

**TACIANA FREIRE DE OLIVEIRA**

**Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando a glicerina residual como substrato e avaliação de seu efeito antimicrobiano contra bactérias redutoras de sulfato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

**São Paulo  
2022**

**TACIANA FREIRE DE OLIVEIRA**

**Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando a glicerina residual como substrato e avaliação de seu efeito antimicrobiano contra bactérias redutoras de sulfato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Patricia Léo

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo  
2022**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Freire de Oliveira, Taciana

Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando a glicerina residual como substrato e avaliação de seu efeito antimicrobiano contra bactérias redutoras de sulfato / Taciana Freire de Oliveira; orientador Patricia Léo. -- São Paulo, 2022.

130 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biossurfactante. 2. Surfactina. 3. Bioprocesso. 4. Glicerina . 5. Antimicrobiano. I. Léo, Patricia , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Taciana Freire de Oliveira

Titulo da Dissertação: Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando a glicerina residual como substrato e avaliação de seu efeito antimicrobiano contra bactérias redutoras de sulfato

Orientador: Patrícia Léo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**       **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## **CERTIFICADO DE ISENÇÃO** **1083/2020 - ERRATA**

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1083/2020** referente ao projeto intitulado: "**Produção de surfactina por Bacillus subtilis ATCC 21332 utilizando a glicerina residual como substrato e avaliação de seu efeito antimicrobiano contra bactérias redutoras de sulfato**", sob a responsabilidade do(a) aluno(a) "**Taciana Freire de Oliveira**", e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Patricia Léo**, vinculada ao Programa de Pós-Graduação interunidades em Biotecnologia USP, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 26 de maio de 2022.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**  
Coordenadora CEPSH ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e incentivo dados durante toda a minha vida escolar e acadêmica, em especial minha mãe, Eliana, por todo carinho e cuidado comigo. Obrigada por acreditarem em mim e por terem suavizado tanto a minha caminhada até aqui. À minha irmã Nataly por ter sido sempre tão acolhedora, paciente, compreensiva e por ter tornado as coisas suportáveis nos momentos mais difíceis.

À Patricia Léo pela oportunidade oferecida e também pela confiança depositada em mim durante todo esse tempo. Obrigada por ter me recebido tão bem.

Às pessoas do LBI, Alice, Aline, Antônio, Carol, Elda, Fernando, João, Jonas, Henrique, Luana, Oderlei e Renato, por todos os ensinamentos, conselhos e risadas compartilhadas durante esse percurso. Que fique registrada a minha grande admiração por cada um e o meu muito obrigada por tudo! Um agradecimento especial aos colegas Alexandre, Beatriz, Kelly Vaver, Manuella e Sirlene, pelo apoio mútuo e incentivo. Muito obrigada por estarem ao meu lado e ouvirem meus desabafos, vocês fizeram essa experiência ser muito mais leve e divertida.

À Rosane Piccoli pelas contribuições inestimáveis dada neste trabalho e por todo companheirismo e disposição em ajudar. Obrigada pela ajuda no planejamento, parte prática e discussões de resultados. Meus mais sinceros agradecimentos por todo conhecimento transmitido e também por me fazer enxergar essa etapa como um momento importante para investir na pesquisadora que eu estou me tornando.

Às pessoas do LPP, Bianca, Denivaldo, Larissa e Natália, pela ajuda com a parte analítica. Muito obrigada pela paciência e disposição em ajudar! Um agradecimento mais que especial a Kelly Manhani pela imensa ajuda e apoio dados nesse trabalho. Obrigada também pelos conselhos e palavras de conforto nos momentos mais atribulados. Seu carinho e acolhimento fizeram toda diferença.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram com críticas e transmissão de conhecimentos. Obrigada por resistirem e continuarem acreditando na importância da educação e da ciência, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) (Processo 130811/2020-3) e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) pelo apoio financeiro dado a este projeto.

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”*

*Paulo Freire*

## RESUMO

**OLIVEIRA, T. F. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 utilizando a glicerina residual como substrato e avaliação de seu efeito antimicrobiano contra bactérias redutoras de sulfato. 2022. 130 p.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2022

Biossurfactantes podem ser definidos como moléculas anfífilas, obtidas por rotas biotecnológicas, e que possuem características únicas, tais como a diminuição da tensão superficial e capacidade de estabilizar emulsões. Com a vantagem de serem menos tóxicos e biodegradáveis, os biossurfactantes emergem como uma alternativa sustentável aos surfactantes sintéticos. Neste contexto, o presente trabalho teve como proposta a produção de surfactina, um biossurfactante lipopeptídico conhecido por exibir alta atividade tensoativa e por seu potencial antimicrobiano, empregando como substrato a glicerina residual. Primeiramente foram avaliadas diferentes concentrações deste resíduo, sendo 2 % (m/v) a concentração mais adequada para os estudos de produção. Posteriormente, avaliou-se a cinética de crescimento microbiano e produção em cultivos em frascos agitados, chegando a concentração de 2,4 g/L de surfactina. O estudo da produção em biorreatores foi realizado adotando o sistema de batelada alimentada, com reatores de 2 e 15 litros. Em seguida foram propostas algumas modificações na estratégia de coleta de espuma do processo e na transferência de oxigênio, resultando em um aumento na produção de surfactina de quase três vezes, chegando a 6,6 g/L de produto, concentração superior ao que tem sido descrito em literatura, utilizando este substrato. Os testes de estabilidade físico-química mostraram que a molécula permaneceu estável em todas as condições de temperatura e nas faixas de pH e salinidade empregadas. A caracterização química realizada pelas técnicas de cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e análise de infravermelho (FTIR) indicou que o biossurfactante produzido pertence à classe de lipopeptídeos, havendo indício de que se trata da família de surfactinas. Por fim, os testes antimicrobianos mostraram sensibilidade da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* frente algumas concentrações do extrato rico em biossurfactante. Nesse contexto, verificou-se que a glicerina residual proveniente da produção de biodiesel mostrou-se uma alternativa promissora para a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332. Além disso, a biomolécula produzida mostrou um potencial contra biocorrosão a ser explorado.

**Palavras-chave:** Biossurfactante. Surfactina. Bioprocesso. Glicerina. Antimicrobiano.



## ABSTRACT

**OLIVEIRA, T. F. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using crude glycerol as substrate and evaluation of its antimicrobial effect against sulfate-reducing bacteria. 2022. 130 p.** Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2022

Biosurfactants can be defined as amphiphilic molecules, obtained from biotechnological process, which have unique characteristics, such as the reduction of surface tension and the ability to stabilize emulsions. With the advantage of being less toxic and biodegradable, biosurfactants emerge as a sustainable alternative to synthetic surfactants. In this way, the replacement of carbon source by the use of renewable raw materials, like industrial by-products, could represent a promising alternative to minimize high production costs. Thus, the current study investigates surfactin production, using crude glycerol as a substrate. Firstly, different concentrations of crude glycerol were evaluated and the concentration 2 % (m/V) was select as the most adequate for culture medium. Then, the kinetics of production and microbial growth were evaluated in shake flask cultures, reaching 2.4 g/L of surfactin. In addition, a study of production was also carried out in 2 and 15 liters bioreactors, adopting the fed-batch fermentation. Moreover, some modifications were proposed in the foam collection strategy and in the oxygen transfer. The results showed an increase of almost three times in surfactin production, reaching 6.6 g/L. This concentration is higher than what has already been described in the literature, using crude glycerol as a carbon source. The physical-chemical stability tests showed that the molecule remained stable under all temperature conditions and in the pH and salinity tented ranges. Chemical characterization performed by thin layer chromatography (CCD), high performance liquid chromatography (HPLC) and infrared analysis (FTIR) techniques indicated that the biosurfactant belongs to lipopeptides class, indicating that it could be part of surfactin family. Finally, the antimicrobial tests showed an antimicrobial effect against *Desulfovibrio vulgaris* to some concentrations of the semi-purified biosurfactant. In this context, crude glycerol from biodiesel production proved to be a promising alternative for the production of surfactin applying *B. subtilis* ATCC 21332. In addition, its application as an antimicrobial against biocorrosion showed a potential to be explored.

**Keywords:** Biosurfactant. Surfactin. Bioprocess. Glycerol. Antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolução da produção de biodiesel (2011 -2020) .....	20
<b>Figura 2:</b> Fluxograma do processo de obtenção de biodiesel por transesterificação. ....	21
<b>Figura 3:</b> Reação global de transesterificação.....	22
<b>Figura 4:</b> Formação de micelas e CMC.....	28
<b>Figura 5:</b> Estrutura clássica da surfactina.....	30
<b>Figura 6:</b> Esquema da permeabilização da membrana lipídica pela ação de biossurfactantes .....	40
<b>Figura 7:</b> Efeito inibitório da formação de biofilme pela aplicação do biossurfactante .....	41
<b>Figura 8:</b> Estimativa das principais causas de falhas em oleodutos para transporte de petróleo. ....	42
<b>Figura 9:</b> Fluxograma de atividades .....	45
<b>Figura 10:</b> Esquema de extração e purificação da surfactina .....	55
<b>Figura 11:</b> Frações obtidas após a extração do biossurfactante .....	59
<b>Figura 12:</b> Teste de formação de halo em ágar contendo CTAB e azul de metileno .....	64
<b>Figura 13:</b> Resultados do teste do espalhamento da gota.....	64
<b>Figura 14:</b> Resultados do índice de emulsificação para os meios testados e o controle .....	66
<b>Figura 15:</b> Variação de pH, glicerol e pH em cultivos com diferentes concentrações de glicerina residual .....	69
<b>Figura 16:</b> Comparação das curvas de crescimento com glicerina residual e glicerina padrão .....	72
<b>Figura 17:</b> Glicerina residual usada neste trabalho .....	73
<b>Figura 18:</b> Dados de crescimento celular (g/L), consumo de glicerina residual (g/L) e nitrogênio amoniacal (g/L) e produção de surfactina (g/L).....	76
<b>Figura 19:</b> Curva de crescimento, consumo de substrato e pulsos de alimentação no ensaio RBS1.....	81
<b>Figura 20:</b> Curva de agitação (rpm), aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO <sub>2</sub> ) no ensaio RBS1 .....	81
<b>Figura 21 :</b> Esquema do processo de produção de surfactina em reator para os ensaios RBS2 e RBS3.....	83
<b>Figura 22:</b> Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator Biostat B para a produção de surfactina .....	85

<b>Figura 23:</b> Curva de crescimento, consumo de substrato, produção de surfactina e pulsos de alimentação no ensaio RBS2 .....	85
<b>Figura 24:</b> Curva de agitação, aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO <sub>2</sub> ) no ensaio RBS2 .....	86
<b>Figura 25:</b> Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> em biorreator Biostat Cplus para a produção de surfactina .....	89
<b>Figura 26:</b> Curva de crescimento, consumo de substrato, produção de surfactina e pulsos de alimentação no ensaio RBS3 .....	90
<b>Figura 27:</b> Curva de agitação, aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO <sub>2</sub> ) no ensaio RBS3 .....	90
<b>Figura 28:</b> Curva de crescimento, consumo de substrato, produção de surfactina e pulsos de alimentação no ensaio RBS4 .....	93
<b>Figura 29:</b> Curva de agitação, aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO <sub>2</sub> ) no ensaio RBS4 .....	93
<b>Figura 30:</b> Curva de determinação da CMC .....	97
<b>Figura 31:</b> Curva de estabilidade para diferentes valores de pH do biossurfactante.....	99
<b>Figura 32:</b> Curva de estabilidade para diferentes valores de concentrações de NaCl.....	100
<b>Figura 33:</b> Curva de estabilidade para diferentes valores de temperatura.....	101
<b>Figura 34:</b> Etapas da extração do bissurfactante .....	102
<b>Figura 35:</b> Placa de CCD contendo a surfactina padrão o extrato da extração por solvente	105
<b>Figura 36:</b> Cromatograma a) do padrão de surfactina, b) do extrato e c) sobreposição dos cromatogramas do padrão e da amostra .....	107
<b>Figura 37:</b> Espectro na região do infravermelho da amostra recuperada e do padrão de surfactina .....	109
<b>Figura 38:</b> Resultados dos ensaios antimicrobianos do teste de difusão em ágar .....	111
<b>Figura 39:</b> Teste de concentração inibitória mínima no tempo inicial e após 168 horas .....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características de cada classe de biossurfactante .....	25
<b>Tabela 2</b> - Utilização da glicerina residual como fonte de carbono para produção de surfactina .....	35
<b>Tabela 3</b> - Composição do meio de cultivo para <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332, segundo Arima et al. (1968) .....	46
<b>Tabela 4</b> - Composição do meio de cultivo para as BRS, segundo Nakao et al. (2009) .....	46
<b>Tabela 5</b> - Composição da glicerina residual utilizada neste trabalho .....	47
<b>Tabela 6</b> - Composição dos meios Copper et al. (1981); Pretorius et al. (2015) e Sheppard; Cooper (1991).....	48
<b>Tabela 7</b> - Composição do meio Ramsay et al. (1994).....	48
<b>Tabela 8</b> - Resumo da operação de cada ensaio em biorreator.....	52
<b>Tabela 9</b> - Resultados dos testes de seleção de meio de cultivo para a produção de biossurfactante .....	63
<b>Tabela 10</b> - Médias dos resultados da produção de biossurfactante.....	71
<b>Tabela 11</b> - Parâmetros cinéticos e de processo para os ensaios em frascos agitados e biorreator (RBS2) .....	88
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros cinéticos para os ensaios RBS3 e RBS4.....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BRS – Bactérias redutoras de sulfato
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CIM – Corrosão influenciada microbiologicamente
- CMC – Concentração micelar crítica
- $CMD^{-1}$  – Diluição micelar crítica (10x)
- $CMD^{-2}$  - Diluição micelar crítica (100 x)
- DO – Densidade ótica
- EOR – *Enhanced oil recovery*
- FTIR - *Fourier-transform infrared spectroscopy*
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
- LP - Lipopeptídeos
- MIC – *Minimum inhibitory concentration*
- OTR – *Oxygen Transfer Rate*
- OUR – *Oxygen Uptake Rate*
- ORF – *Operon reading frame*
- $\mu_x$  – Velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )
- $q_p$  – Velocidade específica de formação do produto ( $h^{-1}$ )
- $q_s$  – Velocidade específica de consumo do substrato ( $h^{-1}$ )
- $Y_{x/s}$  – Fator de conversão de substrato em células ( $g_{células}/g_{substrato}$ )
- $Y_{p/s}$  – Fator de conversão de substrato em produto ( $g_{produto}/g_{substrato}$ )
- $Y_{p/x}$  – Fator de conversão de células em produto ( $g_{células}/g_{produto}$ )
- X – Concentração celular (g/L)
- S – Concentração de substrato (g/L)
- P – Concentração de produto (g/L)
- $P_p$  – Produtividade em produto (g/L/h)
- $k_{La}$  – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
2.1 Produção do biodiesel e geração da glicerina .....	19
2.2 Aspectos gerais dos biossurfactantes .....	23
2.3 Propriedades dos biossurfactantes .....	26
2.4 Lipopeptídeos.....	29
2.5 Surfactina .....	29
2.6 Biossíntese de surfactina por <i>Bacillus subtilis</i> .....	31
2.7 Fatores importantes para a produção de surfactina.....	33
2.7.1 Efeitos das condições nutricionais.....	33
Fonte: Arquivo pessoal.....	35
2.7.2 Efeito das condições de processo .....	35
2.8 Atividade biológica da surfactina .....	39
2.9 Aplicação da surfactina: antimicrobiano contra biocorrosão.....	41
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 Gerais .....	44
3.2 Específicos .....	44
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>45</b>
4.1 Fluxograma de atividades .....	45
4.2 Manutenção dos microrganismos .....	45
4.3 Obtenção e caracterização da glicerina residual .....	46
4.4 Estudo do meio de cultivo para a produção de surfactina .....	47
4.4.1 Preparo do inóculo.....	47
4.4.2 Teste de seleção do meio de cultura para produção de surfactina.....	47
4.4.3 Avaliação do crescimento microbiano em diferentes concentrações de glicerina residual 48	
4.5 Estudo da cinética de crescimento e produção de surfactina em frascos agitados ....	49
4.6 Estudo da produção de surfactina em biorreator.....	49
4.6.1 Preparo dos inóculos.....	50
4.6.2 Ensaio em biorreator .....	50
4.7 Obtenção dos parâmetros cinéticos e de processos.....	52
4.7.1 Velocidades específicas .....	52
4.7.2 Velocidade específica máxima de crescimento .....	53

4.7.3	Fatores de conversão .....	53
4.7.4	Produtividade em produto .....	53
4.7.5	Determinação dos parâmetros do modelo de Luedeking-Piret.....	54
4.8	Isolamento e caracterização do biosurfactante .....	54
4.8.1	Precipitação ácida.....	54
4.8.2	Extração por solvente .....	54
4.9	Determinação da concentração de surfactina no HPLC .....	55
4.10	Caracterização parcial do biosurfactante.....	56
4.10.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	56
4.10.2	Identificação por HPLC.....	56
4.11.2	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourie (FTIR).....	57
4.12	Estudo da estabilidade do biosurfactante e determinação da CMC.....	57
4.12.1	Temperatura.....	57
4.12.2	pH.....	57
4.12.3	Salinidade .....	58
4.12.4	Determinação da concentração micelar crítica (CMC) .....	58
4.13	Testes antimicrobianos.....	58
4.13.1	Padronização dos inóculos.....	58
4.13.2	Avaliação das frações da extração quanto sua atividade antimicrobiana.....	59
4.13.3	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC - <i>Minimum inhibitory concentration</i> ).....	59
4.14	Métodos analíticos .....	60
4.14.1	Densidade óptica .....	60
4.14.2	Concentração da biomassa.....	60
4.14.3	Determinação da concentração de glicerol.....	60
4.14.4	Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal .....	60
4.14.5	Medição da tensão superficial (TS) e diluição micelar crítica (CMD).....	61
4.14.6	Índice de emulsificação .....	61
4.14.7	Teste do espalhamento da gota.....	61
4.14.8	Formação de halo (CTAB) .....	62
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
5.1	Teste de seleção dos meios de cultivo .....	62
5.2	Avaliação do crescimento microbiano em diferentes concentrações de glicerina residual .....	69
5.3	Estudo da cinética de produção de surfactina utilizando a glicerina residual como substrato.....	76

5.4	Produção de surfactina em biorreatores .....	79
5.4.1	Desenvolvimento do processo em biorreator e estudo da cinética de produção	80
5.4.2	Avaliação da influência da aeração enriquecida com oxigênio para a produção de surfactina.....	89
5.5	Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	96
5.6	Estudos de estabilidade .....	98
5.6.1	pH .....	98
5.6.2	Salinidade .....	100
5.6.3	Temperatura.....	100
5.7	Extração e caracterização da molécula .....	102
5.7.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato .....	104
5.7.2	Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato.....	106
5.7.3	Análise de Infravermelho .....	108
5.8	Ensaio antimicrobianos .....	110
5.8.1	Confirmação da fração biologicamente ativa.....	110
5.8.2	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente a bactéria reductora de sulfato .....	111
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>116</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>117</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O atual cenário da pandemia de COVID-19 trouxe um olhar especial para a ciência como um instrumento de bem estar social, em especial a biotecnologia. A interligação trazida à tona entre ciência, meio ambiente e sociedade destacou a importância de se fazer uma análise crítica a cerca do modelo vigente de civilização ecologicamente insustentável. Neste contexto, o desenvolvimento e melhoria de tecnologias e produtos sustentáveis tem se tornado cada vez mais necessário.

Um exemplo disso são os biossurfactantes, cujo aumento no número de publicações e patentes nos últimos anos mostra a crescente atenção que vem sendo dada a essas moléculas. Os biossurfactantes podem ser definidos como surfactantes de origem microbiana, produtos do metabolismo de algumas bactérias, fungos e leveduras. Possuem uma estrutura química característica formada por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Essa característica anfifílica da molécula é responsável por conferir algumas propriedades interessantes, tais como a diminuição da tensão superficial e interfacial e a capacidade de estabilizar emulsões (DESAI e BANAT, 1997; BUSTAMANT et al., 2012). Além disso, possuem algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e estabilidade em condições diversas de temperatura, pH e salinidade (WATTABAPHON et al., 2008; BUSTAMANT et al., 2012).

A diversidade de moléculas biossurfactantes é muito grande e cada vez mais se deseja melhor compreensão de suas características físico-químicas, ampliando ainda mais seu espectro de atuação. A atividade biológica dos biossurfactantes vem ganhando destaque e tem relação com sua natureza anfipática, que possibilita a interação com a membrana lipídica das células, podendo ocasionar a formação canais iônicos e vazamento do conteúdo celular (CAO et al., 2009; SIMIQUELI, 2014; LARINI et al., 2017).

Dentre os vários grupos de biossurfactantes, um dos mais estudados é a surfactina, pertencente à classe dos lipopeptídeos. A surfactina é frequentemente descrita por sua atividade biológica, como antibacteriana, antiviral, antibiofilme e antitumoral (CERESA et al., 2021). Neste trabalho, buscou-se apresentar uma aplicação ainda pouco explorada da surfactina enquanto antimicrobiano frente às bactérias redutoras de sulfato. Sendo essas bactérias as principais responsáveis por processos de biocorrosão em tubulações de petróleo, é necessário o desenvolvimento de novos produtos biodegradáveis com ação antimicrobiana, a fim de evitar prejuízos econômicos e impactos ambientais decorrentes do vazamento de óleo.

Apesar das vantagens associadas aos biosurfactante, sua produção em escala industrial ainda esbarra no alto custo de produção e dos processos de *downstream* (CERESA et al., 2021). Uma das estratégias adotadas para diminuição de custos e que também vai ao encontro do conceito de sustentabilidade é a utilização de substratos de baixo custo, provenientes de resíduos industriais e da agroindústria, considerada uma alternativa econômica e sustentável para a produção de bioprodutos (ZANOTTO et al., 2019).

Com relação à produção de resíduos industriais, a crescente demanda de biodiesel traz consigo a geração de um subproduto, a glicerina residual. Enquanto a glicerina após passar por um uma série de processos de purificação pode ser direcionada para diversas aplicações, inclusive na indústria farmacêutica, a glicerina residual não tem aplicação direta, podendo gerar problemas ambientais, caso o descarte seja realizado de forma incorreta. Uma vez que essa produção não é totalmente absorvida pelo mercado, o excedente gerado leva a queda do preço e a estocagem deste subproduto sem um destino certo (PEITER et al., 2016). Neste contexto, o uso dessa matéria-prima em rotas de conversão biotecnológicas configura uma estratégia interessante para viabilizar a produção de biomoléculas, em consonância com os conceitos de sustentabilidade e economia circular (RIVALDI et al., 2007).

A produção em larga escala de biosurfactantes encontra ainda desafios na condução do bioprocessos. Uma consequência direta do processo em cultivos submersos em reatores de tanque agitado é a intensa formação de espuma, que dificulta o controle do processo conforme o cultivo começa a atingir maior densidade celular (NAZARETH et al., 2021). À medida que ocorre o aumento da demanda por oxigênio para a respiração microbiana, altas taxas de agitação e aeração são exigidas para aumentar a taxa de transferência de oxigênio, ocasionando o aumento da formação de espuma e podendo acarretar a interrupção do processo (YEH et al., 2006). Assim sendo, a estratégia de coleta de espuma e condução do bioprocessos são fatores importantes para a melhoria do rendimento do processo de produção dos biosurfactantes.

Neste contexto, levando em consideração a proposta de sustentabilidade e o baixo desempenho obtido em cultivos convencionais submersos, o presente trabalho teve como objetivo a produção de surfactina utilizando a glicerina residual como fonte de carbono. Além disso, buscou-se desenvolver um processo em biorreator de 15 litros, adotando um sistema de recirculação de espuma e aeração enriquecida com oxigênio, visando conter a formação de espuma durante o processo e o aumento da produção deste biosurfactante.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Produção do biodiesel e geração da glicerina**

A interação homem-natureza é marcada atualmente pela exploração e dominação dos recursos naturais, culminando na degradação do meio ambiente. As relações de produção vigentes e a produção capitalista, além de exacerbarem a degradação dos recursos naturais, ainda corroboram com a geração de resíduos poluentes (PENELUC, 2020). Com o agravamento dos problemas ambientais pós-guerra (1939 a 1945) começa a ser questionada e debatida a questão ambiental, promovendo importantes mudanças na visão de mundo existente até então e na relação sociedade-consumo. A partir desses questionamentos surge uma maior preocupação em prevenir e reparar os danos ambientais causados pelo avanço da industrialização no mundo moderno (MELO, 2008).

Tendo em vista o cenário exposto, a preocupação com o meio ambiente criou um novo modelo de pensamento, evidenciando a busca por uma visão integrada que englobe ciência, tecnologia, sociedade e meio ambiente (PIZZATO et al., 2013). Dessa forma, surge a necessidade de desenvolvimento de novos produtos e processos produtivos que acompanhem essa tendência. Neste contexto, a biotecnologia vem sendo protagonista, oferecendo contribuições importantes para a manutenção do equilíbrio entre as atividades humanas e a preservação ambiental e desempenhando um papel importante para atingir as metas da sustentabilidade.

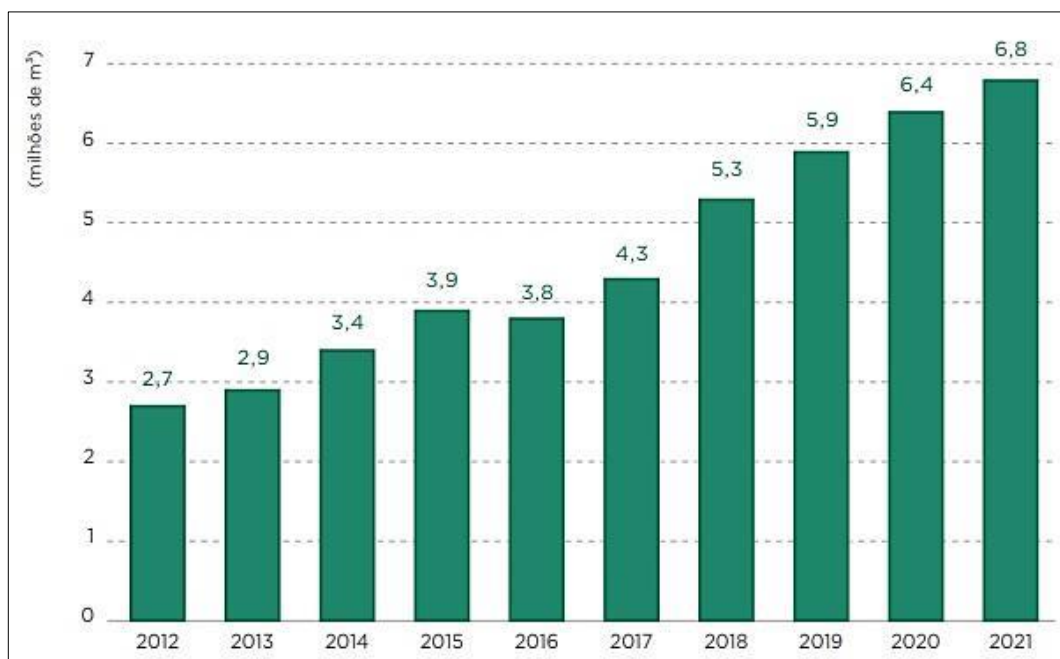
Nos últimos anos observou-se uma tendência no que se refere ao desenvolvimento de novas tecnologias para a produção de bioprodutos a partir de recursos renováveis, em resposta ao esgotamento da matéria-prima de origem fóssil e as preocupações com o meio ambiente. Nesse cenário, a glicerina residual apresenta-se como um subproduto da cadeia de produção do biodiesel, cujo excesso produzido pode ocasionar alguns inconvenientes se não for destinada corretamente (ALMEIDA et al., 2012).

A preocupação atual pela redução da poluição e a crise energética tem estimulado o mercado mundial dos biocombustíveis. Em 2004 foi lançado no Brasil o Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB), que tinha como objetivo incentivar a entrada desse biocombustível na matriz energética brasileira e estimular a participação da agricultura familiar através do aproveitamento de matérias-primas regionais (BRASIL, 2022). Desde 2008 entrou em vigor em todo território nacional a mistura legalmente obrigatória de biodiesel no diesel de petróleo, tendo atingido a partir de 2021 o percentual de 10 % a 12 %

em volume de biodiesel (ANP, 2022), o que promoveu um amadurecimento da indústria nacional neste setor e colocou o Brasil no patamar de terceiro maior produtor mundial de biodiesel (BRASIL, 2022).

De acordo com dados divulgados pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) no Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (2022), em 2021 foram gerados 6,8 milhões de metros cúbicos de biodiesel, registrando um aumento de 6,25 % em relação ao ano anterior (Figura 1).

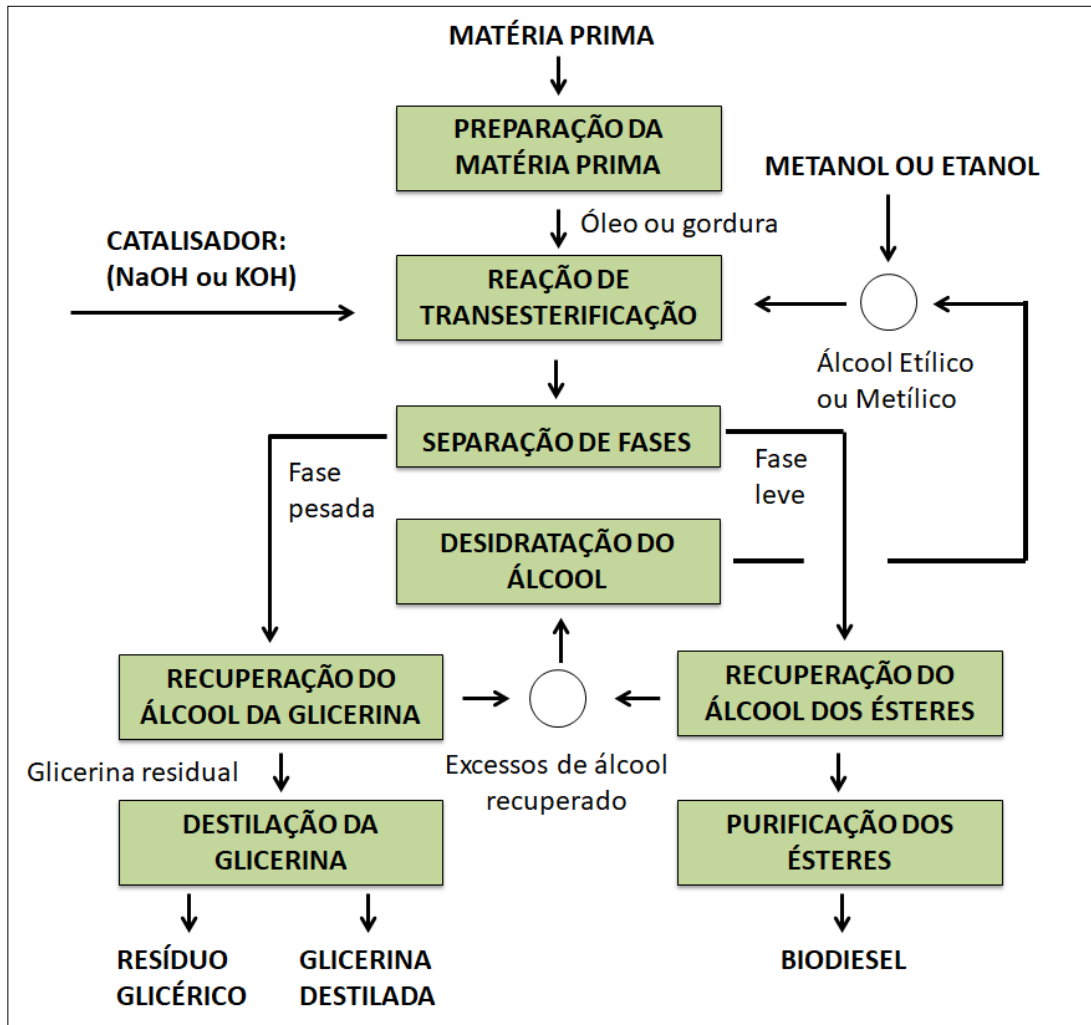
**Figura 1:** Evolução da produção de biodiesel (2012 -2021)



Fonte: Agência Nacional do Petróleo – ANP (2022)

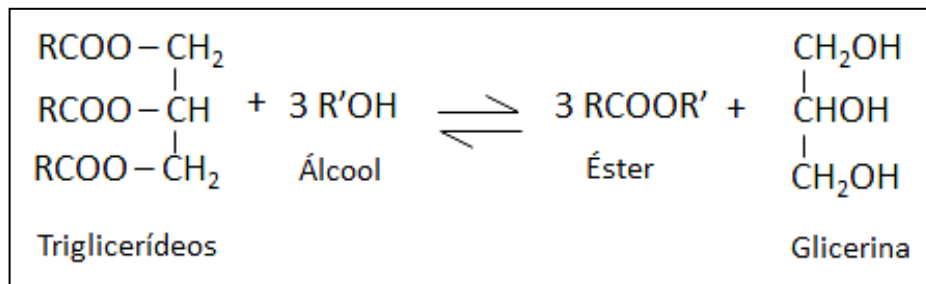
A produção de biodiesel pelo processo de transesterificação consiste na reação de um óleo ou gordura com um álcool (o metanol ou etanol), na presença de um catalisador para a produção de ésteres metílicos ou etílicos (biodiesel). Na estequiometria da reação, um mol de glicerina residual é produzido para cada três mols de ésteres metílicos, o que equivale a cerca de 10% da produção total (RIVALDI et al., 2007). Na Figura 2 está representado o fluxograma do processo de produção do biodiesel, mostrando que a glicerina residual é obtida a partir da recuperação de parte do álcool utilizado no processo.

**Figura 2:** Fluxograma do processo de obtenção de biodiesel por transesterificação.



Fonte: Adaptado de PARENTE et al. (2003).

A reação global de transesterificação está representada na Figura 3. Para que a reação aconteça é necessária a adição de três mols de álcool para cada mol de triglicerídeo. Ao ser completada a reação, obtém-se uma massa líquida de duas fases, composta pelo biodiesel, glicerina e impurezas, que são separadas por decantação e/ou centrifugação. A fase mais leve é composta pelos ésteres metílicos ou etílicos constituintes do biodiesel e a fase inferior é a fase rica em glicerina (RIVALDI et al., 2007). Neste momento, a glicerina contém um teor de aproximadamente 30 % (v/v) de impurezas, como catalisadores, álcoois, ácidos graxos e sais. A composição dessas impurezas depende da natureza do óleo vegetal ou da gordura animal utilizados e do tipo de catálise empregada na preparação deste biocombustível. Mesmo com as impurezas formadas durante o processo, a glicerina residual é considerada um subproduto de valor agregado no mercado (PEITER et al., 2016).

**Figura 3:** Reação global de transesterificação

Fonte: Arquivo pessoal

A glicerina ou glicerol, quimicamente 1,2,3-propanotriol, é um composto orgânico de função álcool com três hidroxilas, cuja fórmula molecular é  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ . Possui um aspecto líquido, sem cheiro, com densidade mais elevada que a água e elevada viscosidade (PEITER et al., 2016). O termo glicerol geralmente aplica-se somente ao componente químico puro e o termo glicerina é utilizado para nomear os produtos comerciais purificados, com a presença de 95% de glicerol (SOUZA et al., 2008). Vários níveis e designações de glicerina estão disponíveis comercialmente. Eles diferem principalmente com relação ao seu conteúdo de glicerol e outras características, tais como cor, odor e impureza (PEITER et al., 2016).

O crescimento da geração de glicerina é diretamente proporcional ao aumento da produção de biodiesel. Seu uso comercial, porém, está condicionado ao seu grau de pureza, que deve ser, usualmente, igual ou superior a 95%. Contudo, sua purificação ao padrão requerido para uso na indústria farmacêutica e cosmética tem um alto custo, não sendo economicamente viável para a comercialização deste produto (PEITER et al., 2016; RIVALDI et al., 2007; SOUZA et al., 2008). Além disso, a glicerina residual apresenta uma alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e, por questões ambientais, não deve ser depositada em aterros (SOUZA et al., 2008). Levando em consideração a geração de glicerina proveniente do aumento da produção de biodiesel e sua purificação não economicamente viável para aplicações mais nobre, novos usos para a glicerina residual devem ser encontrados, visando o aproveitamento do material disponível.

Segundo Raza et al. (2021), a geração de glicerina é um desafio a ser enfrentado na produção de biodiesel. Uma vez que um grande volume é gerado são envolvidos custos adicionais com seu processamento, despejo e estocagem, impactando assim no custo do processo de produção do biodiesel. Além disso, o excedente de glicerina associado à baixa demanda por este produto no mercado pode gerar um desequilíbrio econômico em usinas de biodiesel, levando assim a queda do preço desse subproduto e a estocagem do mesmo sem um

destino certo (SOUSA et al., 2011). Atualmente o destino dessa glicerina no mercado interno é a queima para produção de energia. A maior parte, contudo, é exportada, principalmente para o mercado asiático. No entanto, com o intuito de evitar futuros problemas derivados da acumulação de glicerol e para tornar a produção de biodiesel mais competitiva, torna-se necessária a busca por alternativas para que novas tecnologias sejam criadas para a agregação de valor a este produto (RAZA et al., 2021; SOUSA et al., 2011).

Uma alternativa de uso para a glicerina residual é a rota biotecnológica. O glicerol é considerado uma fonte de carbono altamente reduzida, dessa forma pode ser utilizado como substrato alternativo aos açúcares tradicionais, tais como glicose, sacarose e amido, sendo considerado promissor para a produção de diversos bioprodutos de interesse industrial, como os biossurfactantes (ANDRADE et al., 2011). Além disso, a glicerina residual contém elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são factíveis de serem utilizados por microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos (RIVALDI et al., 2008).

Existe uma crescente demanda por parte de diversos segmentos industriais para o desenvolvimento de soluções verdes e com baixo custo. A vantagem do uso de resíduos industriais e agroindustriais em processos biotecnológicos reside, principalmente, na sua grande quantidade de matérias orgânicas, composta por macronutrientes (proteínas e carboidratos) e micronutrientes (minerais), que são essenciais para o crescimento microbiano e produção de biomoléculas (ZANOTTO et al., 2019). Neste contexto, a valorização da glicerina residual através da produção de metabólitos microbianos de interesse comercial via rota biotecnológica tem mostrado cada vez mais um grande potencial para a geração de compostos de alto valor agregado.

## **2.2 Aspectos gerais dos biossurfactantes**

O termo surfactante deriva da contração da expressão em inglês “*surface active agent*”, que significa agente de atividade superficial. Essas moléculas constituem uma classe importante de compostos químicos, formados por moléculas anfifílicas, que são caracterizadas, principalmente, pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Essas moléculas são formadas por uma porção hidrofílica e outra lipofílica, que faz com que elas se distribuam nas interfases líquido/líquido ou gás/líquido, formando um filme molecular ordenado capaz de alterar as características entre as fases e reduzir a tensão superficial (DESAI, BANAT et al., 1987; BARROS, 2007; COSTA, 2005).

No caso dos surfactantes sintéticos, a porção apolar da molécula é geralmente composta por uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto que a porção polar pode ser iônica, não aniônica ou anfótera. Essa configuração de uma parte polar e apolar na mesma molécula é o que confere as propriedades características dos surfactantes (DESAI, BANAT et al., 1987; SANTOS et al., 2016).

