAN, 2005; SOBERON, 2011). Contudo, os BS englobam funções diversas tais como detergência, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases, entre outras (UZOIGWE et al, 2015; ROY, 2017; GAYATHIRI et al, 2022).

Comparativamente aos análogos químicos, os BS apresentam uma série de vantagens como biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa ou nenhuma toxicidade, especificidade de ação, maior formação de espuma, eficácia mesmo em baixas concentrações, e em condições extremas de pH, temperatura e força iônica, além de estabilidade físico química extensa (ELAZZAZY; ABDELMONEIM; ALMAGHRABI, 2015; MENESES et al, 2017; JAHAN et al, 2019; BJERK et al, 2021; MARKANDE; PATEL; VARJANI, 2021; NAGTODE et al., 2023). Destarte, estas biomoléculas são alternativas naturais e ecológicas frente aos surfactantes químicos, podendo substituí-los de forma segura nas aplicações em

áreas ambientais e industriais (JAHAN et al, · 2020; GAYATHIRI · et al, 2022). Além disso, os biosurfactantes se destacam frente aos surfactantes químicos, pois são únicos para emprego em alimentos, óleos comestíveis, determinados produtos farmacêuticos e cosméticos (COLLA, et al., 2003; NITSCHKE; COSTA, 2007; BHADORIYA et al., 2013, FRACCHIA et al., 2015; AKBARI et al, 2018; AHMADI-ASHTIANI et al, 2020).

Os biosurfactantes, além de eficazes agentes tensoativos, também podem apresentar capacidade emulsificante (FRACCHIA; CERESA; BANAT, 2019; NAUGHTON et al, 2019). Neste caso, ao revestir gotículas de água em fase oleosa ou óleo em fase aquosa, estas biomoléculas evitam a coalescência destes fluidos e, por conseguinte, permitem a formação de emulsões estáveis, de óleo em água ou água em óleo.

Em geral, os bioemulsificantes (BE) têm massa molar mais alta do que os biosurfactantes, tratando-se de misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (SEKHON-RANDHAWA, 2014). Tal qual os biosurfactantes, os bioemulsificantes propiciam a emulsão de dois líquidos imiscíveis, mesmo em baixas concentrações, mas, em contrapartida, são menos eficazes na redução da tensão superficial. Portanto, pode-se dizer que estas biomoléculas possuem apenas atividade emulsificante, mas não atividade de superfície. Logo, embora os agentes emulsificantes e tensoativos possam envolver estruturas similares, apresentam distintas funções não podendo serem aplicados indistintamente (FERREIRA et al, 2020).

Nos últimos anos, vêm crescendo o número de publicações demonstrando outras propriedades de interesse como o seu potencial para a produção de sistemas de administração de medicamentos pelo encapsulamento de bioativos (SEVERINO et al, 2017; JIMOH; LIN, 2019; WANG et al, 2020; OLIVEIRA et al, 2020; BJERK et al, 2021; KHAN et al, 2022) e na síntese de nanopartículas metálicas (THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010; VEDARETHINAM; CHELLIAH, 2022). A formação de nanopartículas, por exemplo para a administração de fármacos, se baseia na capacidade dos biosurfactantes de formar micelas (Figura 2), o que por sua vez permite promover a biodisponibilidade também de moléculas de baixa solubilidade em água.

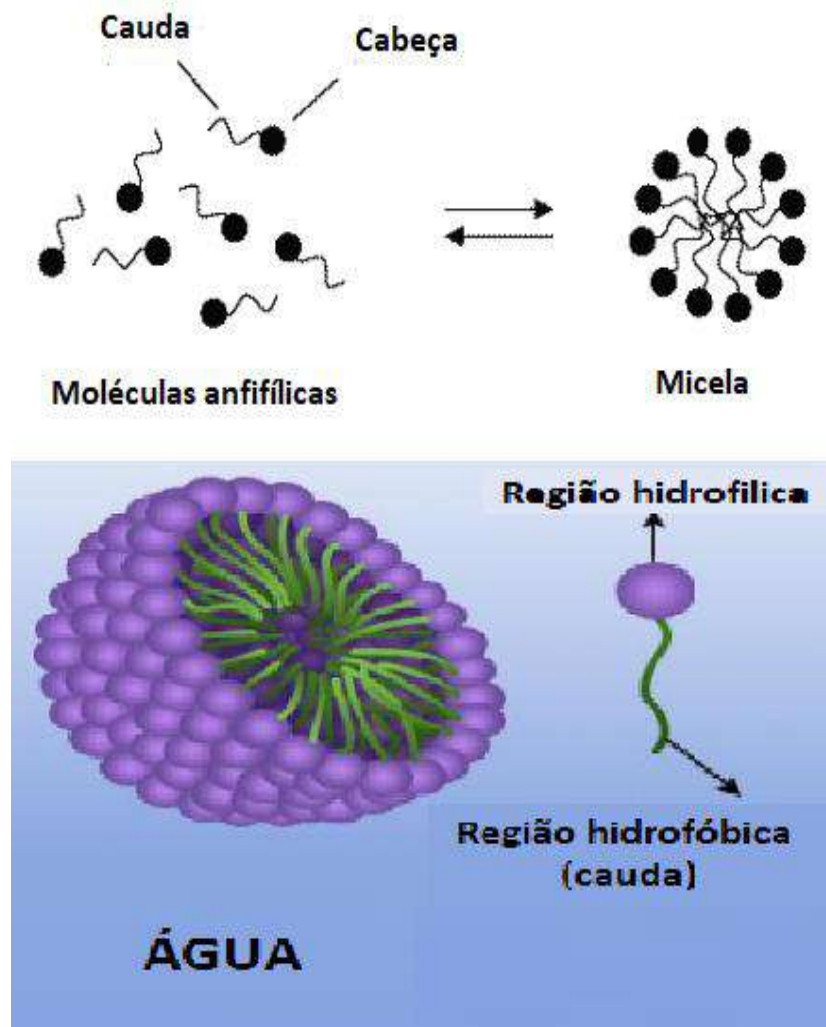


Figura 2: Formação de micelas. Fonte: Dave e Joshi, 2017.

De fato, comparativamente aos surfactantes sintéticos, os biosurfactantes apresentam menor concentração micelar crítica (CMC). Como ilustrado na Figura 3, a CMC corresponde a menor concentração de biosurfactante que leva à formação de micelas, que se dá no menor valor de tensão superficial.

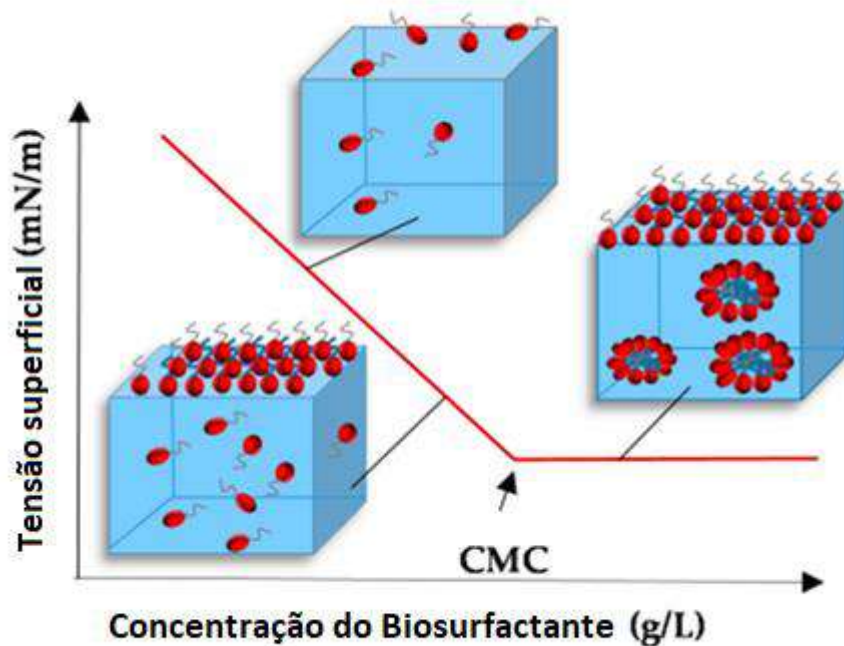


Figura 3: Regiões em que ocorre a formação de micelas (concentração micelar crítica). Fonte: Santos, 2016.

Outro ponto que distingue os biosurfactantes dos surfactantes químicos é a possibilidade de a biossíntese ser conduzida a partir de fontes renováveis, inclusive resíduos industriais, garantindo, assim, a implementação de processos sustentáveis (UZOIGWE et al., 2015; BARBOSA et al., 2022); além do que a condução dos bioprocessos se dá em condições amenas, muito embora a aplicação dos biosurfactantes possa ocorrer em faixas amplas de pH, temperatura e força iônica.

3.1.2 Propriedades dos Biosurfactantes

Os biosurfactantes, assim como os surfactantes químicos, possuem em comum propriedades como redução da tensão superficial, capacidade de formação de espuma, emulsificação, capacidade de estabilização, solubilidade e detergência (SARUBBO et al., 2022). As propriedades de maior interesse são descritas a seguir:

Tensões superficial e interfacial

Por definição, a tensão superficial corresponde a medida das forças de coesão entre as moléculas na superfície do líquido, sendo a unidade internacional de mN/m (BERG, 2010; ZHANG et al, 2015). A Figura 4 ilustra como as moléculas interagem no interior e na superfície de um líquido em contato com o ar. No interior do líquido, as moléculas estão sujeitas as mesmas forças de atração e repulsão de Van der Waals, resultando em soma vetorial nula. Na superfície, existe um menor número de interações intermoleculares, favorecendo a aproximação entre as moléculas longitudinalmente vizinhas, o que cria uma aparência elástica.

Por sua vez, a tensão interfacial é o fenômeno físico decorrente das forças de coesão entre moléculas na interface entre líquidos imiscíveis. A mensuração de ambos pode ser determinada por diversos métodos, sendo o do anel Du-Nouy, considerado o mais comum dentre os que são baseados no princípio de balanço de força (DU NOUY, 1925).

Os líquidos em contato com o ar apresentam valores variados de TS, sendo a da água de 72,7 mN/m a 20 °C. Mas, a depender da temperatura, a TS da água pode ser 70 mN/m, visto que em temperaturas mais altas tem-se maior agitação das moléculas, o que resulta em redução das forças de atração.

A eficácia de um agente tensoativo está relacionada as determinações das tensões superficial (TS) e interfacial (TI) (SANTOS et al, 2016). É reconhecido que os biossurfactantes superam os surfactantes químicos em ambas, apresentando menores TS e TI (ABBOT et al, 2022).

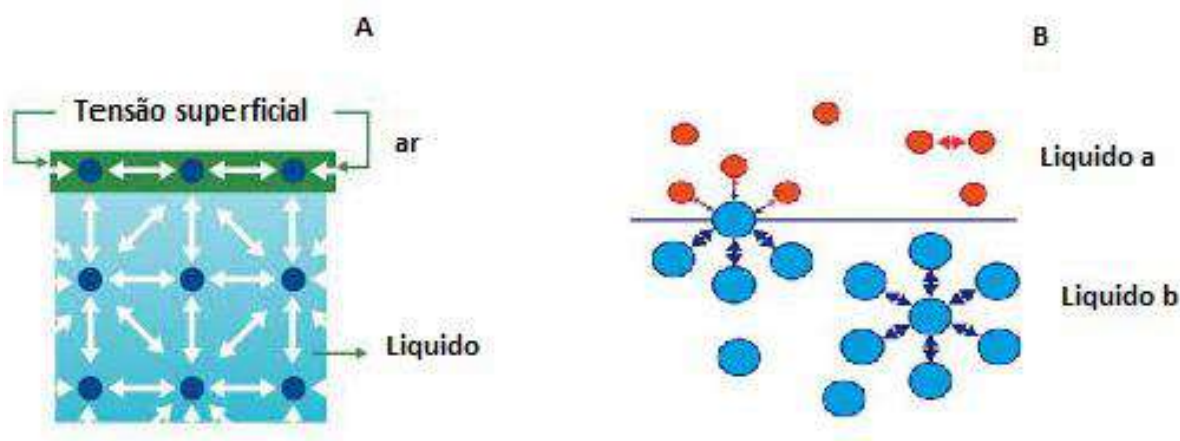


Figura 4: Representação das forças intermoleculares: (A) tensão superficial (fases líquido-ar) e (B) Tensão interfacial (líquidos imiscíveis). Fonte: Clegg, 2009.

Concentração Micelar Crítica

A concentração micelar crítica é definida como a concentração mínima de surfactante relacionada com a menor tensão superficial, conforme apresenta a Figura 3 (SARUBBO et al, 2022). Para baixas concentrações de surfactante, ocorre o posicionamento das moléculas paralelamente à superfície de um líquido em contato com o ar ou na interface entre líquidos imiscíveis. À medida que a quantidade do surfactante aumenta, as moléculas na superfície se reorientam de forma a minimizar a repulsão pelas moléculas no líquido. Quando toda a superfície do líquido está preenchida por moléculas tensoativas, aumenta a concentração de moléculas de BS livres no interior do líquido. Deste modo, tem início a interação das moléculas pela interação entre as partes hidrofílica ou hidrofóbica (DALTIM, 2011). O arranjo das moléculas no interior do líquido é chamado de micela, cuja orientação é dependente da natureza hidrofílica/hidrofóbica da superfície (PORTER, 1994). A medição da concentração micelar crítica (CMC) determina a eficiência de um agente tensoativo.

Molhabilidade

É a capacidade de um líquido de se espalhar sobre uma dada superfície, o que é função da sua aderência ao sólido (NEVES et al, 2021). O tensoativo favorece a molhabilidade de uma superfície ao adsorver na interface sólido-líquido, pela redução da tensão superficial.

A molhabilidade pode ser determinada pela medição do ângulo de contato (θ), Figura 5, sendo inversamente proporcional ao ângulo de contato. A temperatura pode alterar a molhabilidade por afetar o surfactante em si ou as características de sua adsorção à superfície do sólido (SCHRAMM et. al, 2003).

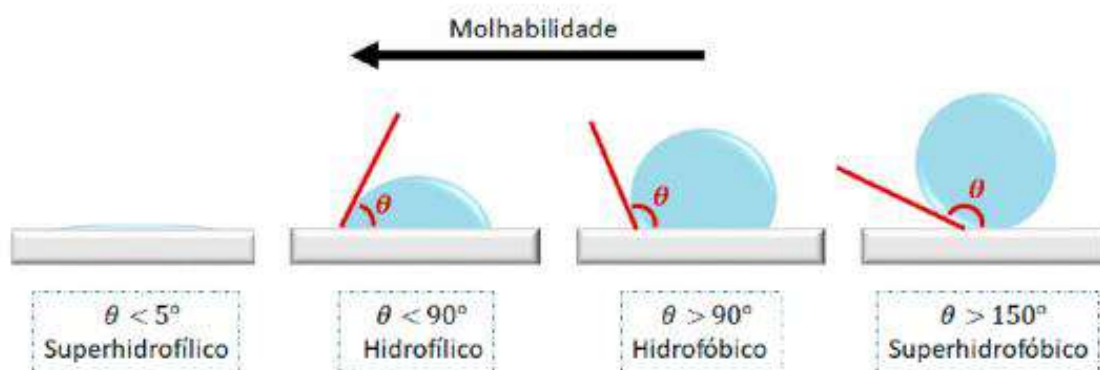


Figura 5: Representação da molhabilidade em função do ângulo de contato. Fonte: Adaptado de Schramm, 2003.

Emulsificação

É o processo que permite a mistura de dois ou mais líquidos incompatíveis, proporcionando que a fase dispersa se divida em pequenas gotículas, o que resulta na formação de mistura estável (COSTA et al, 2019).

