



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BIANCA JESUS VICENTE

**PRODUÇÃO BACTERIANA DE MOLÉCULAS
TENSOATIVAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS**

Londrina
2024



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



BIANCA JESUS VICENTE

**PRODUÇÃO BACTERIANA DE MOLÉCULAS
TENSOATIVAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS**

Londrina
2024

BIANCA JESUS VICENTE

**PRODUÇÃO BACTERIANA DE MOLÉCULAS
TENSOATIVAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Guillen
Moreira Gasparin

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V632p Vicente, Bianca Jesus.
 PRODUÇÃO BACTERIANA DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS / Bianca Jesus Vicente. - Londrina, 2024.
 96 f. : il.

 Orientador: Fabiana Guillen Moreira Gasparin .
 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.
 Inclui bibliografia.

 1. Biossurfactante - Tese. 2. Bacillus cereus - Tese. 3. Lipopeptídeos - Tese. 4. Surfactina - Tese. I. Gasparin , Fabiana Guillen Moreira . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

BIANCA JESUS VICENTE

PRODUÇÃO BACTERIANA DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Guillen Moreira Gasparin
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Franciely Grose Colodi
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, ____ de ____ de ____.

Dedico este trabalho àqueles que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me dado forças, por sempre ser meu guia em minhas decisões e nunca desanimar com um fracasso momentâneo. Sem Ele, tudo teria se resumido a nada.

Agradeço especialmente à minha mãe, Elisabete, pelo seu amor incondicional, pelas suas promessas, sua força, seu apoio e por ter se esforçado tanto para a realização dos meus sonhos. Por ser o maior exemplo de vida que eu conheço, meu porto seguro, minha base, minha amiga, conselheira e meu anjo da guarda em todos os aspectos da minha vida. Sem você, nada disso seria possível e cada vitória em minha vida é por você, mãe.

Ao meu pai, Antônio, meus irmãos Letícia e Miguel e meu padrasto Daniel, pelo carinho, paciência, por sempre me apoiar e incentivar em todas as decisões que tomei. Sou muito feliz e grata por ter vocês em minha vida.

A minha orientadora, professora Dra. Fabiana Guillen Moreira Gasparin, que sempre se dedicou em me ensinar, agradeço o carinho, apoio e confiança em mim depositada. Muito obrigada.

A professora Dra. Maria Inês Rezende, pelos ensinamentos, apoio, conselhos e carinho durante a minha trajetória na UEL.

A Professora Dra. Daniele Sartori, pelo microrganismo cedido e por sempre estar presente para dar conselhos para a pesquisa.

Ao professor Dr. Doumit Camilios Neto, por estar sempre disponível para resolver algum problema e dar conselhos para ajudar no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, em especial ao técnico Nelson Janeiro Rodrigues, por toda ajuda e conhecimentos fornecidos.

A profa. Dra. Lígia Carla Faccin Gualhardi, do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LAVIR), pela ajuda durante a realização dos testes de atividade antiviral.

Ao meu amigo Rodolfo, uma grande amizade que fiz na pós-graduação, sou muito grata pela sua amizade, conselhos, conversas e toda a sua ajuda.

A todos os meus amigos de pós-graduação, em especial à Beatriz Ticiani, Briani, Dâmaris, Nilton, Enya, Beatriz Cortellini, Tainã e Ariane. São as pessoas que, no meu dia a dia, eu sei que estarão lá, seja para um momento de descontração ou mesmo para dividir um problema. Muito obrigado pelos momentos inesquecíveis.

Ao meu amigo Sadi, por todas as risadas, conversas e companhia. Os anos se passam, mas a nossa amizade nunca enfraquece, que continue assim pelo resto de nossas vidas. Sua amizade é essencial para mim.

À Universidade Estadual de Londrina pela formação acadêmica e à Capes pelo financiamento desta pesquisa e pela bolsa concedida.

Aos membros da banca, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

E a todos os que eu não citei o nome, mas que foram muito importantes para a conclusão dessa etapa, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

VICENTE, BIANCA JESUS. **PRODUÇÃO BACTERIANA DE MOLÉCULAS TENSOATIVAS PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS**. 2024. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