A maioria dos surfactantes comercializados é proveniente de fontes não renováveis, como produtos da indústria petroquímica, e podem ser produzidos a baixos custos e maiores rendimentos. A natureza tóxica e sua baixa biodegradabilidade, contudo, motivaram a busca por produtos alternativos que, sobretudo, minimizem esses impactos ambientais e estejam também de acordo com as metas globais estabelecidas pela ONU para o desenvolvimento sustentável (SARUBBO et al., 2022). Neste contexto, a classe de surfactantes denominada biossurfactante vem se destacando por apresentar alta biodegradabilidade, baixa toxicidade, estabilidade em condições diversas de temperatura, pH e salinidade e biocompatibilidade. (WATTABAPHON et al., 2007; BUSTAMANT et al., 2012; SARUBBO et al., 2022). Os biossurfactantes podem ser definidos como surfactantes de origem biológica, produtos do metabolismo de algumas plantas, bactérias, fungos e leveduras, sendo considerados surfactantes naturais (WATTABAPHON et al., 2007; BUSTAMANT et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013).

O estudo de biossurfactantes ganhou notoriedade a partir dos anos 60 e desde então vem ganhando cada vez mais importância, principalmente na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e petrolífera. São consideradas moléculas complexas e com uma grande variedade de estruturas (ROY et al., 2017). Segundo Faria (2010), a porção hidrofílica dos biossurfactantes pode conter um grupo éster, hidroxil, fosfato, carboxil ou um carboidrato na forma neutra ou negativamente carregado. A parte hidrofóbica geralmente é formada por longas cadeias de ácidos graxos, contendo entre 10 a 18 átomos de carbono na forma saturada ou insaturada, hidroxilada, linear ou ramificada.

Segundo Naughton et al. (2019), os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua massa molecular e categorizados segundo sua origem microbiana e composição química da molécula. Os biossurfactantes de baixa massa molecular diminuem a tensão superficial e interfacial, enquanto que aos biossurfactantes de alta massa molecular são também conhecidos como bioemulsificantes e atuam principalmente na estabilização da emulsão água/óleo (RON e ROSEMBERG, 2001; MOHANTY et al., 2021). As moléculas de baixa massa molecular são as que possuem maior interesse pela indústria, especialmente as



classes dos ramnolipídeos, lipopeptídeos e fosfolipídeos. Na Tabela 1 são apresentados as características e exemplos de cada classe de biossurfactante.

**Tabela 1** - Características de cada classe de biossurfactante

Classe de biossurfactante	Característica do grupamento hidrofílico	Exemplos de microrganismos produtores	Exemplos de biossurfactantes
<b>Glicolipídeo</b>	Carboidratos (monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos ou oligossacarídeos), alguns apresentam anéis lactônicos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Torulopsis bombicola</i> ; <i>T. apícola</i> ; <i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Mycobacterium sp</i>	Ramnolipídeos Trealolipídeos Soforolipídeos
<b>Lipopeptídeo</b>	Peptídeos ou proteínas, alguns deles apresentam estrutura cíclica	<i>Bacillus lichemiformis</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Serratia marcescens</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus brevis</i> ; <i>Bacillus polymyxa</i>	Surfactina Fengicina Iturina Viscosina Gramicidina
<b>Ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos</b>	Grupo carboxilato, fosfato/hidroxil ligados ou não ao glicerol	<i>Corynebacterium lepus</i> ; <i>Nocardia erythropolis</i> ; <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Ácidos graxos Lipídeos neutros Fosfolipídeos
<b>Poliméricos</b>	Polímeros como heteropolissacarídeos, ou uma mistura de polissacarídeos e proteínas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ; <i>Cândida lipolytica</i> ; <i>Pseudomonas fluorescens</i> ; <i>Cândida tropicalis</i>	Emulsan Alasan
<b>Particulados</b>	Vesículas e membranas celulares que possuem maior quantidade de fosfolipídeos e polissacarídeos formam micro emulsões	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Vesículas de filmes extracelulares

Adaptado de Brumano (2017) e Nitschke et al. (2002)

Os surfactantes microbianos são produzidos predominantemente durante o crescimento na presença de substratos insolúveis, sendo geralmente parcialmente associados ao crescimento. Embora a função fisiológica dos biossurfactantes não tenha sido completamente elucidada, acredita-se que possa estar relacionada à emulsificação e a solubilização de compostos insolúveis, pois facilitaria a sobrevivência microbiana nesses substratos e a adesão do microrganismo a substratos hidrofóbicos. Além disso, a atividade antibiótica que é apresentada por muitos biossurfactantes, principalmente os glicolipídeos e lipopeptídeos, pode estar associada à capacidade de solubilização da membrana celular,

fornecendo maior chance competitiva para sobrevivência (DESAI; BANAT, 1997; ARAÚJO et al., 2013; MAIER, 2003).

O interesse nos biossurfactantes tem aumentado na última década, devido principalmente ao estreitamento das regulações ambientais, perfazendo assim uma fração cada vez maior do mercado de surfactantes. Os números de patentes com o termo biossurfactante teve um considerável aumento nos últimos vinte anos, passando de um total de 250 no ano de 2006 para quase 4000 em 2022 (EPO, 2022). Atualmente os biossurfactantes ocupam cerca de 10 % da produção total de surfactantes, que é equivalente a dez milhões de toneladas por ano.

Até a década de 90, o mercado para os biossurfactantes era principalmente a indústria petrolífera. Entretanto, a diversidade de estruturas químicas dessas moléculas incentivou a busca por aplicações comerciais em outros setores industriais, como os setores cosméticos e alimentícios (ZANOTTO et al., 2019). Algumas aplicações possíveis para o uso dos biossurfactantes englobam os setores de petróleo (emulsificantes), farmacêutico (formulações e medicamentos), biomédico (agentes antimicrobianos), agricultura (fertilizantes) e meio ambiente (biorremediação) (SARUBBO et al., 2022).

Apesar das vantagens dos biossurfactantes, a grande maioria dos surfactantes aplicados em setores industriais ainda são substâncias sintéticas, derivadas do petróleo. A utilização de biossurfactantes em escala industrial encontra ainda como fator limitante altos preços de produção associados principalmente ao uso de meios de cultura dispendiosos e o processo de *downstream*, causando uma grande restrição ao uso de biossurfactantes no mercado global (NITSCHKE et al., 2002; ROCHA, 2018; ANDRADE et al., 2016). Além disso, o alto grau de pureza exigido pelos setores farmacêuticos e biomédicos pode ser um fator limitante (SARUBBO et al., 2022). Dessa forma o desenvolvimento de estratégias que viabilizem a produção dessa biomolécula em escala industrial e o direcionamento adequado de sua aplicação são fundamentais para tornar o uso dos biossurfactantes economicamente competitivo.

### **2.3 Propriedades dos biossurfactantes**

Os biossurfactantes constituem uma vasta gama de compostos anfifílicos com diferentes estruturas químicas, resultando em moléculas com diferentes propriedades físico-químicas. O reconhecimento dessas propriedades é muitas vezes o que direciona sua aplicação comercial. As principais propriedades dos biossurfactantes de interesse industrial são: a

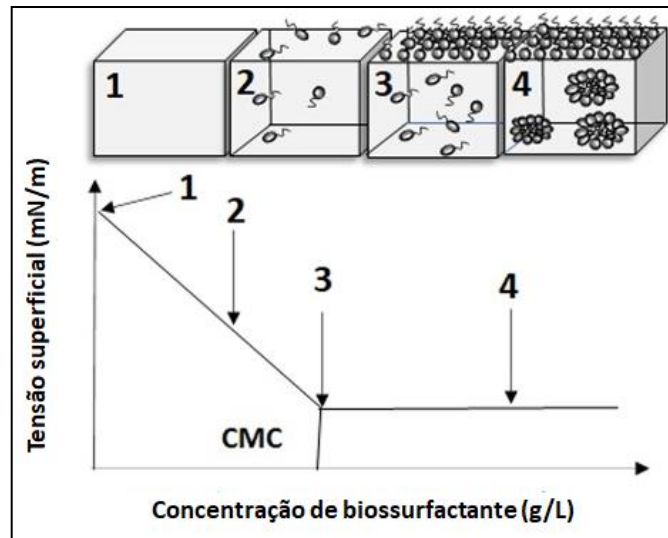
capacidade de formar agregados moleculares (micelas), diminuição da tensão superficial e emulsificação (SANTOS et al., 2021). Além disso, a biodegradabilidade dos biossurfactantes, assim como sua estabilidade às condições adversas de temperatura, pH e concentração de sais são fatores importantes para a maioria das aplicações comerciais, colocando-os em evidência quando comparados com os surfactantes sintéticos (SHARMA et al., 2016).

A concentração do biossurfactante é um fator que influencia no comportamento da molécula no meio e está relacionada com sua capacidade de diminuição da tensão superficial. A presença de grupos lipofílicos na molécula faz com que elas fiquem adsorvidas nas interfaces ar-líquido, líquido-líquido ou sólido-líquido, diminuindo a força de coesão entre essas moléculas, levando assim a redução da tensão superficial. Termodinamicamente, os surfactantes reduzem a energia livre da superfície por unidade de área para aumentar a área de contato entre duas fases (SANTOS et al., 2021 ; AKBARI et al., 2018). Um biossurfactante eficiente é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 a 35 mN/m e a tensão interfacial da água contra n-hexadecano de 40 a 1 mN/m (MULLIGAN et al., 1993).

Outra característica fundamental dos biossurfactantes é a capacidade de formação de agregados moleculares, chamados de micelas (Figura 4). Esses agregados se formam como um resultado de numerosas interações químicas fracas entre o grupo hidrofílico e hidrofóbico, como força de Van der Waals e ligações de hidrogênio (MAIER, 2003). A concentração mínima para que ocorra a formação de micelas é denominada concentração micelar crítica (CMC), que constitui um parâmetro importante para determinar a eficiência do surfactante, uma vez que surfactantes mais eficientes têm menor CMC, ou seja, menor quantidade desse composto é necessária para diminuir a tensão superficial. Após atingir a CMC, a adição de surfactante tem pouco efeito sobre a tensão superficial/interfacial do meio (MARCELINO, 2016; BRUMANO, 2017).

Segundo Sarubbo et al. (2022) a eficiência de um surfactante é medida por sua CMC e a maioria dos biossurfactantes apresentam valores de CMC menores em comparação aos surfactantes sintéticos, fazendo com que possam ser considerados mais eficientes. A habilidade dos biossurfactantes em formar micelas é interessante do ponto de vista industrial, podendo contribuir para diferentes aplicações, como na formulação de nanoemulsões e sistemas de *drug-delivery* utilizado no tratamento de diversas doenças (MARKANDE et al., 2021).

**Figura 4:** Formação de micelas e CMC



Fonte: Adaptado de Sarubbo et al. (2022)

Além de serem compostos de atividade superficial, os biossurfactantes podem ainda possuir a capacidade de emulsificação. Dependendo da sua massa molecular, os biossurfactante podem apresentam propriedades físico-químicas diferentes com relação as suas capacidades de diminuição da tensão superficial e estabilização de emulsões. Enquanto os biossurfactantes são conhecidos por sua excelente atividade de superfície, podendo formar emulsões estáveis, os bioemulsificantes podem emulsionar com eficiências dois líquidos imiscíveis, mas são menos eficazes na redução da tensão superficial. Esse contraste provavelmente se deve a diferenças em sua estrutura química (UZOIGWE et al., 2015).

Uma emulsão é definida como um sistema heterogêneo composto de, pelo menos, uma fase imiscível ou parcialmente miscível, dispersa em outra fase contínua no formato de pequenas gotas, de diâmetro de 1 a 10  $\mu\text{m}$  (FARIA, 2010). É um sistema termodinamicamente instável e caso não haja nenhum componente estabilizante no meio, a emulsão se separa novamente em duas ou mais fases. Dessa forma, o fenômeno de emulsificação a partir de um tensoativo em misturas de dois líquidos imiscíveis ocorre quando, em um sistema geralmente agitado, a molécula tensoativa é direcionada para superfície óleo-água criada pela agitação, gerando assim a diminuição do seu número de micelas. Assim, forma-se uma camada de tensoativo envolvendo as gotículas, produzindo assim uma emulsão. Dependendo de qual composto está na fase contínua, a emulsão pode ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (SANTOS et al., 2021; FARIA, 2010; SANTOS et al., 2016; ROY et al., 2017). A capacidade de formar emulsões tornam os

biossurfactante propensos ao uso em diversos setores, como na indústria de cosméticos e de alimentos, visando, principalmente, a produção de emulsões estáveis (SANTOS et al., 2016).

Neste contexto, os biossurfactantes se consolidam como moléculas versáteis, possuindo grande diversidade de estruturas químicas, e com vasto potencial para aplicações industriais. O crescente número de estudos envolvendo os biossurfactantes e a busca por produtos sustentáveis colocam essas biomoléculas em evidência, como uma alternativa aos surfactantes sintéticos, principalmente devido à sua biodegradabilidade.

## 2.4 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são uma das cinco classes de biossurfactante e constituem um grupo estrutural diverso de metabólitos secundários produzidos por várias bactérias e fungos. Biossurfactantes do tipo lipopeptídeo (LPs) são formados por uma porção lipídica ligada a uma cadeia linear ou cíclica de oligopeptídeo e são produzidos por fungos, como *Aspergillus*, e vários outros gêneros de bactérias, como *Streptomyces*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Os LPs são formados por diversas estruturas químicas análogas, agrupadas em diferentes famílias. As mais conhecidas são as isoformas surfactina, fengicina e iturina, que diferem entre si de acordo com a composição da parte peptídica da molécula e tamanho da cadeia de ácidos graxos. Alguns estudos mostram que os biossurfactantes lipopeptídicos são naturalmente produzidos como uma mistura de várias isoformas por uma mesma cepa, dependendo das condições nutricionais e de cultivo (INÉS et al., 2015; RAAJIMAKERS et al., 2010; THÉATRE et al., 2021).

Os estudos a cerca dos lipopeptídeos têm ganhado destaque, uma vez que possuem atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, antitumoral, antifúngica e antiviral. Dentre as bactérias produtoras, os lipopeptídeos de *Bacillus* são os mais estudados. Devido ao seu rápido crescimento, baixas exigências nutricionais, segurança para saúde humana e animal e alta atividade antibacteriana, *Bacillus subtilis* é um dos microrganismos mais utilizados industrialmente para produção de lipopeptídeos ativos (THÉATRE et al., 2021).

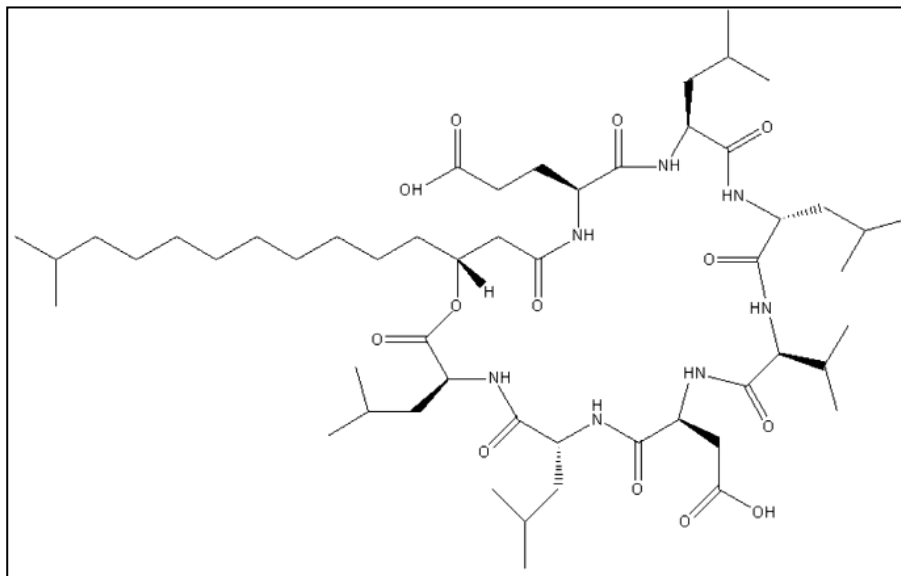
## 2.5 Surfactina

A surfactina é reportada em diversos estudos como um dos mais efetivos biossurfactantes conhecidos, principalmente devido à sua alta atividade tensoativa, baixa CMC e propriedades de atividade biológica ativa (LIU et al., 2015; BARROS et al., 2007;

COOPER et al., 1981; DESAI, BANAT, 1997; MAKKAR, CAMEOTRA, 1997). O primeiro relato da surfactina ocorreu ainda nos anos 60, quando Arima et al. (1968) reportou a existência de um composto bioativo com atividade tensoativa produzido por *B.subtilis* ATCC 21332. Foi então nomeado surfactina, devido as suas excelentes propriedades tensoativas e desde então a surfactina se tornou o membro mais conhecido da família dos biosurfactantes lipopeptídicos (PEYPOUX et al., 1999; FERNANDES, 2006).

A estrutura química típica das moléculas de surfactina é formada por uma sequência de 7 aminoácidos: L-Glu<sup>1</sup>-L-Leu<sup>2</sup>-D-Leu<sup>3</sup>-L-Val<sup>4</sup>-L-Asp<sup>5</sup>-D-Leu<sup>6</sup>-L-Leu<sup>7</sup>, dispostos na forma de um anel peptídico tipo lactona, ligados a um  $\beta$ -hidroxi ácido, com cadeia que pode variar o tamanho de C13 a C16 (Figura 5) (PEYPOUX et al., 1998; ZHAO et al., 2017; THÉATRE et al., 2021). As surfactinas são consideradas uma família de lipopeptídeos, com grande diversidade estrutural, devido aos compostos homólogos e isoformas que podem surgir pela diferença na sequência de aminoácidos do anel peptídico e no número de átomos de carbono na cadeia de ácido graxo. Além disso, uma mesma linhagem pode produzir diferentes tipos de surfactinas (THÉATRE et al., 2021; ZHAO et al., 2017; LIU et al., 2015). As diferenças estruturais relacionadas às variações existentes na composição da cadeia carbônica e fração peptídica tem impacto direto nas propriedades físico-química da surfactina, influenciando assim suas aplicações (SEYDLOVÁ et al., 2008).

**Figura 5:** Estrutura clássica da surfactina



Fonte: Adaptado de Drakontis et al. (2020)

O comportamento molecular da surfactina em solução e em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade é relatado com frequência na literatura, pois está relacionado com mudanças na estrutura espacial da molécula (SEYDLOVÁ et al., 2008). Em relação à estabilidade da molécula, vários trabalhos já reportaram que a surfactina consegue manter sua estrutura química estável mesmo em condições de alta temperatura e salinidade e em várias faixas de pH (COSTA et al., 2005; ABADIA, 2015).

A surfactina é corriqueiramente relatada como sendo um biossurfactante poderoso, capaz de diminuir a tensão superficial na água de 72 para 27 mN/m, mesmo em concentrações inferiores a 20 µM. Além da capacidade tensoativa e de emulsificação, a surfactina também é conhecida por ser uma molécula biologicamente ativa, possuindo atividade antimicrobiana (NITSCHKE et al., 2004; KORENBLUM et al., 2012), antiviral (VOLLENBROICH et al., 1997), antifúngica (COSTA, 2005) e antitumoral (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004). Além disso, muitos trabalhos relatam seu uso em aplicações relacionadas ao meio ambiente, como biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados (MULLIGAN et al., 2001) e contaminação com petróleo (ALVAREZ et al., 2020).

## 2.6 Biossíntese de surfactina por *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* é o microrganismo mais importante na produção de surfactina, sendo a espécie *B. subtilis* ATCC 21332 mais comumente citada na literatura para a produção dessa biomolécula (DLAMINI, 2017). Caracteriza-se como uma bactéria gram-positiva, que apresenta forma de bastonete e que pode ser naturalmente encontrada em solo e vegetação (LARINI et al., 2017; CHEN et al., 2015). De acordo com Willenbacher (2017), muitos produtos derivados dessa bactéria são geralmente conhecidos como seguros (GRAS – *General recognized as safety*), tendo sua aplicação assegurada em diversos setores, como o setor alimentício e de medicamentos.

A biossíntese da surfactina foi discutida pela primeira vez por Kluge et al. (1988), que investigaram a produção desse biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 21332. Aspectos da regulação genética da biossíntese da surfactina são descritos com detalhes no trabalho de Rahman et al. (2021). De acordo com os autores, o entendimento da regulação da produção de surfactina é muito importante, a fim de se compreender as interações e genes associados à produção deste biossurfactantes, podendo assim, aprimorar o processo produtivo. No caso da surfactina, os mecanismos que induzem a síntese são complexos. A síntese de metabólitos secundários que incorporam peptídeos, como os lipopeptídeos, geralmente envolvem um

complexo multienzimático, chamado peptídeo sintase não ribossomal (NRPS - *nonribosomal peptide synthetase*), que, no caso da surfactina, é responsável pela incorporação dos sete aminoácidos no anél peptídico e pela ligação com a cadeia de ácido graxo (WILLENBACHER et al., 2015).

A surfactina sintetase é codificada por quatro ORFs (*Open Reading frames*), *srfA-A*, *srfA-B*, *srfA-C*, *srfA-D*, localizados no operon *srfA*, que também é responsável pela esporulação e desenvolvimento da competência microbiana. O operon *srfA* contém o gene *comS*, pertencente a classe de genes comunicadores de *B subtilis*, que regula a habilidade das cepas de performarem o *quorum sensing*. Devido a esse arranjo, o operon *srfA* seria regulado por mecanismos envolvidos no desenvolvimento de competência, sendo um desses mecanismos o responsável pelo monitoramento da densidade celular (WILLENBACHER et al., 2017).

As comunidades bacterianas podem perceber as mudanças ambientais e ajustar a expressão gênica de acordo com um sistema conhecido como *quorum sensing*. É um processo dependente da densidade celular que é realizado com a ajuda das moléculas de sinalização chamadas autoindutores (AI), que são produzidos e secretados pelas células, podendo induzir a diferenciação celular em múltiplas subpopulações. A surfactina é uma dessas moléculas sinalizadoras e atua, portanto, como um sinal extracelular que desencadeia outra subpopulação de células de *Bacillus* para conduzir a diferenciação celular através da produção de matriz celular (biofilme) (RAHMAN et al., 2021). Durante o crescimento microbiano todas as células produzem e liberam certa quantidade de autoindutores. Quando a população atinge a fase exponencial (alta densidade populacional) e o início da fase estacionária de crescimento, a quantidade de AI chega a uma concentração limite, suficiente para disparar o processo de alteração da expressão gênica (ARAÚJO et al., 2013).

Esse mecanismo molecular de moléculas indutoras já foi descrito para *B. subtilis*. O sistema *quorum sensing* desempenha um papel regulador em muitas vias metabólicas de *Bacillus* e, entre outras, na regulação do operon *srfA*. (THÉATRE et al., 2021). Dessa forma, a expressão do operon *srfA* é regulada por vários reguladores globais e diretamente dependente da densidade celular e histórico de cultivo (WILLENBACHER et al. 2017). Uma vez sintetizada, a surfactina é excretada pela membrana citoplasmática bacteriana, evitando o acúmulo intracelular (PEYPOUX et al., 1999).

Diversos trabalhos descrevem o baixo rendimento obtido nos processos de produção da surfactina. De acordo com Zhi et al. (2017) esses resultados podem ser atribuídos a sua regulação biossintética pelo sistema de *quorum sensing*. Como consequência, a síntese de



surfactina depende da densidade celular, impedindo a produção constante e limitando o rendimento da produção. Além disso, uma vez que as células iniciam a produção da matriz de biofilme, ela não mais se torna produtora de surfactina. Esses fenômenos destacam a complexidade da produção de surfactina e sua dependência de diferentes fatores.

## **2.7 Fatores importantes para a produção de surfactina**

### **2.7.1 Efeitos das condições nutricionais**

A surfactina foi relatada pela primeira vez por Arima et al. (1968). Os autores descreveram a produção de um agente tensoativo por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio complexo, contendo apenas peptona, extrato de carne e NaCl. O rendimento, contudo, foi considerado bem baixo, em torno de 100 mg/L de produto. Posteriormente, um trabalho publicado por Cooper et al. (1981) resultou em um aumento significativo na produção de surfactina, chegando a 800 mg/L. Os autores desenvolveram um meio mineral definido e usaram a concentração de 40 g/L de glicose, além da adição de alguns micronutrientes. Com isso, foi demonstrado a importância e os efeitos estimulatórios de alguns cátions, como o ferro e manganês para produção de surfactina. O uso de meios quimicamente definidos para a produção de surfactina apresenta algumas vantagens, pois permite a facilidade de aumento de escala, consistência do produto, menores concentrações de impurezas e melhor adaptabilidade do sistema a diferentes tipos e modos de operação do biorreator (RANGARAJAN et al., 2016).

Em seu estudo, Cooper et al. (1981) mostrou ainda que a adição de 2 – 4% de hexadecano no meio não aumentou a produção de surfactina, ao contrário do que ocorre com a maioria dos biossurfactantes, que normalmente tem sua produção estimulada com a adição de substratos hidrofóbicos. Embora muitos estudos mostrem a produção de biossurfactante por microrganismos em meios de cultivo contendo substratos imiscíveis na fase aquosa, os substratos solúveis são geralmente mais baratos e são preferíveis em termos de condições de processo, uma vez que a manipulação de meios monofásicos é mais simples quando comparada com meios bifásicos (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Faria (2010) analisou a produção de surfactina por *Bacillus subtilis*, empregando diferentes fontes de carbono. Neste trabalho, na presença dos substratos hidrofóbicos utilizados não foi observada a produção de biossurfactante pelo microrganismo, contudo com a utilização de substratos hidrossolúveis

(glicerina residual e padrão) obtiveram-se os melhores resultados de produção desse tensoativo.

A influência dos micronutrientes no meio de cultivo para o estímulo da produção já foi relatada em diversos trabalhos (WEI e CHU et al., 2002; WEI et al., 2007; SEN et al., 1997). Wei et al. (2007) estudaram a otimização da solução de elementos-traço, utilizando o método estatístico de Taguchi e concluíram que os cátions  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  são particularmente importantes na produção de surfactina por *B. subtilis* por atuarem como cofatores em sistemas multienzimáticos envolvidos na via de biossíntese. De acordo com Shaligram et al. (2010), o manganês é conhecido por aumentar a produção de metabólitos secundários em *B. subtilis*, sem mostrar muito efeito no crescimento celular. Já o ferro é requerido para o estímulo do crescimento celular, embora não tenha tanto impacto no aumento da produção de surfactina.

A produção de surfactina parece estar relacionada com a proporção entre carbono e nitrogênio no meio e cultivo (BARROS et al., 2007). A influência da fonte de carbono na produção e estrutura da molécula de biossurfactantes tem sido muito estudada, sendo relatada na literatura com frequência. Fontes de nitrogênio orgânico (ureia, triptona, digerido pancreático de caseína, hidrolisado de caseína, extrato de carne e extrato de levedura) ou inorgânico ( $NH_4Cl$ ,  $NaNO_3$  e  $(NH_4)_2SO_4$ ) podem ser utilizados para a produção de surfactina por *Bacillus* (LARINI et al., 2017). Davis et al. (1999) estudaram o efeito de concentrações limitantes de carbono e nitrogênio no cultivo de *B. subtilis* ATCC 21332 em meio mineral para a produção de surfactina em condições aeróbicas e limitantes de oxigênio. De acordo com os autores, a produção de surfactina foi maior utilizando o nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, devido ao consumo do nitrato pelos microrganismos após o esgotamento do nitrogênio amoniacal no meio.

Uma nova abordagem para o desenvolvimento de novos meios de cultura para a produção de surfactina vem sendo adotada. Considerando os altos custos de produção e a necessidade da busca por processos mais sustentáveis, o uso de resíduos industriais como substrato tem se tornado comum. Essa estratégia além de diminuir os custos de produção, ajuda a reduzir o impacto ambiental causado pela geração desses resíduos (FONTES, 2008). A literatura reporta uma grande diversidade de substratos utilizados como fonte de carbono para a produção de surfactina, tais como glicerina residual (ANDRADE et al., 2017; SOUSA et al., 2014; CRUZ et al., 2018); melão de cana de açúcar (ROCHA et al., 2020); polpa de sisal (ABADIA, 2015); suco de caju (FELIX et al., 2019) e manipueira (NITSCHKE et al., 2004; ANDRADE et al., 2016).

Um potencial ainda pouco explorado para a produção de surfactina é a utilização da glicerina residual, sem pré-tratamento, como substrato. Segundo Wendisch et al. (2011), o glicerol é uma boa fonte de carbono e energia para o crescimento de diversos microrganismos e pode ser adequado para a produção biotecnológica de uma série de bioprodutos, incluindo os biossurfactantes. A Tabela 2 mostra alguns trabalhos recentes em que a glicerina residual é utilizada para a produção de surfactina. De acordo com Andrade et al. (2017), a produção média de surfactina em meio mineral utilizando a glicose como substrato é em média 0,5 g/L. Contudo, quando se emprega a glicerina como fonte de carbono, a produção média tende a ser um pouco menor. Nessa tabela observa-se que a concentração de surfactina variou de 0,07 a 2,7 g/L nos cultivos, evidenciando assim a glicerina como uma alternativa promissora para a produção deste biossurfactante.

**Tabela 2** - Utilização da glicerina residual como fonte de carbono para produção de surfactina

<b>Origem da matéria prima</b>	<b>Concentração de glicerina (% v/v)</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Produção de surfactina (g/L)</b>	<b>Referência</b>
Produção de biodiesel	5%	<i>B. subtilis</i> <i>LSFM-0</i>	2,4 (na espuma)	Faria et al. (2010)
Produção de biodiesel	2%	<i>Bacillus subtilis</i> <i>LAMI009</i>	0,441	Sousa et al. (2011)
Produção de biodiesel	2%	<i>B. subtilis</i> <i>ATCC6633</i>	0,158	Sousa et al. (2014)
Produção de biodiesel	1%	<i>Bacillus subtilis</i> <i>LB2b</i>	0,07 (na espuma)	Andrade et al. (2017)
Produção de biodiesel	5%	<i>Bacillus subtilis</i> <i>ATCC 6633</i>	0,146	Cruz et al. (2018)
Produção de biodiesel	4%	<i>B. subtilis</i> #309	1,2	Janek et al. (2021)
Estearina	4%	<i>B. subtilis</i> #310	0,62	Janek et al. (2021)
Produção de sabão	4%	<i>B. subtilis</i> #311	2,7	Janek et al. (2021)

Fonte: Arquivo pessoal

## 2.7.2 Efeito das condições de processo

Além das condições nutricionais do meio de cultivo, alguns parâmetros de processo são fundamentais para a produção de surfatina. Com relação aos valores de pH, geralmente é utilizado pH constante e igual a 7,0 , uma vez que o pH menor que 6,0 pode resultar em queda do rendimento para produção de surfactina (WEI et al., 1998). Já a temperatura para produção desse biossurfactante pode variar de 30 a 37 °C (SHALIGRAM et al., 2010). A aeração e a agitação são, contudo, os parâmetros mais importantes, principalmente considerando o *scale*

up do processo. Sheppard et al. (1990) identificaram a transferência de oxigênio como um dos parâmetros críticos para a otimização e escalonamento do processo, principalmente devido a intensa formação de espuma. Uma vez que a surfactina é uma molécula surfactante e, por definição, tende a aumentar a estabilidade da dispersão gás-líquido, a agitação constante leva a uma abundante formação de espuma, sendo um dos pontos mais críticos para a produção de biosurfactante em cultivos submersos.

Muitos autores já descreveram a relação existente entre o aumento da transferência de oxigênio no processo e a obtenção de maior produtividade de surfactina (DESAI; BANAT, 1997; CHEN et al., 2015). Uma vez que a maioria dos bioprocessos é aeróbica, o papel da suplementação de oxigênio em processos microbianos industriais é essencial. O oxigênio tem o papel de aceptor final de elétrons na cadeia respiratória e é responsável pelas vias metabólicas de crescimento, manutenção celular e formação de produto (GARCIA-UCHOA et al., 2009). No entanto, em comparação com os outros nutrientes no meio de cultivo, o oxigênio é muito pouco solúvel em meio aquoso, aproximadamente 8,1 mgO<sub>2</sub>/L a 1 atm e 25°C, tornando-o frequentemente limitante no processo (SCHMIDEL et al., 2001).

A solubilidade do oxigênio é influenciada pela temperatura, presença de sais no meio e pressão parcial de oxigênio no ar. Nesse contexto, faz-se necessário o fornecimento constante de oxigênio a fim de manter as condições de aerobiose durante todo o processo. Se tratando de soluções bastante diluídas a Lei de Henry pode ser utilizada para o cálculo da concentração de saturação do oxigênio dissolvido no meio e relaciona a concentração de saturação e oxigênio com a pressão parcial, de acordo com as Equações 1 e 2:

$$C_s = H * p_g \quad (1)$$

$$p_g = y_{O_2} * P_{atm} \quad (2)$$

Sendo C<sub>s</sub> a concentração de saturação do oxigênio dissolvido (gO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>);

H a constante de Henry (gO<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> \* atm);

p<sub>g</sub> a pressão parcial de oxigênio na fase gasosa;

y<sub>O<sub>2</sub></sub> a fração molar ou volumétrica do oxigênio no gás e

P<sub>atm</sub> a pressão total do gás (atm)

Com base nas equações apresentadas, observa-se que a concentração de oxigênio dissolvido no equilíbrio (saturação) é proporcional à pressão parcial de oxigênio no gás. Dessa forma, ao variar a composição química de um dado líquido, o que varia é a constante de

Henry e, conseqüentemente, a concentração de saturação para um dado valor da pressão parcial do oxigênio no gás (SCHMIDELL, 2011).

De acordo com Garcia-Uchoa et al. (2009), a concentração de oxigênio no meio de cultura é geralmente associada com a taxa de transferência de oxigênio (OTR – *Oxygen Transfer Rate*) da fase gasosa para a fase líquida e a taxa de consumo de oxigênio pelo microrganismo (OUR – *Oxygen Uptake Rate*). A relação matemática existente entre essas variáveis está apresentada na Equação 3. Essa equação, apesar de ser simples, permite uma exata compreensão de todas as formas de que se dispõe para o controle da concentração de oxigênio dissolvido em um determinado meio.

$$\frac{dC}{dt} = \underbrace{k_L a * (C_s - C)}_{OTR} - \underbrace{q_{O_2} X}_{OUR} \quad (3)$$

Sendo C a concentração instantânea de oxigênio no cultivo (g/L);

$k_L a$  o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ );

$C_s$  a concentração de saturação do oxigênio dissolvido no líquido em equilíbrio com a  $p_g$  (g/L);

$q_{O_2}$  a velocidade específica de respiração ( $gO_2/(gX*t)$ );

X a concentração celular no instante t (g/L)

Algumas conclusões podem ser tiradas a partir dessa equação. O aumento da frequência de agitação e vazão de aeração tem impacto direto no aumento da transferência de oxigênio através do aumento do  $k_L a$ . O aumento da frequência de agitação contribui para o rompimento e dispersão das bolhas de ar, uma vez que auxilia na redução da espessura do filme líquido. Além disso, o aumento da vazão de aeração provoca um maior acúmulo de bolhas de ar no meio líquido e, dessa forma, aumenta-se a área interfacial de transferência de massa. Por outro lado, o enriquecimento do gás de entrada com oxigênio puro interfere no aumento da pressão parcial do oxigênio, incrementando o gradiente ( $C_s - C$ ), graças ao aumento do valor de  $C_s$  (SCHMIDELL, 2001).

Dessa forma, pode-se concluir que a agitação e aeração são dois fatores que contribuem muito para o aumento da transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Contudo, no caso da produção de biossurfactante, esses são fatores que impactam diretamente no aumento da formação de espuma, podendo dificultar a condução do processo.

Dessa forma, algumas estratégias podem ser aplicadas a fim de controlar os problemas associados à intensa formação de espuma e, assim, viabilizar a produção deste bioproduto.

De acordo com Atwa et al. (2013), a adição de antiespumante é um dos métodos mais utilizados. Entretanto, essa estratégia apresenta uma série de desvantagens, uma vez que são caros e podem ocasionar limitações nas transferências de oxigênio e nutrientes para as células. Nesse mesmo trabalho os autores discutiram a influência da agitação e aeração para a produção de surfactina, utilizando diferentes sistemas de coleta de espuma. Os resultados mostraram que as maiores condições de aeração e agitação empregadas (2 vvm e 300 rpm, respectivamente) resultaram em uma produção do biosurfactante duas vezes maior em comparação com as menores condições. Além disso, o sistema de reciclo de espuma foi aquele que resultou nas maiores concentrações de surfactina quando comparado com as outras estratégias empregadas, como a adição de antiespumante e coleta contínua de espuma.

Yeh et al. (2006) estudou a influência de diferentes condições de agitação e aeração na transferência de oxigênio para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Foi desenvolvido um modelo de processo com a recirculação de espuma, no qual um recipiente coletor de espuma foi acoplado ao biorreator pela saída de gases. Observou-se que a produção máxima de surfactina foi atingida com o aumento da aeração de 0,5 para 1,5 vvm e agitação de 200 para 300 rpm. Os autores verificaram ainda uma forte relação entre o consumo de oxigênio e a cinética de produção de surfactina.

Nazareth et al. (2021) avaliou a influência da agitação e aeração na produtividade volumétrica de surfactina a partir de *B. subtilis* ATCC 6051, utilizando um planejamento fatorial completo (2<sup>2</sup>). Os experimentos foram conduzidos em reatores de 5 litros, com um sistema de coleta contínua de espuma. Segundo os autores, a condição de menor agitação e aeração (0,5 vvm e 150 rpm) foi a que resultou na maior concentração de surfactina. Já a produção observada nos maiores níveis do delineamento experimental (1,5 vvm e 300 rpm) resultou na menor concentração de biosurfactante. Os autores discutem que embora tenha sido observado um aumento expressivo no  $k_L a$  na condição de maior agitação e aeração, a intensa formação de espuma no sistema ocasionou a saída de cerca de 28 % do meio de cultivo para o frasco de coleta. Segundo Yeh et al. (2006), a formação de espuma pode resultar em menor tempo de cultivo, diminuição da concentração celular e, conseqüentemente, diminuição da produção de surfactina.

Neste contexto, a estratégia de cultivo com enriquecimento de oxigênio na aeração do sistema pode ser uma alternativa promissora para o cultivo de biosurfactantes. A condução do processo com ar atmosférico enriquecido com oxigênio eleva a pressão parcial

desse gás na mistura, contribuindo assim para o aumento da concentração de oxigênio dissolvido sem alterar as condições de agitação e aeração (mantendo o  $k_{La}$ ), evitando assim a sobrecarga do sistema pela formação intensa de espuma.

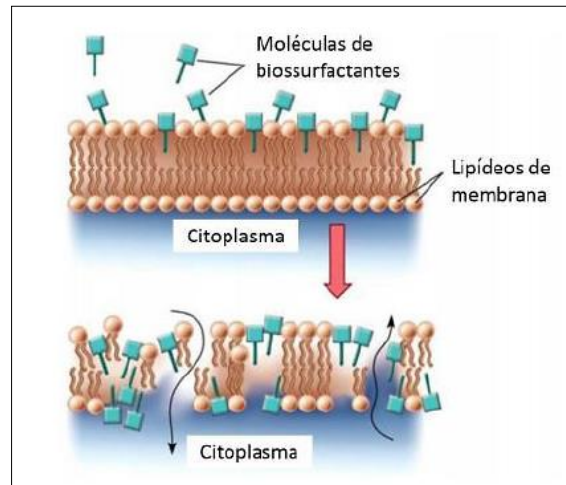
## 2.8 Atividade biológica da surfactina

Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem evidenciado cada vez mais as atividades biológicas dos biossurfactantes, especialmente a classe dos lipopeptídeos, realçando sua grande diversidade estrutural e suas propriedades biológicas (CERESA et al., 2021; RAAIJMAKERS et al., 2010). As atividades biológicas dos biossurfactantes lipopeptídicos são fortemente influenciadas por sua estrutura química, como a presença de aminoácidos na molécula e tamanho da cadeia de ácido graxo.