Os BS apresentam melhor propriedade emulsificante comparados aos surfactantes químicos, pois não se degradam facilmente e formam emulsões estáveis que podem ser armazenadas por um longo período (SANTOS et al., 2016; ABBOT et al, 2022).

Porém, os biossurfactantes apresentam, ainda, propriedades únicas que os diferenciam, tornando-os vantajosos para utilização em alguns desenvolvimentos tecnológicos e aplicações em áreas industriais (ABBOT et al., 2022).

Biocompatibilidade, biodegradabilidade e menor toxicidade

Os biossurfactantes são substâncias mais sustentáveis do que os análogos químicos. E, distintamente destes últimos, os BS sofrem degradação biológica, com mais de 90% de

conversão em metabólitos mais simples, como CO₂, água e minerais. Portanto, são menos tóxicos ou mesmo atóxicos para os seres vivos e ambiente (ABBOT et al, 2022). Isto possibilita o emprego mais apropriado dos biossurfactantes diretamente em ambientes, como para biorremediação de áreas impactadas, bioissorção de metais de efluentes industriais e tratamento de resíduos (SANTOS et al., 2016; SARUBBO et al, 2022). Mais ainda, são mais adequados para emprego em indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, onde os surfactantes químicos são frequentemente aplicados em altas concentrações, e cujo efeito acumulativo sabidamente pode levar a vários efeitos colaterais e reações tóxicas (SANTOS et al, 2016; SARUBBO et al, 2022).

Agentes antiadesivos

A propriedade antiadesiva dos biossurfactantes está relacionada à redução da hidrofobicidade de superfícies, ou seja, de melhorar o molhamento do solo pela água, o que ajuda a diminuir a adesão de microrganismos (ABBOT et al, 2022). De acordo com Ahimou et al., os lipopeptídeos podem modificar a hidrofobicidade da superfície bacteriana e, conseqüentemente, alterar a adesão destes microrganismos em superfícies abióticas. Os efeitos dependem da hidrofobicidade bacteriana inicial, bem como do tipo e da concentração do lipopeptídeo.

Estabilidade em condições extremas

Os BS, ao contrário dos surfactantes quimicamente sintetizados, são estáveis mesmo em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (ABBOT et al., 2022; SARUBBO et al, 2022). A produção de BS pela cepa de *Bacillus subtilis* C9 apresentou estabilidade e capacidade de manter suas propriedades emulsificantes em temperaturas de 20 a 100 °C, pH de 5,0 a 9,5 e concentrações salinas de 1000 mM de NaCl e 10 mM de CaCl₂ (KIM et al., 1997). Outra linhagem demonstrou estabilidade térmica de 100°C por 2 horas, 121°C por 0,5 hora e 135°C por 1 hora, pH de 6,0 a 12,0 e concentração salina de 15% de NaCl (COSTA, 2005).

3.2 Classificação dos Biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser aniônicos, catiônicos ou neutros. Por isso, em geral, são classificados de acordo com a massa molar e pela estrutura química, organizados em cinco grupos distintos: glicolipídeos; fosfolipídeos e ácidos graxos; particulados; poliméricos; lipopeptídeos e lipoproteínas (CHEN; JUANG; WEI., 2015; SANTOS et al., 2016), como ilustra a Figura 6.

Os BS de baixa massa molar compreendem os glicolipídeos e lipopeptídeos, os mais estudados, e que vem ganhando crescente atenção por compreenderem estruturas diferenciadas, algumas com bioatividade, apresentando propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014; SHU et al, 2021).

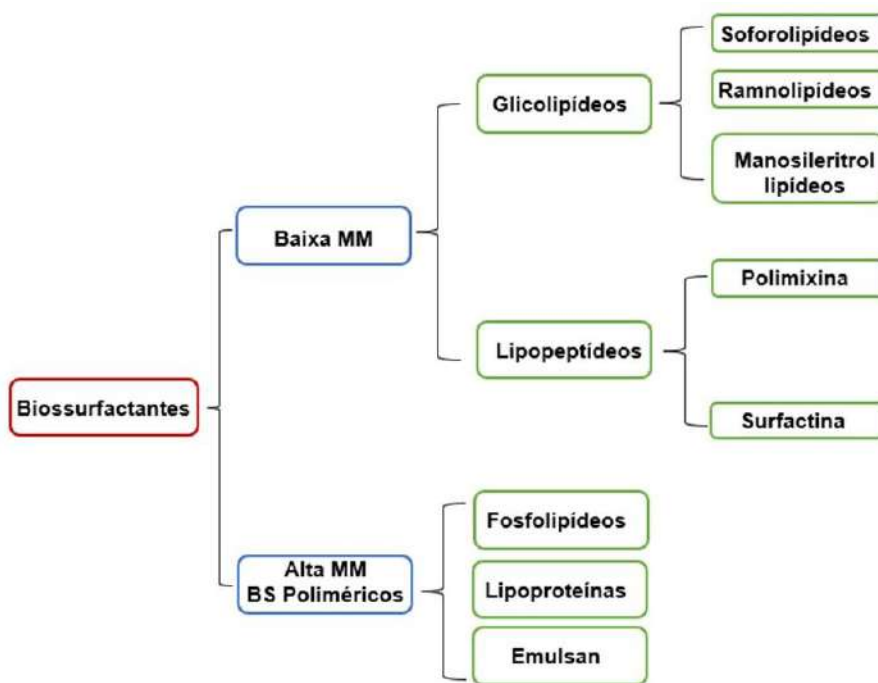


Figura 6: Principais tipos de biossurfactantes. Fonte: Adaptada de Lou et al, 2021.

Os lipopeptídeos (LP) são considerados os mais eficazes tensoativos (SINGH; RAUTELA; CAMEOTRA, 2014; GUTIÉRREZ-CHÁVEZ; BENAUD; FERRARI, 2021). Além disso, a estrutura dos LP muitas vezes também lhes confere atividade emulsificante, o

que propicia seu uso intensivo em uma ampla variedade de aplicações industriais (RAAIJMAKERS et al, 2010).

Os LP são compostos cíclicos resultantes da condensação de um oligopeptídeo com um ácido graxo linear ou ramificado, com diferentes comprimentos e graus de oxidação (AHIMOU; JACQUES; DELEU, 2010; ROCHA, 2017); contemplando LP catiônicos (GREBER, 2017; MALUCH et al, 2021; NEUBAUER et al, 2021; e LP aniônicos (ETCHEGARAY et al, 2008; MNIF; GHIBI, 2015; GHAZALA et al, 2017).

Há décadas que os LP pertencentes às famílias das fengicinas, iturinas, e principalmente, surfactinas vêm sendo os mais estudados (Figura 7). Embora já tenham sido caracterizados vários outros LP como liquenisinas, subtilisinas, bacilomicinas, viscosinas, seravetinas, artrofactinas, daptomicinas, fosfolipídeos e inclusive formas lineares, entre outros (LI et al, 2013; SUNEETA et al, 2018; KUMAR et al, 2021; THÉATRE et al, 2021; YEAK et al, 2022; FARDAMI et al, 2021; GUAYATHIRI et al, 2022; ABBOT et al, 2023; ZHEN et al, 2023). Uma detalhada relação de famílias e subfamílias de LP foi publicada por Geissler e colaboradores (2019).

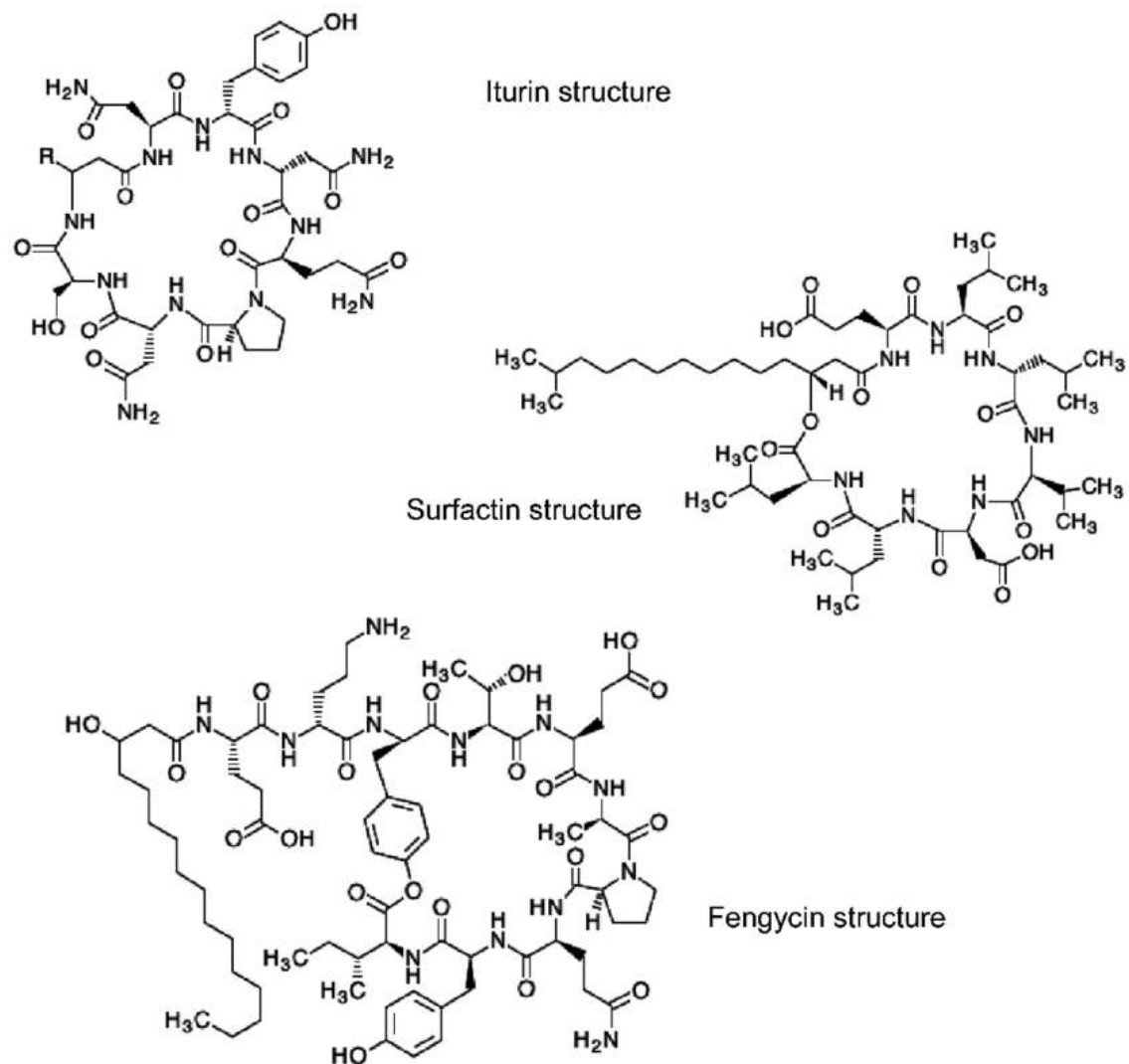


Figura 7: Principais lipopeptídeos com ação tensoativa. Fonte: Mongkolthanaruk, 2012.

As surfactinas, com massa molar (MM) de aproximadamente 1,36 kDa, são basicamente compostas por um peptídeo de sete aminoácidos (Figura 7). Por serem objeto do presente estudo, uma descrição mais detalhada consta do próximo item.

A estrutura química das fengicinas, com MM por volta de 1,5 kDa, é constituída de: (1) uma cadeia peptídica de dez aminoácidos, incluindo seis L-aminoácidos (Glu, Glu, Pro, Gln, Tir, Ile) e quatro D-aminoácidos (Tir, Orn, Tre, Ala), nas sequencias Ile-Tir-Gln-Pro-Ala ou Val-Glu-Tre-Tir-Glu-Orn, ligada a (2) uma cadeia de ácido graxo β -hidroxilado com comprimento variando de 14 a 17 átomos de carbono. Nota-se que pode haver

diferenciação do aa na posição 6 do peptídeo, o que permite diferenciar as estruturas em Fengicina A e Fengicina B, onde tem-se alanina ou valina, respectivamente.

Por fim, as iturinas que apresentam menor MM (~1,1 kDa), que abrange 5 estruturas. A iturina A, tal qual as surfactinas é um lipopeptídeo, porém a cauda é formada por 11 ou 12 aminoácidos; enquanto os ácidos graxos das outras iturinas contêm de 14 a 17 átomos de carbono.

Particularmente, os baixos valores de CMC dos LP surfactina, iturina A e fengicina os destacam pela possibilidade de uso em pequenas quantidades em comparação aos surfactantes derivados de hidrocarbonetos do petróleo (GEISSLER et al, 2019). Trabalhos de revisão são indicados para um conhecimento mais detalhado e profundo sobre os diferentes tipos de lipopeptídeos, em particular as surfactinas, com 15 variantes identificadas, que ainda são consideradas como os agentes tensoativos mais eficazes e com maior abrangência de aplicações pelas suas propriedades inerentes, compreendendo atividades antimicrobiana e anticancerígena (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁROI, 2008; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010; ROY, 2017; FENIBO; STANLEY; DOUGLAS, 2019; THEATRE et al, 2021; ERAS-MUÑOS et al, 2022; GUAYATHIRI et al, 2022; XIA; WEN, 2022; ZHEN et al, 2023).

A composição química da molécula de surfactina obtida a partir do cultivo de linhagem de *Bacillus subtilis*, respectivas estruturas cristalinas e propriedades físico-químicas foram reportadas pela primeira vez em 1968 por Arima, Kakinuma e Tamura (HU; LIU; LI, 2019). Na época, foi relatado se tratar de um lipopeptídeo de MM de 1,05 kDa, (ARIMA; KAKINUMA; TAMUR, 1968). A estrutura primária da surfactina, cristal formado por agulhas brancas, foi revelada em 1969, por uma combinação de técnicas, tais como análise elementar, infravermelhos (IR), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectros de massa (KAKINUMA et al. 1969).

De acordo com a literatura científica, a surfactina é considerada um metabólito secundário, embora estudos do nosso grupo de pesquisa tenham demonstrado ser o metabólito produzido por *B. subtilis* LFB732 nas condições de cultivo testadas associado ao crescimento (VALPUESTA, 2008; SANTIAGO, 2018; VIANA, 2022). Dentre os BS, esta

biomolécula é a que apresenta maior espectro de atividade antibacteriana e maior efetividade em reduzir a tensão superficial de sistemas ar-líquido, mesmo estando em concentrações bem baixas (KAMAL-ALAHMAD, 2015; ABDOLLAHI · 2020; JANEK et al, 2021; ZHEN et al, 2023). Por isso, provavelmente, a surfactina é um dos BS mais estudados e, por conseguinte, mais bem conhecido (JANEK et al, 2021; BOCHYNEK et al, 2023).

Trata-se de um lipopeptídeo cíclico composto de um anel heptapeptídico ligado a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxilado (12 a 16 átomos de carbono), conferindo a biomolécula simultaneamente características hidrofílica e hidrofóbica, respectivamente (SEYDLOVA; SVOBODOVA, 2008; RAHMAN et al, 2021); portanto, a surfactina é um lipopeptídeo. A Figura 8 apresenta algumas variantes de surfactinas.