Produzidos por microrganismos, os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, biodegradáveis e de baixa toxicidade, com propriedades emulsificantes e tensoativas, além de possuírem maior estabilidade do que os surfactantes sintéticos sob condições extremas. Este estudo teve por objetivo produzir, extrair, caracterizar e aplicar biossurfactantes oriundos de bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* isoladas de alho roxo comercializado na região norte do Paraná. Para tanto, realizou-se um teste inicial com o intuito de verificar a capacidade de produção de biossurfactante das bactérias. A linhagem que produziu o biossurfactante com melhor índice de emulsificação de 24h (IE24) foi selecionada para prosseguimento da pesquisa. Após a seleção, avaliou-se a produção de biossurfactante em meios de cultivo com diferentes composições. Em seguida, verificou-se a estabilidade da emulsão em função de tempo, temperatura, pH e concentração salina. Avaliou-se a atividade emulsificante com diferentes compostos hidrofóbicos, a capacidade de dispersão de óleo de motor usado, a citotoxicidade, a atividade antiviral e antioxidante. Além disso, realizou-se a caracterização do biossurfactante extraído. *Bacillus cereus* UELAsF2.2 apresentou um IE24 ($58,53 \pm 4,01\%$) superior às demais culturas ($p < 0,05$), sendo escolhida para o prosseguimento do estudo. Dentre os diferentes meios de cultivo testados, os melhores resultados de IE24 foram nos meios Dyg's total ($64,87 \pm 2,2\%$), Dyg's sem glicose ($62,13 \pm 0,7\%$), Dyg's sem glicose + 2% de óleo de soja usado ($60,8 \pm 1,6\%$), Dyg's sem glicose e peptona + 2% de óleo de soja usado ($60,43 \pm 0,6\%$) e Dyg's sem glicose e extrato de levedura + 2% de óleo de soja usado ($63,47 \pm 0,5\%$), não havendo diferença estatística entre eles. Os biossurfactantes produzidos nessas condições apresentaram ainda, capacidade de emulsificação para compostos hidrofóbicos como hexadecano (IE24= 64,5%), estabilidade da emulsão ao longo de 60 dias e frente a variações de temperatura e salinidade. Foi possível verificar que o meio de cultivo teve influência na estabilidade frente a variações de pH. O biossurfactante não foi considerado citotóxico para a linhagem celular Vero ATCC CCL81, com mais de 70% de viabilidade celular na concentração de 500 µg/mL. O

biosurfactante exibiu atividade antiviral contra o Herpes vírus simples 1 (HSV-1) (cepa KOS) com 100% de inibição na concentração de 400 µg/mL. Apresentou também atividade antioxidante, determinada pelos métodos DPPH• e inibição dos radicais ABTS. As análises de FT-IR e HPLC mostraram que o biosurfactante produzido pela bactéria *Bacillus cereus* apresenta similaridades químicas de surfactina, pertencente à classe dos lipopeptídeos.

Palavras-chaves: Biosurfactante; *Bacillus cereus*; Lipopeptídeos e Surfactina.

ABSTRACT

VICENTE, BIANCA JESUS. **BACTERIAL PRODUCTION OF SURFACTANT MOLECULES FOR BIOTECHNOLOGICAL PURPOSES.** 2024. 96 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology), State University of Londrina, Londrina, 2024.

Produced by microorganisms, biosurfactants are amphipathic, biodegradable, and low-toxicity molecules with emulsifying and tensioactive properties, as well as greater stability under extreme conditions compared to synthetic surfactants. This study aimed to produce, extract, characterize, and apply biosurfactants derived from bacteria of the *Acinetobacter*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* genera isolated from commercially available purple garlic in the northern region of Paraná. To achieve this, an initial test was conducted to verify the biosurfactant production capacity of the bacteria. The strain that produced the biosurfactant with the best emulsification index of 24h (EI24) was selected for further investigation. After selection, biosurfactant production was evaluated in culture media with different compositions. The stability of the emulsion was then assessed concerning time, temperature, pH, and saline concentration. The emulsifying activity with different hydrophobic compounds, the dispersion capacity of used engine oil, cytotoxicity, antiviral and antioxidant activity were evaluated. Furthermore, the extracted biosurfactant was characterized. *Bacillus cereus* UELAsF2.2 exhibited a superior EI24 ($58.53 \pm 4.01\%$) compared to other cultures ($p < 0.05$) and was chosen for further study. Among the different culture media, the best results were obtained in Dyg's total ($64.87 \pm 2.2\%$), Dyg's without glucose ($62.13 \pm 0.7\%$), Dyg's without glucose + used soybean oil (60.8 ± 1.6), Dyg's without glucose + used soybean oil ($60.43 \pm 0.6\%$), and Dyg's without glucose + used soybean oil ($63.47 \pm 0.5\%$), with no statistical difference between them. The biosurfactants produced under these conditions also showed emulsification capacity for hydrophobic compounds such as hexadecane (IE24= 64.5%), emulsion stability over 60 days and against variations in temperature and salinity. It was possible to verify that the cultivation medium had an influence on stability against pH variations. The biosurfactant was not considered cytotoxic for the Vero ATCC CCL81 cell line, with more than 70% cell viability at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$. The biosurfactant exhibited antiviral activity against Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) (strain KOS) with 100% inhibition at a concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$. It also presented antioxidant activity,

determined by the DPPH• and inhibition of the ABTS radical methods. FT-IR and HPLC analyzes revealed that the biosurfactant produced by the bacteria *Bacillus cereus* is a surfactin, belonging to the lipopeptide class.