Alguns autores descrevem que a natureza anfipática da molécula de surfactina tem uma relação direta com as atividades biológicas, uma vez que interferem na integridade da bicamada lipídica das células (LARINI, 2017). Dessa forma, a interação da surfactina com a membrana celular pode alterar a permeabilidade da membrana, uma vez que induz a formação e canais iônicos, podendo resultar em sua ruptura (Figura 6) (CAO et al., 2009; SIMIQUELI, 2014). Devido a esse modo de ação, as chances de desenvolver resistência em microrganismos são baixas, tornando a surfactina uma alternativa promissora aos antibióticos para organismos multirresistentes (SAJNA et al., 2015). Seydlová et al. (2008) também discutem que o desenvolvimento de um mecanismo de resistência contra lipopeptídeos é raro.

Os mecanismos possíveis de interações da surfactina com as estruturas da membrana exibem um padrão complexo de efeitos, como inserção em bicamadas lipídicas, modificação da permeabilidade da membrana por formação de canal ou solubilização da membrana por um mecanismo semelhante ao de detergência. Em baixas concentrações, o lipopeptídeo pode contribuir para a formação de poros condutores de íons na membrana e em concentrações mais altas, o efeito detergente prevalece e resulta no rompimento da membrana. Variações tanto na porção lipídica quanto no anel de aminoácidos modificam a estrutura molecular da surfactina e podem interferir em sua atividade biológica. Geralmente, a atividade bactericida do lipopeptídeo aumenta com a adição de uma porção lipídica à cadeia carbônica (SEYDLOVÁ et al., 2008).

**Figura 6:** Esquema da permeabilização da membrana lipídica pela ação de biossurfactantes



Fonte: MARCELINO, 2016

Outra propriedade da surfactina envolve sua capacidade de dificultar a formação de biofilmes microbianos em superfícies. Os biofilmes são organizações de células bacterianas aderidas a uma superfície e envoltas por uma matriz adesiva excretada pelas células. Uma das propriedades mais relevantes dessas comunidades de biofilme bacterianos é a sua inerente tolerância aos antimicrobianos, quando comparados com células planctônicas da mesma espécie. Algumas razões que justificam essa maior tolerância são as taxas de crescimento mais lento, a penetração reduzida de substâncias antimicrobianas através da matriz extracelular, e a expressão de genes de aumento da tolerância ao estresse (MADIGAN et al., 2016). Essa baixa sensibilidade dos biofilmes aos antimicrobianos é responsável por dificultar o tratamento de infecções na área médica e também por causar prejuízos econômicos em diversos setores industriais, advindos de incrustações e biocorrosão (ARAÚJO et al., 2013).

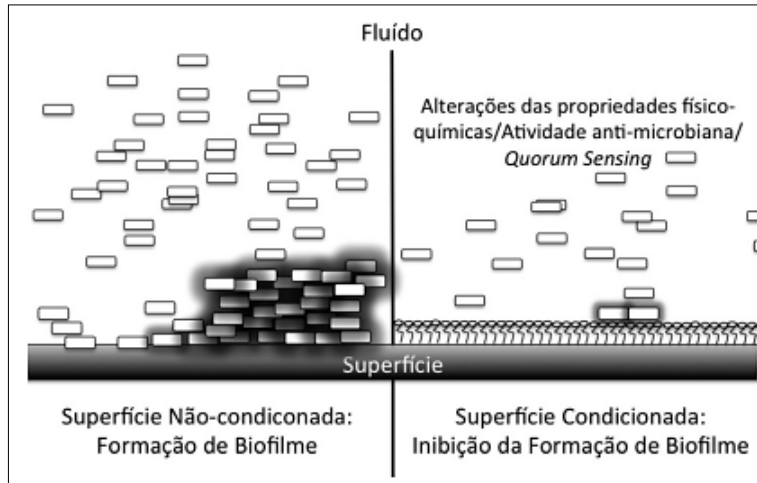
A adsorção da molécula de biossurfactante em superfícies altera sua hidrofobicidade, contribuindo assim para inibir a adesão de patógenos, uma vez que alteram suas interações atrativas entre superfície e microrganismo. Quando um surfactante é adsorvido a superfícies hidrofóbicas, geralmente orienta o grupo hidrofóbico para a superfície e expõe o grupo polar à água. A superfície torna-se assim hidrofílica, podendo assim reduzir a tensão interfacial entre a superfície e a água (Figura 7). Dessa forma, o pré-condicionamento de superfícies com biossurfactantes pode reduzir consideravelmente a formação de biofilme (ARAÚJO et al., 2013).

Satput et al. (2016) cita outros mecanismos para inibir a formação de biofilmes pelos biossurfactantes. De acordo com os autores, os lipopeptídeos também são capazes de modificar a hidrofobicidade da superfície bacteriana, podendo assim alterar a adesão deste



microrganismo a superfícies sólidas. Além disso, além da inibição por adesão, a surfactina já foi descrita como tendo a capacidade de penetrar e dispersar o biofilme já formado, aumentando ainda mais o seu espectro de aplicação.

**Figura 7:** Efeito inibitório da formação de biofilme pela aplicação do biossurfactante



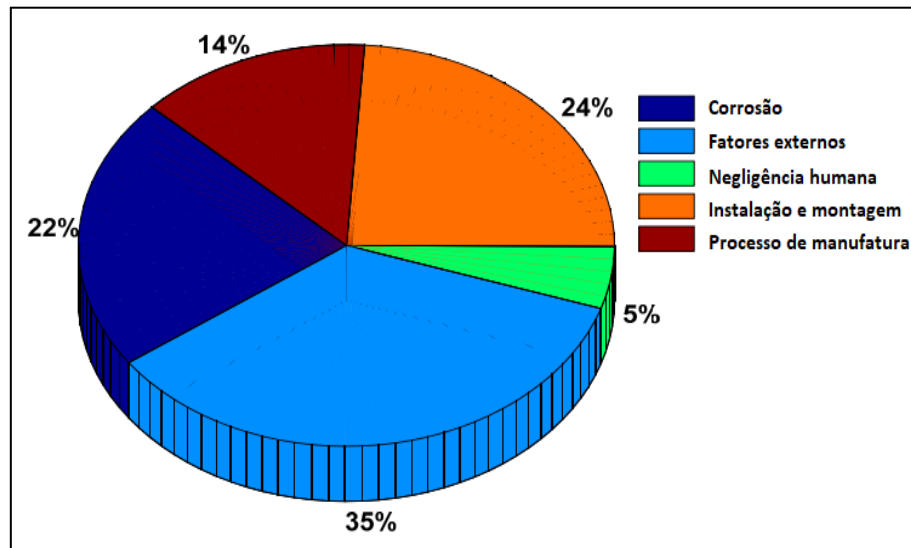
Fonte: ARAÚJO et al. (2013)

## 2.9 Aplicação da surfactina: antimicrobiano contra biocorrosão

Nas últimas décadas têm se intensificado as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação proveniente das atividades da indústria petrolífera. Sérios danos ao meio ambiente podem ser ocasionados por vazamentos acidentais das frações do petróleo dos tanques de estocagem, das tubulações, dos navios utilizados no transporte e pela grande quantidade de água de produção e resíduos sólidos gerados em suas atividades. (MARQUES, GUERRA, 2010).

A Figura 8 ilustra as principais causas de derramamento de petróleo, segundo Adegboye et al. (2019). De acordo com a imagem, em 22 % dos casos a causa do vazamento de petróleo é a ocorrência do processo de corrosão nos dutos. Dentre os mecanismos de corrosão, a microbiologicamente influenciada (CMI) exerce grande influência, uma vez que causa a deteriorização do material, que frequentemente resulta em danos nas tubulações. Esses danos podem ocasionar perdas econômicas consideráveis, além de problemas ambientais ocasionados pela poluição por hidrocarbonetos de petróleo (PUWASENA et al., 2019).

**Figura 8:** Estimativa das principais causas de falhas em oleodutos para transporte de petróleo.



Fonte: Adaptado de Adegboye et al. (2019)

A biocorrosão é o resultado de reações eletroquímicas que são influenciadas por microrganismos. Nesse processo os microrganismos estimulam a corrosão pela secreção de enzimas e metabólitos ácidos e pela oxidação do hidrogênio. Os tipos de bactérias associadas à biocorrosão são as bactérias redutoras de sulfato, bactérias oxidantes/redutoras de ferro, bactérias oxidantes de manganês e bactérias produtoras de ácidos orgânicos ou exopolímeros. Essas bactérias coexistem formando consórcios microbianos com interações complexas dentro de um biofilme aderente à superfície do metal (HAMILTON et al., 1991).

Dentre os grupos de bactérias envolvidas no processo de biocorrosão sobressaem-se as bactérias redutoras de sulfato (BRS). O crescimento de BRS em ambientes marinhos causa significativas modificações de parâmetros físico-químicos na interface metal/água do mar, incluindo alterações locais de pH, e potencial redox, além de variações na composição e estrutura dos materiais. A atividade das enzimas hidrogenases e/ou a presença de sulfeto de ferro são considerados os principais mecanismos envolvidos na deterioração de materiais metálicos pelas BRS. A hidrogenase, que catalisa a oxidação reversível do hidrogênio, está presente em todas as BSR e mesmo dentro da matriz de biofilme, a enzima pode manter suas capacidades de despolarização catódica por meses (BEECH, 2003). Outro mecanismo de corrosão influenciado por BRS pode envolver a produção de alguns compostos corrosivos sintetizados pelo metabolismo microbiano, como o sulfeto de ferro, que pode ser agressivo à superfície metálica (BEECH, 2003).

Os biocidas geralmente empregados para o controle de biocorrosão são considerados tóxicos para o meio ambiente e para os humanos. Além disso, altas dosagens são necessárias

para a erradicação do biofilme, aumentando assim a chance de ocorrência do surgimento de resistência microbiana (PUWASENA et al., 2019). Dessa forma, o desenvolvimento de novos antimicrobianos é uma abordagem que vêm sendo considerada cada vez mais promissora. Um antimicrobiano é basicamente uma molécula biologicamente ativa capaz de controlar o crescimento ou matar os microrganismos alvo. Algumas características importantes para esses compostos são a baixa toxicidade, biodegradabilidade e baixo custo. Neste contexto, a atividade antimicrobiana e a habilidade em romper biofilmes faz da surfactina um potencial candidato para aplicação como antimicrobiano contra BRS (PLAZA et al., 2020). Além disso, suas características relacionadas de biodegradabilidade e estabilidade frente a condições adversas de pH, temperatura e salinidade são desejáveis para aplicações neste setor.

Korenblum et al. (2012) descreveram em seu trabalho o efeito bactericida da surfactina frente a cepa *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 em testes realizados em microplacas. Os autores estudaram ainda o efeito da surfactina no tratamento de superfícies e descreveram que após o tratamento com o biossurfactante foram observadas alterações na superfície de aço inoxidável. De acordo com os autores, o tratamento com o biossurfactante deixou as superfícies menos hidrofóbicas, interferindo na adesão dos microrganismos e, conseqüentemente, na formação de biofilme. Essa camada protetora formada pelas micelas dificulta a aderência microbiana na formação de biofilme, prevenindo a corrosão do material.

Purwasena et al. (2019) estudaram a aplicação de um biossurfactante produzido por *Bacillus sp.* e observaram em seu trabalho que a concentração mínima para a inibição da formação de biofilme foi maior do que a concentração para inibição das células planctônicas. Além disso, observou-se ainda que a maior concentração de inibição foi observada para a erradicação do biofilme já formado, demonstrando, assim, menor eficiência dos biossurfactantes na interação da matriz polimérica do biofilme. De acordo com os autores isso ocorre devido aos diferentes mecanismos de ação antimicrobiana dos biossurfactantes. Já a habilidade de inibição da formação do biofilme está relacionada com o revestimento da superfície do material, dificultando a aderência do microrganismo (PLAZA et al., 2020)..

O mecanismo de ação antimicrobiana dos biossurfactantes mostrou envolver a interação com a membrana citoplasmática e alteração na hidrofobicidade das superfícies, dificultando a formação de biofilme, conforme descrito no item 2.8. Essa habilidade dos biossurfactantes poderia ser usada para inibir e erradicar o biofilme das superfícies metálicas, minimizando a taxa de corrosão causada pelos microrganismos. Devido aos biocidas químicos atualmente utilizados serem classificados como nocivos ao meio ambiente e a saúde humana, a necessidade de substituição dessas substâncias é uma demanda que visa, acima de tudo,

cumprir os critérios de sustentabilidade. Neste contexto, os biossurfactantes são uma alternativa promissora para substituição desses compostos. Além disso, embora existam muitos estudos com relação às diferentes aplicações dos biossurfactante, o uso dessas biomoléculas no combate a processos de biocorrosão ainda é pouco explorado, representando assim uma oportunidade de estudo a ser explorada.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Gerais**

- Avaliação da produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, empregando a glicerina residual como substrato;
- Isolamento e caracterização parcial da biomolécula;
- Avaliação do biossurfactante produzido quanto a sua atividade antimicrobiana.

#### **3.2 Específicos**

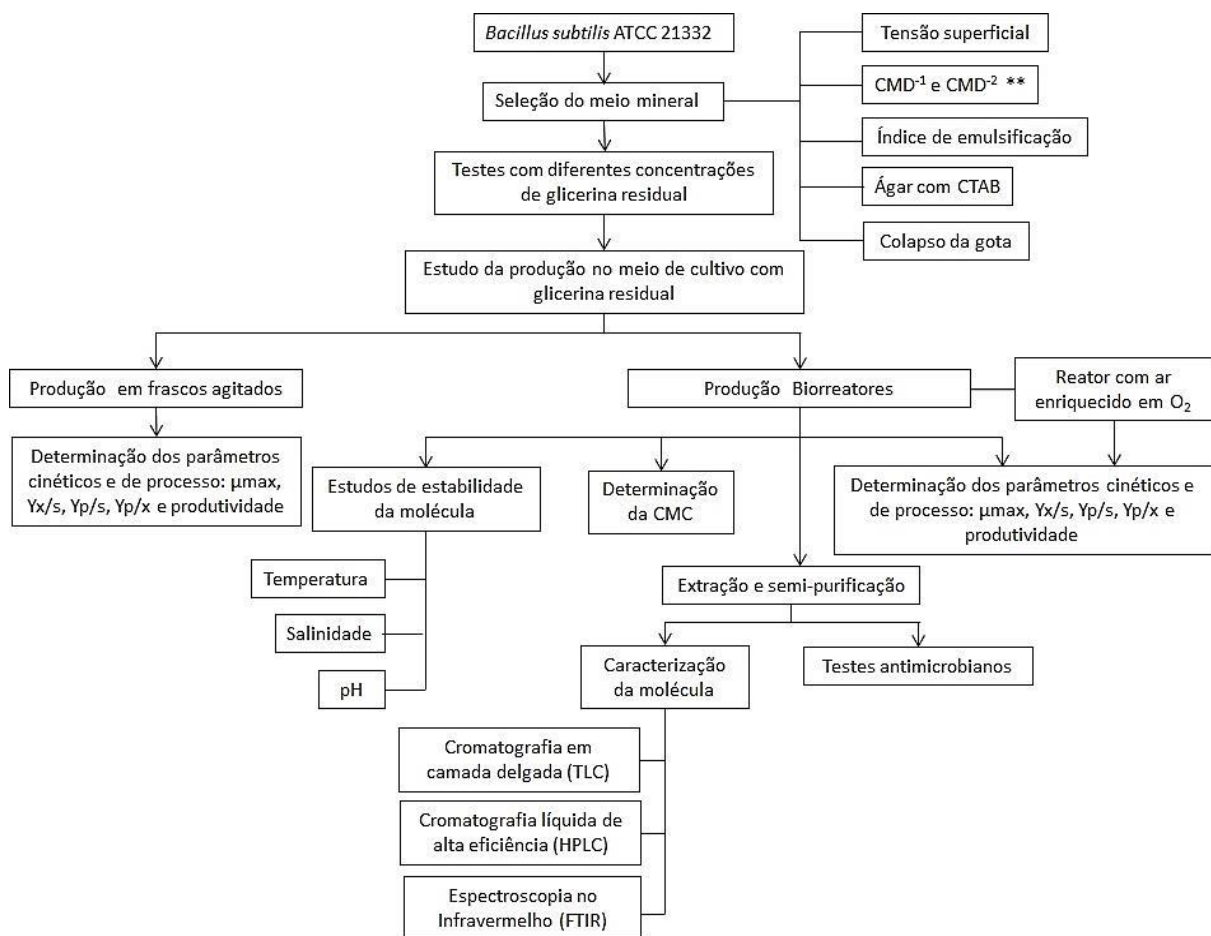
- Avaliação do meio de cultivo e das concentrações de glicerina residual para produção do biossurfactante;
- Determinação da cinética de crescimento, consumo do substrato e produção do biossurfactante;
- Estudo do processo em biorreator com sistema de recirculação de espuma;
- Extração e caracterização parcial da biomolécula;
- Determinação da CMC e estudo da estabilidade do biossurfactante em diferentes condições de pH, salinidade e temperatura;
- Investigação do potencial antimicrobiano da molécula contra bactérias redutoras de sulfato, tendo como bioindicador a bactéria *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 7757.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Fluxograma de atividades

Na Figura 9 a seguir está apresentado o fluxograma com a descrição de todas as atividades realizadas.

**Figura 9:** Fluxograma de atividades



\*\*CMD<sup>-1</sup>: Concentração micelar crítica (diluição 10 vezes)

CMD<sup>-2</sup>: Concentração micelar crítica (diluição 100 vezes)

Fonte: Autoria própria

### 4.2 Manutenção dos microrganismos

O microrganismo utilizado neste estudo para a produção de surfactina foi a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 21332, obtida a partir da coleção de culturas *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos utilizados nos testes antimicrobianos foram as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Bacillus subtilis*

ATCC 19654. Para os testes com bactérias redutoras de sulfato foi utilizada a cepa *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 7757. Os meios de cultura adotados para a preservação foram selecionados de acordo as particularidades de cada microrganismo. Para a cepa produtora de surfactina, utilizou-se o meio descrito por Arima et al. (1968), conforme Tabela 3. Os demais microrganismos aeróbicos foram armazenados em caldo Müller Hinton (Difco Laboratories, USA) e a cepa BRS foi armazenada em meio proposto por Nakao et al. (2009) com adaptações, conforme mostrado na Tabela 4.

Todas as culturas foram preservadas em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  em seus respectivos meios de crescimento, com 10 % (v/v) de glicerol como crioprotetor. Os repiques das BRS foram realizados em frascos no mesmo meio de armazenamento e incubados em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e foram realizados a cada 20 dias para novos frascos de vidro, do tipo penicilina.

**Tabela 3** - Composição do meio de cultivo para *Bacillus subtilis* ATCC 21332, segundo Arima et al. (1968)

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de carne	7
NaCl	3

**Tabela 4** - Composição do meio de cultivo para as BRS, segundo Nakao et al. (2009)

Componentes	Concentração (g/L)
Polipeptona	15
Peptona de soja	7,5
Extrato de levedura	7,5
Extrato de carne	7,5
L-cisteína HCl	0,75
Citrato de ferro amoniacal	0,75
Dextran sulfato de sódio	10
Ágar	15

### 4.3 Obtenção e caracterização da glicerina residual

A glicerina residual utilizada neste trabalho é subproduto do processo de produção do biodiesel e foi gentilmente cedida pela PETROBRAS/CENPES (Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello) para o Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). Seu armazenamento foi feito em tambores de polietileno de alta densidade (PEAD), armazenado em câmara fria, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esse material foi caracterizado

quanto ao teor de glicerol presente, de acordo com metodologia descrita no item 4.14.3. A composição da glicerina residual fornecida pelo CENPES está apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5** - Composição da glicerina residual utilizada neste trabalho

<b>Componentes</b>	<b>Composição (mg/kg)</b>
<b>Glicerol</b>	83000
<b>Metanol</b>	1000
<b>NaOH</b>	5000
<b>K</b>	10
<b>Mg</b>	2
<b>Ca</b>	2,7
<b>Sulfato</b>	40

Fonte: CENPES (2020)

#### **4.4 Estudo do meio de cultivo para a produção de surfactina**

##### **4.4.1 Preparo do inóculo**

Para a reativação do microrganismo, a suspensão de células criopreservadas foi adicionada em frasco Erlenmeyer contendo o meio descrito por Arima et al. (1968), na concentração de 1 % (v/v). O cultivo foi então incubado em agitador orbital a 200 rpm e 30 °C. A fim de se avaliar o tempo de incubação do inóculo, foi realizado o acompanhamento da cinética de crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 no referido meio de cultivo.

##### **4.4.2 Teste de seleção do meio de cultura para produção de surfactina**

Para os testes de seleção do meio para a produção de surfactina foram utilizadas cinco composições de meio descritas de acordo com Arima et al. (1968); Copper et al. (1981); Pretorius et al. (2015); Ramsay et al. (1990) e Sheppard et al. (1991). A composição de cada meio estão mostradas nas Tabelas 6 e 7. Os experimentos foram conduzidos em duplicata biológica. As médias, o desvio padrão, a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5 % de significância) dos dados foram obtidos utilizando o software Minitab® 19.1.1.

**Tabela 6** - Composição dos meios Copper et al. (1981); Pretorius et al. (2015) e Sheppard; Cooper (1991).

Componentes	Concentração (g/L)			
	COOPER et al., (1981)	PRETORIUS et al., (2015)	SHEPPARD; COOPER (1991)	ARIMA et al., (1968)
Glicose	40	40	40	10
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4,0	8,0	4,0	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,08	6,805	4,08	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7	5,7	7,12	-
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,196	0,332	0,196	-
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,0010	0,001	0,0010	-
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,0011	0,002	0,015	-
EDTA	0,0015	-	0,0015	-
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,00017	0,0017	0,00196	-
NaCl	-	-	-	3
Extrato de levedura	-	0,5	-	-
Peptona	-	-	-	10
Extrato de carne	-	-	-	7

**Tabela 7**- Composição do meio Ramsay et al. (1994)

Componentes	Concentração (g/L)
	RAMSAY et al., (1990 )
Glicose	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,5
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,01
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> FeNO <sub>7</sub>	0,06
Elementos traços*	1,0 mL/L

\*Composição da solução de elementos traços: (g/L): MnCl<sub>2</sub> 0,03; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,3; CoCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O 0,2; ZnSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O 0,1; NaMoO<sub>4</sub>\*2 H<sub>2</sub>O 0,03; NiCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0,02; CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O 0,01.

#### 4.4.3 Avaliação do crescimento microbiano em diferentes concentrações de glicerina residual

Após o teste de seleção do meio de cultura, o meio mineral escolhido para dar prosseguimento aos testes de produção de surfactina foi o meio descrito por Sheppard e Cooper (1991). Para o preparo do meio de cultivo a glicerina residual foi esterilizada separadamente, assim como o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, o MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O e a solução do tampão formada por



$\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Os demais micronutrientes foram preparados em uma solução concentrada 1000 vezes e adicionados posteriormente ao meio. O pH final do meio foi ajustado na faixa de 6,8 e 7,0, com a adição de NaOH 2M em condições assépticas.

Em seguida, o meio de cultivo selecionado foi preparado com diferentes concentrações de glicerina residual em substituição a glicose. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultivo, incubados a 200 rpm e 30 °C e 72 horas. As concentrações de glicerina residual estudadas foram 1 %, 2%, 4% e 6% (m/v) e, além disso, cada condição foi acompanhada de um controle contendo a glicerina padrão em substituição à residual. Foram coletadas amostras a cada 12 horas para medição da densidade ótica e massa seca e a cada 24 horas para o consumo de substrato e medição da tensão superficial. Os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica. As médias, o desvio padrão, a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5 % de significância) dos dados foram obtidos utilizando o software Minitab® 19.1.1. Os cálculos dos parâmetros cinéticos e de processos foram realizados de acordo com Schmidell et al. (2001) e estão descritos no item 4.7.

#### **4.5 Estudo da cinética de crescimento e produção de surfactina em frascos agitados**

Tendo selecionada a melhor condição de glicerina residual para o crescimento microbiano, foi realizado um estudo da cinética de produção da surfactina em frascos agitados. Para tanto, os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultivo, incubados a 200 rpm e 30 °C e 72 horas. Amostras para a verificação da densidade ótica (DO), massa seca, consumo de glicerol e concentração de surfactina foram retiradas a cada 4 horas nas primeiras 12 horas e depois de 12 em 12 horas até o final do cultivo. Os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica. As médias, o desvio padrão, a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (5 % de significância) dos dados foram obtidos utilizando o software Minitab® 19.1.1. Os cálculos dos parâmetros cinéticos e de processos foram realizados de acordo com Schmidell et al. (2001) e estão descritos no item 4.7.

#### **4.6 Estudo da produção de surfactina em biorreator**

Para o estudo da produção de surfactina em biorreator foi utilizado o mesmo meio de cultivo dos ensaios em frascos agitados com a concentração de 2 % (m/v) de glicerina residual

(item 4.5.3). A fim de se estudar a produção de surfactina em biorreator foi realizado inicialmente um ensaio exploratório em dorna de 2 litros, denominado RBS1, para se verificar todas as adaptações necessárias na configuração do biorreator e frascos de coleta de espuma. Tendo definido o desenho do processo com todas as entradas e saídas do biorreator, foi realizado outro ensaio, RBS2, a fim de reproduzir as configurações ajustadas no ensaio anterior. Em seguida, foi realizado um novo estudo para a fim de avaliar o efeito da oxigenação do meio na produção de surfactina. Esses estudos foram realizados em biorreatores de 15 litros, nomeados nesse trabalho como RBS3 e RBS4, e foram usadas as mesmas configurações de coleta de espuma dos biorreatores menores.

#### **4.6.1 Preparo dos inóculos**

Para os ensaios RBS1 e RBS2, o inóculo foi obtido de acordo com o item 4.5.1 e foi adicionado no reator na proporção de 5 % (v/v). Já no ensaio RBS3 e RBS4, após a reativação do microrganismo, foi realizada ainda uma etapa de adaptação do inóculo no mesmo meio a ser utilizado no reator. Em ambos os ensaios, foi utilizada a proporção de 10 % (v/v) de inóculo em fase exponencial de crescimento.

#### **4.6.2 Ensaio em biorreator**

Os ensaios RBS1 e RBS2 foram realizados em biorreator Biostat® B, Sartorius, com dorna de 2 litros e volume de trabalho de 1,3 litros. Os demais ensaios, RBS3 e RBS 4, foram realizados em reator Biostat® Cplus, Sartorius Stedim Biotech com dorna de 15 litros e volume útil ocupado pelo meio e inóculo de 5 litros. A esterilização do biorreator menor foi feita em autoclave, a 121 °C e 30 min; e o reator de 15 litros foi esterilizado *in situ*. Os meios de cultivo foram preparados e autoclavados separadamente (item 4.5.1), sendo adicionados posteriormente aos biorreatores para evitar precipitação dos seus componentes.

O processo foi iniciado em batelada simples até que a fonte de carbono atingisse uma concentração limitante, entre 5,0 e 10,0 g/L, quando foram feitas novas adições de glicerina residual, em pulsos, até que a concentração se igualasse a inicial. A suplementação do meio com soluções de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e micronutrientes também foi realizada através de pulsos ao longo do processo, a fim de garantir que não houvesse limitação por esses nutrientes. As soluções de alimentação desses nutrientes foram preparadas concentradas e os pulsos realizados foram de 50 mL para a fonte de nitrogênio (250 g/L) e 40 mL para os demais nutrientes (solução 150 vezes concentrada), que foram preparados juntos. Essas

soluções foram adicionadas à medida que se observava um aumento nas medidas dos parâmetros de porcentagem de oxigênio e adição de base.

A temperatura foi mantida em 30 °C e o pH foi controlado entre 6,8 e 7,0 pela adição de NaOH (4 M). A aeração foi definida como a razão entre a vazão de ar injetada no meio pelo volume do meio de cultura (vvm) e teve seus valores iniciais estabelecidos em 0,75 vvm nos reatores de 2 litros e 0,3 vvm nos reatores de 15 litros. Tanto a vazão de ar como a agitação foram ajustadas ao longo dos ensaios de acordo com a formação de espuma para cada experimento, mantendo a saturação mínima de 20 % de oxigênio. A saturação de oxigênio foi mantida inicialmente pelo controle em cascata com a agitação e aeração. Todos os bioprocessos foram acompanhados por aproximadamente 40 horas e tiveram monitoramento em tempo real de oxigênio dissolvido, aeração, agitação, pH, temperatura e volumes de ácido e base adicionados para o controle de pH.

No reator RBS4 foi utilizada a aeração enriquecida com oxigênio, a fim de aumentar a transferência de O<sub>2</sub>, diminuindo assim a necessidade do aumento da aeração e agitação (e conseqüente formação excessiva de espuma) à medida que o cultivo atingia altas densidades celulares. Para tanto, o reator foi equipado com um cilindro de oxigênio puro que operava em pulsos para enriquecer a porcentagem de oxigênio na mistura de gases do ar comprimido em até 15 % (v/v). Esses pulsos eram acionados à medida que a porcentagem de oxigênio dissolvido ficava abaixo de 20 % de saturação, mesmo tendo atingido a aeração e agitação máximas definidas no controle cascata.

Para o acompanhamento dos processos foram retiradas periodicamente amostras do biorreator para o monitoramento da densidade ótica, massa seca e pH em eletrodo externo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 10 °C e 10 minutos para separação das células e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de glicerol por HPLC (item 4.5) e surfactina (item 4.9). Uma vez que o biossurfactante se concentra na interface líquido-ar (BARROS, 2007), foi montado um esquema a fim de retornar a espuma do frasco de coleta novamente para o meio no biorreator por meio de uma bomba peristáltica. No final do experimento, toda a espuma contida no biorreator e no frasco de coleta foi colapsada e coletada junto com o caldo do cultivo para a extração e purificação da surfactina, a fim de ser utilizada nos testes antimicrobianos. A descrição da operação de cada ensaio está resumida na Tabela 8.

**Tabela 8-** Resumo da operação de cada ensaio em biorreator

	<b>RBS1</b>	<b>RBS2</b>	<b>RBS3</b>	<b>RBS4</b>
<b>Tempo de ensaio (h)</b>	46	35	48	44
<b>V<sub>inicial</sub> de meio</b>	1,3 litros	1,3 litros	5 litros	5 litros
<b>Inóculo</b>	5 % (v/v) do inóculo não adaptado	5 % (v/v) do inóculo não adaptado	10 % (v/v) do inóculo adaptado	10 % (v/v) do inóculo adaptado
<b>Agitação inicial</b>	200 rpm	200 rpm	300 rpm	300 rpm
<b>Aeração inicial</b>	0,75 vvm	0,75 vvm	0,3 vvm	0,3 vvm
<b>Saturação mínima de O<sub>2</sub></b>	20 % (controle em cascata)	20 % (controle em cascata)	20 % (controle em cascata)	20 % (controle em cascata e pulsos de O <sub>2</sub> )
<b>Análises das amostras coletadas</b>	DO, massa seca, pH e glicerol	DO, massa seca, pH, glicerol e surfactina	DO, massa seca, pH, glicerol e surfactina	DO, massa seca, pH, glicerol e surfactina

#### 4.7 Obtenção dos parâmetros cinéticos e de processos

O consumo de substrato (S), crescimento celular (X) e síntese de produto (P) foram analisados em função do tempo com curvas de  $S = S(t)$ ,  $X = X(t)$  e  $P = (t)$ . O cálculo dos parâmetros cinéticos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Schmidell et al. (2001) e estão apresentados detalhadamente a seguir.

##### 4.7.1 Velocidades específicas

As velocidades específicas de formação de células ( $\mu_x$ ), produto ( $q_p$ ) e de consumo de substrato ( $q_s$ ) foram calculadas para cada tempo  $t$ , conforme as Equações 4, 5 e 6. O ajuste dos dados foi realizado pela interpolação (*spline* cúbica), realizada com o auxílio do software *Emerson*, desenvolvido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).

$$\mu_x = \frac{dx}{dt} * \frac{1}{x} \quad (4)$$

$$q_p = \frac{dp}{dt} * \frac{1}{x} \quad (5)$$

$$q_s = - \frac{ds}{dt} * \frac{1}{x} \quad (6)$$

#### 4.7.2 Velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) durante a fase exponencial foi calculada a partir do coeficiente angular da representação semi logaritmica das concentrações de biomassa (X) em função do tempo (t), de acordo com a Equação 7:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_{\max} * t \quad (7)$$

Sendo X o valor de biomassa (g/L) correspondentes ao tempo t durante a fase exponencial,  $X_0$  a biomassa no início da fase exponencial (g /L) e  $\mu_{\max}$  a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ )

#### 4.7.3 Fatores de conversão

Os fatores de conversão do substrato (S) em célula (X) e em produto (P) foram obtidos de acordo com as Equação 8 e 9.

$$Y_{X/S} = \frac{(X_{\max} - X_0)}{(S_0 - S)} \quad (8)$$

$$Y_{P/S} = \frac{(P_{\max} - P_0)}{(S_0 - S)} \quad (9)$$

Sendo  $Y_{X/S}$  o fator de conversão de substrato em célula ( $g_x/g_s$ ),  $Y_{P/S}$  o fator de conversão de substrato em produto ( $g_p/g_s$ ),  $X_0$  (g/L) a concentração celular no tempo  $t_0$  (h),  $X_{\max}$  (g/L) a concentração celular máxima,  $P_0$  (g/L) o produto no tempo  $t_0$  (h) e  $P_{\max}$  (g/L) a concentração máxima de produto.

#### 4.7.4 Produtividade em produto

A produtividade em produto ( $P_p$ ) foi calculada de acordo com a Equação 10.

$$P_p = \frac{(P_{\max} - P_0)}{t} \quad (10)$$

Sendo  $P_p$  a produtividade em produto (g/L/h),  $P_{\max}$  e  $P_0$  as concentrações máxima e inicial de produto, respectivamente, e t o tempo necessário para atingir a concentração máxima de formação do produto.

#### 4.7.5 Determinação dos parâmetros do modelo de Luedeking-Piret

A relação entre a produção do biossurfactante e o crescimento celular foi avaliada de acordo com o modelo desenvolvido por Luedeking-Piret (1959). Os parâmetros cinéticos foram obtidos de acordo com a Equação 11.

$$q_p = \alpha * \mu_x + \beta \quad (11)$$

Sendo  $\alpha$  o parâmetro relativo à formação do produto associado ao crescimento celular e  $\beta$  o parâmetro correspondente ao parâmetro não associado. As constantes  $\alpha$  e  $\beta$  foram determinadas através da curva de  $q_p$  em função do  $\mu_x$ , sendo  $\alpha$  o coeficiente angular e  $\beta$  o coeficiente linear da reta.

### 4.8 Extração e caracterização do biossurfactante

Para a quantificação da surfactina é necessária a extração do biossurfactante, que foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Rocha et al. (2020) e Geissler et al. (2016). Os extratos preparados foram utilizados para as análises de caracterização, para a quantificação da surfactina e para os testes antimicrobianos.

#### 4.8.1 Precipitação ácida

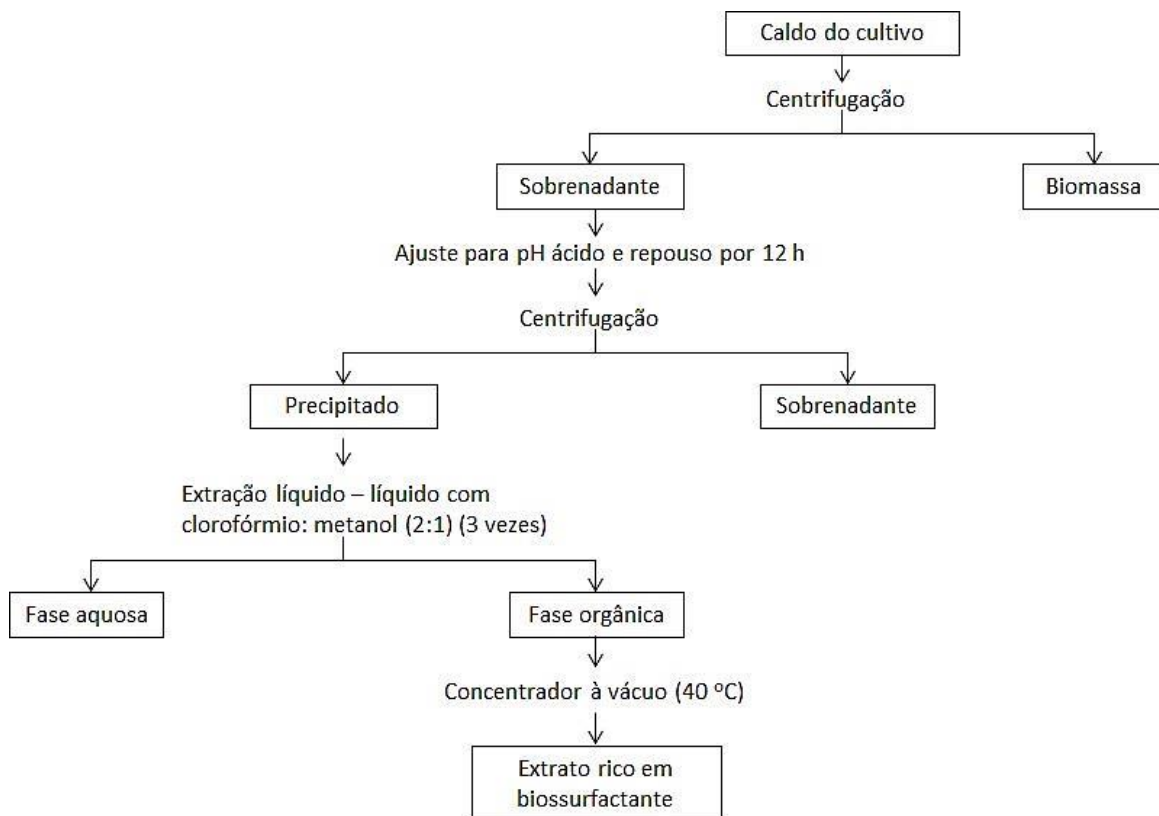
As amostras dos cultivos foram primeiramente centrifugadas para a separação das células. Em seguida, uma alíquota de 10 mL do sobrenadante teve seu pH ajustado para 2,0 com uma solução de HCl 6 M, sendo depois a amostra acidificada deixada em repouso a 4 °C por um período de 12 horas para a formação de precipitado. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 16000 x g, 10 °C durante 20 minutos. O precipitado recolhido foi ressuspenso em 2,0 mL de água destilada e seu pH foi neutralizado com uma solução de NaOH 1 M. (COOPER et al., 1981; ROCHA, 2017).