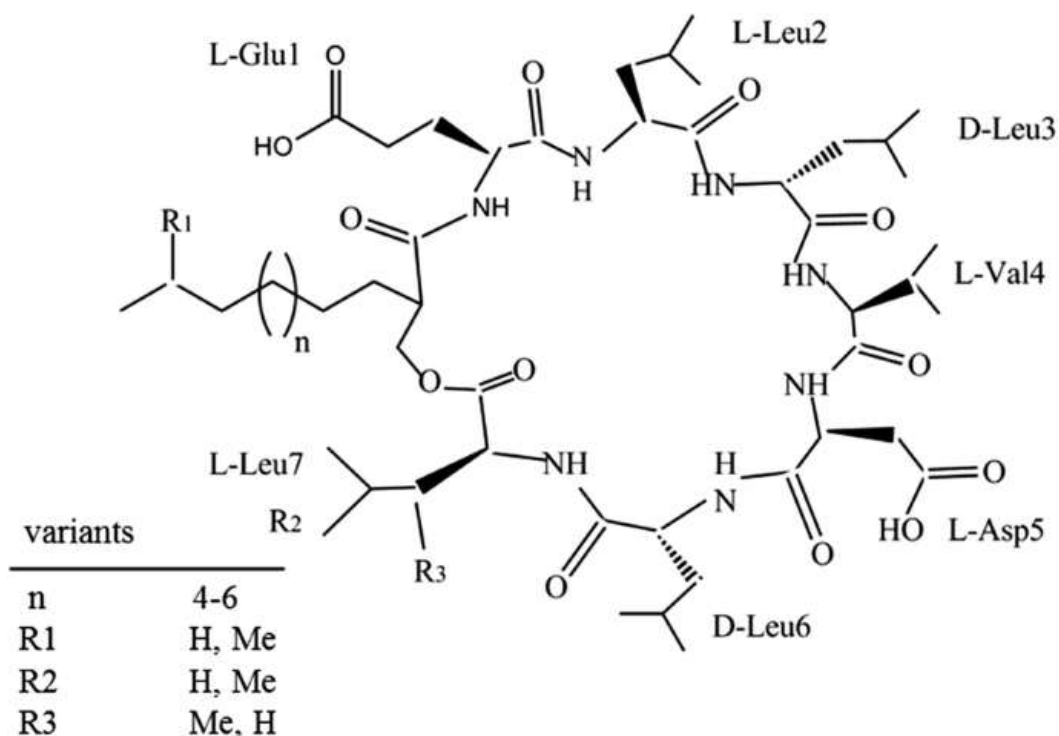


Figura 8: Estruturas químicas de surfactinas. Fonte: Hu, Liu e Li, 2019.

Os aminoácidos mais comumente constituintes do heptapeptídeo - Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu – estão ligados a um ácido graxo β -hidroxilado, que pode se tridecanoato, tetradecanoato, pentadecanoato e hexadecanoato, formando um anel lactona. Pode haver diferenças na sequência de aminoácidos, assim como no comprimento da cadeia do ácido

graxo, o que resulta na ocorrência de diferentes isoformas e séries homólogas, respectivamente (BARTAL et al, 2018; KECSKEMÉTI et al, 2018; BOCHYNEK et al, 2023). Koim-Puchowska e colaboradores (2021) demonstrou a variação nas proporções de isoformas em função da fonte de nitrogênio.

No peptídeo, a composição de aminoácidos e sua sequência, bem como a natureza da parte lipídica tem forte influência na atividade biológica da surfactina (BACCILE et al, 2021; THÉATRE et al, 2021). Isto porque tais alterações resultam em mudanças efetivas da distribuição polar/apolar e/ou da acessibilidade dos grupos carboxílicos, interferindo nas capacidades hemolítica e de quelação de metais, além da atividade superficial (HAMME, SINGH; WARD, 2005; RAAIJMAKERS et al, 2010).

A biossíntese da surfactina é mediada por peptídeo não-ribossomal sintetases, com domínios multi-específicos. Trabalhos explanando as vias de síntese vêm sendo publicados ao longo dos anos até recentemente (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; HU; LUI; LI, 2019; ZHOU et al, 2019; SANCHES et al, 2021; THÉATRE et al, 2021; LI et al, 2023)

A adição de surfactina à água resulta em redução da tensão superficial de 72 a 27 mN/m, em concentrações bem baixas, como 10 μ M, o que é muito inferior ao que se obtém pelo uso de detergentes comerciais. Entretanto, Koim-Puchowska e colaboradores (2021) reportaram ser possível reduzir a tensão superficial da água para 22 mN/m, com 20 μ M. A efetiva ação tensoativa se deve à forte agregação das moléculas de surfactina mesmo em baixas concentrações (PATTANATHU; RAHMAN; GAKPE, 2008).

Ademais, a surfactina apresenta a capacidade de diminuir a TI de sistema n-hexano e água de 43 mN/m para valor menor do que 1 mN/m (VEDARAMANI; VENKATESHII, 2011). Um valor 5 vezes maior foi determinado para o mesmo sistema bifásico usando o surfactante químico dodecilsulfato de sódio (SDS) (GURKOV et al, 2005).

Estudos têm validado ser a surfactina bastante estável em diferentes tipos de aplicação, mesmo em condições mais adversas de temperatura, pH e salinidade (BARROS et al, 2007; JHA et al, 2016; PHULPOTO et al, 2020; JANEK et al, 2021; UMAR et al, 2021; DOBLER et al, 2022; DIAS et al, 2023). Estas propriedades em conjunto com a baixa

toxicidade e ausência de irritabilidade (ISMAIL et al, 2015; FEI et al, 2019) permitem seu emprego nos variados tipos de aplicações (SANCHES et al, 2021).

3.3 Microrganismos produtores de Biossurfactantes

A Figura 9 agrupa os surfactantes resultantes de sínteses química e microbiológica, bem como algumas estruturas de biossurfactantes e principais microrganismos produtores. Porém, cabe pontuar que o tipo de estrutura, como já mencionado anteriormente, como também sua quantidade pode variar de acordo com as condições de cultivo, tais como a natureza e quantidade do substrato, concentração de íons no meio de cultura e as condições ambientais (BUENO, 2008; CORONEL-LEÓN et al, 2015; MARTINS et al, 2021).

Conforme se evidencia na Figura 9, os BS podem ser obtidos a partir do cultivo de diferentes espécies microbianas. Os trabalhos de revisão recentes (FENIBO; STANLEY; DOUGLAS, 2019; FARDAMI et al, 2021; MARTINS et al, 2021; SANCHES et al, 2021; THEATRE et al, 2021; ERAS-MUÑOS et al, 2022; GUAYATHIRI et al, 2022; XIA; WEN, 2022; ZHEN et al, 2023) apresentam a diversidade de espécies bacterianas e fúngicas para os quais a capacidade de sintetizar substâncias tensoativas foi comprovada. Alguns destes trabalhos ainda abordam as biossínteses envolvidas.

Classe/Tipo de Biossurfactante	Micro-organismos
Glicolipídeos	
Ramnilipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolipídeos	<i>Candida bombicola, Candida apicola</i>
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
Lipídeos neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Mannan-lipídeo-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactante particulado	
Vesícula	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Figura 9: Diferentes tipos de biossurfactantes e potenciais grupos microbianos empregados para sua produção. Fonte: Marinho et al., 2022.

Como consta na Figura 9, a produção de lipopeptídeos pode ser conduzida empregando bactérias Gram-positivas (ex. *Bacillus* spp), Gram-negativas (ex: *Pseudomonas* spp) ou Gram-variáveis (ex: *Paenibacillus* spp), actinobactérias (ex: *Streptomyces* spp) e fungos (ex: espécies dos gêneros *Phoma* e *Emericella*), conforme listas publicadas recentemente por alguns autores (GUTIÉRREZ-CHÁVEZ; BENAUD; FERRARI, 2021; JANEK et al, 2021; FARDAMI et al, 2022). Nestas publicações pode ser constatado que as bactérias do genero *Bacillus* são os principais microrganismos produtores de LP.

Especificamente para surfactina, no Quadro 9, em Apêndice, estão listadas as espécies bacterianas identificadas como potenciais produtoras. Comprovadamente, as moléculas de surfactina são sintetizadas por espécies do gênero *Bacillus* e, particularmente, pela espécie *B. subtilis*, com mais de 30 linhagens naturais, a maioria isolada do solo, já definidas (DOBLER et al, 2022).

As quantidades de surfactina determinadas para os 29 isolados variaram de 2 a 1.444 mg/L, sendo os valores mínimos encontrados para *B. aryabhatai* IR1-3 e *B. flexus* EFSO2-02 e máximo para *B. subtilis* IRB2-A1. Cabe destacar que as concentrações foram bem diversas para as outras linhagens da mesma espécie. Por exemplo, o valor máximo foi de 409 mg/L para *B. aryabhatai* IRB2-A4, enquanto o valor mínimo foi de apenas 98 para *B. subtilis* IRB2-A2. Isto demonstra como a produção de surfatina está associada a linhagem produtoras e as condições de cultivo, como anteriormente referendado.

A espécie *Bacillus subtilis*, pertencente ao gênero *Bacillus* e família Bacillaceae, é uma bactéria Gram-positiva, não patogênica, que recebeu o status GRAS (Generally Regarded As Safe) pela US Food and Drug Administration (FDA), o que significa ser segura para os seres humanos e animais, por isso já vem sendo amplamente utilizada para a produção de enzimas extracelulares (ALVES et al., 2018). Linhagens desta espécie são comumente encontradas no solo, mas também podem ser isoladas de ambientes aquáticos.

Esses microrganismos possuem morfologia macroscópica bem característica, com colônias opacas circulares difusas, de superfície rugosa e bordos ondulados, de coloração branca ou ligeiramente creme (LU; GUO; LIU, 2018). Microscopicamente, se evidenciam como células na forma de bastonetes Gram-positivos, ou Gram-variáveis, em diferentes arranjos como isolados, aos pares e em pequenas cadeias (Figura 10). A presença de flagelos peritríquios lhes confere motilidade (KEARNS; LOSICK, 2005; LOSICK, 2022). Além disso, formam endósporos, um por célula vegetativa, que se caracterizam pela resistência a condições adversas, como carência nutricional e condições ambientais estressantes (CHEN; JUANG; WEI., 2015). Na Figura 10(a) identifica-se a presença de endósporos.



Figura 10: Morfologia microscópica de preparação de Bacillus subtilis coradas pela técnica de coloração diferencial de Gram, onde se evidencia a presença de esporângios (a). Fonte: Sohail et al., 2019.

A maioria é saprófita, com grande diversidade de características fisiológicas, que em conjunto com a capacidade de esporular, lhes confere ubiquidade, podendo ser encontrados em fontes termais, areias desérticas ou em ambientes árticos. Existem linhagens psicrófilas, mesófilas, termófilas, acidófilas, basófilas (BRIDE; TURNBULL, 1998).

Esta espécie tem sido intensivamente estudada pelo seu papel primordial na produção de surfactina, entre outros LP (SEN et al., 2010). A produção dos diferentes tipos de lipopeptídeos ocorre em fases distintas do crescimento. A formação de iturina e fengicina, por exemplo, ocorre durante a fase estacionária, enquanto a de surfactina ocorre geralmente na fase exponencial, demonstrando que a sua produção está associada ao crescimento do microrganismo (VATER et al., 2002; ABDEL-MAWGOUD et al., 2008; RAAIJMAKERS et al., 2010), ao contrário do que comumente é preconizado na literatura científica.

3.4 Fatores que afetam a produção de surfactina

3.4.1 Fatores Nutricionais

A produção de surfactina, assim como ocorre normalmente para os BS, sofre influência direta de fatores nutricionais, essencialmente das fontes de carbono, nitrogênio e elementos traço (KANWAL et al, 2021). Além de interferir nas propriedades tensoativa e emulsificante, tem efeito também na formação de espuma (KOIM-PUCHOWSKA et al, 2021).

O meio de cultura, mais precisamente o substrato, pode representar de 30 a 50% dos custos de produção de BS (GUDIÑ et al, 2015). Portanto, deve ser bem explorado o uso de matérias-primas de baixo custo, resíduos agrícolas ou industriais para redução dos custos do processo fermentativo, não tão somente para que o valor final do bioproduto seja competitivo com os surfactantes químicos disponíveis no mercado, mas também para que as propriedades do BS sejam similares ou melhores (ZHOU et al, 2023).

Também deve ser levado em conta a importância da densidade das células e a idade empregadas como inóculo (GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

A seguir, a importância dos fatores nutricionais especificamente para a produção de surfactina por linhagens de *Bacillus subtilis*.

3.4.1.1 Fontes de carbono

Muitos estudos vêm investigando o efeito da fonte de carbono no crescimento e na produção de BS (ISMAIL et al, 2015; MOUAFO; MBAWALA; NDJOUENKEU, 2018). A revisão de Nurfarahin, Mohamed, Phang (2018) mostra em detalhes o efeito dos nutrientes e elementos químicos na biossíntese de BS.

A escolha da fonte de C, e a sua concentração, são determinantes para o rendimento do bioprocessamento e para a estrutura do biosurfactante, em especial sobre sua cauda hidrofóbica, o que leva a variações das propriedades físico-químicas (CAMEOTRA et al.,1998; SANCHES et al, 2021). Em geral, fontes de carbono hidrofóbicas são melhores do que as hidrofílicas visto que permitem a metabolização de substâncias imiscíveis em meio aquoso.

Bacillus sp. são reconhecidamente capazes de metabolizar hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia (JOSHI; SHEKHAWAT, 2014). Entretanto, os carboidratos se apresentam melhores para a produção de surfactina. Por exemplo, foi verificado o crescimento das linhagens de *B. subtilis* MTCC 2423 e ATCC 21332 pelos cultivos em meios contendo n-hexadecano ou pristano, porém não foi constatada a formação de

biossurfactante (COOPER et al, 1981; MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Abdel-Mawgoud e colaboradores (2008) também constataram haver efeito inibitório na produção de surfactina por *B. subtilis* BS5 quando cultivada em meios a base de óleos vegetais (soja e oliva) ou hidrocarbonetos (hexadecano e parafina). Isso demonstra que a síntese de LP por linhagens de *B. subtilis* é exclusivamente dependente de fontes de carbono solúveis em água, sendo os carboidratos os mais utilizados (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008). No presente trabalho foi utilizada como fonte de carbono o açúcar VHP, que será abordado a seguir.

Açúcar VHP

Denominação que provém da expressão em inglês *Very High Polarization* sugar, é dada ao açúcar bruto obtido a partir da cristalização do caldo de cana, sem processamento posterior. A presença de uma camada de “mel” recobrindo o cristal do açúcar, lhe confere coloração mais escura, como ilustra a Figura 11 (EGGLESTON; BORGES, 2015). A polarização do VHP varia de 99,00 a 99,49%, percentual que expressa a massa de sacarose no açúcar (PAPADAKI, PAPAPOSTOLOU et al., 2018).

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial do açúcar VHP, cuja produção média estimada nos últimos cinco anos foi de 33 milhões t a/a, correspondente a 20% do volume global (NOGUEIRA, 2023). Neste período, a exportação média foi de 22 milhões de t a/a. Ainda de acordo com Nogueira (2023), seu preço varia de 0,49 a 0,51 dolares por kilograma. A alta disponibilidade aliada ao baixo custo lhe garante a posição de principal commodity brasileira.

Por se tratar de um açúcar de baixa umidade, com alta polarização, é usado como matéria prima para a produção de açúcar refinado, além de outros processos industriais, após os devidos tratamentos para remoção das impurezas. Como aponta Boviatsi e colaboradores (2019) seu emprego tem sido foco de diferentes desenvolvimentos biotecnológicos.



Figura 11: Açúcar VHP. Fonte: Usina Granelli.

3.4.1.2 Fontes de nitrogênio

O nitrogênio desempenha papel essencial na composição de meios, contribuindo tanto para a produção de biossurfactante quanto para o crescimento celular, devido sua grande importância para a síntese de proteínas e enzimas (CAMEOTRA et al.,1998; FONTES et al., 2008). Diferentes fontes orgânicas e inorgânicas podem ser usadas para a composição do meio de cultura, a depender dos microrganismos e do propósito do bioprocesso. São exemplos: ureia, caseína hidrolisada enzimaticamente, extrato de carne, extrato de levedura e hidrolisado de caseína.

Ghribi e colaboradores (2011) obtiveram maior rendimento de surfactina pelo emprego de ureia. Em contrapartida, Li e colaboradores (2023) determinaram ser a produção de surfactina por *B. subtilis* 168 mais efetiva com NH_4Cl . Haddad, Wang e Um (2009), anteriormente também identificaram ser os sais amoniacais mais indicados para a produção de surfactina por *B. subtilis* HOB2.