#### 4.8.2 Extração por solvente

A amostra obtida na etapa de precipitação ácida foi extraída de acordo com a metodologia descrita por Rocha et al. (2017). Primeiramente, foi adicionado 2,0 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) a solução neutralizada obtida no item 4.8.1. A solução foi então agitada em agitador vórtex por 5 minutos, sendo em seguida centrifugada a

16000 x g, 10 °C e 10 minutos para a separação das fases. Em seguida, as fases inferiores foram recolhidas e armazenadas. Para garantir a eficiência da extração da surfactina, o processo de extração foi realizado três vezes. O solvente contendo o biossurfactante foi então evaporado em um concentrador a vácuo (SpeedVac, Termofischer) a 40 °C para a concentração da surfactina. O esquema do processo de extração está descritos a seguir (Figura 10):

**Figura 10:** Esquema de extração da surfactina



Fonte: Arquivo pessoal

#### 4.9 Determinação da concentração de surfactina no HPLC

A quantificação da surfactina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), de acordo com a metodologia descrita por Rocha et al. (2020). Para tanto, utilizou-se o cromatógrafo Thermo Scientific (Ultimate 3000), equipado com coluna de fase reversa Shim-pack CLC-ODS (M)® (Shimadzu Co., Japão) C18 (250 x 4,5 mm, 100 Å, com partículas de 5 µm). Como fase móvel foi empregado 20% de ácido trifluoracético (3,8 mM) e 80 % de acetonitrila na vazão 1 mL/ min, a 30 °C. O detector utilizado foi o detector DAD a 205 nm. O tempo de análise foi de 30 minutos e o volume de injeção foi de 20 µL de amostra.

As amostras foram quantificadas através de uma curva de calibração com surfactina padrão  $\geq 98,0\%$  (Sigma-Aldrich).

O extrato rico em biossurfactante e o padrão de surfactina foram ressuspensas em acetonitrila:metanol (1:1, v/v) para a análise no HPLC, sendo as diluições realizadas nesta mesma fase, quando necessário.

## **4.10 Caracterização parcial do biossurfactante**

### **4.10.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A fim de se realizar uma caracterização preliminar do extrato rico em biossurfactante foi realizada uma CCD, de acordo com a metodologia proposta por Vater et al. (2002). Após a extração do biossurfactante (item 4.8.2), o sólido foi ressuspensado em água:metanol (1:1) e aplicado, através de um capilar, em placa de sílica 0,25 mm de espessura (Merck, 60 F254), utilizando como sistema eluente o(s) sistema(s) clorofórmio: metanol: água (65: 25: 4).

A revelação química das manchas foi realizada através da aplicação de vapor de iodo às placas para a detecção de compostos hidrofóbicos. Os fatores de retenção ( $R_f$ ) das bandas reveladas foram comparados com os  $R_f$  da surfactina padrão (Sigma-Aldrich). O cálculo dos fatores de retenção foi realizado de acordo com a Equação 12.

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}} \quad (12)$$

### **4.10.2 Identificação por HPLC**

A análise por HPLC é descrita em vários trabalhos como um dos melhores métodos para identificar e quantificar a surfactina (MUBARAK et al., 2015). Dessa forma, a identificação das isoformas da surfactina no extrato rico em biossurfactante foi confirmada por HPLC (item 4.9). Para tanto, o padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) e as amostras extraídas foram dissolvidas em acetonitrila:metanol (1:1). Em seguida, as amostras foram fortificadas com o padrão a fim de se verificar o aumento da intensidade do sinal dos picos de interesse.



#### **4.11.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A análise dos grupos funcionais presentes na molécula do biossurfactante produzido foi realizada utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), utilizando o equipamento *Nicolet*, modelo iS50. Para a análise uma pequena amostra do extrato em pó foi misturada a brometo de potássio (KBr), macerada e prensada na forma de pastilha. O espectro FTIR foi gerado com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  na faixa de 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , a partir da média de 64 scan (ISMAIL et al., 2013). O mesmo procedimento foi realizado com a surfactina padrão (Sigma-Aldrich).

#### **4.12 Estudo da estabilidade do biossurfactante e determinação da CMC**

A estabilidade do biossurfactante produzido foi avaliada frente à temperatura, pH e salinidade, utilizando como parâmetro a medida da tensão superficial. Os testes foram realizados no sobrenadante dos cultivos, obtidos após centrifugação a  $16000\text{ x g}$ ,  $10\text{ °C}$ , durante 10 minutos.

##### **4.12.1 Temperatura**

Para o teste de estabilidade à temperatura, um tubo cônico contendo 50 mL do sobrenadante do cultivo foi aquecido em banho de óleo a  $100\text{ °C}$  durante 15, 30, 60, e 120 minutos e a  $121\text{ °C}$ , em autoclave, durante 15 minutos. Em seguida, os tubos foram mantidos em repouso até atingir a temperatura ambiente para novas medidas de tensão superficial, a fim de avaliar se houve perda da atividade tensoativa da molécula pela temperatura (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997; COSTA, 2005).

##### **4.12.2 pH**

No teste de pH, foram utilizadas soluções de NaOH 1 M e HCl 1 M para ajustar os valores de pH do sobrenadante para 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12 e 13. Para tanto, diferentes tubos cônicos contendo o volume de 50 mL do meio de cultivo tiveram os valores de pH ajustados e após 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as medições de tensão superficial (COSTA, 2005).

### 4.12.3 Salinidade

A estabilidade frente a diferentes condições de salinidade foi avaliada no sobrenadante pela adição de NaCl em concentrações de 1,0; 2,5; 5; 10; 15 e 20 % (m/v). Após 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as medições de tensão superficial (KIM *et al.*, 1997; BARROS *et al.*, 2007).

### 4.12.4 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

A determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) foi realizada baseada na mediação da tensão superficial em diferentes diluições da amostra do cultivo. Para tanto, foram realizadas diluições sucessivas no sobrenadante e a leitura da tensão superficial foi efetuada da amostra mais concentrada para a mais diluída. Com esses dados foi construído um gráfico dos valores da concentração de surfactina (mg/L) em função da tensão superficial (mN/m), obtendo assim uma curva cujo valor mínimo corresponde a CMC do biossurfactante.

## 4.13 Testes antimicrobianos

### 4.13.1 Padronização dos inóculos

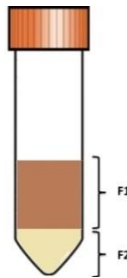
Foram testadas 3 cepas de microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Bacillus subtilis* ATCC 19654. O crescimento das bactérias foi realizado em caldo Mueller Hinton, a 37 °C, 180 rpm e 12 horas de cultivo, a partir da suspensão congelada a -80 °C. Para a padronização dos inóculos foram realizadas curvas de correlação para cada microrganismo relacionando a densidade ótica a 600 nm com o número de UFC/mL. A concentração celular padrão utilizada nos testes de difusão em ágar foi de  $1,0 \cdot 10^8$  UFC/mL.

A bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 7757 foi crescida em meio de cultivo proposto por NAKAO *et al.* (2009) a 37 °C durante 28 dias, a partir da suspensão congelada a -80 °C. A contagem das BRS foi realizada por determinação do número mais provável (NMP) e para a determinação da concentração mínima inibitória foi utilizada a concentração de  $1,0 \cdot 10^5$  UFC/mL.

#### 4.13.2 Avaliação das frações da extração quanto sua atividade antimicrobiana

Para a verificação da fração biologicamente ativa foram testadas as duas frações formadas durante o processo de extração, de acordo com a Figura 11. Para tanto, foi preparado em meio Mueller Hinton uma solução do extrato de cada fração, na concentração de 50 mg/mL.

**Figura 11:** Frações obtidas após a adição do solvente para a extração do biossurfactante



Fonte: Arquivo pessoal

A atividade antibacteriana dos extratos foi analisada qualitativamente pelo método de difusão em ágar, conforme descrito pela norma NCCLS, M2-A8 (2003). Após a padronização do inóculo, a suspensão de células foi espalhada na superfície da placa de Petri contendo o meio Mueller Hinton com o auxílio de um *Swab*. Foram testadas duas metodologias de difusão em ágar: os discos de papel, feitos em papel filtro (Whatman nº 1, 6 mm), e a perfuração em poço (6 mm de diâmetro) (OSTROSKY et al., 2008). Em ambos os métodos foi utilizada uma alíquota de 50 µL dos extratos preparados previamente. A inibição do crescimento foi observada através da medida dos diâmetros dos halos (em mm) formados ao redor dos discos e poços, após incubação a 30 °C e 24 horas. O controle foi realizado com o mesmo veículo utilizado para dissolver as amostras.

#### 4.13.3 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC - *Minimum inhibitory concentration*) frente à BRS

O teste para determinação da concentração inibitória mínima foi realizado em placas de microdiluição de 96 poços, de acordo com a metodologia descrita por Korenblum et al. (2012). Para tanto, foram testadas as concentrações 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10 e 5 mg/mL da fração biologicamente ativa do extrato (F2), diluída em meio DA. Todos os controles e concentrações de teste foram preparados em cinco réplicas. As placas foram incubadas durante 7 dias, a 37 °C, em câmara de anaerobiose (*GasPak Anaerobic System*). A

concentração inibitória mínima foi determinada como a menor quantidade de substância antimicrobiana adicionada que não resultou na coloração enegrecida do meio. Para verificação do efeito antimicrobiano, uma concentração de 1 % das suspensões de células da placa de MIC foram usadas para inocular o meio DA fresco e incubadas por mais 7 dias, a 37 °C e em câmara de anaerobiose.

#### **4.14 Métodos analíticos**

##### **4.14.1 Densidade óptica**

O aumento da biomassa do cultivo foi monitorado pela leitura da amostra em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm.

##### **4.14.2 Concentração da biomassa**

O crescimento celular foi avaliado pela determinação da massa seca de células após o período de incubação. No final de cada cultivo, um volume conhecido da amostra foi filtrado em membrana 0,22 µm e após a filtração, a membrana foi seca em estufa a 105 °C por 4 horas. A massa de células em g/L foi determinada pelo cálculo da diferença entre a massa da membrana antes da filtração e sua massa após a secagem, dividindo o resultado pelo volume da amostra.

##### **4.14.3 Determinação da concentração de glicerol**

A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando o cromatógrafo Shimatzu equipado com coluna Shodex SC1011 (8 x 300 mm). Como fase móvel foi empregado EDTA-Ca na vazão 0,6 mL/min a 72 °C. O detector utilizado foi um detector de índice de refração.

##### **4.14.4 Determinação da concentração de nitrogênio amoniacal**

A determinação do teor de nitrogênio nos sais de amônio foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Treadweel et al. (1956). Essa metodologia se baseia no fato de que o íon amônio é liberado como gás amônia após a adição de uma solução concentrada de hidróxido de sódio. Dessa forma, a amostra foi primeiramente alcalinizada com NaOH 10 M para converter o íon amônio em amônia, sendo a leitura realizada em milivolt (mV) por um eletrodo de íons seletivos. O teor de nitrogênio é então determinado através de uma curva de

calibração previamente preparada com padrões conhecidos. Nessa curva são relacionadas a diferença de potencial, em milivolts, com a concentração, em mg/L, de nitrogênio amoniacal.

#### 4.14.5 Medição da tensão superficial (TS) e diluição micelar crítica (CMD)

A tensão superficial foi medida nas amostras do sobrenadante dos cultivos. Para tanto, foi utilizado o tensiômetro Dataphysics modelo DCAT 11, configurado para fazer medidas em um intervalo de 10 s entre elas, até que se encontrasse um desvio padrão menor que 0,2 mN/m ou até 50 repetições para cada amostra. O método utilizado foi o método da placa de Wilhelmy, a 25 °C. A medida realizada diretamente no sobrenadante do cultivo foi denominada tensão superficial (TS), enquanto as medidas realizadas nos sobrenadantes diluídos com água foram chamadas de diluição micelar crítica  $CMD^{-1}$  (diluição de 10 vezes) e  $CMD^{-2}$  (diluição de 100 vezes) (SIMIQUELI, 2014).

#### 4.14.6 Índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi medido no sobrenadante dos cultivos, de acordo com a metodologia proposta por Cooper e Goldenberg (1987). Para a obtenção da emulsão, foram misturados 2 mL do sobrenadante livre de células e 2 mL de querosene. Essa mistura foi então agitada por 2 minutos em agitador vórtex. Como controle foi utilizada água destilada no lugar da amostra. A emulsão formada foi medida no tempo inicial e após 24 horas. O cálculo do índice de emulsificação foi realizado dividindo-se a altura total da mistura pela altura da emulsão formada, e o resultado, multiplicado por 100, conforme a Equação 13.

$$IE (\%) = \frac{\textit{altura da emulsão}}{\textit{altura total da mistura}} * 100 \quad (13)$$

#### 4.14.7 Teste do espalhamento da gota

Uma placa de Petri foi preenchida com 40 mL de água destilada, sendo adicionado em seguida 20 µL de óleo usado de motor automotivo e 10 µL do sobrenadante dos cultivos. A presença do biossurfactante foi confirmada pelo espalhamento da gota, através da formação de um halo na mancha de óleo (MORIKAWA et al., 2000).

#### 4.14.8 Formação de halo (CTAB)

O teste de formação de halo em ágar contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi realizado de acordo com Siegmund e Wagner (1991), com algumas modificações. Primeiramente, foi preparado um meio sólido composto por:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (4,4 g/L);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5 g/L), ágar bacteriológico (20 g/L), CTAB (0,2 g/L) e azul de metileno (10 mL/L). Em seguida, cilindros de metais foram colocados em contato com o ágar e uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  da amostra foi adicionada no interior dos cilindros. Após o período de incubação de 24 h, avaliou-se se houve ou não formação de halo ao redor dos cilindros.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de seleção dos meios de cultivo

Inicialmente foram testados diferentes meios de cultivo descritos na literatura a fim de se selecionar um meio para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Ao todo, foram testados cinco meios de cultura para a produção de surfactina: **MM1** (ARIMA et al., 1968); **MM2** (SHEPPARD; COOPER, 1998); **MM3** (COOPER et al., 1989); **MM4** (PRETORIUS et al., 2015) e **MM5** (RAMSAY et al., 1989). Além dos testes para avaliação da produção de tensoativo, foram ainda acompanhados o crescimento celular e o pH ao longo do processo (dados não mostrados), que não apresentaram diferenças significativas entre os meios testados. As metodologias adotadas para verificação de produção do biossurfactante foram baseadas na atividade tensoativa da molécula (tensão superficial, diluição micelar crítica, espalhamento da gota e formação de halo em ágar com CTAB) e na atividade emulsificante (índice de emulsificação).

Devido a sua versatilidade e gama de aplicações em diversos setores, o interesse pelos biossurfactantes tem crescido nos últimos anos, evidenciando assim a necessidade de estudo e aplicações de protocolos simples e rápidos para a identificação de microrganismos produtores e verificação da produção de tensoativos. De acordo com Dhiman et al. (2016), alguns métodos mais comuns para se verificar a produção de biossurfactantes se baseiam principalmente na avaliação de sua atividade superficial.

Satput et al. (2010) revisaram em seu trabalho alguns métodos de *screening* para detecção de biossurfactante. Segundo os autores, os métodos indiretos costumam utilizar as propriedades físico-químicas dos surfactantes como indicadores. O método da formação de halo no ágar com CTAB é descrito como uma excelente técnica para a detecção de

surfactantes aniônicos. Já a técnica do espalhamento da gota é citada como um dos melhores métodos para a detecção da produção de biosurfactante. Ambos os métodos citados são qualitativos, mas métodos semi-quantitativos, também são comumente empregados, como é o caso da medição da tensão superficial. De acordo com Dhiman et al. (2016), uma mistura de vários métodos é a melhor estratégia para fazer uma triagem bem-sucedida de biosurfactantes.

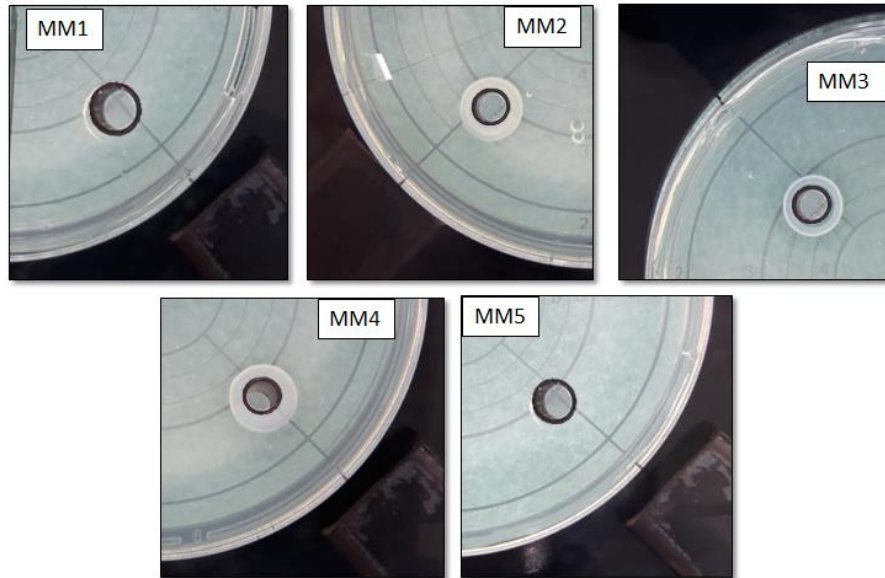
Em seu trabalho, Brumano (2017) investigou 33 leveduras isoladas de biomas brasileiros com relação a sua capacidade de produzir biosurfactantes. Foram utilizados diversos métodos para detecção desses compostos, como escorrimento da gota, atividade hemolítica, colapso da gota, espalhamento da gota e índice de emulsificação. A autora discute ainda sobre a baixa sensibilidade de alguns testes qualitativos para a identificação de surfactante, podendo haver resultados falsos negativos pela baixa concentração de biosurfactante no meio. Além disso, no ensaio de índice de emulsificação, existe a interferência de alguns fatores relacionados a composição do meio, como a concentração de proteínas e salinidade. A Tabela 9 apresentada a seguir mostra os resultados obtidos por vários métodos para a detecção indireta da presença de biosurfactante para todos os meios testados

**Tabela 9** - Resultados dos testes de seleção de meio de cultivo para a produção de biosurfactante

Meios de cultivo	Tensão superficial (mN/m)	CMD <sup>1</sup> (mN/m)	CMD <sup>2</sup> (mN/m)	IE <sub>24h</sub> (mm)	Halo (mm)	Ágar com CTAB
MM1	30,959± 0,4 <sub>A</sub>	41,337± 0,3 <sub>A</sub>	71,830± 0,4 <sub>A</sub>	41,24± 0,9 <sub>C</sub>	7,82± 0,4 <sub>C</sub>	-
MM2	24,937± 0,2 <sub>C</sub>	28,359± 0,2 <sub>D</sub>	35,777± 0,2 <sub>CD</sub>	59,20± 1,3 <sub>AB</sub>	64,92± 6,9 <sub>A</sub>	+
MM3	25,367± 0,3 <sub>C</sub>	29,425± 0,9 <sub>C</sub>	36,436± 0,6 <sub>C</sub>	51,34± 4,5 <sub>B</sub>	62,36± 4,7 <sub>AB</sub>	+
MM4	26,567± 0,2 <sub>B</sub>	27,944± 0,2 <sub>D</sub>	34,112± 0,09 <sub>D</sub>	59,21± 0,6 <sub>AB</sub>	73,42± 2,8 <sub>A</sub>	+
MM5	26,794± 0,2 <sub>B</sub>	30,749± 0,4 <sub>B</sub>	40,745± 0,7 <sub>B</sub>	62,57± 0,1 <sub>A</sub>	46,82± 2,4 <sub>B</sub>	-

Letras *ABC* representam informações de agrupamento usando o método de Tukey com 95 % de confiança.

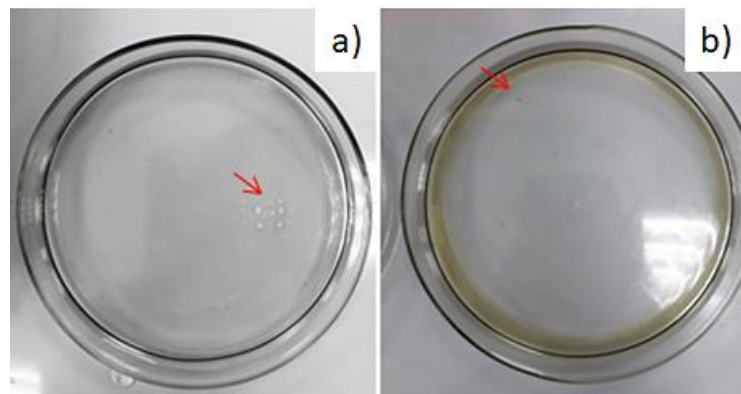
**Figura 12:** Teste de formação de halo em ágar contendo CTAB e azul de metileno



Fonte: Arquivo pessoal

No teste do espalhamento da gota, o meio MM1 foi o que apresentou menor tamanho de halo, indicando assim menor concentração de tensoativo. O meio MM5 apresentou um valor intermediário, enquanto que os meios MM2, MM3 e MM4 apresentaram os maiores valores de halo, ocupando praticamente todo o diâmetro da placa de Petri (Figura 13). A comparação das médias pelo teste de Tukey mostrou que o meio MM1 apresentou diferença significativa com relação aos demais. Esses resultados corroboram com os resultados do teste do CTAB. O teste do espalhamento da gota mede o diâmetro da zona clara formada quando a amostra de biossurfactante é depositada na superfície do óleo (Figura 13). De acordo com Morikawa et al. (2000), o tamanho do halo formado é proporcional a concentração de biossurfactante na amostra testada.

**Figura 13:** Resultados do teste do espalhamento da gota. a) Resultado negativo; b) Resultado positivo.



Fonte: Arquivo pessoal



A medida da tensão superficial é comumente utilizada para verificação da presença de tensoativo no meio (YOUSEFF et al., 2004), contudo é uma indicação geral do processo e não está diretamente relacionada à quantidade de biossurfactante (ABADIA et al., 2015). Nos dados apresentados na Tabela 7, observa-se que todas as amostras conseguiram reduzir a tensão superficial de 72,5 mN/m (tensão superficial da água) para valores inferiores a 30 mN/m. De acordo com Cooper e Paddock (1984), tensoativos que são capazes de reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 40 mN/m podem ser considerados promissores para aplicações industriais.

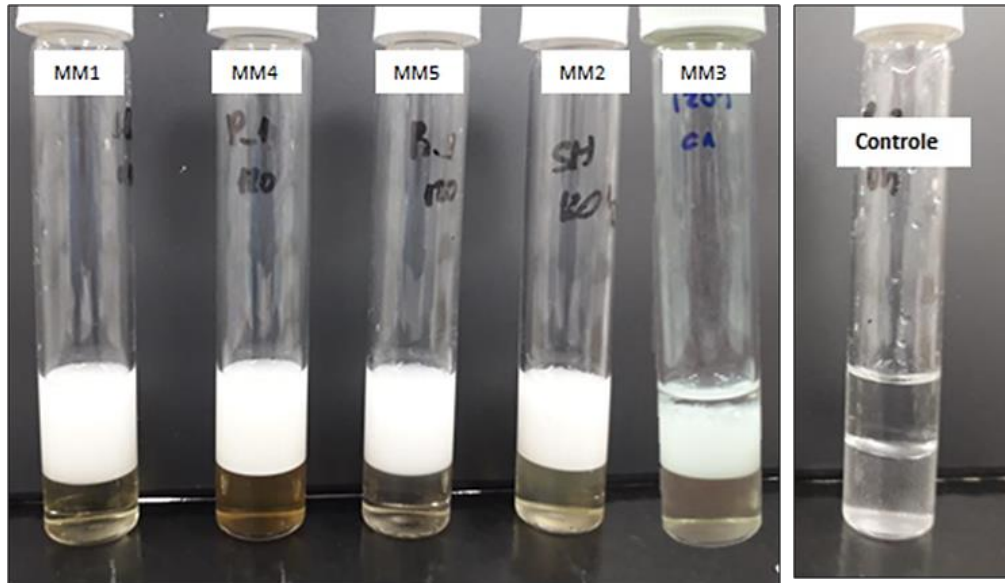
Diversos autores relataram encontrar valores semelhantes para a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (WEI et al., 1998; ARIMA et al., 1961; ABADIA et al., 2015). A surfactina é conhecida como um dos biossurfactantes mais potentes já relatados (JANEK et al., 2021; COOPER et al., 1981), sendo necessária uma quantidade muito pequena no meio para se observar uma diminuição da tensão superficial. Os valores mínimos de tensão superficial são observados quando uma determinada concentração de tensoativo no meio é atingida, a concentração micelar crítica (CMC). Dessa forma, a medida de tensão superficial não está diretamente relacionada com a quantidade de biossurfactante no meio, uma vez que atingido seu valor de CMC, os valores não mais se alteram (Figura 4).

A fim de contornar essa situação, pode-se empregar a medida de diluição micelar crítica,  $CMD^1$  e  $CMD^2$ , que fornecem os valores de tensão superficial a partir de diluições de 10 e 100 vezes, respectivamente, realizadas nas amostras (BARROS et al., 2008; SIMIQUELI et al., 2014; COSTA et al., 2005). Dessa forma, quanto menor o valor de CMD, maior é a diluição necessária para causar um aumento significativo nos valores de tensão superficial e, conseqüentemente, maior a concentração de biossurfactante no meio. A análise de variância realizada para as medidas de TS,  $CMD^{-1}$  e  $CMD^{-2}$  mostrou que houve diferença entre as médias. O teste de Tukey mostrou que o meio MM2 foi aquele que obteve os menores resultados nas três medidas, indicando assim ser o meio em que se obteve maior concentração de biossurfactante. Esse resultado converge com os resultados obtidos nos outros testes realizados.

Com relação ao teste de índice de emulsificação, nenhum dos meios testados apresentaram a formação de emulsão na amostra correspondente ao tempo zero. Após 24 horas, contudo, todos os meios, com exceção do meio MM1, apresentaram valores maiores que 51 % (Figura 14). De acordo com Haba et al., (2000), um bom emulsificante deve apresentar índice de emulsificação superior a 50 %. Embora exista uma correlação entre a atividade tensoativa e emulsificante, a habilidade da molécula em formar uma emulsão estável

não é sempre associada com sua capacidade de diminuir a tensão superficial (YOUSSEF, 2004). Plaza et al. (2006) investigou o biossurfactante produzido por dezesseis espécies de bactérias isoladas de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. Os resultados mostraram que embora a redução da tensão superficial seja uma boa forma para a medição da produção de biossurfactante, não está diretamente relacionada com a atividade emulsificante.

**Figura 14:** Resultados do índice de emulsificação para os meios testados e o controle



Fonte: Arquivo pessoal

Rufino et al. (2007) em seu trabalho também testaram a capacidade de emulsificação do sobrenadante da cultivo pela levedura produtora de biossurfactante *C. lipolytica*. Foram utilizados diferentes substratos hidrofóbicos para o teste, dentre eles o óleo diesel e o hexano, no qual também apresentaram baixos índices de emulsificação. Segundo os autores, esse comportamento sugere que a capacidade de emulsificação do biossurfactante depende da afinidade com o substrato hidrofóbico, indicando que o efeito da interação com o composto orgânico é mais pronunciado do que a capacidade de redução da tensão superficial. Marcelino et al. (2019) estudaram a produção de biossurfactante a partir da levedura *Cutaneotrichosporon mucoides* utilizando o hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Segundo o autor, a análise da tensão superficial no meio de cultivo apresentou valores na faixa de 60 a 70 mN/m, mesmo tendo apresentado bons índices de emulsificação, superiores a 60 %.

A habilidade de diminuir a tensão superficial e interfacial está associada com a capacidade da molécula de adsorver na interface de diferentes fases (líquido/ar,

líquido/líquido, sólido/líquido), aumentando a interação entre as diferentes fases (UZOIGWE et al., 2015). Já no processo de formação de emulsão, essas moléculas são capazes de se ligarem fortemente na interface de um líquido insolúvel, formando assim uma barreira que previne a coalescência da gota, ainda que em baixas concentrações, aumentando assim a estabilidade cinética da emulsão (UZOIGWE et al., 2015; PERFUMO et al., 2010). É importante salientar que todas as emulsões formadas foram estáveis no período de 24 horas em que foram avaliadas (Figura 14). O aspecto da emulsão formada é de grande importância, pois está relacionada a sua estabilidade e aplicações industriais em diversos ramos, como alimentício, cosmético, agroquímicos, etc. (FRANZOL; REZENDE, 2015)

Dessa forma, nos testes de seleção de meio de cultivo realizados em frascos agitados, os meios MM1 e MM5 foram os que obtiveram resultados menos satisfatórios. Esses meios apresentaram resultados negativos no teste com ágar CTAB e tiveram os maiores resultados nos testes semi-quantitativos de CMD. O meio MM1 foi utilizado por Arima et al. (1968) para produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 e trata-se de um meio complexo, contendo extrato de carne e peptona, resultando na produção de 0,1 g/L de surfactina, segundo os autores. Já o meio MM5 foi empregado por Vieira et al. (2019) para a produção de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa*, sendo, portanto, destinado a suprir as exigências nutricionais deste microrganismo. O ramnolipídeo é um tipo de biosurfactante da classe dos glicolipídeos e de acordo com Venkana-Ramana et al. (1989), a limitação de nitrogênio pode induzir o aumento da produção deste biosurfactante, sendo indicada uma razão carbono/nitrogênio de 16 a 18 para este caso.

Os demais meios testados apresentaram resultados semelhantes em todos os testes. O meio MM4 proposto por Pretorius et al. (2015) é o único desses meios que leva em sua composição o extrato de levedura, mas apesar disso, apresentou resultados de CMD<sup>-1</sup> e CMD<sup>-2</sup> bastante semelhante aos meios MM2 e MM3, que são meios definidos. Cooper et al. (1981) estudaram em seu trabalho a adição de alguns componentes no meio de produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, como o extrato de levedura e alguns aminoácidos. Segundo o autor, tanto o extrato de levedura como os aminoácidos não resultaram em aumento da produção de surfactina. Sabe-se que a adição de um componente complexo no meio mineral, além dos sais e da fonte de carbono, tem impacto direto no custo de produção e, além disso, a composição complexa do extrato de levedura feita a partir de componentes bioativos varia muito lote a lote, podendo assim causar variabilidade no produto em escala industrial. Dessa forma, a escolha por um meio de cultura definido pode ser

vantajosa por ser mais barato e ter composição razoavelmente fixa (SCHMIDELL et al., 2007).

Os meios MM2 e MM3 foram propostos pelo grupo canadense de Cooper et al. (1981) tendo sido os primeiros a sugerirem um meio mineral definido para a produção de surfactina (COOPER et al., 1981). O meio de Cooper com adição de 4 % de glicose foi desenvolvido a fim de suprir as necessidades nutricionais do crescimento celular e a síntese de surfactina por *Bacillus subtilis*. Esse meio resultou na produção de 0,8 g/L de surfactina e se tornou o principal meio basal empregado no estudo da produção deste biossurfactante até os dias de hoje (WILLENBACHER et al., 2015).

A diferença entre os meios MM2 e MM3 reside nas concentrações de manganês e ferro. Uma vasta gama de pesquisas sobre a influência das condições nutricionais para a biossíntese da surfactina já foi realizada por diversos autores com a finalidade de se melhorar a produção. O efeito da suplementação, assim como da concentração de cátions multivalentes, como magnésio, cálcio, ferro e manganês já foi relatado em vários trabalhos (COOPER et al., 1981; WEI; CHU, 1988; WEI, 2007; HUANG et al., 2015), mostrando um aumento tanto no crescimento celular como na produção de surfactina.

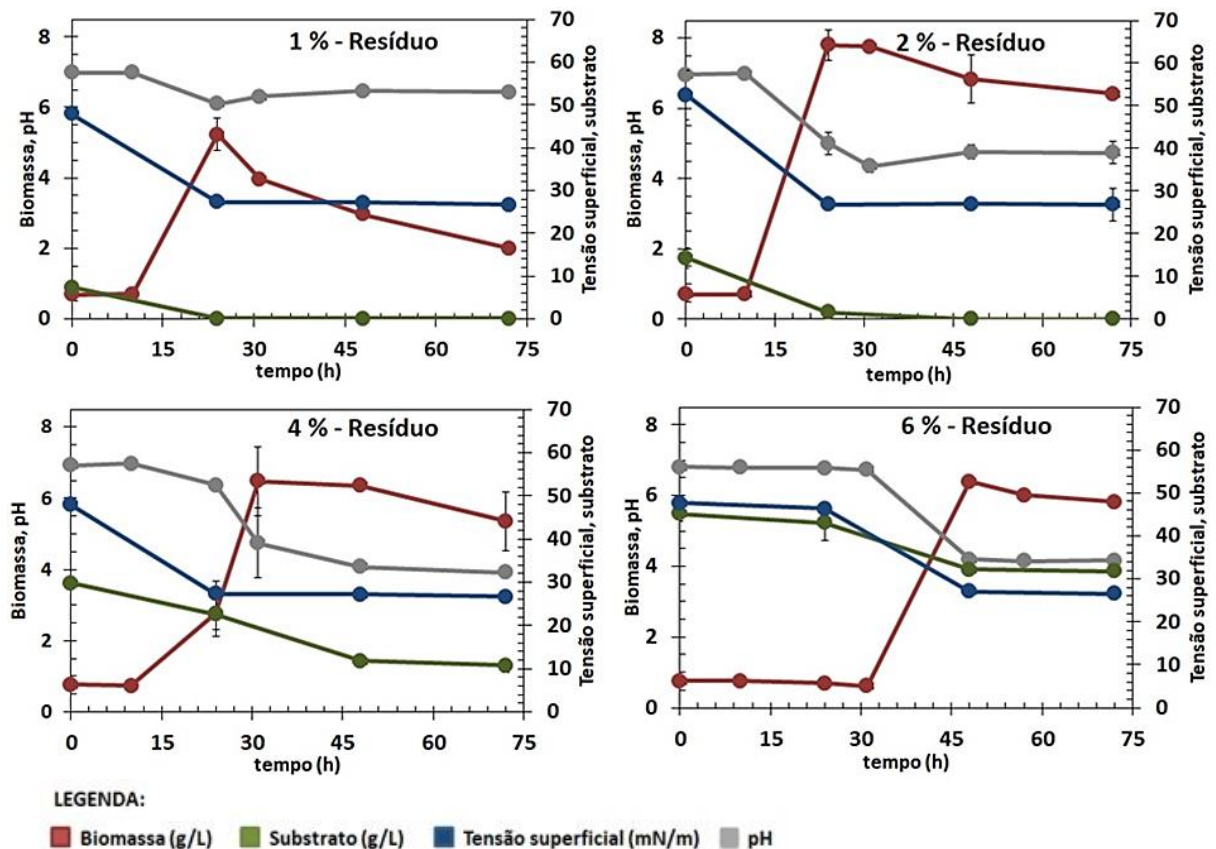
Cooper et al. (1981) estudaram a influência de alguns micronutrientes no meio de produção de surfactina e constataram que o manganês e o ferro impactaram significativamente na produção deste biossurfactante. Wei; Chu (1998) estudaram o efeito da alimentação de diferentes concentrações de ferro em cultivo contínuo para a produção de surfactina e observaram uma superprodução deste biossurfactante em maiores concentrações de ferro. Huang et al. (2015) observaram em seu trabalho que a adição de manganês em até 0,1 mmol/L aumentou a produção de surfactina, atingindo uma produção seis vezes maior comparada com o meio sem adição de manganês, evidenciando assim a importância do balanço do conteúdo nutricional para a produção de surfactina (ABADIA, 2014).

Neste contexto, o meio MM2 proposto por Sheppard e Cooper (1991) foi selecionado para dar prosseguimento no estudo de produção de surfactina, uma vez que apresentou resultados significativamente menores nos testes de TS,  $CMD^{-1}$  e  $CMD^{-2}$ , além de conter algumas modificações com relação à concentração de micronutrientes, visando a melhoria do processo produtivo.

## 5.2 Avaliação do crescimento microbiano em diferentes concentrações de glicerina residual

Tendo selecionado o meio de cultivo, foram testadas diferentes concentrações de glicerina residual, em substituição a glicose, a fim de se avaliar o efeito dessas concentrações no crescimento microbiano e produção de biossurfactante. As concentrações da glicerina (% m/v) e a proporção carbono:nitrogênio (C:N) avaliadas foram: 1 % (C:N = 2,5); 2 % (C:N = 5); 4% (C:N = 10) e 6 % (C:N = 15). Na Figura 15 estão plotados os resultados obtidos para as quatro condições testadas.

**Figura 15:** Variação de pH, glicol e pH em cultivos com diferentes concentrações de glicerina residual



Fonte: Arquivo pessoal

Diante dos dados apresentados é possível observar que as concentrações celulares máximas obtidas foram de 5,2; 7,8; 6,5 e 6,4 g/L para os cultivos com 1%, 2%, 4% e 6% de glicerina residual, respectivamente. É importante salientar ainda que o tempo da fase de adaptação na curva de crescimento celular para as condições de concentração de 1%; 2% e 4% foi em torno de 10 horas, enquanto que na concentração de 6% esse tempo durou cerca de 30 horas. A velocidade específica máxima de crescimento foi atingida entre 10 e 24 horas nos

cultivos com 1 e 2% de substrato, enquanto que nas concentrações de 4 e 6%, o  $\mu_{\max}$  foi atingido a partir de 24 e 48 horas, respectivamente. Essa diferença sugere a ocorrência de inibição pelo substrato para maiores concentrações de glicerina residual no meio (4 e 6%). Em todas as condições, após um determinado período, observou-se uma diminuição do crescimento da biomassa. Segundo Heyd et al. (2007), a queda na concentração celular pode ser devido ao grande arraste de células pela espuma formada durante o cultivo, que ficam adsorvidas na superfície das bolhas de gás.

Com relação ao consumo de substrato, pode-se observar que dentro do período de 24 horas de cultivo, apenas na condição com 1 % de glicerina residual o substrato foi consumido totalmente. No cultivo com 2% o esgotamento ocorreu após 48 horas e os demais cultivos apresentaram alguma concentração de glicerina residual mesmo após as 72 horas de ensaio. Além disso, a variação de pH foi maior nas concentrações de 2, 4 e 6%, chegando a valores de 5,0; 4,74 e 4,20, respectivamente. A pequena variação de pH na concentração de 1 % foi esperada, dado o baixo crescimento celular. A diminuição de pH acompanhou a curva de crescimento, uma vez que à medida que maiores concentrações de biomassa foram sendo atingidas, o valor de pH diminuía.

Os resultados de tensão superficial em cada tempo do cultivo mostraram que em todas as condições foi observada uma diminuição de aproximadamente 42 % no valor de tensão superficial em comparação com o tempo inicial de cultivo, chegando a valores de aproximadamente 27 mN/m. Nos cultivos contendo 1; 2 e 4% de glicerina residual foi possível observar já em 24 horas o decréscimo na tensão superficial. No cultivo com concentração de 6 %, contudo, a diminuição da tensão superficial só foi observada após 48 horas. Uma vez que a condição com 6 % de resíduo também foi a que apresentou maior período da fase de adaptação de crescimento, pode-se dizer que os resultados obtidos corroboram com o que é descrito na literatura para produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 21332, sugerindo que a produção deste bioproduto possa ter associação com crescimento microbiano (SHEPPARD et al., 1991; COOPER et al., 1981; ROCHA et al., 2017; MARIN et al., 2015 ).

A produção de biossurfactante foi também avaliada indiretamente nesse ensaio pela análise da amostra obtida no tempo final de cultivo para cada condição, utilizando como respostas a tensão superficial (TS),  $CMD^{-1}$ ,  $CMD^{-2}$  e índice de emulsificação (IE). Os resultados estão apresentados na Tabela 10. A fim de testar a igualdade das médias e avaliar a diferença entre elas foi realizada a análise de variância e o teste de Tukey (com nível de confiança de 95%), utilizando o software Minitab® 19.1.1.

**Tabela 10** - Médias dos resultados da produção de biossurfactante

Condição	TS	CMD <sup>-1</sup>	CMD <sup>-2</sup>	IE
1%	26,650 <sub>A</sub>	28,974 <sub>A</sub>	36,613 <sub>A</sub>	62,67 <sub>A</sub>
2%	26,857 <sub>A</sub>	28,489 <sub>BC</sub>	35,965 <sub>A</sub>	62,89 <sub>A</sub>
4%	26,343 <sub>A</sub>	28,147 <sub>C</sub>	35,608 <sub>A</sub>	62,50 <sub>A</sub>
6%	26,578 <sub>A</sub>	28,688 <sub>AB</sub>	36,082 <sub>A</sub>	63,36 <sub>A</sub>

Letras *ABC* representam informações de agrupamento usando o método de Tukey com 95 % de confiança.

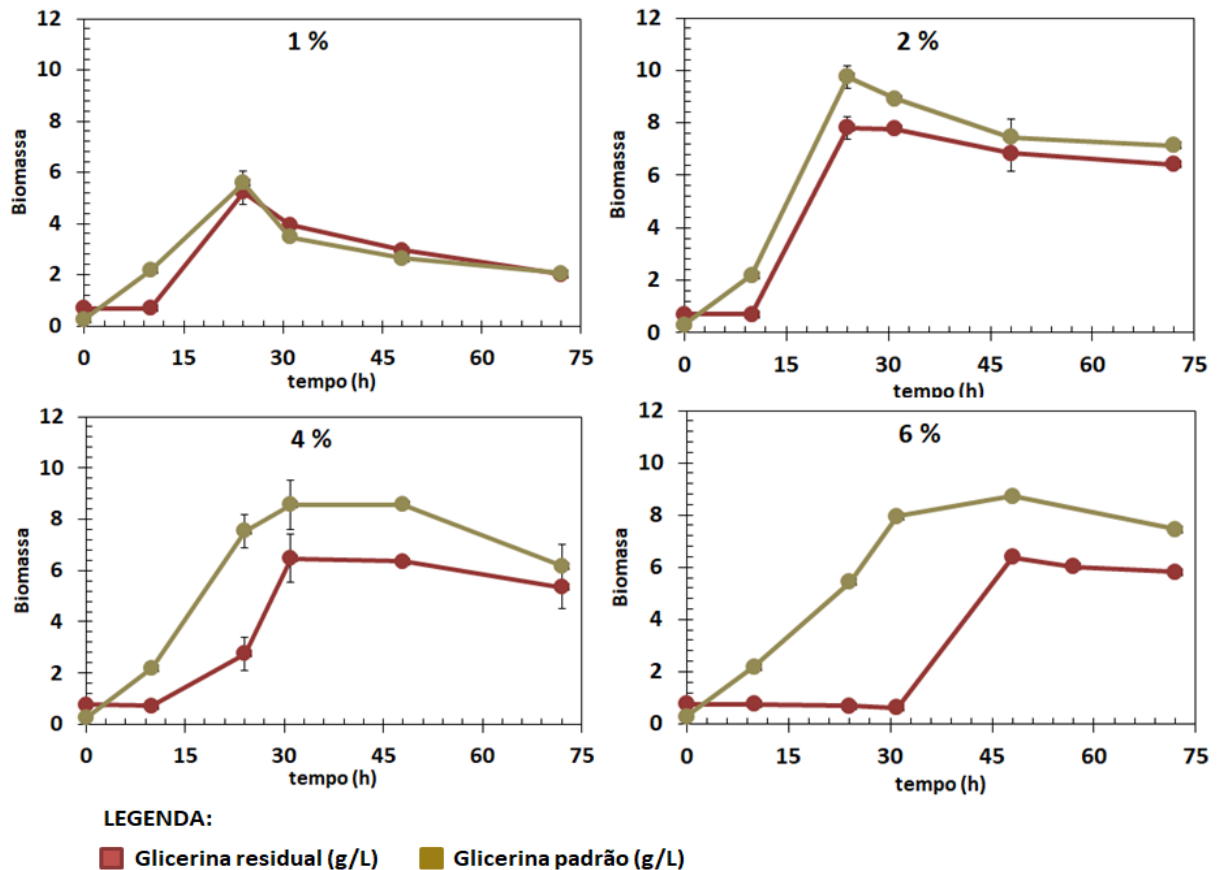
A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre as médias para nenhuma das respostas analisadas ( $p > 0,05$ ), exceto para o CMD<sup>-1</sup>. Os resultados da comparação de Tukey representam a comparação entre as médias de cada fator estudado com o intervalo de confiança de 95 % para cada resposta. De acordo com os dados de agrupamento obtidos pelo teste de Tukey pode-se dizer que, nos tempos finais de cultivo, não houve diferença significativa nos valores de TS, CMD<sup>-2</sup> e IE para as concentrações de glicerina residual utilizadas. O resultado de CMD<sup>-1</sup> mostrou que não houve diferença significativa entre a concentração de 2 % e as concentrações de 4 % e 6 %. Conforme discutido no item 5.1, as medidas indiretas para avaliação da concentração de biossurfactante podem apresentar resultados não muito precisos quando a variação da concentração do tensoativo no meio não é muito alta.

Dessa forma, diante dos resultados apresentados nessa sessão, pode-se dizer que o microrganismo foi capaz de crescer e produzir biossurfactante utilizando a glicerina residual como única fonte de carbono, sendo a concentração de 2 % de glicerina residual a condição em que o microrganismo teve maior crescimento. Para cada concentração de glicerina residual foi ainda testado paralelamente a glicerina padrão como comparativo para o crescimento da biomassa. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 16.

Na Figura 16 nota-se que para as condições de 1% e 2% o perfil da curva de crescimento foi semelhante entre os cultivos com glicerina residual e padrão. Nas condições de 4 e 6% foi observada uma duração maior na fase de adaptação, deslocando a curva de crescimento para a direita em comparação com o controle. Dessa forma, pode-se dizer que é provável que a diferença no perfil de crescimento entre os cultivos com glicerina residual e padrão tenda a crescer à medida que maiores concentrações de glicerina residual são testadas no meio. Além disso, observou-se que em todos os cultivos contendo a glicerina padrão o crescimento microbiano ocorreu logo no início do cultivo, ao contrário do que é observado

nos cultivos com a glicerina residual. Esse resultado sugere que, concentrações do resíduo superiores a 4 % podem ter ocasionado alguma inibição no crescimento, induzindo a um maior período de adaptação do microrganismo no meio e menores concentrações celulares.

**Figura 16:** Comparação das curvas de crescimento com glicerina residual e glicerina padrão



Fonte: Arquivo pessoal

Alguns estudos mostram que concentrações muito altas de glicerina podem afetar o crescimento microbiano. Em seu trabalho, Cruz et al. (2007) descreveu que as concentrações de 70 e 90 g/L de glicerina no meio de cultivo influenciaram negativamente o crescimento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633. De acordo com os autores, o glicerol é uma molécula que apresenta uma forte influência na pressão osmótica dentro da célula, portanto, altas concentrações de glicerol no meio podem causar modificações intracelulares para garantir a sobrevivência do microrganismo em condições não favoráveis.

O glicerol é um dos poucos substratos que atravessa a membrana celular por difusão facilitada nas células procarióticas (RIVALDI et al., 2007). A via de utilização do glicerol e a biossíntese da surfactina em cepas de *Bacillus* foram descritas detalhadamente por Zhou et al. (2019). De acordo com o autor, os níveis de transcrição de genes que codificam proteínas da



via de utilização do glicerol e da síntese de surfactina foram relativamente altos. Portanto, as cepas de *Bacillus* podem usar eficientemente o glicerol para produção de surfactina (JANEK et al., 2021).

Durante o cultivo descontínuo é comum observar o fenômeno de inibição pelo substrato ou produto, em que a alta concentração de substrato ou do produto formado pode interferir no metabolismo de crescimento microbiano. Sabe-se que a glicerina obtida a partir da reação de transesterificação de triglicerídeos e álcool apresenta em sua composição, além do glicerol, algumas impurezas, tais como água, sais, ésteres, álcool e óleo residual. De acordo com Yang et al. (2012), a composição química da glicerina residual varia de acordo com a eficiência da reação de transesterificação, assim como os tipos de triglicerídeos e impurezas da matéria-prima. Além disso, os tipos de catalisadores e álcoois utilizados na reação e a eficiência dos processos de recuperação também são fatores importantes que impactam na composição da glicerina gerada. A composição da glicerina utilizada neste trabalho (Figura 17) foi cedida pelo fornecedor e está apresentada seção de metodologia (item 4.3). O teor de glicerol encontrado pela análise no HPLC foi de 77 %, resultado semelhante a concentração disponibilizada pelo fornecedor.

**Figura 17:** Glicerina residual usada neste trabalho



Fonte: Arquivo pessoal

A Tabela 5 mostra que após as etapas de purificação realizadas para se recuperar o biodiesel, a glicerina resultante é uma mistura de vários componentes, tendo o glicerol como composto preponderante. Além disso, observou-se uma concentração relativamente alta de metanol e hidróxido de sódio, ambos utilizados na reação de transesterificação para a produção de biodiesel. O metanol é geralmente utilizado como o álcool que vai reagir com o éster e o NaOH tem a função de catalisador do processo.

Além dos componentes citados, pode-se observar ainda a presença de traços de potássio, magnésio, cálcio e sulfato, que são elementos contidos na composição do meio de cultura. Segundo Thompson et al. (2006), a glicerina residual contém geralmente elementos nutricionais, como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que podem ser utilizados pelos microrganismos para o seu crescimento durante processos fermentativos. Janek et al. (2021) estudaram a produção de surfactina utilizando como fonte de carbono diferentes amostras de gliceras residuais, provenientes de diferentes processos, tais como produção de biodiesel, estearina e sabão. De acordo com os autores, diferentes concentrações de surfactina e biomassa foram atingidas, sugerindo assim que a composição da glicerina residual pode ter influenciado.

Andrade et al. (2017) investigaram em seu estudo a influência das impurezas da glicerina proveniente da produção de biodiesel na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LB2b. De acordo com os autores, os cultivos em que foi utilizada a glicerina residual como única fonte de carbono apresentaram crescimento celular significativamente mais baixo em comparação com os cultivos contendo glicerina padrão. Além disso, a produção de surfactina também foi menor nos cultivos que utilizavam o resíduo. O estudo foi realizado em meio complexo, contendo 10 g/L de cada substrato estudado. Os autores sugerem que essa diferença na produção possa estar relacionada às altas concentrações de metanol presentes na glicerina residual. Comportamento semelhante foi obtido no presente trabalho para as condições em que se empregaram maiores concentrações de glicerina residual.

Sabendo que a composição da glicerina residual a partir da produção do biodiesel pode conter impurezas que limitam seu uso direto na indústria e que o processo de purificação da glicerina é bastante oneroso, existe um grande interesse no seu reaproveitamento direto, sem tratamento (RIVALDI et al., 2007). A glicerina residual é reconhecida como uma alternativa renovável de substrato para a bioconversão em um produto de maior valor agregado e embora tenha seu potencial reconhecido, existem poucos relatos publicados sobre a utilização da glicerina residual não purificada como única fonte de carbono em processos biotecnológicos.

A utilização da glicerina residual no meio de cultivo sem purificação prévia oferece uma vantagem notável em relação ao uso tradicional da glicose como substrato, entretanto, as impurezas contidas na glicerina podem influenciar as vias bioquímicas das bactérias, limitando a eficiência da produção de metabólitos de interesse (SAMUL et al. 2014). Dessa forma, torna-se imprescindível o uso de microrganismos tolerantes as impurezas presentes para a bioconversão do glicerol (CHATZIFRAGKOU et al. 2012).

A glicerina como subproduto da produção de biodiesel pode ser considerada uma candidata para compor a biorrefinaria da indústria oleoquímica. À medida que a produção de biodiesel cresce, uma quantidade crescente de glicerina residual é produzida e, portanto, surge uma demanda por soluções para agregar valor a esse produto. Além disso, a deposição da glicerina contaminada com metanol e alto teor de sais representa um problema do ponto de vista de gerenciamento de resíduos (SAMUL et al., 2014). Embora a glicerina padrão tenha uma vasta gama de aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, seu uso sem purificação é bastante limitado. Uma vez que os processos industriais de purificação da glicerina não são economicamente viáveis, pode-se dizer que os resultados obtidos são promissores, uma vez que indicam um potencial de aplicação para este resíduo, dentro de um contexto de produção sustentável, para gerar um produto de alto valor agregado.

A influência da fonte de carbono na produção e estrutura da molécula de biossurfactante tem sido muito estudada, sendo relatada na literatura com frequência. Segundo Desai e Banat (1997), as vias metabólicas envolvidas na síntese das moléculas precursoras dos biossurfactantes são dependentes da natureza das fontes de carbono utilizadas. Dessa forma, a produção de surfactantes a partir de substratos renováveis e de diferentes microrganismos permite a obtenção de compostos com características estruturais e propriedades físicas distintas. Neste contexto, a utilização de fontes de carbono de baixo custo representa uma alternativa interessante para a obtenção de lipopeptídeos, como a surfactina (Janek et al. 2021).

Em seu trabalho, Faria (2010) discute que a fisiologia do microrganismo produtor pode induzir a produção de biossurfactante por substratos solúveis ou insolúveis em meio aquoso. A autora analisou a produção de surfactina por *Bacillus subtilis*, empregando diferentes fontes de carbono e observou que na presença dos substratos hidrofóbicos utilizados não houve produção de biossurfactante pelo microrganismo. Contudo, a utilização de substratos hidrossolúveis (glicerina residual e padrão) resultou na maior produção desse tensoativo, mostrando assim que a estratégia de utilização da glicerina residual para a produção de surfactina pode ser uma alternativa promissora.

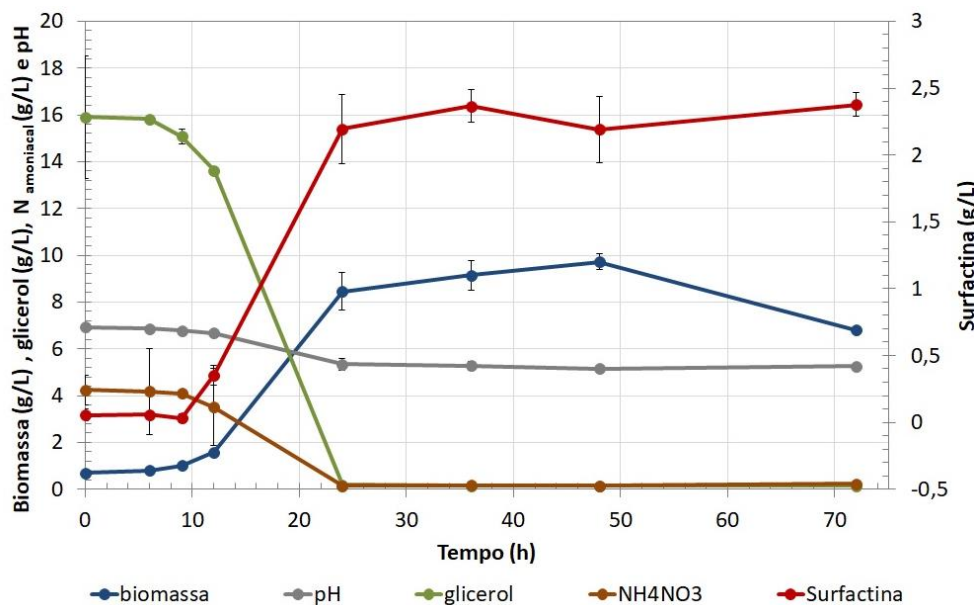
A presença de inibição, seja ela pelo produto ou substrato, tem uma influência muito forte na velocidade específica de crescimento celular, refletindo assim nas etapas posteriores de desenvolvimento do bioprocessamento. Neste contexto, os resultados aqui apresentados indicam que a concentração de 2% de glicerina residual foi a concentração em que o microrganismo pareceu melhor se adaptar e, portanto, optou-se por utilizar essa concentração inicial nos

cultivos em biorreatores, utilizando o regime de batelada alimentada, a fim de minimizar o fenômeno de inibição pelas impurezas presente no substrato.

### 5.3 Estudo da cinética de produção de surfactina utilizando a glicerina residual como substrato

Nesta seção foi avaliada a cinética de produção da surfactina em frascos agitados, contendo o meio de cultivo selecionado anteriormente com a concentração de 2 % de glicerina residual como fonte de carbono (Figura 18)

**Figura 18:** Dados de crescimento celular (g/L), consumo de substrato (g/L) e nitrogênio amoniacal (g/L) e produção de surfactina (g/L) do cultivo em frascos agitados com 2% (m/v) de glicerol.



Fonte: Arquivo pessoal

A Figura 18 mostra o crescimento celular, a produção de surfactina, a variação de pH e o consumo de glicerina e nitrogênio amoniacal ao longo do cultivo, durante 72 horas. Com relação à curva de crescimento microbiano, observou-se que houve uma fase de adaptação de aproximadamente 6 horas, período no qual o pH se manteve praticamente constante e a glicerina e o nitrogênio foram pouco consumidos. De 6 a 24 horas ocorreu a fase exponencial de crescimento e neste período é observado também o decréscimo do pH, que chegou a 5,5 em 24 horas, e o aumento dos consumos das fontes de carbono e nitrogênio, chegando a ser totalmente consumidas entre o período de 12 e 24 horas.

A fase exponencial é caracterizada pela fase em que ocorre a velocidade máxima de crescimento microbiano e conseqüentemente, o maior consumo de nutrientes e formação de

metabólitos primários, como alguns ácidos orgânicos, que podem ter levado à diminuição do pH. Após 24 horas ocorreu o início a fase estacionária de crescimento, que se iniciou provavelmente após o consumo total da glicerina e nitrogênio amoniacal. Neste período ocorreu um decréscimo na velocidade de crescimento, chegando a concentração celular máxima de aproximadamente 9,5 g/L de massa seca.

O pH é considerado um parâmetro importante no processo e já foi relatado como um fator que influencia a produção de surfactina. De acordo com Wei et al. (1998) o pH deve ser mantido em torno de 7 e manter esse valor constante normalmente resulta em melhor rendimento do processo. Além disso, um pH abaixo de 6 pode resultar em menor produção de surfactina. Alguns autores relatam ainda que a surfactina tende a precipitar em pH abaixo de 5,0, resultando em menores valores de tensão superficial (NITSCHKE et al., 2005; WEI et al., 2003; COOPER et al., 1981).

De acordo com a Figura 18, a curva de produção de surfactina pareceu acompanhar o crescimento microbiano, uma vez que o início da produção foi observado aproximadamente em 12 horas de cultivo, período em que o crescimento ainda estava no início da fase exponencial. No final da fase exponencial, em 24 horas, verificou-se um salto na produção de surfactina, chegando a 2,2 g/L, e se mantendo praticamente constante até o final do cultivo. Esse comportamento pode ter ocorrido devido ao fato das fontes de carbono e nitrogênio terem se esgotado, impossibilitando a síntese dos precursores para a formação do produto.

Em seu trabalho, Zhi et al. (2017) compararam o genoma e o transcriptoma de *Bacillus amyloliquefaciens* MT45 e a bactéria selvagem *B. amyloliquefaciens* DSM7 com relação à produção de surfactina. Os autores relataram que a comparação dos transcriptomas das duas bactérias mostrou que para a bactéria superprodutora de surfactina foi observado o enriquecimento na via de síntese de surfactina, incluindo o metabolismo central do carbono e a biossíntese de ácidos graxos, demonstrando assim a importância do fornecimento de quantidades suficientes dos precursores (aminoácidos e ácidos graxos) para a construção da molécula.

Faria (2010) descreve em seu trabalho que os biossurfactantes podem ser excretados no meio de cultura durante a fase estacionária ou exponencial de crescimento. Com relação à cinética de formação de surfactina, alguns autores relatam que a formação de produto ocorre no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento (SHEPPARD et al., 1987; ROCHA et al., 2020; VERDARAN et al., 2011). Cooper et al. (1981) e Kim et al. (1997) descrevem que a produção do biossurfactante por *Bacillus subtilis* está associada ao crescimento microbiano, enquanto Sheppard et al. (1987) sugerem que a produção de

biossurfactante está parcialmente associada, uma vez que também se observa crescimento na fase estacionária do cultivo.

De acordo com Desai e Bannat (1997), o estudo cinético da produção de biossurfactante possui muitas variações entre os sistemas e poucas generalizações podem ser descritas. No caso específico da síntese de lipopeptídeos por *Bacillus*, os genes que regulam a produção de surfactina são regulados pelo sistema de *quorum sensing* e a expressão desses genes é associada com o aumento da densidade celular, ocorrendo especialmente na transição da fase exponencial para a fase estacionária do crescimento (SULLIVAN; 1998).

De acordo com Magnuson et al. (1994), durante a síntese da surfactina, o *quorum sensing* controla a expressão do operon *srfA* através de um peptídeo sinal, ComX, que acumula no meio quando a densidade celular está alta. Além disso, a regulação da biossíntese de surfactina está intimamente ligada a alguns fenômenos induzidos pela fase estacionária e via de desenvolvimento de competências. A expressão de *srfA* é induzida no final da fase exponencial e é controlada por mecanismos regulatórios globais, que detectam e respondem ao estresse nutricional e regulam a expressão de uma variedade de genes (SEYDLOVÁ et al., 2008).

Muitos autores relatam a produção de biossurfactantes em concentrações limitantes de crescimento celular. De acordo com Valpuesta (2008) o crescimento do microrganismo em condições limitantes de nutrientes é importante para a otimização do processo de produção de muitos metabólitos secundários, como é o caso da maioria dos biossurfactantes. O controle da produção de surfactina pelo *quorum sensing* implica em uma complexa interação de genes que induzem ou inibem a produção de acordo com as condições ambientais, incluindo a concentração de nutrientes no meio, a concentração celular, a taxa de aeração e o pH. No presente trabalho, observou-se que o aumento na produção de surfactina entre os períodos de 12 e 24 horas coincidiu com a diminuição das concentrações de glicerina e nitrogênio amoniacal, sugerindo que a produção pode ter ocorrido após alguma limitação nutricional no meio de cultivo.

Davis et al. (1999) reportou em seu trabalho o efeito da limitação de carbono e nitrogênio na produção de surfactina, em condições aeróbicas e anaeróbicas. O microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis* ATCC 21332, cultivado em meio definido contendo glicose e nitrato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio. Nessas condições foi verificado que quando o nitrogênio amoniacal, consumido preferencialmente pelo microrganismo, foi esgotado, o nitrato passou a ser consumido. Observou-se ainda que rendimentos menores de surfactina estavam associados a cultivos em que o nitrato não havia

sido utilizado. De acordo com os autores, o emprego do íon amônio favoreceu o crescimento celular, enquanto o íon nitrato foi consumido durante seu metabolismo secundário, ou seja, para a síntese de surfactina.

A produção de surfactina por *Bacillus subtilis* utilizando como fonte de carbono o glicerol puro ou residual da produção de biodiesel já foi relatada por alguns autores. Sousa et al. (2014) estudou a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633, utilizando o glicerol da produção de biodiesel, alcançando a produção de surfactina de 158.14 mg/L. Andrade et al. (2017) estudaram a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LB2b em reator de 3,5 L, utilizando a glicerina residual como única fonte de carbono, obtida após um processo de purificação para remoção de sais e metanol, e obteve 71,13 mg/L de produto. Janek et al. (2021) estudou a produção desse biossurfactante por *Bacillus subtilis* #309, utilizando o glicerol subproduto de diferentes processos industriais. De acordo com os autores, utilizando o glicerol proveniente da produção de biodiesel a produção de surfactina variou de 0,5 a 1,2 g/L, dependendo da concentração inicial de substrato utilizada.

A produção média de surfactina descrita na literatura utilizando a glicerina padrão e residual da produção do biodiesel como fonte de carbono varia de 0,20 a 1,38 g/L (JANEK et al., 2021). Neste contexto, a concentração máxima de surfactina obtida no presente trabalho foi superior a média relatada na literatura para a produção desse biossurfactante a partir da glicerina, atingindo uma concentração de 2,3 g/L. Esse resultado mostra o potencial da glicerina residual como substrato para a produção de surfactina pela bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Contudo, o estudo da cinética de produção em shaker mostrou limitações com relação ao esgotamento de nutrientes essenciais e à falta de controle de pH e aeração, evidenciando a necessidade de outras abordagens de processo, visando o controle desses parâmetros.

#### **5.4 Produção de surfactina em biorreatores**

Nessa seção será apresentado o desenvolvimento de um protocolo de processo para a produção de surfactina. Uma vez que foi verificada que a produção de surfactina tem associação com o crescimento microbiano e que a glicerina residual utilizada como substrato tem efeito inibitório sobre o crescimento celular a partir da concentração de 2 % (m/v), adotou-se como estratégia de produção a batelada alimentada com alimentação em pulsos. Dessa forma, buscou-se estender a fase de crescimento e conseqüentemente, aumentar a produção de surfactina, sem que houvesse inibição pelo substrato.

Primeiramente, na seção 5.4.1 serão apresentados alguns testes preliminares em reatores de 2 L, realizados a fim de se estabelecer um protocolo de processo para este trabalho, principalmente com relação a contenção da espuma formada durante o cultivo. Em seguida, na seção 5.4.2 serão mostrados os ensaios em reatores de 15 litros, dessa vez considerando a utilização de um inóculo adaptado e a influência da adição de pulsos de oxigênio puro ao longo do processo. Em todos os ensaios foram adotados o sistema de alimentação em batelada alimentada, com alimentação em pulsos de glicerina residual,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$  e solução de micronutrientes, conforme descrito na metodologia (item 4.6.2).

#### **5.4.1 Desenvolvimento do processo em biorreator e estudo da cinética de produção**

Neste tópico realizou-se o estudo da produção de surfactina em biorreatores de 2 L. O preparo do inóculo foi realizado de acordo com o item 4.6.1, sendo utilizada a relação de 5 % (v/v) de inóculo. As condições iniciais de temperatura, agitação, aeração e pH foram empregadas conforme a Tabela 8, da seção de metodologia.

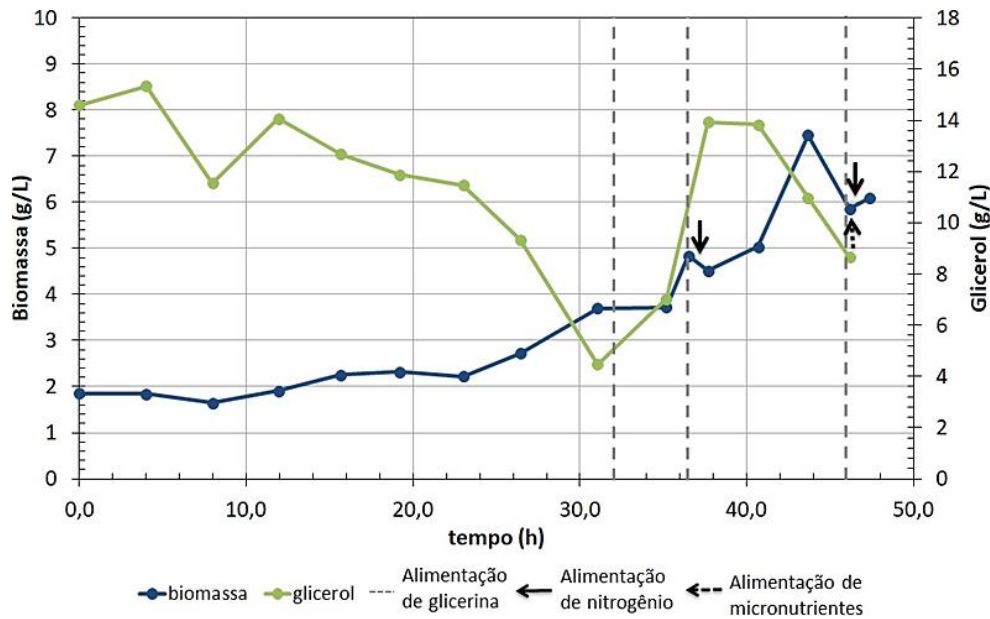
Primeiramente um experimento exploratório (RBS1) foi conduzido a fim de se observar alguns fenômenos que ocorrem na produção da surfactina em maior escala e estabelecer um protocolo de processo para a produção em biorreatores. Em seguida, um novo ensaio (RBS2) foi realizado utilizando a estratégia definida para o processo e os resultados de produção foram comparados com o cultivo em frascos agitados. A seguir estão apresentados os resultados dos ensaios RBS1 e RBS2

##### **5.4.1.1 Ensaio RBS1**

Os resultados do monitoramento de todos os parâmetros do bioprocesso, assim como todas as alimentações realizadas estão apresentados nas Figuras 19 e 20. Inicialmente esse ensaio foi montado apenas com um frasco de coleta acoplado à saída de ar do reator para a captação da espuma formada ao longo do cultivo.

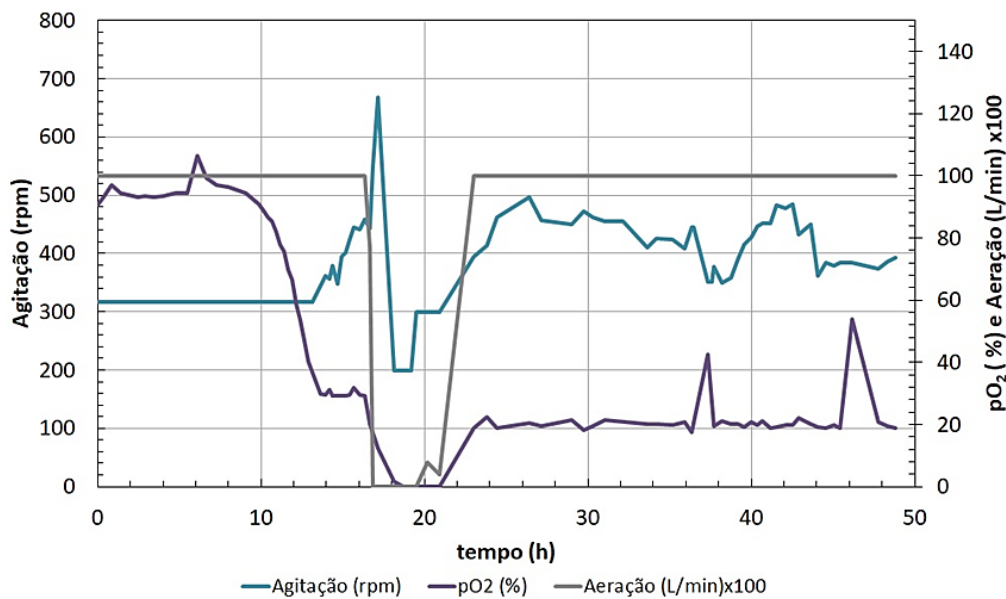


**Figura 19:** Curva de crescimento, consumo de substrato e pulsos de alimentação no ensaio RBS1



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 20:** Curva de agitação (rpm), aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO<sub>2</sub>) no ensaio RBS1



Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a curva de crescimento celular (Figura 19) é possível observar um período de aproximadamente 8 horas em que aparentemente não houve crescimento. Tal comportamento pode ter ocorrido devido ao fato do microrganismo não estar adaptado ao meio de cultivo do reator. A análise da curva de  $\ln X$  em função do tempo (dados não mostrados) mostrou que no período de 8 a 16 horas ocorreu a fase exponencial de

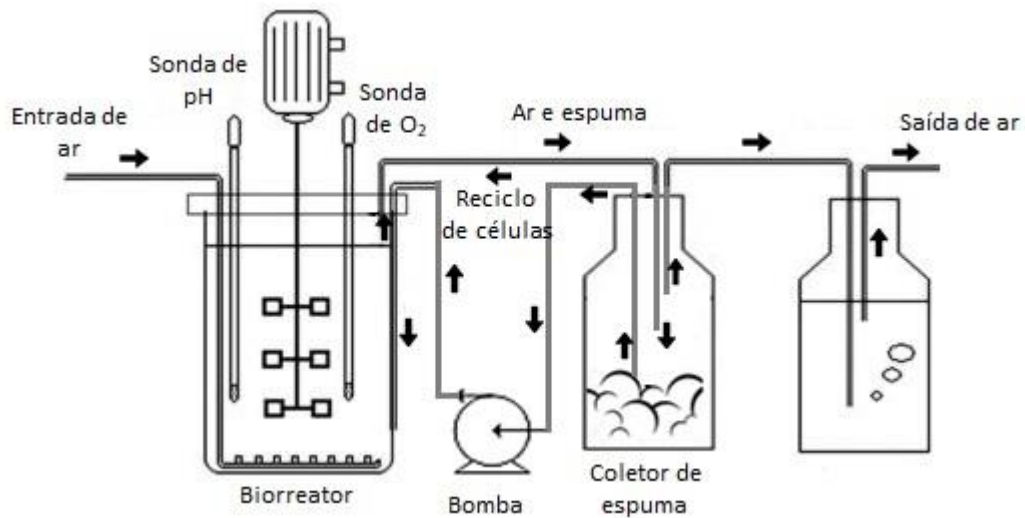
crescimento. Neste período observou-se também o aumento da agitação, que chegou a marcar quase 700 rpm (Figura 20), indicando assim um aumento da demanda de oxigênio pelos microrganismos. De acordo com Nazareth et al. (2021) a maior demanda por oxigênio ocorre no início da fase exponencial, exigindo assim um aumento na aeração e agitação do sistema para que seja mantida a quantidade mínima de oxigênio dissolvido ajustada para o processo.

No Figura 19 observou-se que no período entre 16 e 23 h houve um patamar na curva de crescimento, fazendo com que o cultivo saísse da fase exponencial. Neste período foi observado um aumento considerável na formação de espuma, causando a pressurização do reator pelo entupimento do filtro de saída e a expulsão de grande parte do meio reacional para o frasco de coleta. Como medida de contenção optou-se inicialmente pelo desligamento da aeração e aumento da agitação para manter o oxigênio dissolvido no meio, conforme observado na Figura 20. De acordo com Kaiserman et al. (2017), a surfactina é um composto de superfície ativa e, portanto, a formação de espuma ocorre dentro do recipiente de produção, à medida que o biossurfactante é produzido.

Atwa et al. (2013) discutem que a principal dificuldade durante a produção de biossurfactantes lipopeptídicos em cultivos submersos e reatores aeróbicos é a alta formação de espuma. Ao longo do tempo, a formação de espuma causa a saída do meio de cultivo do biorreator, provocando mudanças no volume de trabalho e nas concentrações de nutrientes e células, além da perda de produto. Geralmente emprega-se o uso de antiespumante para o controle da espuma formada no processo, contudo, o uso desses produtos pode complicar os processos de *downstream*, aumentar o custo total de produção e provocar alterações fisiológicas nas células (ATWA et al., 2013; BARROS et al., 2008).

Neste contexto, considerando o efeito de perda do meio e células do biorreator quando se inicia a formação de espuma, optou-se por implementar um sistema de reciclo de espuma. Para tanto, uma bomba peristáltica foi utilizada para direcionar o fluxo do meio de cultura de volta para o biorreator e frascos de coleta foram adicionados em série, conforme mostrado na Figura 21. Após a adaptação realizada com o frasco adicional e o religamento da aeração, observou-se na curva de crescimento que o microrganismo voltou a crescer, atingindo velocidade específica máxima de  $0,06 \text{ h}^{-1}$  entre os períodos de 23 a 36 horas, indicando que as células foram capazes de recuperarem seu crescimento.

**Figura 21:** Esquema do biorreator com sistema de reciclo de espuma adotado para os ensaios RBS2, RBS3 e RBS4



Fonte: Adaptado de RABELO (2012)

Em 32 horas foi realizada a primeira alimentação com glicerina residual, uma vez que o monitoramento da concentração desse substrato realizado no HPLC mostrou ter atingido a faixa de concentração mínima de glicerina determinada para os ensaios. As demais alimentações de glicerina foram realizadas seguindo esse mesmo critério. A partir de 36 horas houve um aumento contínuo do oxigênio dissolvido, seguido de um decréscimo na curva de crescimento, mesmo o cultivo não estando limitado em glicerina. Foi realizada então uma alimentação com a fonte de nitrogênio, resultando na diminuição da porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO<sub>2</sub>) e retomada do crescimento celular, atingindo o valor máximo de concentração de biomassa (7,5 g/L). Dessa forma, conclui-se que, provavelmente, naquele momento o cultivo estava limitado em nitrogênio.

Em 43 horas observou-se novamente um decréscimo na curva de crescimento celular e em 46 horas ocorreu o aumento da % pO<sub>2</sub>. Foram realizadas adições de glicerina e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, que não resultaram na diminuição da % pO<sub>2</sub>. Essa ocorrência pode sugerir que além das fontes de carbono e nitrogênio, a alimentação com alguns micronutrientes presentes no meio de cultivo também poderia ser importante para garantir que não houvesse limitação por esses minerais.

A alimentação de micronutrientes para a produção de surfactina em batelada alimentada já foi relatada por alguns autores. Wei et al. (1998) estudaram a influência do ferro para o crescimento de *B. subtilis* ATCC 21332 e a produção de surfactina. Para tanto foram adicionadas alimentações em pulsos em diferentes estágios do cultivo, com diferentes concentrações de sulfato de ferro. Como resultado os autores relataram o aumento do

crescimento e produção de biossurfactante nas condições com maiores concentrações de ferro. Klausman et al. (2020) também estudaram um cultivo em batelada alimentada para a produção de surfactina em alta densidade celular, realizando a alimentação em duas etapas. A primeira alimentação era uma solução composta pela fonte de carbono e nitrogênio e era fornecida após o esgotamento da glicose no meio. A segunda alimentação continha a fonte de carbono, de nitrogênio,  $MgSO_4$  e o próprio meio de cultivo. De acordo com o autor, as alimentações foram realizadas dessa forma a fim de limitar o crescimento na fase exponencial e reduzir a agitação necessária nesse período, podendo assim controlar a espuma.

A importância dos micronutrientes para a produção de surfactina é amplamente discutida na literatura. De acordo com Shaligram et al. (2010), a via de biossíntese da surfactina e a natureza dos sistemas multienzimáticos não são totalmente conhecidas, mas sabe-se da importância do papel do ferro como um estimulador de crescimento e do manganês como um fator de indução da produção deste biossurfactante. Cooper et al. (1981) reportaram o aumento da produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 quando vários cátions foram adicionados ao meio. De acordo com os autores, o manganês é conhecido por aumentar a produção de metabólitos secundários em *Bacillus subtilis*, sem necessariamente influenciar no crescimento do microrganismo. Já a grande quantidade de ferro requerida no meio de cultura é necessária para o crescimento, provavelmente devido à produção de alguma substância quelante sintetizada pelo microrganismo, capaz de tornar o ferro indisponível em solução. Após as observações deste ensaio exploratório, os ajustes realizados foram implementados no ensaio RBS2, descrito a seguir.

#### **5.4.1.2 Ensaio RBS2**

O ensaio RBS2 foi montado de acordo com a Figura 21. Nesse ensaio, foi incorporada a alimentação em pulsos da solução de micronutrientes e  $MgSO_4$ , realizada nas mesmas condições que a alimentação com  $NH_4NO_3$ . A Figura 22 mostra a imagem do biorreator e o sistema de coleta de espuma adotado nesse ensaio.