3.4.1.3 Elementos Traço

Os elementos-traço Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} e Fe^{2+} são particularmente importantes na biossíntese de surfactina por *Bacillus subtilis*, pois atuam como cofatores principais em

sistemas multienzimáticos envolvidos nesse processo (CHEN; JUANG; WEI., 2015; SANCHES et al, 2021). De acordo com estes autores, na ausência de K^+ ou Mg^{2+} ocorre redução da síntese de biossurfactante por *Bacillus subtilis*, obtendo apenas 25% do valor obtido na presença desses íons.

Os íons Fe^{2+} e Mn^{2+} também são extremamente importantes para a produção de surfactina, visto que a ausência simultânea de ambos, reduz a produção do biossurfactante para 1/3 daquela obtida na presença desses íons (CHEN; JUANG; WEI, 2015). Em contrapartida, a adição de apenas um deles já atinge mais de 80% da concentração que é alcançada na presença dos dois elementos. Segundo Wei e colaboradores (2006), o tratamento estatístico indicou ser a interação de Mg^{2+} e K^+ mais favorável a síntese de surfactina, propiciando quase dobrar o rendimento. Contudo, já foi reportado que concentrações muito elevadas de Mg^{2+} e de Fe^{2+} podem inibir a produção da surfactina (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Também Gudiña e colaboradores (2015) verificaram a importância de suplementar um meio a base de milhocina com Mg^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{2+} . Com a adição de sais destes elementos, alcançaram valores de surfactina 3 vezes superiores.

3.4.2 Fatores Ambientais

Além dos fatores nutricionais, a produção de surfactina é afetada diretamente pelas condições do processo, tais como pH e temperatura, embora seja reconhecida a estabilidade da surfactina em amplas faixas destes parâmetros. Contudo, a biossíntese e os custos do bioprocessamento estão principalmente relacionados à disponibilidade de oxigênio solúvel o que é dependente da relação taxa de aeração e velocidade de agitação.

Temperatura e pH

Em termos de temperatura, de forma geral, a biossíntese de surfactina por linhagens de *Bacillus subtilis* é prevalente na faixa de temperatura entre 25 e 37 °C (SEN et al, 2005; YEH et al, 2005; CHEN; JUANG; WEI., 2015;). No caso do pH, a faixa se situa entre 6 e 9 (DOBLER et al, 2022). E, em geral, a literatura indica como valores mais adequados, 30°C, e 6,8, respectivamente. Contudo, é sabido que as condições ótimas de temperatura e pH para a biossíntese de surfactina, assim como ocorre comumente para outros bioprodutos, podem

variar com a linhagem e outras condições de cultivo. Particularmente para a produção de surfactina, manter o pH no valor ótimo é necessário (WEI; CHU, 1998).

Sen e Swaminathan (1997) estudaram o efeito de vários parâmetros fermentativos para a linhagem *B. subtilis* DSM 3256. O trabalho mostrou ser a produção máxima de surfactina alcançada para 37.4 °C e pH de 6,75.

Concentração de oxigênio dissolvido (OD)

Os dados científicos são devidos a produção de BS em escala laboratorial utilizando frascos com volumes reduzidos dispostos em agitadores mecânicos (DIAS; NITSCHKE, 2023). No entanto, há que se considerar que a produção em maior escala será conduzida em biorreatores, onde o suprimento de oxigênio é devido à combinação de vazão de ar e velocidade de agitação. A depender dos níveis destas condições, pode haver danos às células por causa da tensão de cisalhamento, além de intensa formação de espuma. Por sua vez, a intensa formação de espuma pode levar a um decréscimo na transferência de oxigênio dissolvido e, portanto, queda de rendimento (YEH et al., 2005).

Em geral, pelo metabolismo aeróbico, é maior a taxa de crescimento e a síntese de metabólitos. Entretanto, há consumo de energia, e a necessidade de esterilizar o ar, o que causa aumentos dos custos globais do bioprocessamento e favorece a formação de espuma. Porém, é possível obter surfactina por linhagens de *B. subtilis* por cultivo em condição de anaerobiose (DAVIS et al, 1999; WILLENBACHER et al, 2015). Por isso, têm sido propostos sistemas de controle de espuma (XU et al, 2020), reatores de membrana sem bolhas (EL-HOUSSAYNE et al, 2020) e fermentação em estado sólido (BONGARTZ et al, 2020).

Segundo a revisão de Dobler et al (2022), alguns estudos mostraram ser possível a recuperação da surfactina pelo fracionamento da espuma (WILLENBACHER et al, 2014; ALONSO; MARTIN 2016). Além disso, Alonso e Martin (2016) reportaram que a espuma estimula a produção de surfactina.

A literatura científica indica ser a faixa de velocidade de agitação adequada para a biossíntese de surfactina entre 200 a 250 rpm. Quando adotados valores superiores a 250

rpm, tem-se um intenso aumento da formação de espuma, levando à redução da transferência de oxigênio, e do rendimento de surfactina. O acúmulo de espuma é outro fator crítico que afeta a produção de surfactina e seu efeito está relacionado com aeração (SEN e SWAMINATHAN, 2005).

A disponibilidade de oxigênio dissolvido tem forte influência na produção de surfactina por *B. subtilis*, podendo ser afetada pela parte superficial do líquido e do gás, a tensão superficial do meio líquido e a presença de partículas sólidas (CHEN; JUANG; WEI., 2015; YEH et al, 2005). De acordo Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011), para obter maior produção de surfactina, o meio deve estar saturado com 30% de oxigênio dissolvido. Em pesquisa utilizando um biorreator trifásico de fase reversa de leito fluidizado para discutir o efeito do kLa na produção de surfactina por *B. subtilis*, observou-se que as velocidades superficiais do gás e do líquido reduzidas diminuem a transferência de oxigênio e aumentam a produção de surfactina (FAHIM et al., 2013).

3.5 Levantamento científico da produção de surfactina

O Quadro 10, em Apêndice, contém uma compilação de alguns dados científicos sobre a produção de surfactina, para diferentes linhagens e fontes de carbono. A sua elaboração teve como propósito dar suporte a presente investigação.

3.6 Aplicações da surfactina

A diversidade estrutural de moléculas de surfactina lhe confere funções de grande potencial na área biomédica e farmacêutica, além de outras possíveis aplicações já comprovadas na agricultura, alimentos, cosméticos, petróleo e ambiental. Alguns trabalhos de revisão apresentam as várias aplicações em detalhes (JACQUES, 2010; MEENA; KANWAR, 2015; CHEN; JANG, WEI, 2015; THÉÂTRE et al, 2021; ZHEN et al, 2023).

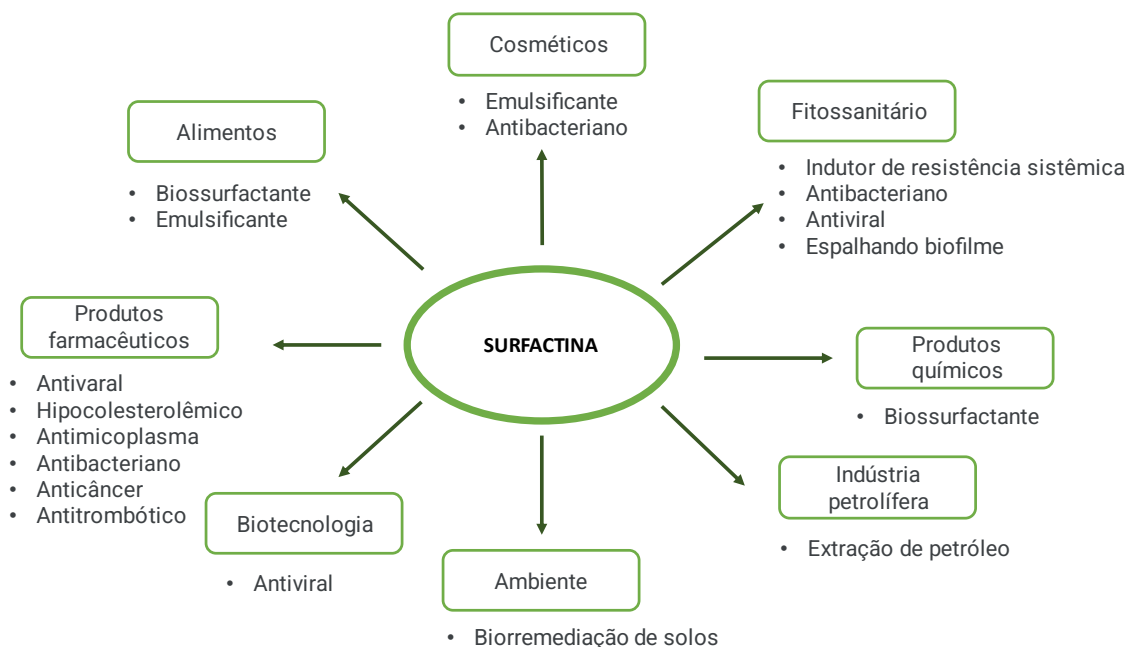


Figura 12: Setores de aplicação e propriedades exploradas da surfactina. Fontes: Adaptação de Jacques, 2010; Meena e Kanwar, 2015.

4 Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo

O microrganismo empregado nesse estudo foi a linhagem *Bacillus subtilis* LFB 732, pertencente à Coleção de Culturas de *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB), do Laboratório de Fisiologia Bacteriana, lotado na Fiocruz - Instituto Oswaldo Cruz. A CCGB é filiada à World Federation for Culture Collections (WFCC), sob o registro WDCM 574. A linhagem utilizada foi a mesma que vem sendo empregada pelo grupo de pesquisa (SANTIAGO, 2019; VIANA, 2022). A morfologia macroscópica da linhagem utilizada no estudo pode ser visualizada na Figura 13, enquanto a imagem da morfologia microscópica das células de cultivo de menos de 24 h, coradas pela técnica de coloração diferencial de Gram, foi anteriormente apresentada (Figura 10).



Figura 13: Morfologia macroscópica da linhagem Bacillus subtilis LFB 732 utilizada no experimento. Fonte: Autoria própria

4.2 Manutenção e ativação da cultura

A linhagem bacteriana foi mantida por repiques mensais em meio sólido (Agar Nutriente), doravante denominada cultura estoque. Após incubação por máximo de 24 h, em estufa bacteriológica 30 ± 1 °C, a cultura estoque (Figura 13) foi checada quanto à pureza e, em seguida, armazenada sob refrigeração em geladeira, em temperatura em torno de 4 °C. Foram preparadas três culturas estoques a cada vez, a fim de evitar a perda da cultura por falha da técnica asséptica, que acarretasse a sua contaminação por microrganismos do ar.

A ativação da cultura estoque foi realizada pela transferência de uma alçada das células, de no máximo 30 dias de estocagem sob refrigeração, para novo meio em tubo de ensaio pela semeadura em zig-zag sobre o bisel. Antes da inoculação e após o crescimento das células no novo meio de cultura, foi coletado material para verificação da pureza, como recomenda a prática (KARWA; RAI; SINGH, 2012). Para tanto, foi feito o exame microscópico de preparações de células coradas pela técnica de Gram.

4.3 Meio de cultura

4.3.1 Meio de crescimento

A propagação da linhagem bacteriana foi realizada em frasco Erlenmeyer de capacidade volumétrica total de 500 mL, contendo 200 mL de caldo nutriente de acordo com os trabalhos de Santiago (2019) e Viana (2022), cuja composição está apresentada no Quadro 1. A propagação foi realizada em duplicata para fins de evitar a não continuidade do experimento caso houvesse algum problema de contaminação.

Quadro 1: Composição do meio de crescimento

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona de carne	5,0
Extrato de levedura	3,0
Glicose	9,0
NaCl	9,0

O meio de cultura, após a devida dissolução dos componentes, teve seu pH ajustado a 7 pela adição de solução 4 M NaOH, e, logo em seguida, foi esterilizado por autoclavação a 1 atm (121°C), durante 20 minutos. Os meios de cultura foram submetidos a teste de esterilidade por 24 h para garantir ausência de microrganismos.

4.3.2 Meio de produção

A produção do biossurfactante ocorreu em meio previamente otimizado por Santiago (2019), o qual é apresentado no Quadro 2. O açúcar VHP, única fonte de carbono presente na formulação, foi cedido pelo CENPES/Petrobras, e proveio da indústria de cana de açúcar Cruz Alta, Grupo Tereos (Olimpia, São Paulo). Este açúcar, apesar do baixo teor de impurezas, contém vários elementos químicos como Ca²⁺, Mg²⁺, K¹⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺ (BORGES; AMORIM, LOPES, 2012), alguns destes comprovadamente essenciais como elementos traço para a biossíntese se surfactina (ARUTCHELVI et al,

2014; YANG; WU; XU, 2020; DOBLER et al, 2020). Provavelmente, por esta razão, o meio após otimização é nutricionalmente mais limitado, qualitativamente e quantitativamente, do que os meios praticados por vários pesquisadores (RAMAN; KARANTH, 1989; NAZINA et al, 2005; ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008; AL-BAHRY et al, 2013; JHA; JOSHI; GEETHA, 2016).

Quadro2: Composição do meio de produção

Componentes	Concentração (g/L)
NH ₄ NO ₃	3,0
MgSO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	3,0
Açúcar VHP	35
9 mL de solução de FeSO ₄	0,1
Solução tampão (Tabela X), q.s.p.	mL

**A solução de ferro²⁺ foi preparada separadamente, esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,1 µm, e acrescentada ao meio de produção imediatamente antes do seu uso.*

Como apresenta o Quadro 2, os componentes do meio de produção (Quadro 2) foram dissolvidos em solução tampão fosfato (Quadro 3), pH 6,643 (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2007), cuja composição química é apresentada no Quadro 3, com o objetivo de garantir o controle da acidez durante o processo fermentativo.

Quadro3: Composição da solução tampão Sørensen Na₂HPO₄/KH₂PO₄ (pH 6,643)

Componentes	Fração	Concentração (g/L)
Na ₂ HPO ₄	0,6	11,876
KH ₂ PO ₄	0,4	9,078

4.4 Preparo do inóculo

A ativação do microrganismo foi realizada a partir do repique da cultura estoque, mantida sob refrigeração, por no máximo 15 dias. Para tanto, uma alçada da cultura estoque

foi semeada sobre o bisel de agar nutriente e, a seguir, o tubo de ensaio foi incubado a 30 ± 1 °C por 24 h. Findo o período de incubação, duas alçadas da cultura ativada foram inoculadas em 200 mL do meio de crescimento (item 4.3.1) em frascos cônicos de 500 mL. Os cultivos foram mantidos em uma mesa incubadora (Shaker Incubadora Ambiental Controlada – Tecnal, TE-420) com agitação orbital de 150 rpm e controle de temperatura a 30 ± 1 °C, por um tempo de 12 h, com o objetivo alcançar o máximo de células na fase exponencial de crescimento.

4.5 Produção do Biosurfactante

O presente estudo teve a necessidade de testar diferentes configurações de biorreatores convencionais de bancada haja visto que, em geral, a condução do processo para produção de BS acarreta elevada geração de espuma o que, por sua vez, impede avaliar condições mais enérgicas de aeração e agitação. Isto é mais imperativo quando o biosurfactante a produzir é o lipopeptídeo surfactina por sua ação efetiva na formação de espuma de alta estabilidade há muito tempo reconhecida (Razafindralambo et al, 1996).