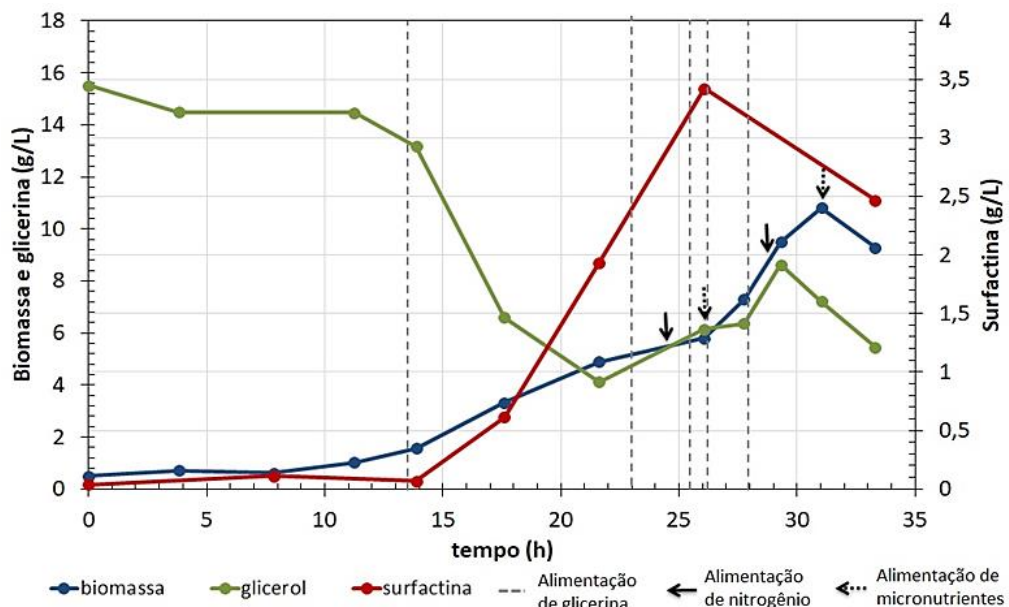
**Figura 22:** Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC21332 em biorreator Biostat B para a produção de surfactina (a e b). A Figura c destaca o frasco de coleta de espuma.



Fonte: Arquivo pessoal

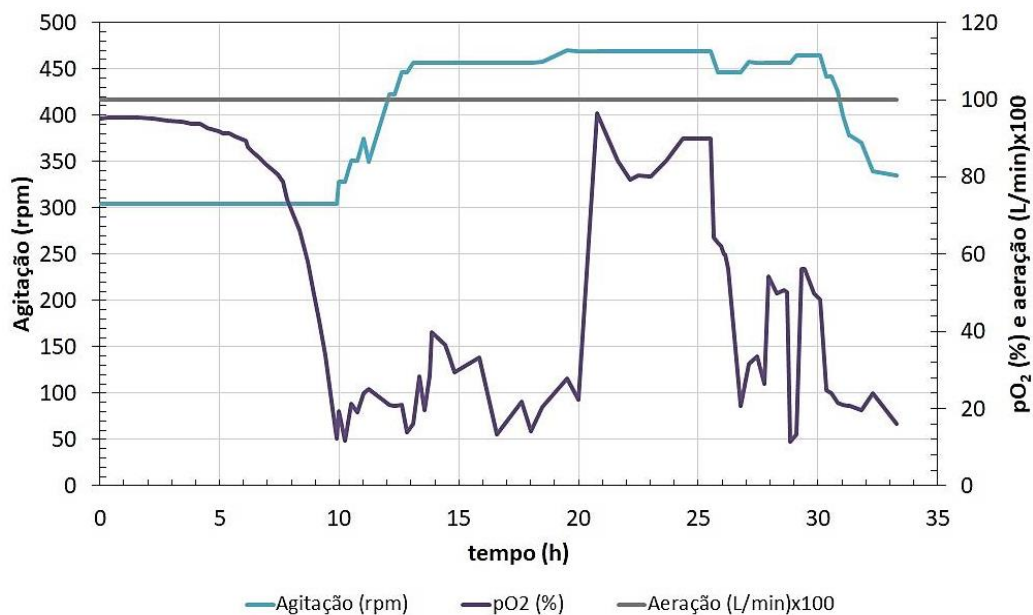
Os resultados de crescimento microbiano, consumo de substrato, produção de biosurfatante e pulsos de alimentação estão apresentados na Figura 23. Os dados de agitação, aeração e porcentagem de oxigênio dissolvido ao longo do cultivo são mostrados na Figura 24.

**Figura 23:** Curva de crescimento, consumo de substrato, produção de surfactina e pulsos de alimentação no ensaio RBS2.



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 24:** Curva de agitação, aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO<sub>2</sub>) no ensaio RBS2



Fonte: Arquivo pessoal

Conforme pode ser observado na curva de crescimento da Figura 23, o crescimento celular pareceu iniciar-se após 8 horas de cultivo. Em seguida, a curva de  $\ln X$  e tempo (dados não mostrados) indicou que de 8 a 22 horas ocorreu a fase exponencial de crescimento, momento em que houve aumento da aeração e diminuição da porcentagem de oxigênio dissolvido até o mínimo ajustado (Figura 24). Após aproximadamente 22 horas de cultivo, observou-se um crescimento mais lento da biomassa e aumento da porcentagem de pO<sub>2</sub> no biorreator, indicando a saída da fase exponencial. Após a alimentação com a fonte de nitrogênio e micronutrientes, notou-se a normalização desses parâmetros e o aumento da inclinação da curva de crescimento celular, indicando assim que, possivelmente, a limitação nesses nutrientes possa ter ocasionado a saída da fase exponencial. A partir de 32 horas não houve mais alimentação e o processo foi encerrado.

Durante a fase exponencial é possível observar que houve a formação de produto, chegando a 1,93 g/L de surfactina. A maior produção, porém, ocorreu durante a transição para a fase estacionária, resultando na concentração de 3,4 g/L de surfactina, em 26 horas de cultivo. Esse comportamento sugere que a produção de surfactina nessas condições de cultivo estaria parcialmente associada ao crescimento, pois mesmo após o microrganismo ter saído da fase exponencial de crescimento, a produção do biosurfactante continuou a aumentar. Após 26 horas observou-se um decaimento na concentração do produto, chegando a concentração de 2,5 g/L.

A diminuição da concentração de surfactina no meio pode ser explicada pelo consumo do próprio microrganismo quando há limitação de nutrientes, uma vez que a molécula possui componentes que podem ser utilizados como fonte de carbono ou nitrogênio. Esse fenômeno é descrito por vários autores (JANEK et al., 2021; ROCHA, 2017). Contudo, no caso desse ensaio, a fonte de carbono não estava limitante no processo, uma vez que a concentração final de glicerina estava em torno de 5 g/L. Rocha (2017) discute em seu trabalho que a redução da concentração de surfactina pode também estar relacionada a ação de enzimas proteolíticas, que são sintetizadas por *Bacillus subtilis*. Dessa forma, pode ocorrer uma ação enzimática na porção peptídica do biosurfactante, resultando em um lipopeptídeo de cadeia aberta. Nitschke e Pastore (2004) também observaram em seu estudo uma crescente atividade proteolítica de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio contendo manipueira, concluindo assim que a queda na concentração do biosurfactante estava relacionada a ação enzimática.

A cinética de produção de surfactina neste ensaio foi avaliada pelo modelo de Luedeking-Piret. A relação entre as velocidades específicas de crescimento e formação de produto para este conjunto de pontos experimentais resultou nas constantes  $\alpha = 0,342$  e  $\beta = 0,023$  ( $R^2 = 0,9945$ ), sendo  $\alpha$  o termo associado ao crescimento e  $\beta$  o termo não associado. Dessa forma, pode-se dizer que o resultado apresentado sugere que a produção deste biosurfactante pode ter sido parcialmente associada ao crescimento microbiano, uma vez que o valor de  $\beta$  foi diferente de zero. Esses dados corroboram com o que já foi descrito por alguns autores sobre a produção de surfactina ser parcialmente associada ao crescimento (SHEPPARD et al., 1997; ROCHA et al., 2020).

Diante dos resultados apresentados no ensaio RBS2 pode-se dizer que as estratégias de processo adotadas neste cultivo resultaram em um aumento de 41 % na produção de surfactina, quando comparado ao cultivo em frascos agitados, em que não foi possível realizar o controle de pH e aeração. Os valores dos parâmetros cinéticos e de processos calculados para esses dois ensaios estão apresentados na Tabela 11.

Os resultados mostraram que a concentração celular e a produção de surfactina foram maiores no ensaio em biorreator com controle de espuma. Uma vez que foi mostrado em ambos os ensaios a associação da produção de surfactina com o crescimento celular, pode-se dizer que o prolongamento do crescimento celular foi positivo para a produção de surfactina. Os valores de  $Y_{p/s}$  e  $\mu_{max}$  foram semelhantes nos dois ensaios, indicando que possivelmente o esgotamento dos nutrientes no ensaio em shaker e a diminuição do pH foi o que antecipou o fim da fase exponencial e interrupção do cultivo, impossibilitando a produção de biomassa e produto. Segundo Zhi et al. (2017), principalmente no final da fase exponencial, uma

subpopulação de *Bacillus* desencadeia a síntese de surfactina pelo sistema de *quorum sensing*, sendo portanto o aumento da densidade celular importante para o aumento da produção. O valor de  $Y_{p/x}$  foi maior no cultivo em biorreator, mostrando que houve maior rendimento de produto por massa de células formada. Os resultados de  $Y_{x/s}$  mostraram que o consumo de substrato para a formação e manutenção de células foi maior no cultivo em frascos agitados. Os resultados de  $P_p$  mostraram ainda um aumento da produtividade em produto nos cultivo em biorreator ( $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em relação aos cultivos em shaker ( $0,03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

**Tabela 11-** Parâmetros cinéticos e de processo para os ensaios em frascos agitados e biorreator RBS2.

	<b>Frascos agitados</b>	<b>RBS2</b>
<b>Concentração máxima de produto (g/L)</b>	2,38	3,42
<b>Concentração celular máxima (g/L)</b>	9,72	12,05
<b><math>\mu_{\max}</math> (<math>\text{h}^{-1}</math>)</b>	0,13	0,16
<b><math>Y_{x/s}</math> (g células/g substrato)</b>	0,62	0,27
<b><math>Y_{p/s}</math> (g produto/g substrato)</b>	0,15	0,16
<b><math>Y_{p/x}</math> (g produto/g células)</b>	0,35	0,59
<b><math>P_p</math> (g produto<math>\cdot</math>L<math>^{-1}</math><math>\cdot</math>h<math>^{-1}</math>)</b>	0,03	0,13

Neste contexto, pode-se dizer que as estratégias de condução do processo em batelada alimentada foram satisfatórias para não limitar o crescimento pela falta de nutrientes. Além disso, o sistema de recirculação para o controle de espuma se mostrou eficiente também para conseguir manter o controle do processo mesmo durante os períodos de formação mais intensa da espuma. No ensaio RBS1, em que não foi empregada a recirculação de espuma desde o início do cultivo, o  $\mu_x$  foi bastante prejudicado pela formação de espuma no início da fase exponencial, chegando a  $0,04 \text{ h}^{-1}$ .

Segundo Alonso et al. (2016) a estratégia de fracionamento da espuma é geralmente empregada para o controle de espuma na produção de surfactina. Contudo, essa estratégia limita a escalabilidade do processo, uma vez que esse sistema se baseia na geração e transbordamento sem controle da espuma, levando a problemas técnicos, como o bloqueio de filtros de saída do biorreator. Atwa et al. (2013) estudaram em seus trabalhos 3 estratégias para controle da formação de espuma: (1) a adição de antiespumante, (2) a coleta e retirada em frascos externos da espuma formada e (3) a recirculação da espuma. Os autores observaram que nos cultivos em que foi empregada a recirculação de espuma, o crescimento celular e a produção de surfactina foram superiores quando comparado com as demais condições. Neste mesmo estudo, a produção de surfactina registrou um aumento de 60 % com



relação ao cultivo com adição de antiespumante e 40 % em relação à estratégia de retirada constante de espuma.

Com base nos dados apresentados, pode-se dizer que a formação de espuma é um dos grandes desafios na produção de surfactina. A agitação e aeração necessárias para a transferência de oxigênio e crescimento dos microrganismos estão diretamente relacionadas com o aumento da espuma. Os efeitos adversos da formação de espuma incluem a remoção indesejável de produto, nutrientes e células na espuma, diminuindo o rendimento da produção do biosurfactante (YEH et al., 2006). Uma das estratégias do ponto de vista de bioprocessos seria o aumento da transferência de oxigênio no sistema, de forma a não criar condições que sobrecarreguem o sistema de contenção da espuma. Dessa forma, uma vez definido o protocolo de processo, foram realizados novos ensaios em reatores de 15 litros, que visaram melhorias no processo através da interferência no sistema de aeração.

#### 5.4.2 Avaliação da influência da aeração enriquecida com oxigênio para a produção de surfactina

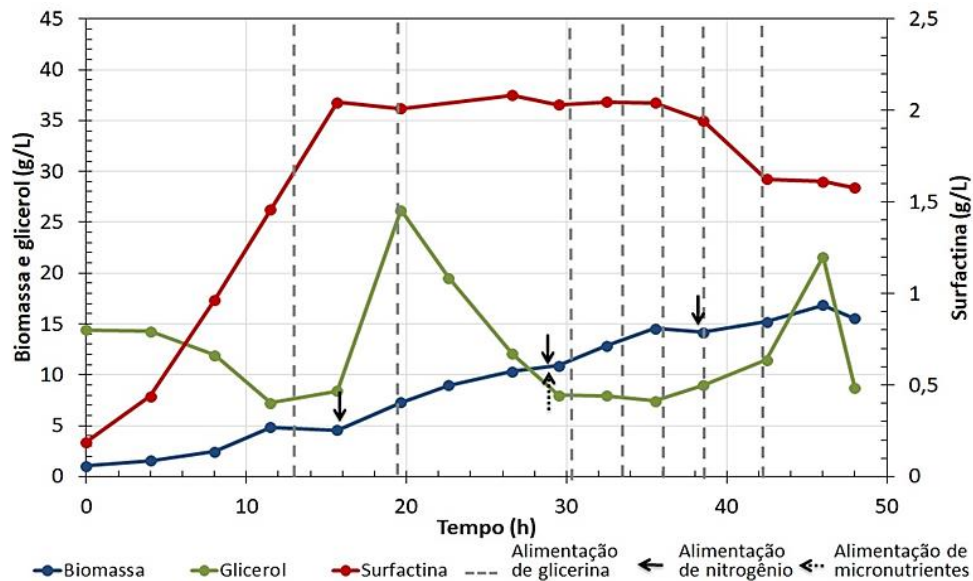
Os ensaios RBS3 e RBS4 foram realizados em biorreator Biostat® Cplus, Sartorius Stedim Biotech, de 15 litros (Figura 25). Em ambos os ensaios foi utilizado um inóculo na proporção de 10 % (v/v), adaptado no mesmo meio de cultivo do biorreator e em fase exponencial de crescimento ( $DO = 1,20$ ).

**Figura 25:** Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em biorreator Biostat Cplus e frascos de coleta de espuma para a produção de surfactina



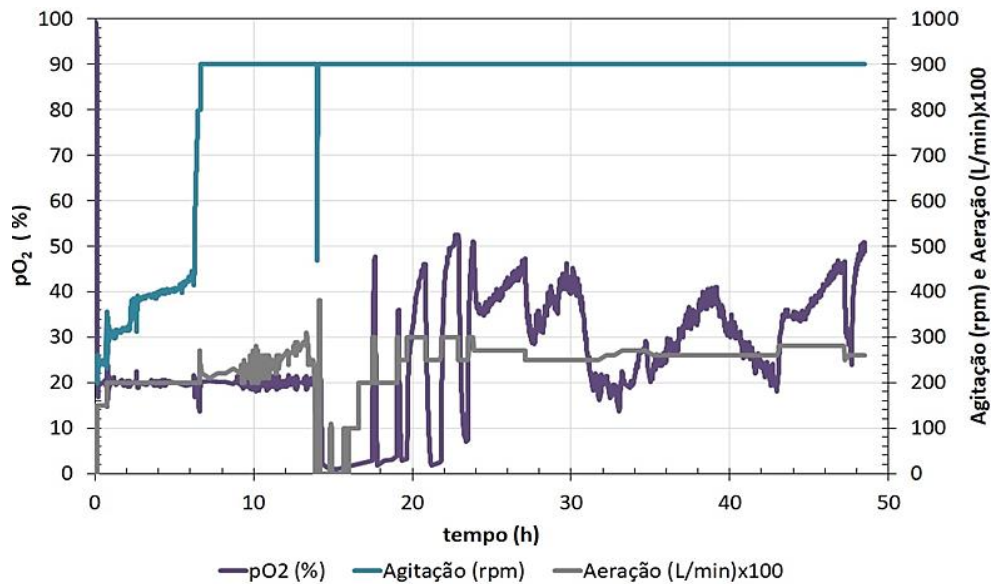
Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 26:** Curva de crescimento, consumo de substrato, produção de surfactina e pulsos de alimentação no ensaio RBS3



Fonte: Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 27:** Curva de agitação, aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO<sub>2</sub>) no ensaio RBS3



Fonte: Arquivo pessoal

Conforme pode ser observado na curva de crescimento de biomassa da Figura 26, logo no início do ensaio notou-se o crescimento celular, ao contrário do que foi observado nos cultivos anteriores, mostrando que a adaptação do inóculo foi positiva para ambientar o microrganismo no meio do biorreator. Uma vez que o inóculo utilizado nestes ensaios foi adaptado previamente no mesmo meio de cultivo para a produção em reator, a formação de espuma foi observada desde o tempo inicial do processo, devido a presença do biosurfactante produzido já durante o inóculo. A relação de  $\ln X$  pelo tempo (dados não mostrados) mostrou

que a fase exponencial teve início desde o começo do ensaio e se estendeu até as 12 horas de cultivo. A partir das 9 horas observou-se o aumento da agitação e aeração do sistema para compensar a maior demanda de oxigênio ocasionada pelo aumento do crescimento microbiano e, conseqüente, da respiração celular. Neste período a agitação atingiu 900 rpm e a aeração chegou em seu valor máximo, 3,0 L/min, sendo observada também intensa formação de espuma.

Entre 12 e 16 horas notou-se a presença de um patamar na curva de crescimento. Esse período foi marcado por uma fase de instabilidade no sistema, graças ao entupimento do filtro de saída do reator e expulsão de parte do meio de cultivo para o frasco de coleta, levando ao desligamento da aeração como medida de contenção. Após a normalização do sistema, o microrganismo voltou a crescer, mesmo que com  $\mu_x$  mais baixo. Em 16 horas foi observada a produção máxima de surfactina, chegando a aproximadamente 2 g/L. A produção de biossurfactante ocorreu desde o início da fase exponencial, tendo continuado durante a fase estacionária de crescimento, comportamento semelhante ao que foi observado no ensaio RBS2.

Devido ao fato do ensaio RBS3 ter sido realizado seguindo o mesmo protocolo de processo estipulado para os outros ensaios, pode-se dizer que o comportamento observado neste período possivelmente foi ocasionado pela ineficiência do sistema de recirculação de espuma, que ficou sobrecarregado pelo aumento da agitação e aeração do biorreator. De acordo com Kaiserman et al. (2017) a surfactina tem uma grande capacidade de formação de espuma, mesmo em baixas concentrações e o transbordamento dessa espuma causa perdas significativas de produto e biomassa, o que pode explicar o menor rendimento de surfactina neste ensaio. Além disso, entre 14 e 20 horas observou-se que o cultivo estava com concentrações muito baixas de oxigênio dissolvido no meio, o que poderia ter prejudicado o crescimento e fisiologia celular.

Segundo Faria et al. (2010), o escalonamento da produção de biossurfactantes apresenta algumas dificuldades, principalmente com relação ao dimensionamento adequado do sistema de transferência de oxigênio. O papel do fornecimento de oxigênio em processos biotecnológicos aeróbicos é essencial, uma vez que o oxigênio é fundamental nas vias metabólicas de crescimento, manutenção celular e produção de metabólitos precursores de novas moléculas (NAZARETH et al., 2021). A eficiência do sistema de agitação e aeração é necessária para a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, podendo assim alcançar as células. Além disso, devido à baixa solubilidade do oxigênio no líquido, o fornecimento de oxigênio deve ser constante no caso de processos aeróbicos. Dessa forma, é a

capacidade de transferência de oxigênio que vai determinar as condições de operação (SCHMIDELL et al., 2001).

Entretanto, no caso da produção de surfactina, altas taxas de agitação e aeração levam a formação de espuma no meio, resultando em baixa produção do biosurfactante. Além disso, a presença de biosurfactante no meio líquido pode causar uma diminuição na transferência de oxigênio devido as bolhas formadas. Neste contexto, a combinação ótima de aeração e agitação depende da estratégia de processo utilizada, levando em consideração, principalmente a quantidade de espuma gerada (NAZARETH et al. 2021).

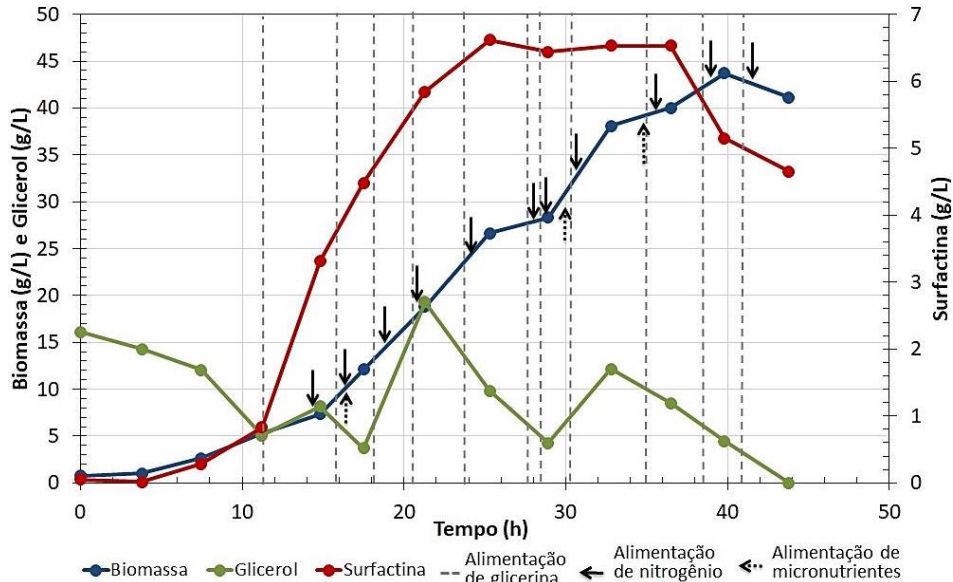
Ha et al. (2018) estudaram o efeito do suplemento de oxigênio na produção de surfactina. Neste estudo foi empregado um aspensor do tipo malha, gerando microbolhas de ar no sistema. Segundo os autores, a instalação desse sistema possibilitou o uso de menor agitação no biorreator, sem prejudicar a transferência de oxigênio, aumentando assim a produção do biosurfactante. De acordo com os autores, a eficácia da transferência de oxigênio e estratégias de processo tem um papel muito importante para a produção de surfactina por *Bacillus spp*, uma vez que foi observada que a produtividade volumétrica do produto aumentou proporcionalmente com a OUR (Oxygen Uptake Rate).

Dessa forma, uma vez que a formação de espuma é uma das principais causas de baixo rendimento para a produção de surfactina e a transferência de oxigênio é de grande importância para a produção deste biosurfactante, avaliou-se neste trabalho a produção de surfactina em um sistema com fornecimento de gás enriquecido com oxigênio. Para tanto, foram realizadas adições de pulsos de oxigênio puro ao longo do cultivo, especialmente durante a fase exponencial, onde ocorre a maior demanda por oxigênio. Desse modo, acoplou-se um cilindro de oxigênio (pressão parcial de oxigênio no gás = 1 atm) ao biorreator, de modo que a mistura gasosa do ar comprimido ficasse enriquecido em oxigênio.

De acordo com Schmidell et al. (2001), o enriquecimento do ar atmosférico com oxigênio pode ser uma alternativa interessante para o aumento da transferência desse gás. Essa estratégia visa suprir a demanda por oxigênio do metabolismo celular, uma vez que contribui para o aumento da pressão parcial de oxigênio na mistura gasosa, elevando a concentração de saturação desse gás na mistura. Esse comportamento é descrito matematicamente pela equação de Henry (Equação 1). Neste ensaio utilizou-se a porcentagem máxima de 15 % de oxigênio puro no gás de entrada do reator, resultando em um aumento de aproximadamente 62,5 % da concentração de saturação do oxigênio dissolvido, em comparação com o ensaio em que não foi empregada a adição dos pulsos. Dessa forma, foi possível manter a agitação e a aeração em valores mais baixos e não sobrecarregar o sistema

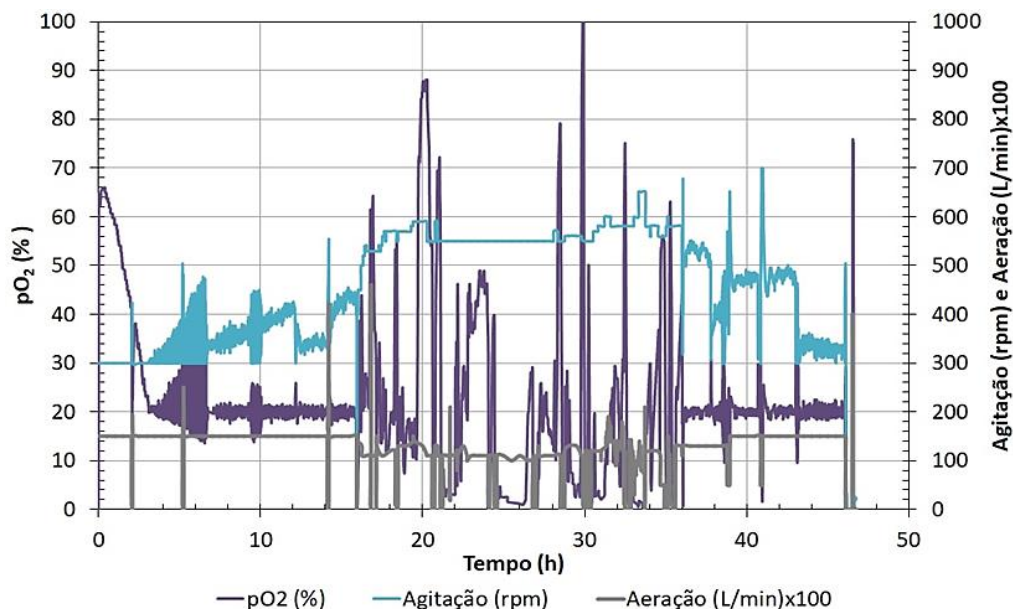
de reciclo de espuma. Os resultados do reator BSR4 obtidos para o crescimento celular, consumo de substrato e consumo de biomassa estão apresentados na Figura 28 e os dados de monitoramento dos parâmetros de processo estão descritos na figura 29.

**Figura 28:** Curva de crescimento, consumo de substrato, produção de surfactina e pulsos de alimentação no ensaio RBS4



Fonte: Arquivo pessoal

**Figura 29:** Curva de agitação, aeração (L/min) e porcentagem de oxigênio dissolvido (% pO<sub>2</sub>) no ensaio RBS4



Fonte: Arquivo pessoal

A partir dos dados apresentados podemos observar que, assim como o ensaio RBS3, o crescimento celular foi observado desde o início do cultivo. A curva de  $\ln X$  em função do

tempo (dados não mostrados) mostrou que crescimento exponencial durou de 0 a 19 horas. A partir de 16 horas de ensaio foram iniciados os pulsos de oxigênio e o controle em cascata para o oxigênio dissolvido foi desligado. A agitação foi mantida em 500 rpm e a aeração não ultrapassou 1,5 L/min, valor ajustado no início do processo

A produção de surfactina teve início após 4 horas de cultivo e foi produzida continuamente durante a fase exponencial de crescimento microbiano, que neste ensaio não sofreu nenhuma interrupção pela formação excessiva de espuma. Sua maior produção, porém, foi observada em 25 horas, período em que o crescimento se encontrava na transição para a fase estacionária. A máxima produção de surfactina obtida neste ensaio foi de 6,6 g/L, resultado três vezes maior do que foi obtido no ensaio RBS3, em que foram empregadas as mesmas condições de processo, exceto pela adição dos pulsos de oxigênio. A tabela a seguir compara os dados da cinética dos ensaios RBS3 e RBS4:

**Tabela 12** - Parâmetros cinéticos e de processo para os ensaios RBS3 e RBS4

	<b>RBS3</b>	<b>RBS4</b>
<b>Concentração máxima de produto (g/L)</b>	2,08	6,60
<b>Concentração celular máxima (g/L)</b>	17,34	43,73
<b><math>\mu_{\max}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	0,13	0,15
<b>Y<sub>x/s</sub> (g células/g substrato)</b>	0,31	0,40
<b>Y<sub>p/s</sub> (g produto/g substrato)</b>	0,09	0,16
<b>Y<sub>p/x</sub> (g produto/g células)</b>	0,19	0,32
<b>P<sub>p</sub> (g produto*L<sup>-1</sup>*h<sup>-1</sup>)</b>	0,07	0,26

Na Tabela 12 podemos observar que a produção máxima de células foi quase três vezes maior no ensaio RBS4, podendo ser um dos fatores que influenciou a maior produção do biosurfactante. Além disso, o valor de Y<sub>x/s</sub> também indica o consumo menor de substrato para a formação de biomassa no ensaio RBS3. O valor de  $\mu_x$  foi parecido nos dois ensaios, mostrando que a velocidade específica de crescimento celular foi semelhante durante a fase exponencial. Os valores de Y<sub>p/s</sub> e Y<sub>p/x</sub> mostraram que o rendimento do produto formado em relação à glicerina consumida e a biomassa formada, respectivamente, foram menores no ensaio em que ocorreu a instabilidade do sistema pela formação da espuma. Com relação à produtividade de surfactina notou-se que no ensaio em que foi utilizado o ar enriquecido a produtividade foi duas vezes maior em comparação com o ensaio realizado com a aeração proveniente do ar atmosférico.

A correlação entre o crescimento celular e a produção de surfactina foi observada em ambos os ensaios. No ensaio RBS4 a duração da fase exponencial foi de 25 horas, enquanto

que no ensaio RBS3 ela durou apenas 12 horas, tendo sido interrompida após a intensa formação de espuma. Isso sugere que a produção mais baixa de surfactina no ensaio RBS3 pode estar relacionada com a ineficiência operacional do sistema do biorreator em conter o excesso de espuma formada, provando assim o encurtamento da fase exponencial e, conseqüentemente, menor formação de biomassa. Resultados semelhantes foram encontrados por Ha et al. (2016), que estudaram a produção de surfactina em diferentes condições de agitação. Os autores concluíram que a produção do biossurfactante foi maior à medida que se aumentou a agitação do biorreator, resultando em um aumento de 20 % na produção. Contudo, nos cultivos em que se aplicou frequências de agitação superiores a 500 rpm houve um decréscimo na produção, devido a intensa espuma formada, provocando assim a perda de biomassa e diminuição da produção de surfactina.

Ghribi et al. (2006) estudou a influência de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido para a produção de surfactina e mostrou que houve um aumento na produção de biossurfactante e concentração celular com o aumento da porcentagem de oxigênio dissolvido durante o cultivo. Contudo, condições muito altas de oxigênio dissolvido, acima de 40 %, acarretaram a diminuição da produção. Yeh et al., (2006) estudaram a otimização de alguns parâmetros na produção de surfactina por *B. subtilis* em reator de 5 litros com reciclo de espuma. O suplemento de oxigênio e a eficiência na transferência de massa foram classificados como tendo um importante papel na cinética de produção da surfactina, uma vez que um aumento na produção de surfactina foi observado quando a aeração era aumentada de 0,5 para 1,5 vvm e a agitação de 200 para 300 rpm. Valores maiores de agitação e aeração, contudo, acarretaram em menor produção de surfactina. Segundo os autores, esse fato estava relacionado à vigorosa formação de espuma decorrente do aumento da agitação, que sobrecarregou o sistema de reciclo de espuma. Esse fenômeno levou a baixa eficiência na produção de surfactina nessas condições.

O baixo desempenho obtido em cultivos convencionais submersos tem limitado a implementação da produção de biossurfactantes em larga escala (FARIA et al., 2010). Portanto, as estratégias de agitação e aeração precisam ser otimizadas não apenas para atender à necessidade de oxigênio para o crescimento microbiano, mas também para minimizar os efeitos da formação intensiva de espuma. Neste contexto, os resultados apresentados mostraram que as estratégias de reciclo da espuma e adição de pulsos de oxigênio se mostraram promissoras para a produção de surfactina, uma vez que resultou na produção de 6,6 g/L de produto, resultado muito acima da média de produção de surfactina a partir de um resíduo. As intervenções sugeridas possibilitaram o prolongamento do crescimento

microbiano e aumento da densidade celular, o que provavelmente induziu a maior produção de surfactina. Além disso, essas medidas viabilizaram a utilização de valores mais baixos de agitação e aeração para suprir a crescente demanda de oxigênio, impactando diretamente na eficiência do sistema de reciclo de espuma.

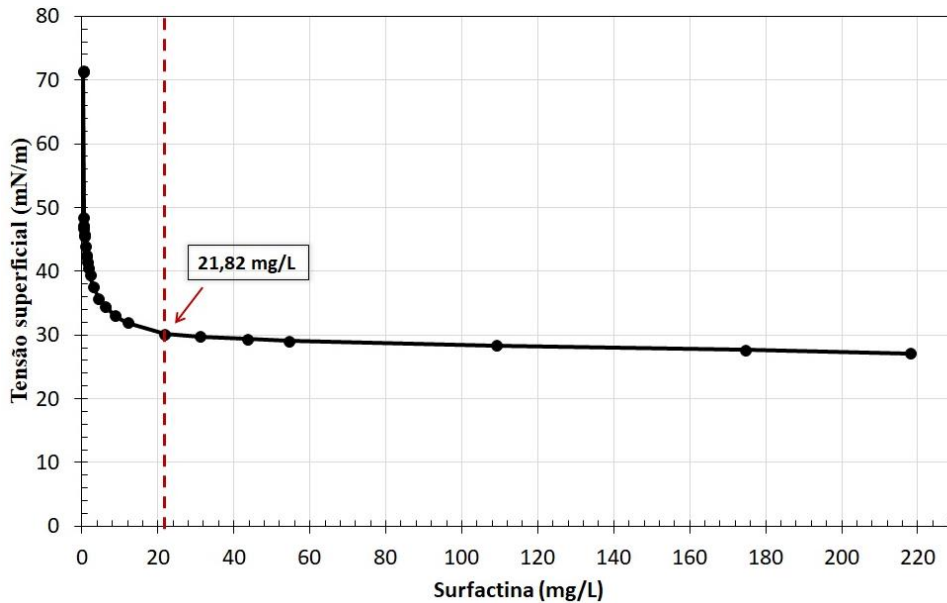
Com isso, o aumento da concentração de surfactina para o mesmo intervalo de tempo de processo resultou em um aumento da produtividade do produto, acarretando uma diminuição do custo fixo de investimento de uma planta de produção deste biossurfactante (CAPEX). Por outro lado, o emprego da glicerina resíduo do processo de biodiesel possibilitou baixo custo de matéria-prima, minimizando o custo operacional. Dessa forma, as estratégias utilizadas geraram um processo eficiente para a produção de surfactina e corroboraram para a diminuição do custo de produção do produto, facilitando a viabilidade econômica do processo.

### **5.5 Determinação da concentração micelar crítica (CMC)**

Uma das propriedades mais importantes dos biossurfactantes é a sua tensoatividade, que determina sua eficiência em diminuir a tensão superficial de um líquido. A tensão superficial se correlaciona com a concentração de moléculas tensoativas até que a concentração micelar crítica (CMC) seja atingida. Quanto menor a CMC de um surfactante, significa que menos surfactante é necessário para diminuir a tensão superficial do meio. A CMC é definida como sendo a menor concentração necessária para se iniciar a formação de micelas, ou seja, é a concentração máxima de monômeros do surfactante em solução aquosa (MULLIGAN et al., 2004). A micela é a configuração das moléculas de tensoativo com melhor estabilidade em solução, com as cadeias hidrofóbicas agrupadas e a parte hidrofílica das moléculas voltada para o meio aquoso (SANTOS et al., 2007).

Neste trabalho a CMC foi determinada no sobrenadante das amostras finais dos cultivos em biorreator. Foram realizadas sucessivas diluições na amostra e em cada diluição foi medida a tensão superficial. Os resultados foram plotados no gráfico a seguir (Figura 30).



**Figura 30:** Curva de determinação da CMC

Fonte: Arquivo pessoal

A partir desses resultados podemos observar que à medida que a concentração de tensoativo foi aumentando, notou-se uma diminuição gradativa nos valores de tensão superficial. Contudo, após a concentração de 21,82 mg/L de surfactina, observou-se que o incremento na concentração do biossurfactante não mais alterou os valores de tensão superficial, que se mantiveram em torno de 27 mN/m. Dessa forma, pode-se dizer que o biossurfactante testado exibiu boa capacidade tensoativa, uma vez que uma pequena concentração foi capaz de provocar o efeito de diminuição da tensão superficial.

A CMC obtida neste trabalho é inferior a CMC obtida por surfactantes sintéticos, tais como Tween 20 e 80 (nas faixas de 63 a 157 mg/L) e dodecil sulfato de sódio (1200 -2000 mg/L) (SYAHRIANSYAH et al., 2016). Zhang e Miler (1992) relataram que a concentração necessária de biossurfactante para se atingir a CMC está tipicamente entre 1 e 200 mg/L (MULLIGAN et al., 2004). De acordo com Barros et al. (2007), quando comparado a outros biossurfactantes e alguns surfactantes sintéticos, a surfactina possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e apresenta menores valores de CMC.

Sousa et al. (2014) em seu trabalho sobre produção de surfactina utilizando a glicerina residual como substrato encontrou a CMC de 33,6 mg/L. Rocha et al. (2017) encontrou a CMC de 19 mg/L para a surfactina produzida utilizando o melaço de cana de açúcar como substrato. Fernandes (2006) relatou ter encontrado a concentração de 40 mg/L para a surfactina produzida a partir de um meio complexo. Essas variações de CMC encontradas podem estar relacionadas com a natureza da fase líquida usado para ressuspender o

biossurfactante e com a pureza da amostra (DURVAL et al., 2019). Além disso, uma vez que diferentes composições de meios de cultivo podem ser utilizadas para produção de surfactina, acredita-se que a presença de diferentes componentes na amostra podem influenciar os valores de CMC.

Neste contexto, comparando os resultados obtidos neste trabalho com a literatura citada, pode-se dizer que foi obtido um biossurfactante com boa atividade tensoativa nos cultivos tendo a glicerina residual como substrato, pois o mesmo foi capaz de diminuir a tensão superficial, utilizando baixas concentrações do tensoativo. Sabendo que a CMC indica a mínima concentração de surfactante na qual se inicia a formação de micelas, pode-se dizer que os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial do biossurfactante produzido para uma gama de aplicações, envolvendo as propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (BARROS et al. 2007).