4.5.1 Reator DASbox

O DASbox é um sistema único de mini biorreatores de *design* compacto que atende o desenvolvimento de ensaios com culturas microbianas, de células humanas, inclusive estaminais¹. Existem diferentes opções com números de biorreatores variando de 4 a 20, e pequenos volumes de trabalho, 60 - 250 mL, controle de parâmetros críticos do processo (temperatura, pH e OD). Este sistema é muito prático pois permite a realização dos ensaios de uma matriz de planejamento experimental em biorreatores e em blocos, e, assim, chegar à padronização e otimização de processos de forma bem rápida, sem que condições externas possam interferir nos resultados. A Figura 14 mostra o sistema do reator DASbox com 4 vasos de 250 mL, similar ao do Laboratório de Biotecnologia Microbiana – LaBiM, IQ/UFRJ, onde foram conduzidos alguns ensaios.

¹ ou células-tronco, são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e divisão ilimitada, altamente eficiente para a melhora da cicatrização tecidual e autorregeneração de tecidos.



Figura 14: Modelo esquemático de um reator DASbox. Fonte: Eppendorf.

Inicialmente, foi escolhido este sistema pela possibilidade de realizar os experimentos em maior número e com pequenos volumes, adotando distintas velocidades de agitação e vazão de ar estéril, além de possibilitar o monitoramento de parâmetros críticos do processo e controle de T, e principalmente estabelecer os níveis iniciais de OD, e o seu registro durante o processo fermentativo.

4.5.1.1 Primeiro Planejamento Experimental

O estudo do efeito do OD em função de distintas condições de velocidade de agitação e vazão de ar estéril foi feito com base no planejamento composto central de dois níveis e duas variáveis, contemplando quatro ensaios mais três pontos centrais e mais quatro axiais, com total de 11 experimentos (Quadro 4). Como consta na tabela, os valores mínimos aeração e agitação, representados por $-\alpha$ foram definidos em 0 vvm (sem aeração) e 0 rpm (sem agitação) e como valores máximos, $+\alpha$, 3,0 vvm e 500 rpm. Os pontos centrais correspondem a média entre os valores máximo e mínimo. Os valores, representados por -1 e +1, foram obtidos pelo modelo estatístico.

Quadro 4: Matriz do planejamento experimental

Experimento	Aeração	Agitação	Taxa de aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)
1	-1	-1	0,5	75
2	+1	-1	2,5	75
3	-1	+1	0,5	425
4	+1	+1	2,5	425
5	0	0	1,5	250
6	0	0	1,5	250
7	0	0	1,5	250
8	1,414214 ($+\alpha$)	0	3,0	250
9	-1,414214 ($-\alpha$)	0	0	250
10	0	1,414214 ($+\alpha$)	1,5	500
11	0	-1,414214 ($-\alpha$)	1,5	0

O volume de meio nos reatores foi definido em 140 mL, para que se houvesse formação de espuma, não interferisse no andamento do bioprocessamento e a temperatura foi controlada a 30 ± 1 °C. Para esta etapa foi definido tempo de processo de 24 h, embora anteriormente tenha sido determinada ser a produção máxima alcançada em 12 h (SANTIAGO, 2015). Isto para atender a logística das etapas preliminares e o uso do laboratório, já que também foi constatada não ser o BS degradado nas 12 h seguintes a sua produção.

4.5.1.1 Segundo Planejamento Experimental

Desta vez, o efeito do OD em função de distintas condições de velocidade de agitação e vazão de ar estéril foi avaliado para matriz de planejamento composto central definida para menores valores de taxa de aeração e velocidade de agitação, além de reduzir o volume operacional para 100 mL. O Quadro 5 apresenta a nova matriz de planejamento experimental.

Quadro 5: Segunda Matriz do planejamento experimental

Experimento	Aeração	Agitação	Taxa de aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)
1	-1	-1	0,3	60
2	+1	-1	1,7	60
3	-1	+1	0,3	340
4	+1	+1	1,7	340
5	0	0	1,0	200
6	0	0	1,0	200
7	0	0	1,0	200
8	1,414214 (α)	0	2,0	200
9	-1,414214 ($-\alpha$)	0	0	200
10	0	1,414214 (α)	1,0	400
11	0	-1,414214 ($-\alpha$)	1,0	0

A execução dos ensaios foi conduzida do mesmo modo descrito para a primeira matriz. Contudo, inicialmente somente foram realizados os experimentos 8 e 10 para avaliar a formação de espuma nas condições mais vigorosas e a ocorrência de vazamento de meio, pois representavam os maiores valores de aeração e agitação, respectivamente.

4.5.6 Reator CSTR

Nesta etapa, foi utilizado um biorreator de bancada - tanque agitado contínuo, perfeitamente agitado ou CSTR (*Continuous Stirred-Tank Reactor*), tipo comumente usado no desenvolvimento de bioprocessos. O biorreator Multigen da New Brunswick Scientific Co, EUA de 2 L de capacidade nominal, e dotado de controle de temperatura, sistema de aeração e agitação magnética, operado com 500 mL de meio e temperatura de 30 ± 1 °C nas condições apresentadas no Quadro 6. Foram definidos alguns valores de aeração e agitação de modo a estabelecer teores iniciais de oxigênio dissolvido, variando de 2,2 a 6,5 mg/L.

Não foi possível realizar a mediação do OD durante o processo fermentativo, por isso a análise dos resultados foi feita com base nos teores iniciais e finais para cada condição estudada.

Quadro 6: Experimentos conduzido em reator CSTR para avaliar o efeito do teor inicial de OD.

Experimento	Aeração	Agitação	Taxa de aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)
1	-1	+1	0,0	250
2	+1	+1	2,0	250
3	+1	-1	2,0	0
4	0	+1	1,0	250
5	-1	-1	0,0	0

4.5 Recuperação do BS

O meio fermentado, adicionado de formol 2% (v/v) para a inativação das células, foi centrifugado a 10.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4°C, por 10 minutos para a retirada das células. A Figura 15 ilustra os tubos Falcon de 50 mL com o meio fermentado, antes e logo após a centrifugação, onde se constata a limpidez do sobrenadante e o *pellet* no fundo devido à sedimentação das células bacterianas. Amostras do sobrenadante foram analisadas microscopicamente e semeadas em meio nutriente para comprovar a ausência de células ativas.

O sobrenadante, isto é, o meio fermentado isento de células foi congelado por no máximo 20 dias em freezer doméstico (cerca de 20 °C) e analisados para determinação da tensão superficial, índice de emulsificação, estabilidade da espuma e ângulo de contato.



Figura 15: Aspecto visual do meio fermentado em tubo Falcon, antes (esquerda) e depois (direita) de centrifugado a 10.000 rpm e 4 °C, por 10 min. Fonte: Autoria Própria.

4.6 Métodos Analíticos

4.6.1 Tensão Superficial

A tensão superficial foi determinada pelo método da Placa de Wilhelmy usando do equipamento Kruss K100, cuja foto está na Figura 16. O método consiste em uma placa retangular de platina, suspensa por balança, que entra em contato com uma amostra de aproximadamente 25 mL do líquido de interesse para medir a TS. A placa é colocada em contato com o líquido até que o ângulo de contato entre o líquido e o ar se aproxime de 0°, como demonstrado na Figura 17. A área molhada da placa, então, sofre a ação da tensão superficial que provoca uma força puxando a placa. Essa força é medida pela balança acoplada à placa e diretamente proporcional à TS, que é calculada através da seguinte equação matemática (BURIN; STURM, 2014):

$$\gamma = \frac{F}{l \cos \theta}$$

Onde F é a força que puxa a placa, l é o perímetro molhado da placa e teta é o ângulo entre os dois fluidos.



Figura 16: Equipamento utilizado para determinar a tensão superficial pelo método da Placa de Wilhelmy. Fonte Autoria Própria.

Os valores são mostrados automaticamente em um computador ligado ao equipamento durante a medida. O tempo de duração da medida varia de acordo com a estabilização dos valores, com a formação de uma assíntota horizontal.

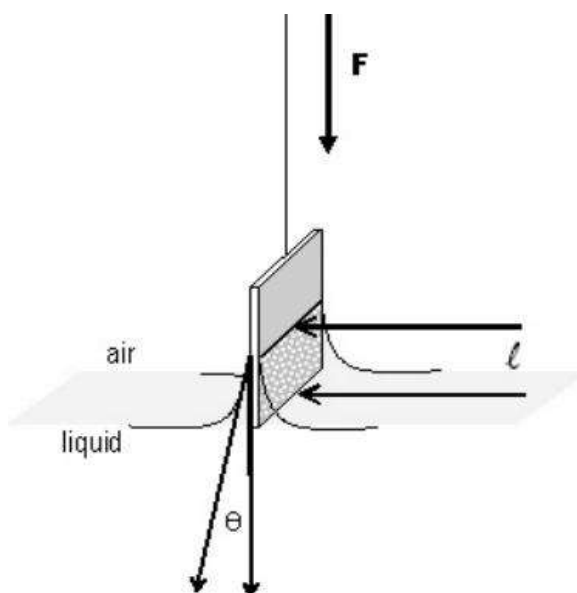


Figura 17: Desenho esquemático do método da Placa de Wilhelmy. Fonte: Burin e Sturn, 2014.

No presente trabalho, a estabilização das amostras ocorreu em tempo menor que 20 minutos, porém para padronizar o mesmo tempo de análise para todos os experimentos, foi definido aguardar 30 minutos para garantir a estabilidade. Dessa forma, o valor para a análise superficial foi obtido a partir da média dos 10 últimos valores.

4.6.2 Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação (IE) foi determinado, seguindo a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987), que é comumente utilizada (PANJIAR; SACHAN; SACHAN, 2015; NAYARISSERI et al, 2018; ALI et al, 2021). Em tubo de ensaio com tampa rosqueada, são introduzidos 2 mL do meio contendo o BS isento de células e 2 mL de um líquido imiscível em água (óleo mineral, óleo vegetal, óleo cru), em geral, hexadecano, que a seguir são agitados vigorosamente em vórtex por 2 minutos, de modo a favorecer a formação da emulsão. A mistura é deixada em repouso por 5 minutos e 24 horas, quando são feitas as medições das alturas da coluna total e da coluna emulsionada, com o auxílio de um paquímetro, de IE_5 e IE_{24} , respectivamente. O Índice de emulsificação é calculado a partir da seguinte equação:

$$IE = \frac{H_{EM}}{H_t} \times 100$$

Onde H_{EM} corresponde à altura da camada emulsificada e H_t é a altura da coluna total.

4.6.3 Estabilidade da Espuma

A determinação da estabilidade da espuma nos meios para as condições de OD ensaiadas foi avaliada adicionando amostra de 50 mL do meio fermentado isento de células em frascos com tampa e posterior agitação manual por aproximadamente 20 segundos. O material foi deixado em repouso à temperatura ambiente (sala climatizada a 25 °C). Após diferentes intervalos de tempo (1 h, 2 h, 3 h, 24 h e 28 h) foi avaliado o aspecto da espuma e a altura foi medida com o auxílio de um paquímetro.

4.6.4 Ângulo de Contato

As medidas de ângulo de contato foram baseadas na técnica da gota séssil e foram reproduzidas em conformidade com os estudos de Oliveira et al. (2018). Dessa forma, a análise ocorreu a partir do depósito de três gotas de amostras do biossurfactante sobre a superfície de placas de vidro no porta-amostra. O valor do ângulo de contato foi determinado com a transformação de imagens, a partir do ângulo formado pela interseção líquido-sólido com o auxílio do software ImageJ.

Essa análise foi realizada no Laboratório de Engenharia de Colóides – Lab EngeCol/COPPE/UFRJ.

4.6.5 pH

As medidas de pH dos meios, antes e após fermentação, foram realizadas com auxílio de potenciômetro digital modelo DMPH-1 (Digimed).

4.6.6 Oxigênio Dissolvido

Foi utilizado o medidor portátil MO 920 (Figura 18). Esse equipamento fornece diretamente o valor de oxigênio dissolvido no líquido em mg/L.



*Figura 18: Imagem ilustrativa do medidor de oxigênio MO 920, utilizado no experimento.
Fonte: Itest.*

5 Resultados e Discussão

5.1 Produção de Biosurfactante

Alguns pesquisadores reportam que o custo da produção de BS pode ser três a dez vezes superior ao custo para obtenção dos surfactantes derivados de sínteses químicas (KRONEMBERGER et al, 2008; NURFARAHIN; MOHAMED; PHANG, 2018; LUENGO et al, 2021; KARNWAL et al, 2023). Estes e outros autores citam que para a produção de biosurfactantes ser competitiva com os análogos químicos são pré-requisitos a obtenção de produtos com grande atividade, emprego de substratos de baixo custo, além de condições operacionais economicamente vantajosas que garantam elevados rendimentos.

São vários os trabalhos publicados que demonstram ser possível obter BS a partir de fontes renováveis e de baixo custo, inclusive resíduos agroindustriais (SINGH; PUTIL; ROLE, 2018; JIMOH; LIN, 2019; ZHU et al, 2020; BANAT et al, 2021; SHI et al, 2021; NAZARETH et al, 2021; RASTOGI et al, 2021; VIEIRA et al, 2021; GAUR et a, 2022; HAIDAR et al, 2022; MGBECHIDINMA et al, 2022). Entretanto, o que parece ser o principal entrave deste bioprocesso, com efetividade para a produção de surfactina por linhagens de *Bacillus subtilis*, é a vigorosa formação de espuma (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001; HÁ et al, 2018; NAZARETH et al, 2021). Talvez, por isso, sejam escassos

os estudos que tratam de avaliar a influência do OD, embora reconhecidamente este parâmetro fermentativo interfira fortemente tanto no rendimento de LP quanto na estrutura química da biomolécula, o que, por sua vez, terá efeito nas propriedades físico-químicas e no tipo de aplicação (ANJUM et al, 2016; SINGH et al, 2018; BJERK et al, 2021; MOHANTY et al, 2021).

É reconhecido que tanto o crescimento microbiano quanto a biossíntese de bioprodutos em biorreatores são intensamente influenciados pela composição do meio de cultura e por fatores físicos, fundamentalmente a agitação, a aeração, a temperatura, o tempo de fermentação e o oxigênio dissolvido (ZHOU et al, 2018). Basicamente, a agitação tem um papel importante de mistura, contribuindo para a transferência de nutrientes e de oxigênio entre o ar, meio e microrganismos, embora possa ser causa de cisalhamento de microrganismos. Como bem coloca Zhou e colaboradores (2018), as forças de cisalhamento podem levar a alterações na morfologia das células, interferindo no seu crescimento e formação de metabólitos.

Para os processos fermentativos conduzidos em aerobiose, o suprimento de oxigênio é um dos principais fatores limitantes do crescimento microbiano e da formação de produtos, por isso a disponibilidade de oxigênio é um dos principais critérios para o escalonamento do bioprocessos (MARQUÉZ-VILLA et al, 2022). Entretanto, a aeração, além de garantir uma suficiente disponibilidade de oxigênio dissolvido para o metabolismo microbiano, pode ter papel importante na homogeneidade dos componentes no meio reacional, especialmente quando adotadas velocidades de agitação mecânica baixas.

Neste contexto, a otimização do processo deve ter início com a condução de experimentos em biorreatores em escala de bancada, passando a seguir para escalas maiores e escala piloto, o que permitirá definir os parâmetros fermentativos na produção industrial (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). A estratégia de escalonamento deve ser baseada em critérios como volume, eficientes sistemas de agitação mecânica e de oxigenação do meio de forma a atender a demanda das células microbianas, e, em consequência, incrementar a produção de lipopeptídeo. Porém, face aos problemas decorrentes da excessiva formação de espuma durante a formação de alguns LP, em especial surfactina, há que se avaliar também modos alternativos de aeração.

A busca por estratégias que minimizem a formação de espuma que acontece frequentemente nos biorreatores tipo CSTR, comumente usados em processos biotecnológicos (SHOW; YAN; LEE, 2019; GARGOURI et al, 2021; SCHIRMER et al, 2021), tem sido a premissa de alguns autores (YAO et al, 2016; YI et al, 2016; OREJA, FLORES; LUCCA, 2019; GONG et al, 2021). Isto sobretudo quando o bioproduto a ser produzido possua como característica intrínseca a formação de espuma, como é o caso de proteínas (SCHIMDT e al, 2010) e BS (RAZAFINDRALAMBO et al, 1996; ALONSO; MARTIN, 2016; LEUNER et al, 2020).

Alguns autores demonstraram ser possível obter surfactina mesmo com baixo suprimento de oxigênio (WILLENBACHER et al, 2015; ANIC et al, 2018; DOBLER et al, 2022). Em trabalho anterior de TCC do nosso grupo, conduzido em frascos Schott Duran® foi observado ser desprezível a diferença tanto da atividade tensoativa quanto emulsificante nas condições testadas de suprimento de oxigênio. Neste estudo, o suprimento de oxigênio foi dado em função da velocidade de agitação mecânica e do volume líquido, mantendo-se constante o borbulhamento de ar estéril, por uso de compressor de ar oxigenador Minjiang 4 saídas 10 w 39 1000L/h com passagem por membrana absoluta. Desta forma, não foi possível avaliar o teor de OD para as diferentes condições testadas. O objetivo do trabalho foi apenas analisar o efeito do suprimento de OD no comportamento da linhagem bacteriana e do LP produzido. Com base nos resultados obtidos, deu-se continuidade à investigação, desta vez com ênfase no teor de OD no meio reacional. Para tanto, os ensaios teriam que ser conduzidos em biorreator.

No presente estudo foram testados dois sistemas, sendo que para o primeiro ainda houve a adoção de diferentes condições de forma a abrandar a formação de espuma. As dificuldades levantadas para os sistemas reacionais e os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.1.1 Reator Sistema DasBOX

Decorridas 24 horas de fermentação para os ensaios 1 e 3 relativos à primeira matriz de planejamento experimental (Quadro 4), foi visível a intensa quantidade de espuma; obviamente houve maior suprimento de ar (Figura 19). Entretanto, para ambas os ensaios, ocorreu o vazamento de meio pelos reatores e filtros (Figuras 19 e 20), inclusive acarretando o rompimento das membranas filtrantes (Figura 20).

Considerando que a obstrução dos filtros compromete a entrada de ar e, mais ainda, que o vazamento não permitiria obter um dado de concentração de BS confiável, optou-se por elaborar nova matriz de experimentos; desta vez trabalhando com menor volume, o que possibilitaria garantir maior *headspace*. Assim sendo, volume de meio que antes correspondeu a 56% da capacidade nominal do reator, passou a ser de 40%. Este foi o menor volume de meio a ser adotado para obter quantidades suficientes de material para quantificação e caracterização do BS produzido para cada condição experimental.

Entretanto, mesmo utilizando o volume mínimo de meio de produção de 100 mL, e adotando menores valores de velocidade de agitação e taxa de aeração para delineamento da nova matriz de planejamento de experimentos (Quadro 5), o teste nas condições mais vigorosas resultou novamente em transbordamento e obstrução dos filtros antes de 24 h.



Figura 19: Produção de BS por linhagem de B.subtilis LFB362, conduzida em sistema DASbox decorridas 24 horas de fermentação: experimento 1 (esquerda) e experimento 3 (direita) conforme primeira matriz de planejamento experimental. Fonte: Autoria Própria.



Figura 20: Produção de BS por linhagem de B.subtilis LFB362, conduzida em sistema DASbox decorridas 24 horas de fermentação, onde se evidencia o vazamento de meio pelos filtros de ar. Fonte: Autoria Própria.

5.1.2 Biorreator CSTR

Para dar continuidade à bateria de experimentos, foi avaliado um biorreator de bancada, tipo CSTR, de 2 L de capacidade, que por ser único, foi necessário realizar apenas um experimento por vez. Deste modo, teve que ser reduzido o número de ensaios, impedindo obter dados suficientes para realização de análise estatística.

Preliminarmente, foram feitas algumas tentativas para definição de volume de meio, sistema de aeração e valores de taxa de aeração e velocidade de agitação visando garantir o bom desenvolvimento do bioprocessamento em todas as condições operacionais alinhadas.

O Quadro 7 apresenta os valores de OD determinados no meio reacional decorridas 24 h de fermentação, quando se deu a interrupção do experimento, seguindo-se a inativação das células e a centrifugação do mosto fermentado.

Quadro 7: Valores de oxigênio dissolvido determinados nos meios fermentados para as condições testadas de aeração/agitação

Experimento	Taxa de aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)	Oxigênio Dissolvido (mg/L)
1	0,0	250	2,8
2	2,0	250	6,5
3	2,0	0	3,1
4	1,0	250	5,7
5	0,0	0	2,2

*Teor de OD no meio reacional, antes do uso e aeração/agitação: 1,8 mg/L

Analisando o Quadro 7, evidencia-se que tanto a aeração e a agitação, individualmente, quanto a combinação de ambas teve efeito no teor de OD no meio reacional, como esperado. E, decorridas 24 h, aparentemente não houve redução expressiva da disponibilidade de OD no meio reacional. Além disso, quando o bioprocessamento foi conduzido com os maiores valores de vazão de ar e velocidade de agitação (Exp. 2) foi

alcançado alto nível de saturação de ar. Similar nível de saturação foi evidenciado por Huang, Chen e Chen (2009) ao estudar a síntese de ácido hialurônico por linhagem de *Streptococcus zooepidemicus*. Nota-se, porém, que ao longo do processo fermentativo, estes autores registraram queda para ao redor de 75%, e retorno ao patamar inicial ao fim do processo fermentativo. Logo, a importância do monitoramento do OD ao longo de todo o processo é fundamental para fazer uma precisa análise crítica do perfil de produção de BS.

Comparando os níveis de OD dos experimentos 5 e 3, nota-se que praticar a oxigenação do sistema, sem agitação mecânica pouco favorece o devido suprimento de O₂ para a atividade celular. Nestes experimentos foram alcançados nível de OD próximos ao obtido quando o sistema foi operado apenas com agitação (Exp. 1). Desta forma, considerando que o custo da aeração pode representar até 25% do custo global do bioprocessamento (ÅMAND; OLSSON; CARLSSON, 2013), não seria economicamente vantajoso adotar a aeração para oxigenação e homogeneização do meio.

Por outro lado, aeração combinada com agitação resulta em bom nível de OD, tanto maior quanto maior a taxa de aeração (Experimentos 1, 4 e 2). Nota-se ainda que o teor de OD do meio fermentado quando o bioprocessamento foi conduzido sem aeração (Exp. 1) foi aproximadamente a metade do determinado para 1 vvm. (Exp. 4), enquanto que para o dobro da vazão de ar tenha proporcionado um acréscimo de tão somente 12% (Exp. 2). Logo, não caberia operar na maior vazão de ar em face do alto custo, a não ser que isso proporcione um efeito positivo na quantidade e estrutura da biomolécula.

A determinação ao final do processo revelou pH próximo à neutralidade para os meios nas cinco condições operacionais analisadas. Portanto, o controle do pH pelo emprego de tampão fosfato foi confirmado. Santiago (2019) verificou queda no pH ao longo do bioprocessamento, o que resultou em redução da produção de BS.

Os meios, decorridas 24 h de fermentação nas cinco distintas condições operacionais de aeração e agitação, após remoção das células, foram analisados para determinação da tensão superficial. A medição foi feita com base em medições em intervalos de 30 minutos de forma a garantir que todas as amostras atingissem o mesmo nível de estabilidade. A Figura 21 apresenta as medições de TS para cada condição testada por 30 min.

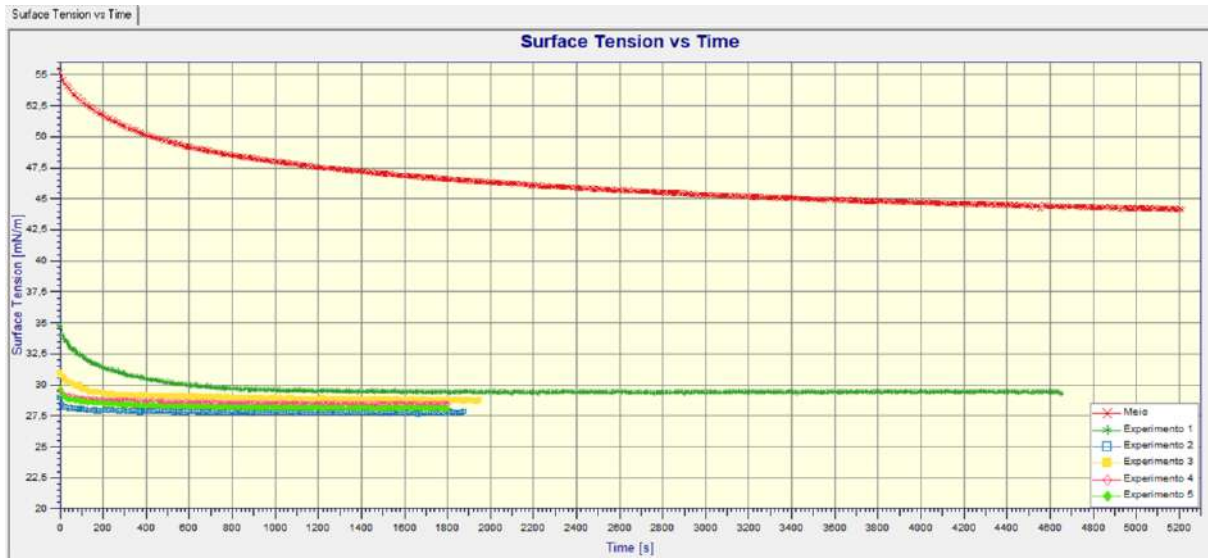


Figura 21: Gráfico com os valores de Tensão Superficial obtidos durante os 30 minutos de análise. Fonte: Autoria Própria.

A tabela 1 apresenta os valores de TS correspondente à média dos 10 últimos valores obtidos no decorrer de 30 min.

Tabela 1: Valores de tensão superficial para distintas condições de aeração e agitação testadas.

Experimento	Taxa de aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)	Tensão Superficial (mN/m)	Desvio
1	0,0	250	29,4	0,0475
2	2,0	250	27,7	0,0276
3	2,0	0	28,7	0,0362
4	1,0	250	28,5	0,0184
5	0,0	0	28,1	0,0281

Segundo levantamento científico, um bioproduto apresenta boa propriedade tensoativa quando é capaz de reduzir a TS da água para valores abaixo de 35-30 mN/m (MULLIGAN, 2005; BARROS et al, 2007; AL-BAHRY et al, 2013; AL-WAHAIBI, 2014;

DE et al, 2016; FERNANDES et al, 2016; SANTOS et al, 2018). Portanto, pode-se concluir que independentemente do nível de OD, baixo ou alto, houve produção de biossurfactante.

Em trabalho realizado por Santiago (2019) com a mesma linhagem e composição de meio os valores de TS variaram de 28,5 a 29,7 mN/m, ratificando os nossos resultados.

Como explanado anteriormente, a partir de uma certa concentração de BS, tem início a formação de micelas, mantendo-se inalterados os valores de TS. Portanto, a determinação de TS só indica a efetividade do bioproduto quanto a atividade tensoativa, não possibilitando antever a quantidade produzida.

As biomoléculas obtidas a partir das fermentações conduzidas nas distintas relações aeração/agitação também foram avaliadas quanto à capacidade de formar emulsões estáveis, à molhabilidade e à estabilidade da espuma de modo a direcionar sua aplicação. Note-se que os testes foram realizados com os meios fermentados e, portanto, em baixas concentrações dos bioprodutos.

A determinação da atividade emulsificante normalmente é feita com hidrocarbonetos, sendo a maioria com n-hexadecano (CAMEOTRA; SINGH, 2009; BAK et al, 2014; SANTOS et al, 2021). Porém, muitas vezes são testadas também outras fases orgânicas, uma vez que a atividade emulsificante pode variar de acordo com o tipo de líquido por conta da afinidade química. Esse fenômeno explica a ocorrência de tantas variações de índice de emulsificação reportados na literatura (ALVES et al., 2017). Além disso, a atividade tensoativa pode impedir a coalescência entre as moléculas, fenômeno irreversível que consiste na ruptura dos filmes finamente formados entre duas gotas que se unem para formar uma gota maior e pode resultar na separação das fases, ou seja, ocorrência de desemulsificação. Por isso, a necessidade de avaliar a estabilidade da emulsão, analisando o fenômeno por um período maior. Não há ainda uma boa concepção do fenômeno, mas sabe-se que está associado a baixas concentrações do agente, ou seja, a concentração do produto está diretamente relacionada à eficiência do emulsificante.

Os valores relativos ao IE de 5 min (IE₅) e 24 h (IE₂₄) frente a óleo vegetal de soja, óleo mineral, petróleo e hexadecano, para fins comparativos foram plotados em gráficos.

Para análise, deve ser levado em consideração que a capacidade de um produto de formar emulsões estáveis é efetiva quando pelo menos 50% do volume total formado por líquidos imiscíveis se mantém emulsionados por 24 horas (BATISTA et. al, 2006).

Ao analisar a Figura 22, é possível verificar que os biossurfactantes produzidos não apresentaram bom desempenho quanto à atividade emulsificante para hexadecano, nem mesmo logo após o contato do meio fermentado com este hidrocarboneto. Contudo, quando utilizada a mistura complexa de hidrocarbonetos (petróleo), o índice de emulsificação decorridas 24 h da agitação entre as fases, permitiu atingir patamares superiores a 50% para todas as condições de fermentação testadas, com destaque para Exp. 1 e Exp. 4 com IE₂₄ de 62% e 57%, respectivamente. Entretanto, para ambos houve decaimento ao redor de 25% em relação ao valor inicial (IE₅), o que sugere baixa estabilidade da emulsão formada. Em alguns casos, isto é até interessante como na recuperação de petróleo de reservatórios. A emulsão deve se manter durante o deslocamento do óleo do poço onde há injeção de água até o poço produtor, e permitir a separação das fases água de produção e óleo assim que cheguem à superfície.