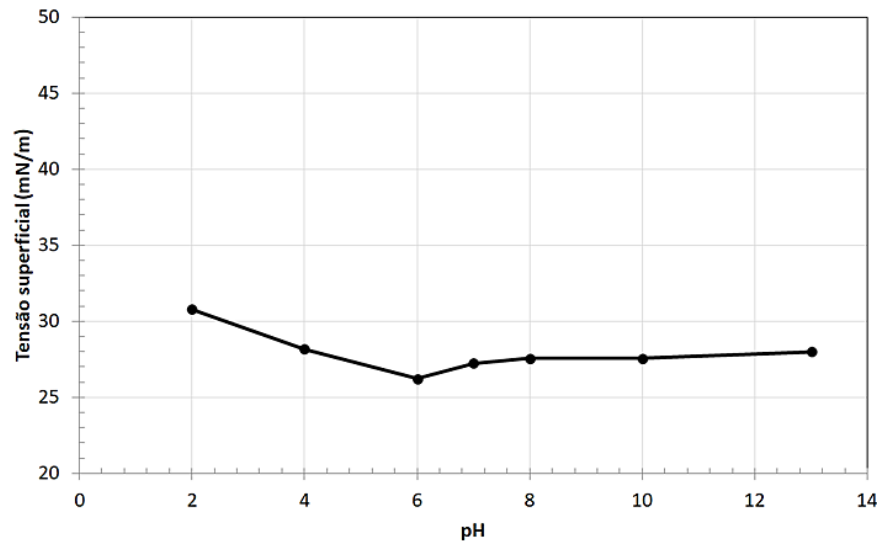
## **5.6 Estudos de estabilidade**

A grande diversidade de moléculas biossurfactantes implica em diferentes propriedades físico-químicas dessas moléculas, que podem direcionar sua aplicação. A estabilidade diante de alterações de temperatura, pH e salinidade aumenta seu potencial em aplicações industriais, especialmente na indústria do petróleo. Neste trabalho, a estabilidade do sobrenadante dos cultivos foi testada frente às mudanças nas medidas de tensão superficial após exposição a diferentes condições de pH, temperatura e salinidade e os resultados estão apresentados a seguir.

### **5.6.1 pH**

O sobrenadante foi testado frente à variação de diferentes valores de pH, na faixa de 2 a 13. Os resultados estão mostrados na Figura 31. De acordo com a figura, pode-se observar que o menor valor de tensão superficial foi registrado em  $\text{pH} = 6$ . O aumento do pH provocou uma pequena variação na tensão superficial, ficando em torno de  $27,5 \text{ mN/m}$  na faixa de pH de 7 a 13. A maior variação de tensão superficial, contudo, ocorreu para o pH ácido, chegando a  $31 \text{ mN/m}$  para o  $\text{pH} = 2$ . Durante o experimento observou-se ainda a formação de uma turbidez na solução para valores de pH abaixo de 5,0.

**Figura 31:** Curva de estabilidade para diferentes valores de pH do biossurfactante



Fonte: Arquivo pessoal

Syahriansyah et al. (2016) estudaram a estabilidade frente a variações de pH, temperatura e salinidade de um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* UKMP-4M5 e observaram que a tensão superficial da amostra foi fortemente influenciada pela variação de pH. De acordo com os autores a tensão superficial se manteve relativamente constante na faixa de pH de 6 a 8 e apresentou considerável aumento em faixas de pH extremos, de 2 a 4 e acima de 10. Os autores concluíram que a surfactina apresenta mais estabilidade em pH alcalino do que em pH ácido.

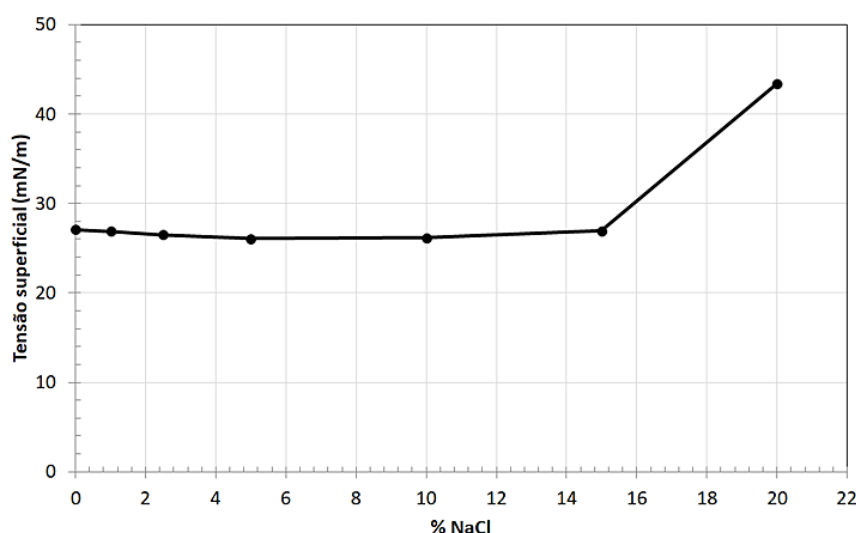
Nitschke e Pastore (2005) também citaram em seu trabalho a perda de estabilidade da surfactina em pH ácido. De acordo com as autoras, esse comportamento se deve ao fato da precipitação da surfactina, que ocorre em pH menor que 5. Wei et al. (2003) estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio enriquecido com ferro e observaram que a adição de ferro influenciou a diminuição do pH do meio. Os autores analisaram a produção de surfactina nas amostras do meio com o pH ácido e neutralizado e a quantificação mostrou valores de concentração do produto inferiores para a amostra acidificada. Dessa forma, os autores concluíram que a acidificação do meio causou a precipitação da surfactina.

Cooper et al. (1981) também mostrou que a acidificação da amostra de surfactina elevou a tensão superficial. Contudo, quando a amostra era novamente neutralizada, a tensão superficial voltou a diminuir, mostrando que a molécula não teve sua estrutura alterada. Esse comportamento mostra a dependência da estrutura química da surfactina em relação ao pH.

### 5.6.2 Salinidade

O sobrenadante foi testado também frente às diferentes concentrações de NaCl na amostra. Os resultados estão apresentados na Figura 32 e mostraram que a amostra permaneceu estável até a concentração de 15 % (m/v) desse sal, mantendo a tensão superficial em torno de 27 mN/m. Entretanto, em concentrações maiores que 15 % observou-se um aumento considerável na tensão superficial, chegando a 43,4 mN/m. Nitschke e Pastore (2005) também estudaram a estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* C9 em diferentes concentrações de NaCl. Neste trabalho, as autoras mostraram que o biossurfactante perdeu a estabilidade em concentrações acima de 20 % do sal.

**Figura 32:** Curva de estabilidade para diferentes valores de concentrações de NaCl.



Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com Syahriansyah et al. (2016), surfactantes sintéticos perdem a estabilidade em baixas concentrações de sal, cerca de 2 a 3%. Dessa forma, o biossurfactante testado apresentou propriedades superiores aos surfactantes sintéticos quanto a sua estabilidade à força iônica. Esse resultado mostra que o biossurfactante produzido é um candidato promissor para o uso em aplicações que envolvam ambientes com elevadas concentrações de sais, como em ecossistemas marinhos.

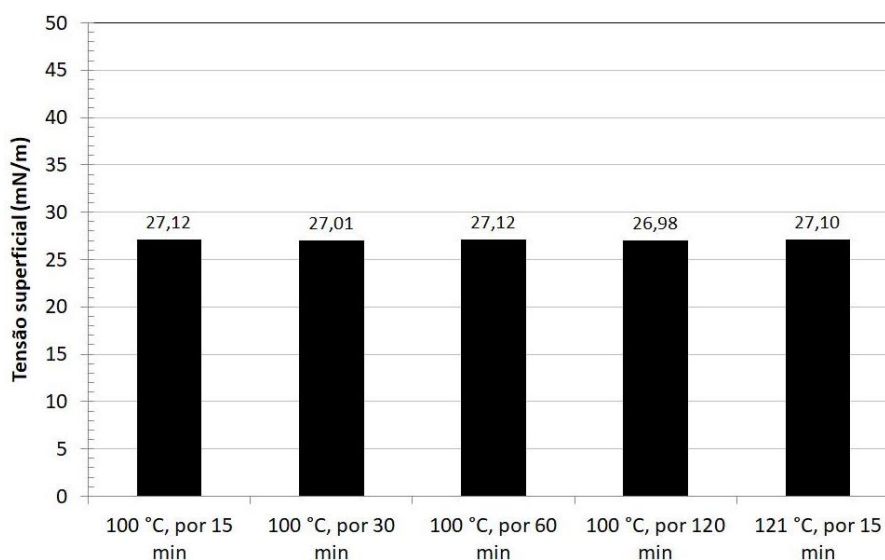
### 5.6.3 Temperatura

A estabilidade térmica do sobrenadante foi avaliada variando o tempo de exposição do sobrenadante a temperaturas de 100 °C e 121 °C. Após o período em que as amostras ficaram expostas em cada condição, elas foram deixadas esfriar até temperatura ambiente para a

medida da tensão superficial. Os resultados descritos na Figura 33 mostraram que as amostras não apresentaram variação de tensão superficial nas diferentes temperaturas testadas, permanecendo em torno de 27 mN/m. Dessa forma, pode-se considerar que o tensoativo produzido é termoestável.

Segundo Syahriansyah et al. (2016), biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* são reportados por exibirem excelente estabilidade térmica. Barros et al. (2008) estudaram a estabilidade térmica do biossurfactante produzido por *B. subtilis* LB5a em um intervalo de 20 °C a 100 °C e observaram que não houve mudança significativa na atividade superficial do biossurfactante. Além da tensão superficial foram realizadas também as medidas de  $CMD^{-1}$  e  $CMD^{-2}$ , as quais também não apresentaram variações.

**Figura 33:** Curva de estabilidade para diferentes valores de temperatura



Fonte: Arquivo pessoal

É importante salientar que a amostra testada mostrou estabilidade mesmo após ter sido submetida ao processo de autoclavagem, a 121 °C durante 15 min. De acordo com Zulkifli, a maioria dos surfactantes sintéticos perde drasticamente sua eficiência em temperaturas superiores a 100 °C, devido à baixa estabilidade química da molécula, limitando assim o uso dessas moléculas em aplicações que requeiram essa capacidade, como o uso em ambientes de reservatório de petróleo.

Zulkifli et al. (2019) discutem a aplicação de alguns surfactantes sintéticos em reservatório de petróleo. A seleção de um surfactante para ser usado nessas condições é bastante desafiadora, uma vez que a maioria é fortemente influenciada pelas elevadas temperaturas (80 a 106 °C) e alta salidade (cerca de 3,2 %, v/m). Essas condições adversas

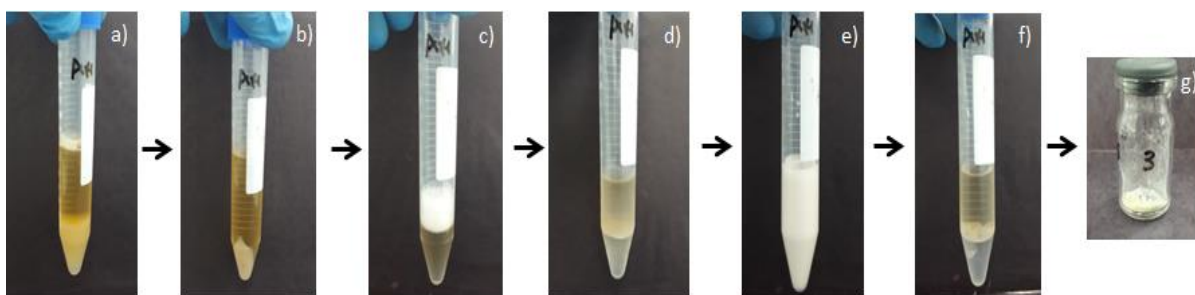
podem afetar a estabilidade dos surfactantes, que são geralmente degradados ou precipitados. Neste contexto, a biomolécula obtida neste trabalho apresentou boa estabilidade frente a drásticas condições de pH alcalino, temperaturas acima de 100 °C e concentração de sais superiores de 15 %, evidenciando assim um potencial para aplicações como biorremediação em ambientes marinhos, recuperação terciária de petróleo e antimicrobiano contra biocorrosão.

### 5.7 Extração e caracterização da molécula

Nesta seção estão apresentados os resultados dos métodos de extração e caracterização do biosurfactante produzido. Para tanto, empregou-se a mistura de solventes clorofórmio:metanol (2:1), que é largamente utilizada para a extração de surfactina e que resultou em um produto com boa solubilidade em meio aquoso, facilitando também o preparo da amostra para os testes de aplicação biológica. A obtenção do extrato foi realizada de acordo com a sequência de imagens da Figura 34.

A eficiência do processo de extração foi avaliada por HPLC, que mostrou que a maior parte da surfactina foi recuperada até a terceira extração, sendo este o protocolo adotado para o preparo das amostras para a quantificação do produto e testes antimicrobianos. Após o recolhimento da fase de interesse (F2) foi realizada a secagem do solvente e o sólido esbranquiçado foi preparado para as análises de CCD, HPLC e FTIR (Figura 34 g).

**Figura 34:** Etapas da extração do biosurfactante: a) Precipitação ácida do sobrenadante; b) Precipitado ácido após centrifugação; c) Reajuste do pH após ressuspender o precipitado; d) Adição do solvente; e) Solvente e amostra após agitação; f) Separação de fases após a centrifugação; g) Produto extraído e seco.



Fonte: Arquivo pessoal

A precipitação ácida é a primeira etapa do processo de purificação e foi realizada após a separação das células do meio de cultivo (Figura 34 a;b). Valores baixos de pH neutralizam as cargas dos aminoácidos da molécula de surfactina, dessa forma o composto torna-se

insolúvel no meio aquoso e passa a formar agregados em solução, que são decantados com o tempo. Embora seja uma metodologia simples e bastante utilizada (ROCHA, 2017; FERNANDES, 2014; NITSCHKE, 2006; QUEIROGA, 2003; SIMIQUELI, 2014), pode ocorrer também a coprecipitação de outras moléculas (BAKER et al., 2010).

Após a precipitação ácida, foi realizada a extração com o solvente (Figura 34 d). O solvente formado pela mistura de clorofórmio e metanol em diversas proporções é um dos métodos mais eficientes para a extração de surfactina, pois facilita o ajuste de polaridade para melhor rendimento da extração (CHEN et al., 2008). Após a adição do solvente na amostra e agitação, observou-se a formação de uma emulsão (Figura 34 e), que após a centrifugação, formou duas fases e uma película esbranquiçada entre essas fases (Figura 34 f). Após a remoção da fase inferior (F2), o processo de extração foi repetido mais duas vezes.

A fim de se verificar a recuperação do produto durante o processo de extração, foram avaliadas as amostras obtidas a partir da precipitação ácida e após a extração pelo solvente, sendo os extratos de ambas as etapas analisados posteriormente por HPLC. A análise da amostra proveniente da precipitação ácida mostrou que esse método não apresentou boa recuperação, uma vez que os picos correspondentes a surfactina ainda estavam presentes no sobrenadante do cultivo, podendo assim induzir a um erro na quantificação do produto. Já a análise do extrato obtido após a realização da extração com solvente mostrou que houve uma recuperação satisfatória do biosurfactante na fase de interesse, não sendo observados picos de surfactina no cromatograma correspondente a fase aquosa (F1).

De acordo com Zanotto et al. (2019) e Dlamini et al. (2017), as técnicas para purificação de lipopeptídeos normalmente descritas são a precipitação ácida, extração por solvente, fracionamento de espuma, adsorção e ultrafiltração. Dentre essas técnicas, o método mais comum e barato para recuperação de surfactina é a precipitação ácida. Segundo Chen et al. (2008), esse método, apesar de simples, não garante um alto grau de pureza. Dessa forma, o precipitado pode ser submetido a outros processos de purificação, como a extração por solvente.

Solventes com diferentes polaridades podem ser empregados para a extração da surfactina, como o metanol (SINGH; SHARMA et al., 2020); acetato de etila (LEWINSKA; KEDSIA et al., 2020); diclorometano (DANTAS et al., 2013) e clorofórmio (VECINO et al., 2015). Dentre os solventes já reportados para a extração de surfactina, a mistura de clorofórmio e metanol é uma das mais eficientes e permite a obtenção de diferentes graus de polaridade (CHEN; JUANG et al., 2008). A extração por solvente se baseia na diferença de solubilidade entre as impurezas e o produto a ser purificado, que é recuperado após a secagem

do solvente. Esse método apresenta, contudo, algumas críticas com relação a sua seletividade, uma vez que nem sempre é possível alcançar uma boa separação entre as impurezas e outros lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*, em relação à surfactina (DLAMINI, 2017).

Neste trabalho, observou-se que a aplicação do sistema de solventes clorofórmio:metanol para a extração da surfactina resultou em uma boa recuperação da molécula de interesse. Contudo, ao analisar no HPLC o extrato obtido na fração correspondente ao clorofórmio (F2), constatou-se que a surfactina correspondia a cerca de 30 % da massa desse extrato. A obtenção deste valor pode ter resultado da presença de umidade da amostra e/ou da extração de outros compostos não identificados por este método no HPLC. Esse resultado sugere que o método de extração escolhido foi eficiente em relação à extração da molécula do caldo de cultivo, mas não foi muito específico, uma vez que outros compostos foram extraídos além da surfactina.

A purificação dos biossurfactantes é a etapa mais significativa no que diz respeito ao custo de produção, podendo chegar a 60 % do custo total do processo (SIVAPATHASEKARAN; RAMKRISHNA; 2017). A estratégia de separação para biossurfactantes varia de acordo com o bioprocessamento e com as propriedades físico-químicas da molécula. A seleção do método de purificação e recuperação da molécula de biossurfactante depende da natureza de sua carga, características de solubilidade, se é um produto intracelular ou extracelular e dos custos de cada processo (SHALIGRAM et al., 2010). Além disso, Dlamini (2017) destaca que os métodos de purificação devem levar em consideração também o tipo e quantidade de impurezas no meio, da composição do meio de cultivo e condições de processo.

A recuperação da surfactina geralmente não pode ser atingida em um único processo com um alto grau de purificação, sendo necessária mais de uma etapa. O grau de purificação da surfactina presente no caldo de cultivo deve ser adequado ao tipo de finalidade pretendida. Aplicações que visam o tratamento de metais pesados ou biorremediação não necessitam de uma alta pureza. Já aplicações em áreas médicas e de cosméticos podem requerer um grau elevado de pureza da surfactina, a depender das características de segurança biológica do material obtido na forma bruta do sobrenadante do cultivo (DLAMINI, 2017).

### **5.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato**

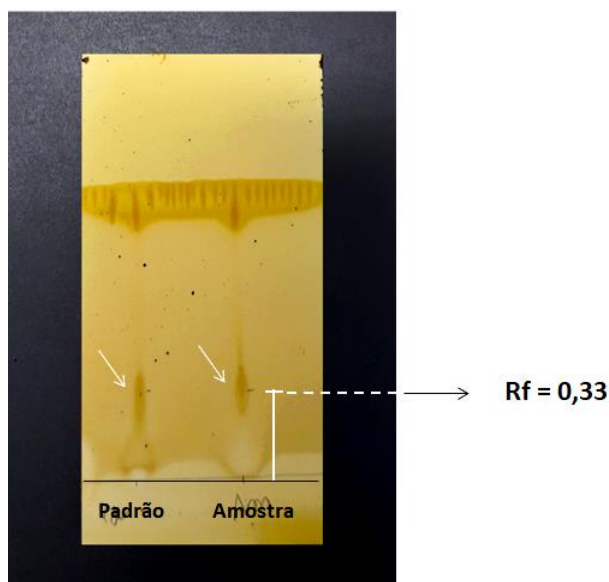
A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente



retido sobre uma superfície plana (LOPES et al., 2006). Segundo Satpute et al. (2010), a CCD pode ser aplicada como uma caracterização preliminar para os biossurfactantes e diversos autores já empregaram essa técnica para análise de surfactina (ARIMA et al., 1968; QUEIROGA et al., 2003; PEYPOUX et al., 1991; NITSCHKE et al., 2004, DLAMINI et al., 2017). Algumas vantagens oferecidas por essa técnica são a fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande repetitividade e baixo custo. Além disso, a análise de CCD pode ser uma técnica empregada para determinar o nível de impurezas da amostra de surfactina, podendo avaliar o resultado do processo de extração (DLAMINI, 2017).

Após o preparo do extrato, a amostra foi aplicada na linha inferior indicada da placa de sílica (Figura 35). O padrão comercial de surfactina também foi aplicado como comparativo. De acordo com a imagem abaixo, apenas uma banda foi observada após a aplicação do agente revelador. O resultado mostrou que o fator de retenção para a amostra foi idêntico ao do padrão ( $R_f = 0,33$ ), indicando que o composto purificado possui uma estrutura química próxima a surfactina padrão.

**Figura 35:** Placa de CCD contendo a surfactina padrão o extrato da extração por solvente



Fonte: Arquivo pessoal

Neste trabalho, optou-se pela revelação com vapor de iodo pela melhor resolução das bandas formadas. Segundo Dlamini et al. (2017) os componentes que apresentam uma porção lipídica na molécula tendem a se mover pela placa. Os compostos orgânicos geralmente ficam incolores no fundo branco da placa de sílica, impossibilitando sua visualização. Por isso, os

compostos precisam ser revelador após a eluição, sendo convertidos em algo temporariamente visível. O vapor de iodo é um revelador não específico, utilizados para compostos orgânicos em geral e já foi utilizado por outros autores para a CCD de surfactina (QUEIROGA et al., 2003; FERNANDES, 2006).

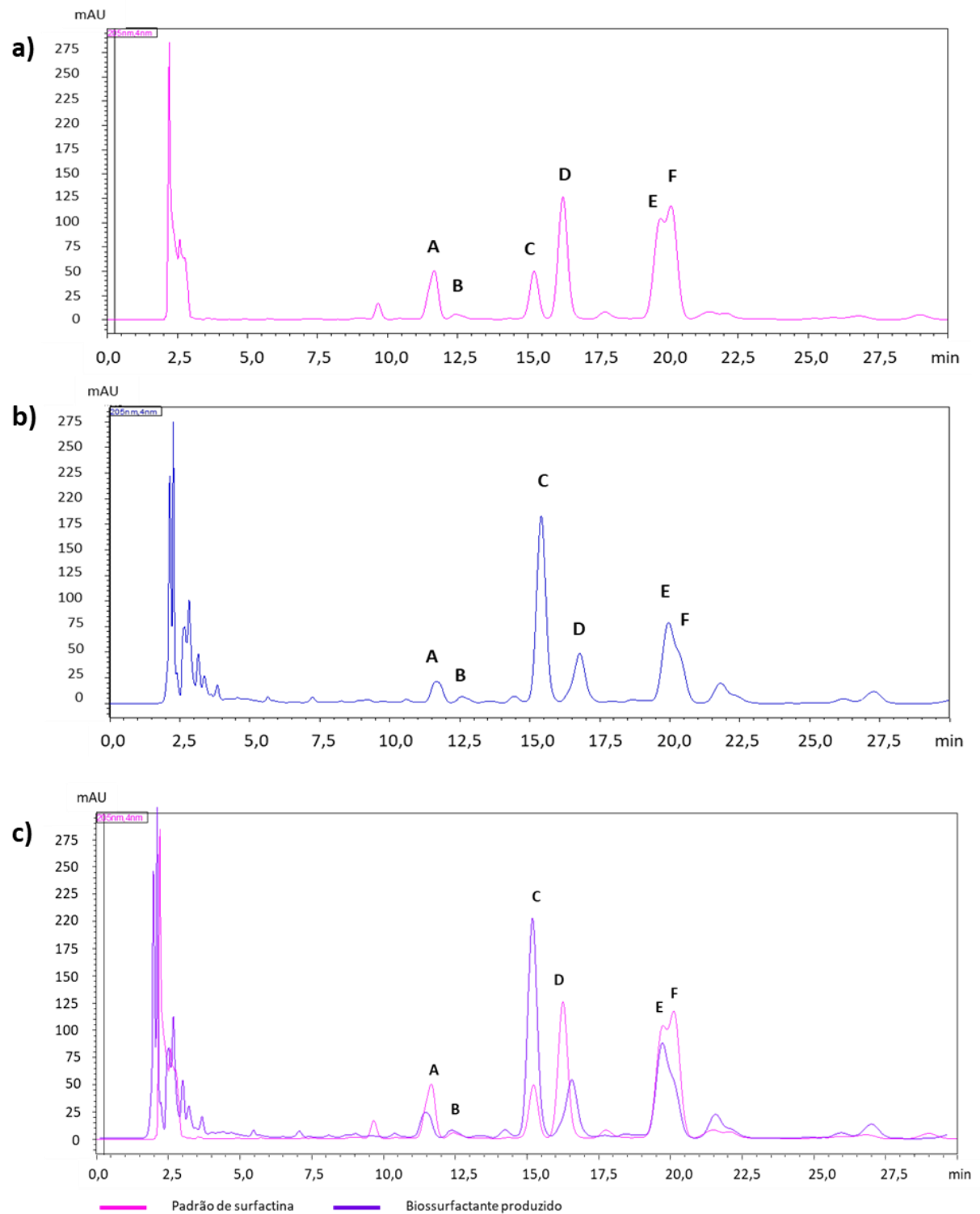
### 5.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato

Os cromatogramas gerados para a amostra e para o padrão de surfactina estão mostrados nas figuras a seguir. A análise de cromatografia líquida para o padrão de surfactina (Figura 36 a) mostrou a presença de seis picos, nomeados de A, B, C, D, E e F. Resultado similar foi mostrado por Dantas et al. (2013) e Wei et al. (2003) em seus trabalhos. De acordo com diversos autores, a surfactina ocorre naturalmente como uma diversidade de compostos, podendo dar origem a diferentes homólogos, que se diferenciam pelo comprimento (C12 a C17) e ramificações da porção lipídica. Além disso, podem ocorrer também como uma mistura de isoformas, que apresentam diferenças na substituição de componentes de aminoácidos no anel peptídico (KOWALL et al., 1998; BINIARZ et al., 2017; ABDELMAWGOUD et al., 2008). Essas variações na ocorrência e abundância com que ocorre cada isoforma dependem da linhagem de *B. subtilis* e das condições nutricionais e ambientais (KOWALL et al., 1998).

Os picos observados na amostra (Figura 36 b) mostraram que o biossurfactante produzido apresentou picos em tempos de retenção muito similares ao padrão. Os seis compostos observados no padrão são percebidos também na amostra, porém em intensidades diferentes, sugerindo que os compostos homólogos e isoformas da surfactina estão presentes em diferentes quantidades. Neste contexto, comparando os cromatogramas da amostra e do padrão pode-se afirmar que os picos dos componentes A, B, C, D, E e F encontrados no padrão de surfactina estão também presentes na amostra do biossurfactante produzido (Figura 36 c), mostrando que há indícios de que o biossurfactante produzido seja a surfactina.

Segundo Biniarz et al. (2017) o estudo da surfactina é geralmente conduzido utilizando todos esses compostos análogos, uma vez que a separação de cada composto pode ser um processo bastante desafiador. Para a identificação dos picos de interesse foi realizado um teste com amostras fortificadas do extrato com o padrão de surfactina, a fim de se observar a mudança na intensidade dos picos. Baseados na semelhança no tempo de retenção de cada pico foram selecionados aqueles que eram de interesse para a quantificação.

**Figura 36:** Cromatograma a) do padrão de surfactina, b) do extrato e c) sobreposição dos cromatogramas do padrão e da amostra.



Fonte: Arquivo pessoal

Muitos métodos de quantificação indiretos são utilizados para análise de biossurfactantes. Entretanto, devido à complexidade da amostra biológica, esses métodos são

considerados apenas qualitativos ou semi-quantitativos por serem pouco precisos, principalmente quando a quantidade de produto é pequena. Para análise quantitativa de lipopeptídeos o método de gravimetria é o mais tradicional, mas é pouco preciso devido à interferência de impurezas na amostra (MENG et al., 2015). Neste contexto, a cromatografia líquida é uma ferramenta importante para quantificação de amostras biológicas. Muitos trabalhos recentes aplicam essa metodologia para quantificar a surfactina (MENG et al., 2015; ROCHA, 2017, SOUSA, 2014).

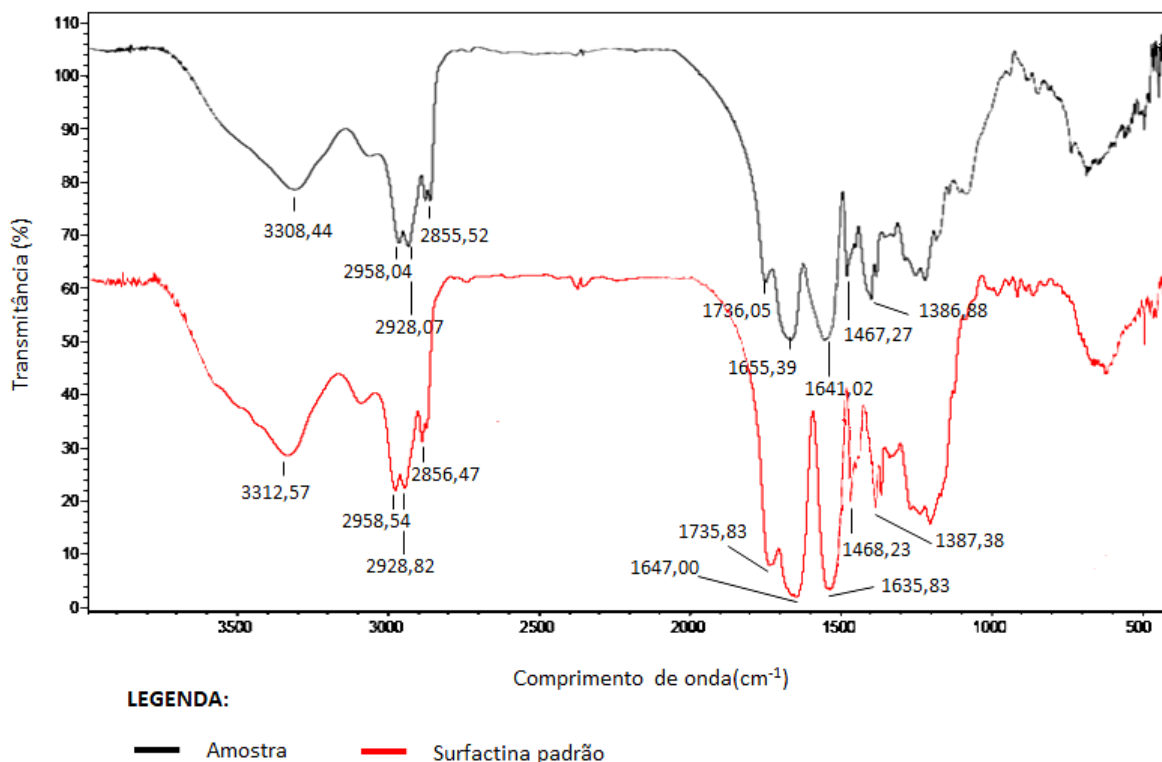
A cromatografia líquida pode ser uma ferramenta poderosa para identificação e caracterização de compostos ativos em amostras biológicas. Além disso, permite a caracterização de uma mistura de componentes de biosurfactante. Entretanto, a identificação por HPLC apresenta resultados preliminares para a identificação de uma amostra em comparação com seu padrão. Outras técnicas, porém, podem ser aplicadas a fim de compor uma caracterização mais completa da molécula, como a espectrometria de massas para a determinação de sua massa molecular e a espectroscopia de infravermelho para a determinação de sua estrutura molecular e substâncias preponderantes (CHEN et al. 2015).

### 5.7.3 Análise de Infravermelho

A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) geralmente é usada como ferramenta qualitativa para a caracterização estrutural dos biosurfactantes, uma vez que a maioria possui radical carbonila, ligação éster, ou ácido carboxílico, os quais absorvem energia da região do infravermelho do espectro eletromagnético (SOUSA et al., 2011). Além disso, muitos trabalhos utilizam essa análise para caracterização química de biosurfactantes produzidos por espécies de *Bacillus subtilis* (DEBON, et al., 2015; DANTAS et al., 2014; JOSHI et al., 2008; SOUSA et al., 2011).

A análise de FTIR foi realizada para a identificação dos grupamentos funcionais do biosurfactante produzido neste trabalho por *B. subtilis* ATCC 21332. A Figura 37 apresenta os espectros de FTIR do biosurfactante produzido e da amostra de surfactina padrão. A análise mostrou que o extrato apresentou praticamente as mesmas bandas de absorção correspondentes aos principais grupos característicos da molécula de surfactina.

**Figura 37:** Espectro na região do infravermelho da amostra recuperada (preto) e do padrão de surfactina (vermelho)



Fonte: Arquivo pessoal

As bandas de absorção mais importantes foram atribuídas por comparação pelos espectros obtidos por Sousa et al. (2011) e Joshi et al. (2008). No espectro mostrado na Figura 37 foram observadas bandas de absorção com máximo de 3308,44 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento da ligação N-H, característica de peptídeos. As bandas em torno de 2958 e 2928 cm<sup>-1</sup> correspondem ao estiramento da ligação C-H dos grupamentos (CH<sub>2</sub>) e (CH<sub>3</sub>). A banda de alta intensidade observada em 1736,05 cm<sup>-1</sup> corresponde a absorção de grupos C = O do grupo -COOH, referente ao grupo carbonil do anel lactona. Observou-se também uma banda na região de 1600 a 1700 cm<sup>-1</sup>, que é característica da ligação CO-N, pertencente a amida em proteínas, indicando a presença de grupos peptídeos. As bandas entre 1476 e 1377 cm<sup>-1</sup> mostra a presença de cadeias alifáticas do grupamento -CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub>.

Os resultados apresentados concluíram que todas as bandas de absorção do extrato também apareceram no padrão de surfactina, indicando a presença de hidrocarbonetos alifáticos e frações peptídicas em sua estrutura. Dessa forma, pode-se dizer que o biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em meio contendo glicerina residual, trata-se de um lipopeptídeo, possivelmente pertencente à família de surfactinas.

## 5.8 Ensaios antimicrobianos

### 5.8.1 Confirmação da fração biologicamente ativa

Os extratos obtidos foram avaliados de forma preliminar quanto à sua atividade biológica. Para tanto, foram utilizadas como indicadores as cepas Gram-positivas *B. subtilis* ATCC 19659 e *S. aureus* ATCC 6538 e a Gram-negativa *E. coli* ATCC 8739. Foram utilizadas duas metodologias, a difusão em disco e a perfuração em ágar, a fim de se avaliar a sensibilidade de cada método. Duas amostras foram avaliadas (F1 e F2), referentes às frações obtidas após a extração do biossurfactante. A fração F1 representa a fração superior que se forma após a separação de fases e é composta pela fase aquosa. A fração F2 é a fase orgânica composta pelo clorofórmio. É importante salientar ainda que todos os testes foram realizados em duplicata biológica, com a concentração de 50 mg/ mL de cada extrato.

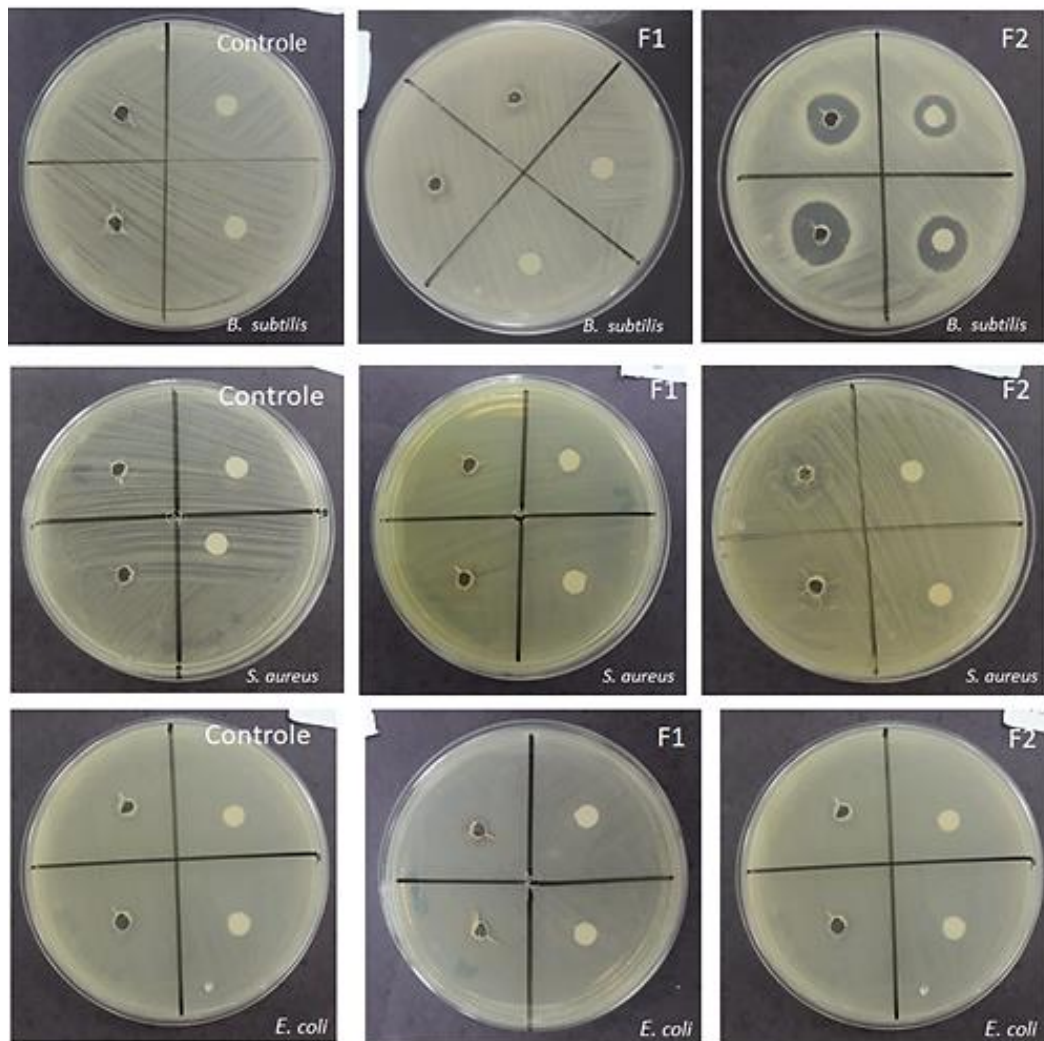
De acordo com os resultados apresentados (Figura 38), observou-se que a amostra correspondente a F1 não apresentou atividade antimicrobiana para nenhuma das linhagens testadas, uma vez que não exibiu nenhum halo de inibição, semelhante ao controle. Na fração F2, contudo, foi observado o halo de inibição apenas em contato com a cepa de *Bacillus subtilis*. Vale ressaltar que a bactéria *S. aureus*, apesar de não ter tido seu crescimento totalmente inibido pelo extrato, apresentou a formação de uma região um pouco mais clara no local onde foi aplicada a amostra pelo método do poço, indicando que possivelmente os extratos possam ter tido um efeito bacteriostático. A bactéria Gram-negativa *E. coli*, contudo, não apresentou sensibilidade ao extrato testado. Diante desses resultados, pode-se dizer que a extração foi eficiente para o isolamento do biossurfactante biologicamente ativo e que F2 é a fração rica nesse composto.

Rivardo et al., (2009), em seu trabalho testou lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* e *B. licheniformis* contra dois microrganismos patogênicos, *Escherichia coli* CFT073 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, e observou que o produto de *B. subtilis* foi efetivo apenas contra o microrganismo Gram-positivo e o inverso ocorreu para *B. licheniformis*. Resultado semelhante foi obtido neste trabalho, em que foi observada maior sensibilidade para as bactérias *B. subtilis* e *S. aureus*.

A atividade antimicrobiana da surfactina é amplamente descrita na literatura. De acordo com Araújo et al., (2014), o efeito antimicrobiano mais acentuado da surfactina em microrganismos Gram-positivos provavelmente se deve ao fato das diferenças observadas na estrutura da parede celular em comparação com os Gram-negativos. De acordo com os autores, a surfactina interfere mais intensamente em membranas contendo fosfolipídeos que

possuem cadeias mais curtas, pois por meio de sua inserção na camada lipídica pode modificar a permeabilidade da membrana pela formação de canais iônicos. Além disso, pode ocorrer também a solubilização da membrana por sua propriedade de detergência.