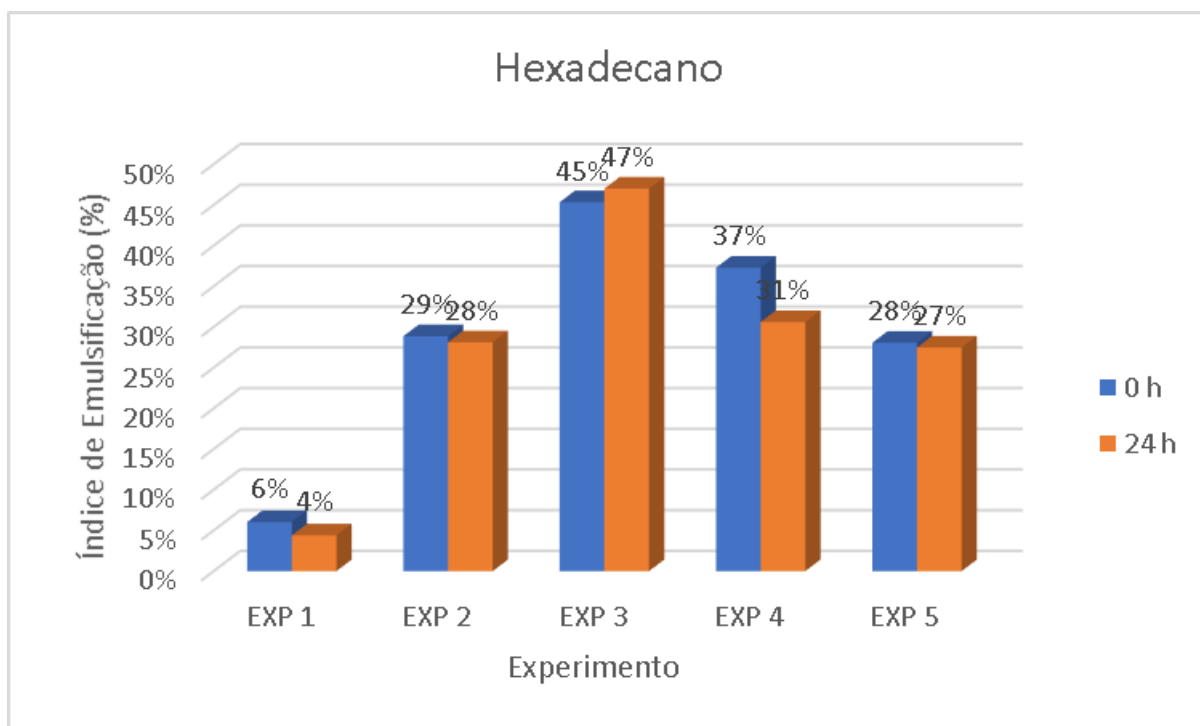
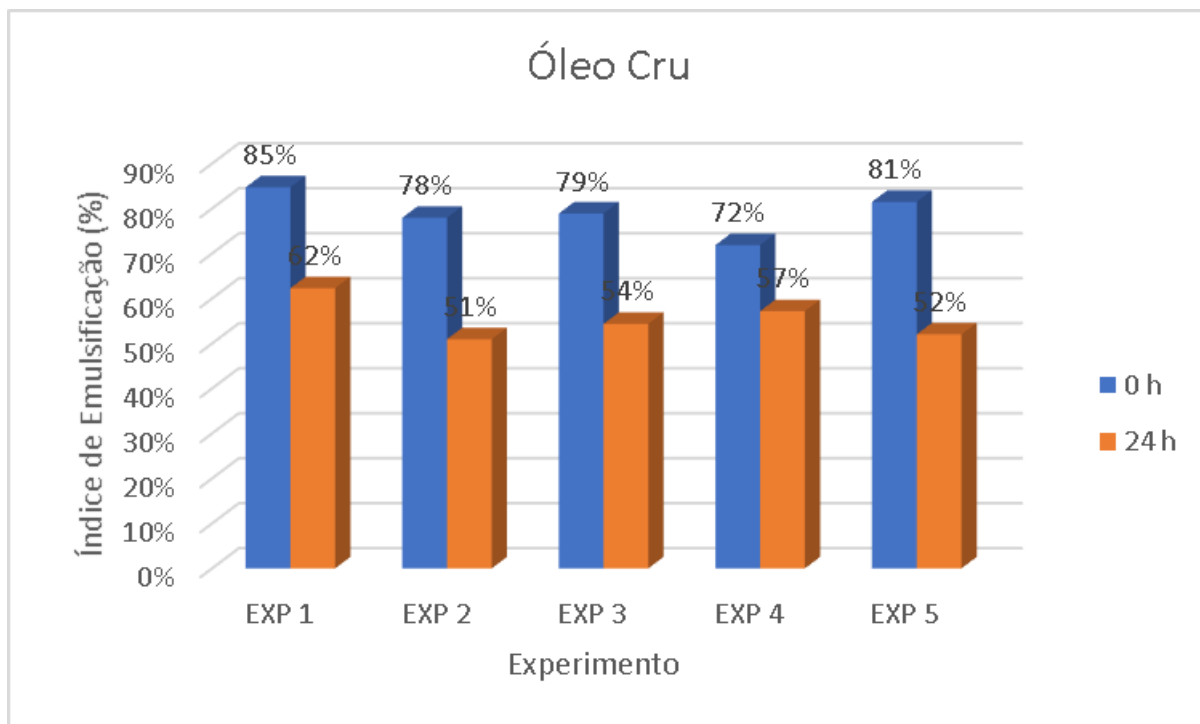


Figura 22: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Hexadecano como hidrocarboneto.
Fonte: Autoria Própria.



*Figura 23: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Petróleo como hidrocarboneto.
Fonte: Autoria Própria.*

Os bioprodutos formados não se mostram eficientes para emulsificação dos óleos mineral (Figura 24) e vegetal (Figura 25), embora para o primeiro tenha sido evidente a estabilidade das emulsões para amostras dos meios fermentados de todas as condições operacionais avaliadas.

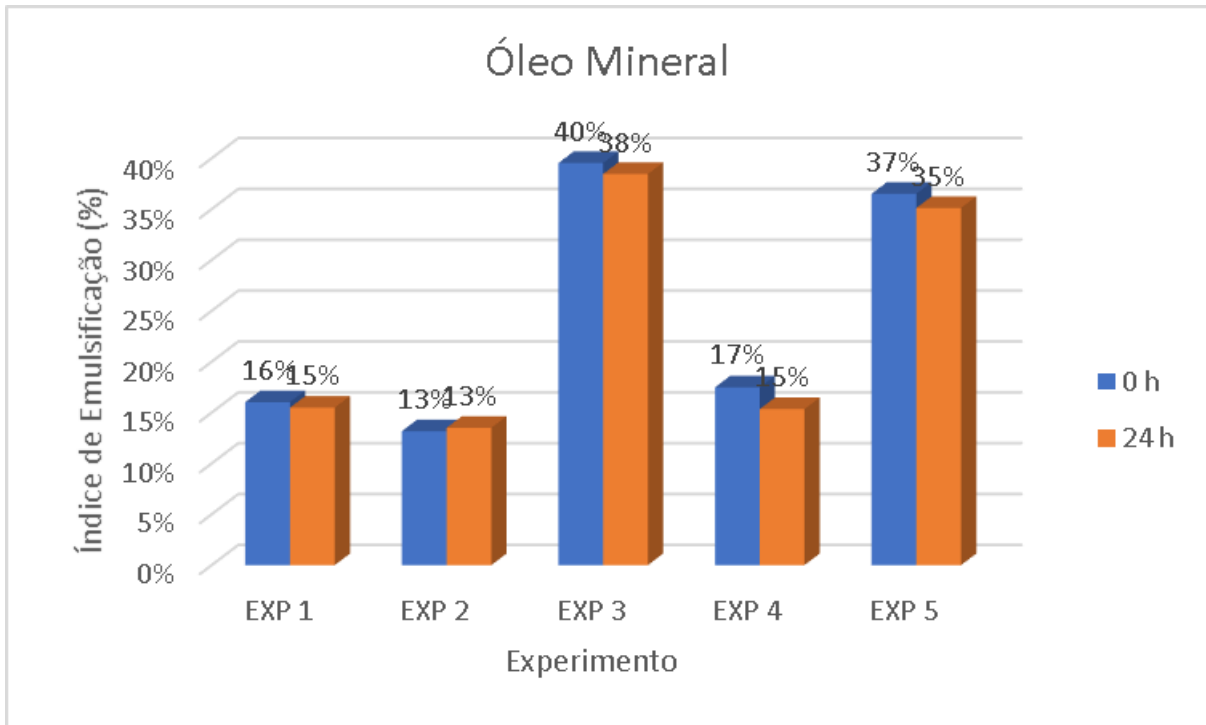


Figura 24: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Óleo Mineral como hidrocarboneto.
Fonte: Autoria Própria.

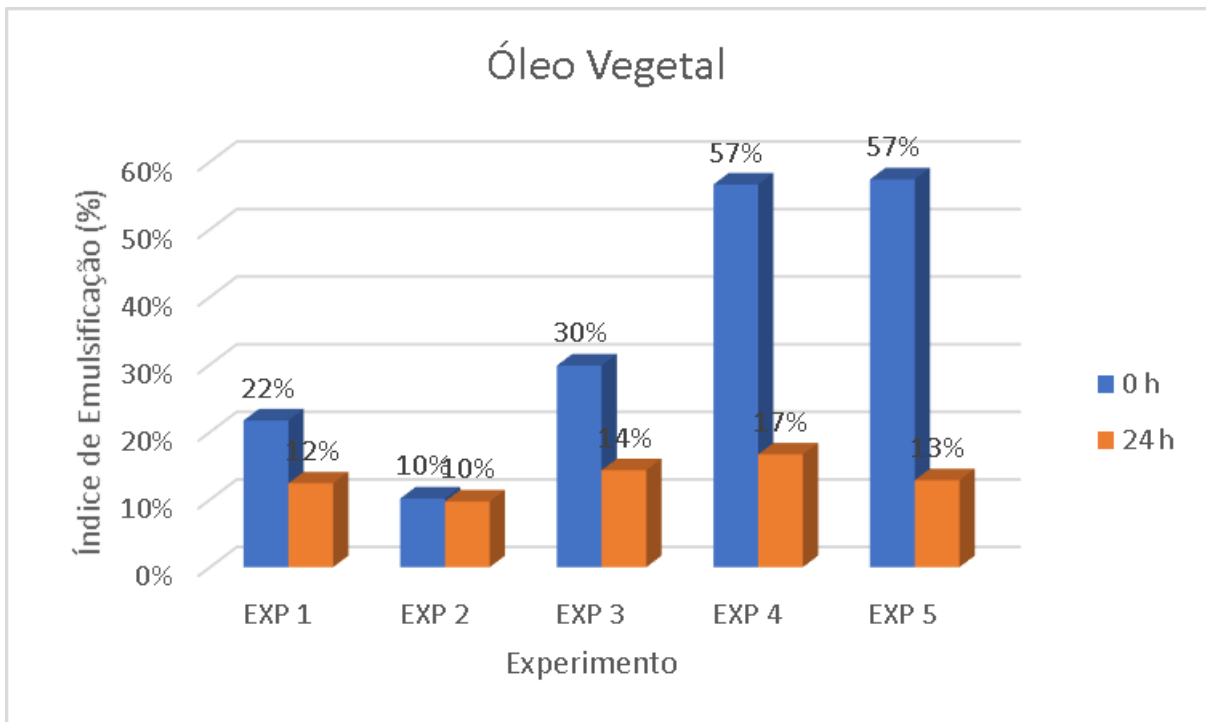


Figura 25: Resultados de Índice de Emulsificação utilizando Óleo Vegetal como hidrocarboneto.
Fonte: Autoria Própria.

Em geral, o Exp. 3 (meio fermentado com baixa concentração de OD, de 3,1 mg/L) foi o que propiciou os melhores resultados de emulsificação e estabilidade da emulsão. Tem-se ainda que a disparidade dos resultados corrobora com a existência de afinidade entre as moléculas da fase aquosa e oleosa, sugerindo o efeito da disponibilidade de OD e velocidade de agitação na quantidade de bioproduto formado e/ou na variação da sua estrutura química.

Por outro lado, os BS produzidos propiciaram uma intensa formação de espuma. Os aspectos das espumas formadas logo após a agitação manual para diferentes tempos em repouso são apresentados nas Figuras 26 a 30. Inicialmente, observa-se a formação de camadas bem compactas similares entre si.



Figura 26: Aspecto da espuma de cada produto logo após a agitação. Fonte: Autoria Própria.

Após repouso de 1 hora após a agitação (Figura 27), é visível a diferença do aspecto da espuma, sendo ainda visível o decaimento da altura para meios de algumas condições.



Figura 27: Aspecto da espuma de cada produto 1 hora após a agitação. Fonte: Autoria Própria.

Com 2 e 3 horas de repouso (Figuras 28 e 29), o decaimento foi pequeno, porém a camada de espuma apresenta maior intensidade de bolhas.

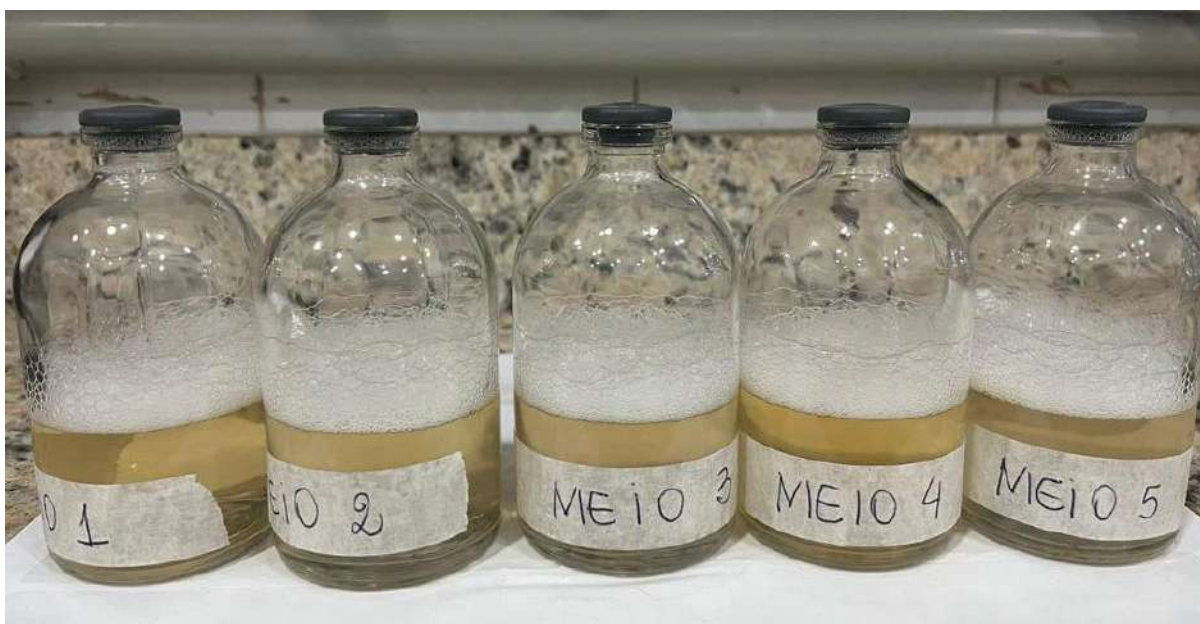


Figura 28: Aspecto da espuma de cada produto 2 horas após a agitação. Fonte: Autoria Própria.



Figura 29: Aspecto da espuma de cada produto 3 horas após a agitação. Fonte: Autoria Própria.

Com 24 horas da agitação, é nítido o decaimento da camada de espuma, permanecendo apenas nas bordas dos frascos.



Figura 30: Aspecto da espuma de cada produto 24 horas após a agitação. Fonte: Autoria Própria.

Os dados de altura da espuma formada por agitação manual em tempos distintos, variando de 1 a 3 h, e decorridas 24 h em repouso a temperatura ambiente (25 °C) para amostras dos cinco meios fermentados foram compilados no Quadro 8 e apresentados Figura 31, de modo a comparar o comportamento da espuma ao longo do tempo de análise.

Quadro 8: Altura (cm) da espuma medida nos respectivos tempos de repouso.

Experimentos	0h	1h	2h	3h	24h
1	1,74	1,44	1,35	0,97	0,55
2	1,64	1,28	1,04	0,51	0,43
3	1,45	1,08	0,78	0,47	0,31
4	1,58	1,19	0,94	0,75	0,44
5	1,31	0,95	0,61	0,43	0,27

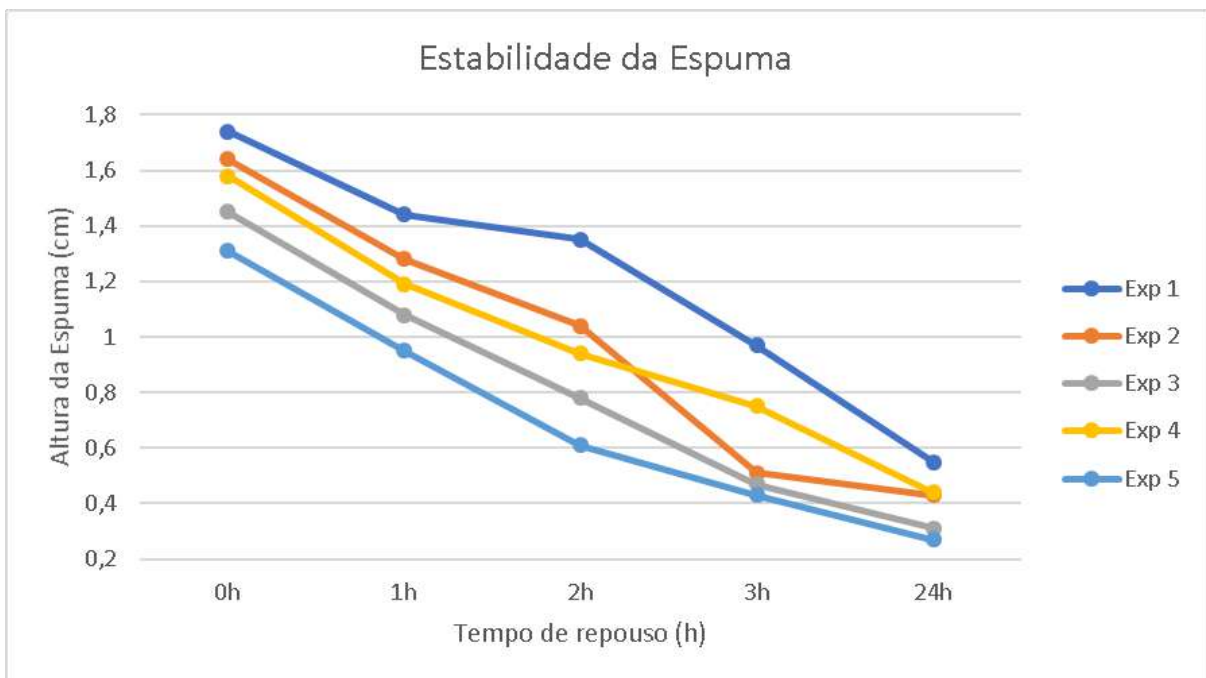


Figura 31: Gráfico altura de espuma versus tempo de cada experimento. Fonte: Autoria Própria.

O perfil de decaimento da altura de espuma foi bem similar para os cinco meios, com quedas variando de 68% a 79%. Portanto, o nível de OD não interferiu na capacidade de formação de espuma e na sua estabilidade, o que está relacionada à estrutura molecular.

A medida do ângulo de contato de uma gota sobre uma superfície demonstra a capacidade de molhamento da superfície pela solução. A partir do resultado, a superfície

pode ser hidrofílica, quando o ângulo for menor que 90° ou hidrofóbico, nos casos em que o ângulo for superior a esse valor. Logo, quanto menor for o ângulo de contato, maior será o espalhamento da gota na superfície. O tratamento de uma superfície com surfactina antes da análise tem a capacidade de reduzir sua hidrofobicidade (ZEIRAK e NITSCHKE, 2010). Além disso, a concentração de biossurfactante é indiretamente proporcional ao ângulo de contato (SOARES, 2014).

A tabela 2 apresenta a média dos valores obtidos para o ângulo de contato nas 5 repetições analisadas para cada amostra.

Tabela 2: Valor obtido para o ângulo de contato para cada amostra.

Experimento	Taxa de aeração (vvm)	Velocidade de agitação (rpm)	Ângulo de contato (°)	Desvio
1	0,0	250	44,29	0,79
2	2,0	250	52,48	1,42
3	2,0	0	54,49	1,93
4	1,0	250	48,42	1,60
5	0,0	0	45,87	2,70

A partir de uma análise geral, é possível observar que todas as amostras obtiveram valores menores que 90°, na faixa de 44 a 55°, mostrando ser uma superfície hidrófila. Com uma visualização mais detalhada da Tabela acima, a amostra que mostrou melhor propriedade de molhamento foi a referente ao experimento conduzido apenas com agitação (Experimento 1), com um ângulo de 44,29°. No entanto, o experimento na ausência de ambas as condições (Experimento 5) manteve o espalhamento da gota bem similar.

As Figuras 32 a 36 representam as imagens analisadas no software ImageJ para cada experimento para realizar o cálculo do ângulo de contato:

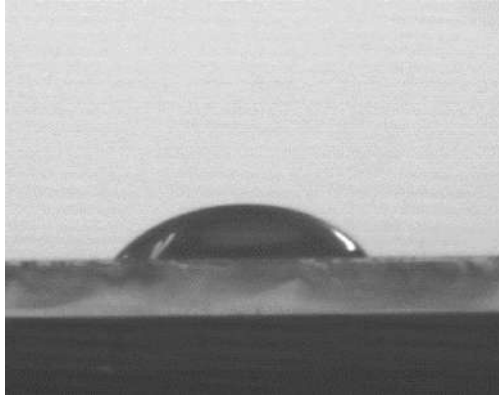


Figura 32: Imagem do experimento 1 analisada no software ImageJ. Fonte: Aatoria Própria.

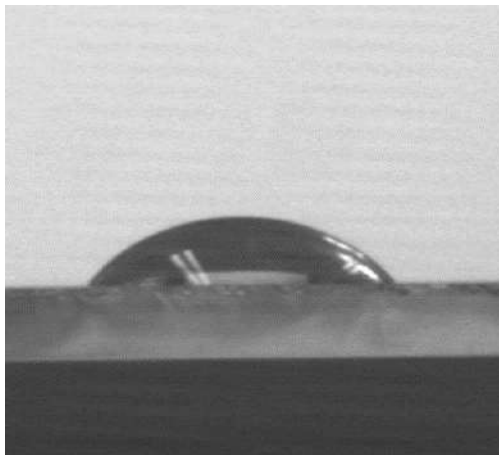


Figura 33: Imagem do experimento 2 analisada no software ImageJ. Fonte: Aatoria Própria.



Figura 34: Imagem do experimento 3 analisada no software ImageJ. Fonte: Aatoria Própria.



Figura 35: Imagem do experimento 4 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.

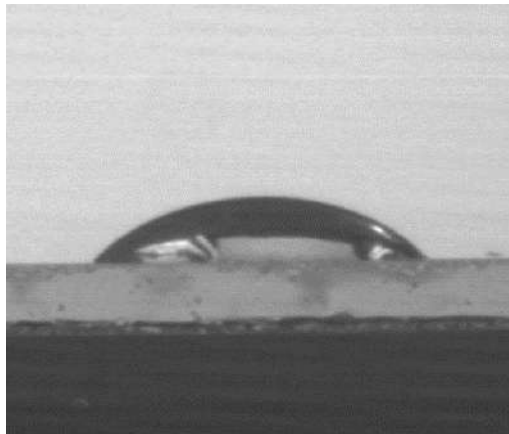


Figura 36: Imagem do experimento 5 analisada no software ImageJ. Fonte: Autoria Própria.

6 Conclusões

- Maiores níveis de oxigênio dissolvido foram determinados nos sistemas aerados com agitação, mostrando seu efeito positivo na transferência de oxigênio do ar para o meio reacional e, assim, garantindo o suprimento adequado de oxigênio para o metabolismo microbiano.
- As condições operacionais de aeração (0, 1 e 2 vvm) e agitação (0 e 250 rpm) foram igualmente favoráveis a síntese de biossurfactante pela linhagem *Bacillus subtilis*

LFB32, apesar da variação do teor de oxigênio dissolvido no meio reacional de 2,2 a 6,5 mg/L, determinados nos mostos fermentados.

- Apenas o meio fermentado com 3,1 mg/L de oxigênio dissolvido foi capaz de apresentar atividade emulsificante para hexadecano e óleo mineral (IE₂₄ 40%);
- Todas as condições testadas com as variáveis nesse processo demonstraram ser eficazes na produção de tensoativos, visto que todos os biossurfactante obtidos reduziram a tensão superficial do meio para valores menores que 30 mN/m;
- Quanto as propriedades de molhamento, as amostras de biossurfactante obtiveram valores de ângulo de contato menores que 90°, variando na faixa de 44 a 55°, comprovando ser uma superfície hidrófila.
- Ademais, o produto obtido apresentou elevada propriedade espumante, a qual se mostrou altamente estável por 3 horas.

7 Referências Bibliográficas

[1] Santiago, M. R. F. Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria do petróleo. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2019.

[2] Karwa, A. S., Rai, M. K., Singh, H. B. HANDBOOK OF TECHNIQUES IN MICROBIOLOGY - A LABORATORY GUIDE TO MICROBES (2012).

[3] Abbot, V., Paliwal, D., Sharma, A., Sharma, P. A review on the physicochemical and biological applications of biosurfactants in biotechnology and pharmaceuticals. *Heliyon*. Volume 8, Issue 8. 2022. Doi:10.1016/j.heliyon.2022.e10149.

- [4] Sarubbo, L. A., Silva, M.G.C., Durval, I.J.B., BezerraK.G.O., Ribeiro B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., Banat, I. M. Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 181, 2022. doi:10.1016/j.bej.2022.108377.
- [5] Chen H L, Chen YS, Juang RS. Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process. *Sep Purif Technol.* 2008;59(3):244-52. doi:10.1016/j.seppur.2007.06.010.
- [6] Chen WC, Juang RS, Wei YH. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Bioch. Eng. J.* 2015; 103:158-69. doi: 10.1016/j.bej.2015.07.009.
- [7] M. Kanlayavattanakul, N. Lourith. *Lipopeptides in cosmetics*. School of Cosmetic Science, Mae Fah Luang University, Chiangrai, 2010.
- [8] Sen R, Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R. Surfactin: Biosynthesis, Genetics and Potential Applications. In: Ramkrishna S, editor. *Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants*. New York: Springer Science+Business media, LCC, Landes Bioscience; 2010, p. 316-323.
- [9] Seydlová G, Svobodová J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent Eur J Med.* 2008;3(2):123-33. doi: 10.2478/s11536-008-0002-5.
- [10] Heerklotz H, Wieprecht T, Seelig J. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by Deuterium NMR. *J Phys Chem.* 2004;108(15):4909-15. doi: 10.1021/jp0371938.
- [11] Liu JF, Mbadanga SM, Yang SZ, Gu JD, Mu BZ. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):4814-37. doi: 10.3390/ijms16034814.

- [12] Tendulkar SR, Saikumari YK, Patel V, Raghotama S, Munshi TK, Balaram P, et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *magnaporthe grisea*. *J Appl Microbiol.* 2007;103(6):2331-39. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03501.x.
- [13] Kachholz, T.; Schingmann, M. Em *Biosurfactants and Biotechnology*; Kosaric, N.; Cairns, W. L.; Gray, N. C. C., eds.; Marcel Dekker: New York, 1987, cap. 7.
- [14] Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.; Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 53, 495
- [15] Barros, F. F. C.; de Quadros, C. P.; Júnior, M. R. M.; Patore, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Quím. Nova* 30, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200031>
- [16] Alves, K. C. S.; de Almeida, M. E. M.; Glória, J. C.; dos Santos, F. A.; Pereira, K. D.; de Castro, D. P.; Mariúba, L. A. M. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. *Scientia Amazonia*, v. 7, n.2, B15-B23, 2018
- [17] Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C 1 Isolated from Petroleum Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 6210–6219.
- [18] Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A.-H. (2008). Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 305–325.
- [19] Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037–1062.

- [20] Larini, M. M.; Rezende, M. I.; Ribeiro, M. L. L.; Moreira-Gasparin, F. G. SURFACTINA: ESTRUTURA, APLICAÇÕES E FATORES ENVOLVIDOS EM SUA PRODUÇÃO, 2017.
- [21] ZHANG F. ZHANG, S. YUEHUI, I.M. BANAT, L. CHAI, S. YI, G. YU, D. Hou Potential microorganisms for prevention of paraffin precipitation in a hypersaline oil reservoir, *Energ. Fuel*, 28 (2014), pp. 1191–1197
- [22] BANAT, I.M. Banat The isolation of thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp *Biotechnol. Lett.*, 15 (1993), pp. 591–594
- [23] MAZAR et al. Isolation, purification and characterization of a thermophilic alkaline protease from *Bacillus subtilis* BP-36. *Journal of Sciences. Islamic Repub. Iran* pp. 7–13. 2012
- [24] MENG et al., 2014 F. Meng, L. Ma, S. Ji, W. Yang, B. Cao. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass *Lett. Appl. Microbiol.*, 59 (2014), pp. 306–312
- [25] Droffner and Yamamoto, 1985 M.L. Droffner, N. Yamamoto Isolation of thermophilic mutants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* and transformation of the thermophilic trait to mesophilic strains *J. Gen. Microbiol.*, 131 (1985), pp. 2789–2794
- [26] Nitschke, M.; Pastore, G. M. BIOSURFACTANTES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 5, 772-776, 2002
- [27] Bueno, S. M. BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BIOSURFACTANTES: ISOLAMENTO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO NUM SISTEMA MODELO, 2008.

- [28] Magalhães, A. V. ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA PRELIMINAR DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE SURFACTINA. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.
- [29] Colla, L. M., Costa, J. A. V. OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DE BIODERIVADOS DE BIOTENSIOATIVOS. *Vetor*, Rio Grande, 13: 85-103, 2003.
- [30] Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., & Sarubbo, L. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401. doi:10.3390/ijms17030401
- [31] Rocha, P. M. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 utilizando melão de cana como substrato. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.
- [32] WEI, Y.; LAI, C.; CHANG, J. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 *Process Biochemistry*, v.42p. 40–45 2006
- [33] Arima, K., Kakinuma, A., & Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31(3), 488–494. doi:10.1016/0006-291x(68)90503-2
- [34] Rahman, F. B., Sarkar, B., Moni, R., Rahman, M. S. Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports*, 2021.
- [35] WEI YH, WANG LF, CHANG JS, KUNG SS. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *J Biosci Bioeng* v.96p.174–8 2003.

- [36] Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2002). Effects of various nutritional supplements on biosurfactant production by a strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. *Journal of Surfactants and Detergents*, 5(1), 11–17.
- [37] Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 37–42.
- [38] Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J., & Kosaric, N. (1981). Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Applied and environmental microbiology*, 42(3), 408–412. <https://doi.org/10.1128/aem.42.3.408-412.1981>
- [39] Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(5), 520–529.
- [40] Ghribi D, Ellouze-Chaabouni S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. *Biotechnol Res Int*. 2011. doi: 10.4061/2011/653654.
- [41] Fontes, G. C., Amaral, P. F. F., & Coelho, M. A. Z. (2008). Produção de biosurfactante por levedura. *Química Nova*, 31(8), 2091–2099.
- [42] Yeh MS, Wei YH, Chang JS. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnol Prog*. 2005;21(4):1329-34. doi: 10.1021/bp050040c.
- [43] Sen R, Swaminathan T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochem*. 2005;40(9):2953-8. doi: 10.1016/j.procbio.2005.01.014
- [44] Fahim S, Dimitrov K, Vauchel P, Gancel F, Delaplace G, Jacques P, et al. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2013;76:70-6. doi: 10.1016/j.bej.2013.04.004.

- [45] DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Rev.*, Salem, v.61, p.47-64, 1997.
- [46] Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R. and Totola, M. R. (2006) Isolation and Characterization of Biosurfactant/Bioemulsifier-Producing Bacteria from Petroleum Contaminated Sites. *Bioresource Technology*, 97, 868-875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.020>
- [47] Alves, E. P.; Tavares, L. B. B.; Gern, R. M. M; Silva, D. A. K.; Furlan, S. A.; Wisbeck, E. Production and characterization of biosurfactants metabolized by *Pleurotus sajor-caju* from soybean oil. 2017. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620170003.0201>
- [48] Valpuesta, R. R. F. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria prima renovável e de baixo custo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- [49] Viana, C. S. L. J. Fermentação de açúcar VHP por *Bacillus subtilis*: efeito da agitação e aeração na produção de biossurfactantes em frascos. Projeto de Final de curso. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2022.
- [50] Mongkolthananuk, W. Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, 123 Mitraparp Road, Khon Kaen 40002, Thailand. 2012.
- [51] AHIMOU F, JACQUES P, DELEU M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*. v.27, p.749-754, 2000.
- [52] Marinho, P. S. S; da Silva, R. R.; de Luna, J., M. Biossurfactantes microbianos e aplicações ambientais: uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 12, e103111234123, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34123>