**Figura 38:** Resultados dos ensaios antimicrobianos do teste de difusão em ágar com as bactérias *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*. Para cada microrganismo foram testados os meios de cultivo sem inóculo (controle), e as frações F1 e F2 após o processo de extração com solvente.



Fonte: Arquivo pessoal

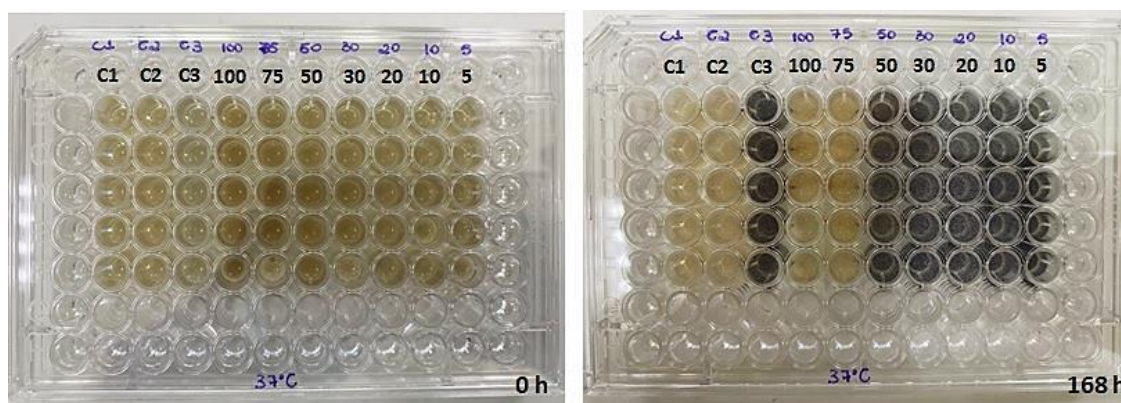
### 5.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente à bactéria redutora de sulfato

O potencial do biossurfactante produzido contra biocorrão foi testado tendo a bactéria *Desulfovibrio vulgaris* como bioindicador. O teste de concentração inibitória mínima foi realizado em microplaca de 96 poços, com diferentes concentrações do extrato: 100, 75, 50,

30, 20, 10, 5 mg/mL. Além disso, foram realizados controles somente do meio de cultivo (C1), do meio de cultura com o extrato (C2) e do meio puro com inóculo (C3).

Os resultados estão apresentados na Figura 39 e mostraram que, após 168 h de ensaio, o microrganismo foi capaz de crescer em contato com as concentrações de 5 a 50 mg/mL. O crescimento microbiano pode ser detectado pela observação da coloração enegrecida causada pela precipitação do sulfeto de ferro, formado após a redução do sulfato a sulfeto pelo metabolismo microbiano. A MIC foi determinada como a menor quantidade da substância antimicrobiana que não resultou no crescimento do microrganismo e neste ensaio foi estabelecida como sendo 75 mg/mL do extrato.

**Figura 39:** Teste de concentração inibitória mínima no tempo inicial e após 168 horas



Fonte: Arquivo pessoal

Com relação à cinética de crescimento, contudo, observou-se que até 48 horas ocorreu o crescimento apenas do controle C3 e da menor concentração de extrato. Em 96 horas foi observado o crescimento nas concentrações de 10, 20 e 30 mg/mL. Somente após 144 horas ocorreu o crescimento no meio com 50 mg/mL do extrato, ainda que com uma coloração visualmente menos intensa que as demais. Esse resultado sugere que o biossurfactante testado teve efeito inibitório de diferentes proporções também nas menores concentrações testadas, quando comparados com o controle.

A fim de determinar o tipo do efeito antimicrobiano, um teste adicional foi realizado inoculando o conteúdo da placa de MIC em meios de cultivo frescos. Após 7 dias de incubação, observou-se que as bactérias cresceram em todas as concentrações, mostrando assim que o efeito dessas concentrações do extrato foi bacteriostático contra *D. vulgaris*. Dessa forma, pode-se dizer que o extrato rico em biossurfactante agiu de forma a inibir a atividade da BRS, reduzindo assim a formação de sulfetos, principal mecanismo da biocorrosão. Os controles de crescimento bacteriano e de meio de cultivo não apresentaram



nenhuma alteração nos dois ensaios, validando o experimento com controle positivo e negativo de crescimento celular pelo aspecto visual.

Sabe-se que muitas espécies de *Bacillus* são capazes de produzir diferentes tipos de substâncias biologicamente ativas. A surfactina é uma mistura de isoformas e sua atividade biológica depende tanto da composição de aminoácidos e da sequência do anel peptídico, como da natureza de sua porção lipídica. Essas variações estruturais, que variam conforme a linhagem e as condições de produção podem provocar diferenças em sua atividade bioativa (KOWALL et al., 1998). Segundo Barros et al. (2008), biosurfactantes com cadeias de ácidos graxos mais longas são mais efetivos em interagir e danificar as membranas celulares em comparação com seus homólogos de cadeias mais curtas.

Apesar dos mecanismos de ação da surfactina não estarem completamente elucidados, acredita-se que a atividade antimicrobiana esteja associada à sua capacidade de alterar a integridade da membrana do organismo alvo, como consequência de interações com constituintes fosfolipídicos da membrana celular. Esse fenômeno seria responsável por causar perda do conteúdo vesicular através da desestabilização lipídica ou formação de poros intramembrana (BARROS et al., 2008). Portanto, essa característica confere a surfactina algumas aplicações antimicrobianas, como a inibição do crescimento de bactérias redutoras de sulfato (PLAZA et al., 2020; PANCHABHAI et al., 2021).

Korenblum et al. (2012) estudou a surfactina produzida por uma bactéria isolada de reservatórios de petróleo brasileiro para o controle de bactérias redutoras de sulfato. Após a análise por microscopia eletrônica, os autores observaram alterações e rupturas na membrana celular do microrganismo após terem sido submetidos ao tratamento com o biosurfactante, sugerindo assim a ação antimicrobiana da surfactina frente às BRS. Jayaraman et al. (1999) também estudaram a influência de peptídeos antimicrobianos, como a gramicina, indocilina e batenecina contra bactérias redutoras de sulfato. Neste trabalho, as substâncias testadas diminuíram em 90% a viabilidade das bactérias *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio gigas* após exposição de 1 hora. Além disso, ao aplicar a batenecina em superfícies de aço inoxidável e aço carbono, observou-se que a formação de biofilme por BRS foi significativamente reduzida, diminuindo assim a taxa de biocorrosão.

Uma vez que a matriz de exopolissacarídeo secretada pelas BSR na formação de biofilme é considerada uma das causas para redução da eficácia dos biocidas, a utilização de antimicrobianos capazes de penetrar no biofilme ou inibir sua formação é uma característica importante para auxiliar o tratamento contra biocorrosão (JAYARAMAN et al., 1999). Neste contexto, os biosurfactantes são conhecidos por sua habilidade de adsorver nas superfícies,

retardando a aderência microbiana e formação de biofilme. Os efeitos antibiofilme dos biossurfactantes estão principalmente relacionados à capacidade de adsorver na superfície sólida e alterar sua hidrofobicidade, dificultando assim a adesão microbiana e consequentemente, a formação do biofilme (ARAÚJO et al., 2013).

A CIM é responsável por cerca de 20% do total de perdas por corrosão na indústria de petróleo, estando relacionado a grandes desastres de vazamentos de oleodutos que não só trazem grandes perdas econômicas, mas que também levanta preocupações ambientais (JIA et al., 2019). As bactérias redutoras de sulfato têm sido as principais responsáveis pela corrosão microbiana induzida e outros processos destrutivos nas indústrias. Portanto, a mitigação dessas bactérias é um grande desses setores no cenário atual (PLAZA et al., 2020).

Almeida et al. (2006) discute em seu trabalho algumas estratégias de controle para o controle da biocorrosão por BRS, dentre elas a aplicação de antimicrobianos que podem ter atividade biocida ou bactericida. Contudo, de acordo com os autores, o uso de biocidas como o glutaraldeído e compostos de aminas quartenárias, além de requererem altas doses de aplicação e serem considerados nocivos ao meio ambiente, estão também associados ao aumento da resistência microbiana. Dessa forma, o uso de biossurfactante como substitutos dos compostos biocidas já usados para BRS é uma abordagem inovadora, uma vez que os biossurfactantes são compostos biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade e podem ser sintetizados a partir de fontes renováveis, sendo uma alternativa promissora e sustentável para a aplicação industrial.

Nesse contexto, os resultados apresentados até o momento são preliminares e sugerem o potencial antimicrobiano do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* ATCC 21332, obtido a partir da glicerina residual. Sabe-se que a aplicação do biossurfactante está fortemente relacionada com a sua estabilidade em diversas condições ambientais. Neste trabalho, o biossurfactante produzido teve ainda sua estabilidade avaliada, mostrando que a molécula foi termoestável em temperaturas superiores a 100 °C e não perdeu sua atividade tensoativa quando submetida às faixas de pH de 6 a 13 e salinidade de 0 a 15 %. Sendo as condições dos reservatórios de petróleo bastante drásticas, principalmente com relação à temperatura e salinidade, pode-se dizer que os resultados obtidos mostraram que o biossurfactante produzido é um candidato promissor para o uso em aplicações em ambientes marinhos, como agente de inibição microbiana e em processos de recuperação terciária de petróleo.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 21332 foi capaz de crescer e produzir biossurfactante utilizando a glicerina residual como única fonte de carbono. A produção de tensoativo alcançada no reator de 15 litros foi de 6,6 g/ L, resultado superior ao que geralmente é descrito na literatura para esse mesmo microrganismo. Dessa forma, pode-se dizer que as estratégias de processo adotadas para a produção deste biossurfactante (regime em batelada alimentada, sistema de recirculação de espuma e aeração com ar enriquecido em oxigênio) mostraram-se eficazes para o aumento da produtividade da surfactina. Uma vez poucos estudos na literatura relatam a produção de surfactina em alta densidade celular, os resultados obtidos neste trabalho mostraram uma alternativa promissora para este bioprocessos.

As análises de identificação química para a amostra extraída (CCD e HPLC) mostraram que a molécula produzida apresentou comportamento semelhante ao observado para o padrão comercial de surfactina (Sigma-Aldrich). Além disso, a análise de FTIR indicou que o biossurfactante produzido se trata de um lipopeptídeo. Dessa forma, pode-se concluir que há indícios de que o biossurfactante produzido seja uma mistura de compostos homólogos e isoformas da surfactina.

A determinação da CMC mostrou que o uma pequena concentração do biossurfactante foi capaz de diminuir a tensão superficial para valores próximos de 26 mN/m, sendo portanto, considerado um tensoativo eficiente. As análises de estabilidade mostraram que o biossurfactante produzido não perdeu sua atividade tensoativa quando submetida a diversas faixas de pH, temperatura e salinidade, evidenciando assim um potencial de aplicação em condições de reservatórios de petróleo, onde as condições ambientais são bastante drásticas.

Por fim, nos testes antimicrobianos foi observada a sensibilidade de bactérias redutoras de sulfato quando em contato com a fração do extrato mais rica em biossurfactante, mostrando assim um potencial como alternativa sustentável aos biocidas sintéticos já utilizados.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O cultivo de *B subtilis* ATCC 21332 em biorreator para a produção de biossurfactante apresentado nessa dissertação foi um estudo inicial para o desenvolvimento de um bioprocesso para a obtenção da surfactina, visando principalmente conter a elevada formação de espuma. Existem muitas melhorias e modificações a se fazer, sobretudo na perspectiva de criar um protocolo de produção, em que sejam validadas todas as intervenções no processo. Neste contexto, novos estudos poderiam ser conduzidos a fim de se entender melhor a relação entre a produção de surfactina e o crescimento microbiano. Além disso, um estudo de otimização da composição do meio de cultivo contendo o resíduo proposto poderia resultar em melhorias na produção de surfactina e diminuição de custos com matéria-prima.

Quanto ao processo de *downstream*, poderiam ser realizados estudos que visassem a obtenção de um produto purificado, de acordo com a aplicação desejada, considerando diferentes métodos de purificação, assim como os custos da implementação de cada metodologia e o impacto ambiental gerado pelo uso de solventes. O estudo de viabilidade técnica e econômica poderia ser interessante para fornecer informações importantes do ponto de vista de custos com matéria-prima e outros insumos, além de estimar os equipamentos necessários em cada operação unitária.

Finalmente, quanto à aplicação da surfactina em combate aos processos de biocorrosão, esse trabalho investigou de forma preliminar o potencial do biossurfactante produzido para esta aplicação. Como continuidade, é necessária a realização de novos testes que simulem as condições de dutos de petróleo, como a presença de consórcios microbianos e formação de biofilmes. Além disso, a realização de estudos relacionados ao preparo adequado do produto a ser aplicado também são importantes, considerando principalmente a pureza requerida para a biomolécula e as formas de aplicação.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABADIA, C. P. M.; Utilização do licor proveniente de hidrólise da polpa de sisal como substrato para a produção de biossurfactante. **Dissertação**. Universidade de São Paulo. 2014
- ADEGBOYE, M. A.; FUNG, W. K.; KARNIK, A. Recent Advances in Pipeline Monitoring and Oil Leakage Detection Technologies: Principles and Approaches. **Sensors**, v.19, 2019
- AKBARI, S.; ABDURAHMAN, N. H.; YUNUS, R. M.; FAYAZ, F.; ALARA, O. R. Biosurfactants: a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology research and innovation**, 2018
- ALMEIDA, J.R.; FAVARO, L.C.; QUIRINO, B. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. **Biotechnol. Biofuels**, v. 5, p. 48–73, 2012.
- ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; CARVALHO, E. B.; SOUZA, E. R.; CARVALHO, A. S.; SILVA, C. H. T. P.; TAFT, C. A. Overview of sulfate-reducing bacteria and strategies to control biosulfide generation in oil waters. In: **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Índia: Signpost Research, 2006. p. 1-15
- AL-WAHAIBI, Y. M., AL-BAHRY, S. N., ELSHAFIE, A. E., AL-BEMANI A. S., JOSHI S. J., AL-BAHRI, A. K. Screening of Minimal Salt Media for Biosurfactant Production by *Bacillus spp.*; World Academy of Science, **Engineering and Technology**, v. 86, International Conference on Environmental Science and Development (ICESD), 2014
- ALONSO, S.; MARTIN, P. Impact of foaming on surfactin production by *Bacillus subtilis*: Implications on the development of integrated in situ foam fractionation removal systems. **Biochemical Engineering Journal**. v.110, p. 125–133, 2016
- AMPARO, T. R.; BRAGA, V. C. C.; SEIBERT, J. B.; SOUZA, H. B.; TEIXEIRA, L. F. M. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma**. Ciências farmacêuticas. v. 30 p. 50-59, 2017
- ANDRADE, C. J. Estudo da Utilização do glicerol oriundo da cadeia do biodiesel por *Bacillus subtilis* para a produção de biossurfactante, enzimas e aromas. **Dissertação** (Mestrado em Ciência de alimentos), Universidade estadual de Campinas, Campinas 2011
- ANDRADE, C. J.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, L. M.; MENDES, A. M.; JAUREGI, P.; PASTORE, G. M. Comparative study: bench-scale surfactin production from *Bacillus subtilis* using analytical grade and concentrated glycerol from the biodiesel industry. **International Journal of Scientific World**. v. 5(1), p. 28-37, 2017.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustível. Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2022. Disponível para download: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2022/anuario-2022.pdf>; p. 193, 2022

APARNA, A., SRINIKETHAN, G., HEGDE, S. Isolation, Screening and Production of Biosurfactant by *Bacillus clausii* 5B. **Research in Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 49-56, 2012.

ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quim Nova*, v. 36, n. 6, p. 848-858, 2013

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G.; Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, vol. 31, p. 488. 1968

ATWA, N. A.; EL-SHATOURY, E.; ELAZZAZY, A.; ABOUZEID, M.; EL-DIWANY, A. Enhancement of surfactin production by *Bacillus velezensis* NRC-1 strain using a modified bench-top bioreactor. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. vol.11 (2), p. 169-174, 2013

BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P., JÚNIOR, M. R. M., PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BEECH, I. B. Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion. **Microbiology today**. v. 30, 2003

BINIARZ, P.; LUKASZEWICS, M. Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Appl. Microbiol Biotechnol*. v. 101, p. 4747-4759, 2017

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

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/biodiesel/programa-nacional-de-producao-e-uso-do-biodiesel-pnpb>. Acesso em 10 de junho de 2022.

BRUMANO, Larissa Pereira. Produção de biossurfactante por levedura utilizando fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar. **Tese** (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017

BUSTAMANTE, M.; DURÁN, N.; DIEZ, M. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. **Journal of soil science and Plant Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 667–687, 2012.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr Opin Microbiol**. v.7(3), p. 262-266, 2004

CAO, X.-H.; LIAO, Z.-Y.; WANG, C.-L.; YANG, W.-Y.; LU, M.-F. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive,

antimicrobial and antitumor activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 373–379, 2009.

CHATZIFRAGKOU, A.; PAPANIKOLAOU, S. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. **Appl. Microbial. Biotechnol.** v. 95, p. 13-27, 2012

CERESA, C.; FRACCHIA, L.; FEDELI, E.; PORTA, C.; BANAT, I.; Recent Advances in Biomedical, Therapeutic and Pharmaceutical Applications of Microbial Surfactants: Review. **Pharmaceutics.** v.13,p. 466, 2021

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

COOPER D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 408–412, 1981.

COOPER, D. G.; PADDOCK, D. A. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 47, p. 173-176, 1984

COSTA, G. A. N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. **Dissertação** (Ciências de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2005.

CRUZ, J. M., HUGHES, C., QUILTY, B., MONTAGNOLLI, R. N., BIDOIA, E. D. Agricultural Feedstock Supplemented with Manganese for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 4, p. 613-618, 2018

DANTAS, M. S.; FEITOSA, F. X.; ALENCAR, A. E. V.; SOARES, S. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; SANT'ANA, H. B. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. **Bioprocess Engineering Braz. J. Chem. Eng.** v. 31 (3), 2014

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

DEBON, J. Produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em condição anaeróbica. **Tese** (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. 165 p., Florianópolis, 2015.

DESAI, A. J.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol.** v. 61, p. 47-58, 1997

DHIMAN, R., MEENA, K. R., KANWAR, A. S. S., Biosurfactants and their screening methods. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 5, n. 10, p. 1-6, Índia, 2016.

DLAMINI, B. Downstream purification of surfactin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Dissertação**. Universidade de Stellenbosch. 2017

DLAMINI, B.; RANGARAJAN, V.; CLARKE, K. G. A simple thin layer chromatography based method for the quantitative analysis of biosurfactant surfactin vis-a-vis the presence of lipid and protein impurities in the processing liquid. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 25, 2020

EPFL- École polytechnique fédérale de Lausanne..TLC Visualization Reagents. Disponível em: [https://www.epfl.ch/labs/lcso/wp-content/uploads/2018/06/TLC\\_Stains](https://www.epfl.ch/labs/lcso/wp-content/uploads/2018/06/TLC_Stains). Acesso em 10 de novembro de 2021

DESAI, A. J.; BANAT, I. M.; Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Current Science**, v. 57, p. 500-501, 1997

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

FALK, Nancy A.; Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant **Antimicrobial Activity**. **J Surfact Deterg** , v. 22, p. 1119–1127. 2019

FARIA, A. F. Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual. **Tese** (Ciência de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2010.

FARIA, A. F., TEODORO-MARTINEZ, D. S., BARBOSA, G. N. O., VAZ, B. G., SILVA, I. S., GARCIA, J. S., TÓTOLAC, M. R., EBERLINB, M. N., GROSSMAND, M., ALVES, O. A., DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin ( $C_{14}/Leu_7$ ) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n.10, p. 1951-1957, 2011

FELIX, A. K. N., MARTINS, J. J. L., ALMEIDA, J. G. L., GIRO, M. E. A., CAVALCANTE, K. F.; MELO, V. M. M., PESSOA, O. D. L., ROCHA, M. V. P. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. **Colloids Surf B Biointerfaces**. v. 175, p. 256-263, 2019

GONÇALVES, L. R., AGUIAR, R. S. S. Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oilcontaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 175, p. 263, 2019



FERNANDES, P. A. V. Produção, extração e caracterização de surfactante por *Bacillus subtilis* R14. **Dissertação** (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2006

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. R., SANTOS, A. F. A. B.; ARAÚJO, A. A.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38. p. 704-709, 2007

FERRARI, E. F.; RIBEIRO, N. M.; COSTA, R. S. C.; OSÓRIO, R. A. L.; BELTRAME JR, M.; RIBEIRO, W. Cromatografia aplicada a etnofarmacologia para o desenvolvimento de novos fármacos . XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação. Universidade do Vale do Paraíba, 2018

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F; COELHO, M. A. Z. Produção de biosurfactante por leveduras. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2091-2099, 2008.

FRANZOL, A., REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, 2015.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E.; SANTOS, V. E.; MERCHUK, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 289-307, 2010

GHRIBI, D.; ZOUARI, N.; TRABELSI, H.; JAOUA, S. Improvement of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin Production by Overcome of Carbon Catabolite Repression Through Adequate Control of Aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 614-622, 2007

GONG, Z., YANG, G., CHE, C., LIU, J., SI, M., HE, Q. Foaming of rhamnolipids fermentation: impact factors and fermentation strategies. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 77, p. 1-12, 2021

HA, S.; KIM, H. M.; CHUN, H. H.; HWANG, I. M.; LEE, J. H.; KIM, J. C.; KIM, I. S.; PARK, H. W. Article Effect of Oxygen Supply on Surfactin Production and Sporulation in Submerged Culture of *Bacillus subtilis* Y9. *Appl. Sci*, v. 8, p. 1-10, 2018

HAFEZ, M.; ISA, M.;SHANNAQ, M. A. H. F.; MOHAMED, N.; HASSAN, A. R.; SHORGANI, N. K. N.; HAMID, A. A. Antibacterial Activity of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* MSH1. **Transactions on Science and Technology**. v. 4, n.3-3, p. 402-407, 2017

HAMILTON, W. A., Sulphate-reducing bacteria and their role in biocorrosion. In: *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*, FLEMMING, H. C., GEESEY, G. G. Berlin: Springer-Verlag, p. 187–193, 1991

HUANG, X.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LU, L.; The positive effects of Mn<sup>2+</sup> on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29. P. 381-389. 2015.

ISMAIL, W.; AL-ROWAIHI, I. S.; AL-HUMAM, A. A.; HAMZA, R. Y.; EL NAYAL, A. M.; BOUODINA, M. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. **Int. Biodeterior. Biodegradation**. v. 84, p. 168–178, 2013

JANEK, T., GUDIÑA, E. J., POŁOMSKA, X., BINIARZ, P., JAMA, D., RODRIGUES, L. R., RYMOWICZ, W., LAZAR, Z. Sustainable surfactin production by *Bacillus subtilis* using crude glycerol from different wastes. **Molecules**, v. 26, n. 12, 2021.

JAYARAMAN, A.; MANSFELD, F. B., WOOD, T. K. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 22, p. 167-175, 1999

JIA, R.; UNSAL, T.; XU, D.; LEKBACH, Y.; GU, T. Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: A state of the art review. **Int Biodeter Biodegr** v. 137, p. 42–58, 2019

JOHNSON, B. A.; HAGE, A.; KALVERAN, B.; et al.; Peptidoglycan associated cyclic lipopeptide disrupts viral infectivity. **Journal of virology**. V. 93; p. 22, 2019

JOSHI, S.; CHARUCHA, C.; DESAI, A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. **Bioresource Technology**. v. 99 p. 4603–4608, 2008

INÉS, M; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**. v. 71. p. 100–112, 2015

KAISERMAN, C. Bioprocess Intensification of Surfactin Production. Tese (Science and Engineering), School of Chemical Engineering and Analytical Science, University of Manchester. 2017

KHADYDJA, D.; SANTOS, F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of molecular Sciences**,v. 19, p. 401, 2016

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. **Desalination**. v.285, 2012

KIM, H.; YOON, B.; LEE, C.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 41-46, 1997.

KLAUSMANN, P., HENNEMANN, K., HOFFMANN, M., TREINEN, C., ASCHERN, M., LILGE, L., HERAVI, K. M., HENKEL, M., HAUSMANN, R. *Bacillus subtilis* high cell density fermentation using a sporulation-deficient strain for the production of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 10, p. 4141 – 4151, 2021

KLUGE, B.; VATER, J.; SALNIKOW, J.; ECKART, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Biomedical Division**. v. 231, p. 107-110, 1988

KORENBLUM, E.; ARAUJO, L. V.; GUIMARÃES, C. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G.; ABREU, F. NITSCHKE, M.; LINS, U.; FREIRE, D. M. G.; BARRETO-BERGTER, E.; SELDIN, L. Purification and characterization of a surfactin-like molecule produced by *Bacillus* sp. H2O-1 and its antagonistic effect against sulfate reducing bacteria. **BMC Microbiology**, v. 12:252, 2012

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **J. Colloid Interf. Sci.** v. 204, p. 1-8, 1998

LARINI, M.; REZENDE, M.; RIBEIRO, M.; MOREIRA-GASPARIN, F. Surfactina : estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência - Ciência e Tecnologia**, v. 17, p. 105–118, 2017.

LIU, J. F.; MBADINGA, S. M.; YANG, S. Z.; GU, J. D.; UM, B. Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. **Int. J. Mol. Sci.** v. 16, p. 4814-4837, 2015

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. **Biotechnol. Bioeng.** v. 1, p. 393–412, 1959

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14<sup>a</sup> ed., New York: Pearson Education, p. 602-605, 2015

MAGNUSON, R.; SOLOMON, J.; GROSSMAN, A. D. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. **Cell**. v. 77. p. 207–216, 1994

MAIER, R. M. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Soil, Water and Environmental Science**. v. 52, p. 101-121, 2003

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 37-42, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 367-372, 1999.

MARCELINO, P. F. Produção de biossurfactante de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2016

MARKANDE, A. R.; PATEL, D.; VARJANI, S. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. **Bioresource Technology**. v. 330, 2021

- MEENA, K. R., SHARMA, A., KANWAR, S. S. Antitumoral and Antimicrobial Activity of Surfactin Extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, 2019
- MOHAMMAD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, A. H. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 150, p. 289-303, 2008
- MOHANTY, S. S.; KOUL, Y.; VARJANI, S.; PANDEY, A.; NGO, H. H.; CHANG, J. S.; WONG, J. W. C.; BUI, X. T. A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. **Microbial Cell Factories**. 20:120, 2021
- MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1488, p. 211-218, 2000.
- MUBARAK, M. Q. E.; HASSAN, A. R.; HAMID, A. A.; KHALIL, S.; ISA, M. H. A Simple and Effective Isocratic HPLC Method for Fast Identification and Quantification of Surfactin. **Sains Malaysiana** v.44(1), p. 115–120, 2015
- MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel Decker: New York, cap.13, 1993
- NAKAO, K.; TANAKA, K.; ICHIICHI, S.; MIKAMO, H.; SHIBATA, T.; WATANABE, K. Susceptibilities of 23 *Desulfovibrio* Isolates from Humans. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 53. No. 12 p. 5308–5311, 2009
- NAUGHTON, P.; MARCHANT, R.; NAUGHTON, V.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. **Journal of Applied Microbiology**. v. 127, 2019
- NAZARETH, T. C.; ZANUTTO, C. P.; MAASS, D.; SOUZA, A. A. U.; SOUZA, S. M. A. G. U. Impact of oxygen supply on surfactin biosynthesis using brewery waste as substrate. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 9, 2021
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 USA, 2003
- NITSCHKE, M. Produção e caracterização de biosurfactante de *Bacillus subtilis*, utilizando manipueira como substrato. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola e ambiental). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005
- NITSCHKE, M., COSTA, S. G., HADDAD, R., GONÇALVES, L. A. G., EBERLIN, M. N., CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p.1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. Biosurfactant in food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 252-259, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M.; Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**. V. 25, p. 772-776, 2002

OPAS – Organização pan-americana de saúde; 2019 Disponível em [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=a](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=a). Acesso em 15 de novembro de 2021

PANCHABHAI, A. Application of biosurfactant for effective production of biocides from sulfate reducing bacteria. In: Inamuddin; ADETUNJI, C; ASIRI, A. Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Microbially-Derived Biosurfactants for Improving Sustainability in Industry. 1 ed. Elsevier. p. 367-377, 2021

PEITER, G. C.; ALVES, H. J.; DEQUINEL, R.; BAUTITZ, I. R. Alternativas para o uso do glicerol produzido a partir do biodiesel. **Revista brasileira de energias renováveis**. v.5, n.4, p.519-537, 2016

PENELUC, M. C. Pandemia de Covid-19 e destruição da natureza: uma crítica baseada no marxismo ecológico. **Voluntas: Revista Internacional De Filosofia**, v. 11, 2020

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechno**. v. 51, p. 553-563, 1999

PIZZATO, M. C. Ciência, Tecnologia, Sociedade e Ambiente. In: Cibele Schwanke. (Org.). Ambiente: Conhecimentos e Práticas. 1ed. Porto Alegre: Bookman, 2013, v. , p. 1-14.

PRETORIUS, D.; VAN ROOYEN, J.; CLARKE, K.G. Enhanced Production of Antifungal Lipopeptides by *Bacillus Amyloliquifaciens* for Biocontrol of Postharvest Disease. **New Biotechnology**, v. 32 (2), 2014.

PLAZA, G.; ACHAL, V. Biosurfactants: Eco-Friendly and Innovative Biocides against Biocorrosion. **Int. J. Mol. Sci**. v. 21, p. 1- 11, 2020

PLAZA, G. A., ZJAWIONY, I., BANAT, I. M., Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **J. Petro. Sci. Eng.**, 50, 71 (2006).

PURWASENAA, I. A.; ASTUTIA, D. I.; SYUKRONA, M.; AMANIYAHA, M.; SUGAIB, Y. Stability test of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* DS1 using experimental design and its application for MEOR. **Journal of Petroleum Science and Engineering**. v. 183, 2019

RAAIJMAKERS, J. J.; BRUIJN, I.; NYBROE, O.; ONGENA, M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. Mini review. **FEMS Microbiol Ver**. v. 34. p. 1037-1062. 2010

RAHMAN, F. B.; SARKAR, B.; MONI, R.; RAHMAN, M. S. Molecular genetics of surfactin and its effects on diferente sub-populations of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Reports**. v. 32, 2021

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ B.; BATAILLE P.; RAMSAY, J. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-Co- $\beta$ -Hydroxyvaleric) acids. **Applied and Envirommental Microbiology**, v56, p. 2093-2098, 1990.

RANGARAJAN, V.; CLARKE, K. Process development and intensification for enhanced production of Bacillus lipopeptides. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. v. 31, n. 1-2, p. 46-68, 2015

RAZA, M.; INAYAT, A.; JDAYIL, B. A. Crude Glycerol as a Potential Feedstock for Future Energy via Thermochemical Conversion Processes: A Review. **Sustainability**. v. 13, p. 2-27, 2021.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S.; Glicerol de Biodiesel. Biotecnologia, **Ciência e Desenvolvimeto**. v. 37, p. 44-51, 2012

RIVARDO, F.; TURNER, R. J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M. G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 83, p. 541-553, 2009

ROCHA, P. M. Produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC UFPEDA 438 utilizando melação de cana como substrato. **Dissertação** (Engenharia química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

ROCHA, P. M.; MENDES, A. C. S.; JÚNIOR, S. D. O.; PADILHA, C. E. A., LEITÃO, A. L. O. S., NOGUEIRA, C. C., MACEDO, G. R., SANTOS, E. S. Kinetic study and characterization of surfactin production by *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 using sugarcane molasses as carbono source. **Preparative biochemistry and biotechnology**. p. 1-9, 2020

RON, E.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants: minireview. **Environmental Microbiology**. v. 3, n. 4, p. 229-236, 2001

ROY, A.; A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. **J Fundam Renewable Energy Appl**. v. 8, 2017

SAJNA, K. V.; HÖFER, R.; SUKUMARAN, R. K.; GOTTUMUKKALA, L. D; PANDEY, A.; Industrial Biorefineries and White Biotechnology. Chapter 4: White Biotechnology in biosurfactants. p. 499 – 517, 2015

SAMUL, D.; LEJA, K.; GRAJEK, W. Impurities of crude glycerol and their effect on metabolite production. **Ann. Microbiol**. v. 64, p. 891–898, 2014

SANTOS, C. V. M.; VIEIRA, I. M. M.; SANTOS, B. L. P.; RUZENE, D. S.; SILVA, D. P. Ambiente & Sociedade concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da

natureza. CAP 22: Biossurfactantes – conceitos gerais e perspectivas. Editora científica. p. 320-342, 2021.

SANTOS, D. K.F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **Int. J. Mol. Sci.** v. 17, p. 1-31, 2016.

SARUBBO, L. A.; SILVA, M. G. C.; DURVAL, I. J. B.; BEZERRA, K. 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.** v. 181, 2022

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* . v. 30, p. 127-144, 2010.

SATPUT, S. K.; BANPURKAR, A. G.; BANAT, I. M.; SANGSHETTI, J. N.; PATIL, R. H.; GADED, W. N. Multiple Roles of Biosurfactants in Biofilms. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, p. 1429-1448, 2016

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgarg Blucher. v2. 541 p, 2001

SEN, R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 68, p. 263–270, 1997

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal.** v. 21, p. 141-148, 2004

SEYDLOVÁ, G., SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. **Central European Journal of Medicine**, v. 3, n. 2, p. 123-133, 2008.

SHAH, N., NIKAM, R., GAIKWAD, S., SAPRE, V., KAUR, J. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications Nikhil. **Indian Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 1, p. 5-10, 2016

SHALIGRAM N. S.; REKHA, S. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **Food Technol. Biotechnol**, vol 48, p. 119-134. 2010

SHARMA, D. (2016). Classification and Properties of Biosurfactants. In: *Biosurfactants in Food*. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. Springer, Cham. p. 21–42, 2016

SHEPPARD, J., D.; COOPER, D. G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 35, p. 72-76. 1991

SIEGMUND, I.; WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by pseudomonas species during growth on mineral agar, **Biotechnol. Tech.** v.5:4, p. 265-268, 1991

SIMIQUELI, A. P. R. Produção contínua de surfactina utilizando manipueira como substrato e estudo de sua aplicação em conjunto com óleos essenciais. **Tese** (Ciências de alimentos) 2014. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

SINGH, A. K.; SHARMA, P. Desinfectant-like activity of lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus tequelensis* strain SDS21. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 185, 2020.

SIVAPATHASEKARAN, C.; RAMKRISHNA, S. Origin, Properties, Production and Purification of Microbial Surfactants as Molecules with Immense Commercial Potential. V.54, **Tenside Surfactants Detergents**, 2017

SOUSA, J. R. Produção de biossurfactantes a partir da glicerina obtida da produção do biodiesel. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2008.

SOUSA, M. de. Bioconversão do glicerol para produção de biossurfactantes: aplicação no preparo de emulsões. **Dissertação** (Engenharia química). Universidade Federal do Ceará, 2011.

SOUSA, M.; DANTAS, I. T.; FELIZ, A. K. N.; SANT'ANA, H. B.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 2, p. 295-301, 2014.

SOUZA, T. M. F. S. V.; d'ARCE, M. A. B. R. Novos usos agregam valor à glicerina residual do biodiesel. **Visão agrícola.** n.8, p. 63-65, 2008.

SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Curr Opin Biotechnol.** v. 9(3), 1998

TREADWELL, F. P. **Tratado de Química Analítica in Gravimetria o análisis por pesadas.** Barcelona: Ed. Manuel Marín y CIA, 1956. p. 54–56.1956

THÉATRE, A.; PRIETO, C. C.; BARTOLINI, M.; LAURIN, Y.; DELEU, M.; NIEHREN, J.; FIDA, T.; GERBINET, S.; ALANJARY, M.; MEDEMA, M. H.; LÉONARD, A.; LINS, L.; ARABOLAZA, A.; GRAMAJO, H.; GROSS, H.; PHILIPPE, J. The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range: SYSTEMATIC REVIEW article. **Front. Bioeng. Biotechnol.** V. 2, 2021

UZOIGWE, C., BURGESS, J. G., ENNIS, C. J., Rahman, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015



VALPUESTA, Rayane Rodrigues Fonseca. Otimização da produção de biossurfactante por isolado *Bacillus subtilis* a partir de matéria prima renovável de baixo custo. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, **Dissertação** de mestrado, 140 p., 2008

VATER J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S. S. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry of Lipopeptide Biosurfactants in Whole Cells and Culture Filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 Isolated from Petroleum Sludge. **Appl Environ Microbiol.** v. 68, n. 12, 2002

VENKATA-RAMANA, K., KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions, **Jornal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 249-257

VOLLENBROICH, D.; OZEL, P. G.; VALTER, M. et al.; Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals.** V. 25(3). p. 289-97, 1997

WATTANAPHON, H. T.; KERDSIN, A.; THAMMACHAROEN, C.; SANGVANICH, P.; VANGNAI, A. S. A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 416–423, 2008.

WEI, Y. H.; WANG, L., F.; CHANG, J., S.; KUNG, S., S., Identification of Induced Acidification on Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, p. 174-178. 2003

WEI, Y. W.; CHU, I. M.; Enhancemet of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 22, p. 724-728. 1998

WEI, Y.-H.; LAI, C.-C.; CHANG, J.-S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enganced surfactin production by *Bacillus subtitllis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 40–45, 2007.

WEI, Y.W.; CHU, I.M.; Mn<sup>2+</sup> improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 479-482. 2002

WENDISCH, V. F.; LINDNER, S. N.; MEISWINKEL, T. M. Use of glycerol in biotechnological applications. **Biodiesel – Quality, Emissions and By-products.** p. 305–341, 2011

WILLENBACHER, J. YEREMCHUK, W., MOHR, T., SYLDATK, C., HAUSMANN, R. Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. **AMB Express** v. 5, n. 57, 2015

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5:13, 2012

YEH, M. S., WEI, Y. H., CHANG, J. S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*, **Process Biochem.** v. 41, p. 1799-1805, 2006

YOHAN, M.; LIU, J.F.; YANG, S.Z.; YE, R. Q.; UM, B. Z. Quantification of Lipopeptides using High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection after Derivatization. *Analytical Sciences*. **Analytical Sciences** v. 31, 2015

YOUSSEF, N.A.; DUNCAN, K.E.; NAGLE, D.P.; SAVAGE, K.N; KNAPP, R.M.; MCINERNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**.v. 86. p. 339-347, 2004.

ZANOTTO, A. W.; VALÈRIO, A.; ANDRADE, C. J.; PASTORE G. M. New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the Discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 103, p. 8647-8656, 2019

ZHAO, H.; SHAO, D.; JIANG, C.; SHI, J.; LI, QI.; HUANG, Q.; RAJOKA, M. S. R.; YANG, H.; JIN, M. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.101, p. 5951–5960, 2017

ZHI, Y.; WU, Q.; XU, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. **Scientif Reports**. v. 7, 2017

ZHOU, D.; HU, F.; LIN, J.; WANG, W.; LI, S. Genome and transcriptome analysis of *Bacillus velezensis* BS-37, an efficient surfactin producer from glycerol, in response to d-/l-leucine. **Microbiologyopen** v. 8, 2019

ZULKIFI, N. N.; MAHMOOD, S. M.; AKBARI, S.; MANAP, A. A. A.; KECHUT, N. I.; ELSAIS, K. A. Evaluation of new surfactants for enhanced oil recovery applications in high-temperature reservoirs. **Journal of Petroleum Exploration and Production Technology**, 2019