Key words: Biosurfactant; *Bacillus cereus*; Lipopeptides and Surfactin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da força de atração entre as moléculas da superfície e moléculas internas em um meio fluido, sem biossurfactante (A) e após adição do biossurfactante (B)	24
Figura 2 – Ilustração representativa da formação de micelas em meio apolar (A) e meio polar (B)	24
Figura 3 – Estrutura dos principais biossurfactantes da classe dos glicolipídios: (A) ramnolipídios e (B) soforolipídio	26
Figura 4 – Estrutura química de congêneres representativo de iturina	28
Figura 5 – Estrutura química da isoforma da surfactina	29
Figura 6 – Representação da classificação dos congêneres de surfactina	29
Figura 7 – Esquema da biossíntese de surfactina em <i>Bacillus</i>	31
Figura 8 – Estrutura química da molécula de fosfolipídios	32
Figura 9 – Representação do processo de avaliação do índice de emulsificação de 24 horas do biossurfactante	52
Figura 10 – Processo de extração e recuperação do biossurfactante	56
Figura 11 – Avaliação da estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) ao longo de 60 dias	66
Figura 12 - Estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) frente a variações de pH	68

Figura 13 – Estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) frente a variações de temperatura em diferentes tempos	70
Figura 14 – Estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) frente a variações de concentrações de salinidade	72
Figura 15 – Propriedade emulsificante dos biossurfactantes presente no extrato bruto livres de células dos meios A, B e C	75
Figura 16 – Imagens do teste de dispersão em óleo de motor usado com biossurfactantes produzidos em diferentes meios de cultivos	77
Figura 17 – Espectro FT-IR do biossurfactante produzido por <i>Bacillus cereus</i> e padrão de surfactina de <i>Bacillus subtilis</i> ≥98,0% (HPLC) Sigma-Aldrich	79
Figura 18 – Cromatogramas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do biossurfactante (A) padrão Surfactina de <i>Bacillus subtilis</i> ≥98,0% (HPLC) Sigma-Aldrich e (B) produzido por <i>Bacillus cereus</i>	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais tipos de biossurfactantes e seus respectivos microrganismos produtores	34
Quadro 2 – Microrganismos, substratos utilizados como fonte de nutrientes e condições de cultivo empregadas na produção de biossurfactantes	38
Quadro 3 – Processos empregados na recuperação de biossurfactante e suas vantagens	40
Quadro 4 – Empresas que comercializam biossurfactantes	48
Quadro 5 - Produção do biossurfactantes em diferentes meios de cultivo	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Avaliação da produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo através do teste IE24	64
Tabela 2 – Resultados da avaliação da atividade citotóxica do biossurfactante produzido pela bactéria <i>Bacillus cereus</i> em células VERO ATCC CCL81	81
Tabela 3 – Resultado da avaliação do percentual de inibição do HSV-1 pelo biossurfactante produzido pela bactéria <i>Bacillus cereus</i>	83

SÚMARIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1	BIOSSURFACTANTES.....	22
3.1	Propriedades	22
3.1.2	Classificação	25
3.1.2.1	Glicolipídios	25
3.1.2.2	Lipopeptídeos	26
3.1.2.2.1	<i>Iturina</i>	27
3.1.2.2.2	<i>Surfactina</i>	28
3.1.2.2.3	<i>Síntese de lipopeptídeos cíclicos</i>	30
3.1.2.3	Fosfolipídios	31
3.1.2.4	Biossurfactantes poliméricos	32
3.1.2.5	Biossurfactantes particulados	32
3.2	MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSURFACTANTES.....	32
3.3	CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES.....	344
3.3.1	Aproveitamento De Resíduos Como Fonte De Nutrientes	36
3.4	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	38
3.5	EXTRAÇÃO DE BIOSURFACTANTES	39
3.6	APLICAÇÕES DE BIOSURFACTANTES	41
3.6.1	Biorremediação	41
3.6.2	Limpeza De Reservatório De Óleo	42
3.6.3	Área Farmacêutica	42
3.6.4	Produtos Cosméticos E De Higiene	43
3.6.5	Indústria Alimentícia	44

3.6.6	Área Agrícola	46
3.7	BIOSSURFACTANTES NO MERCADO MUNDIAL	46
4.	MATETIAL E MÉTODOS	49
4.1	MICRORGANISMOS E CÉLULAS	49
4.1.1	Bactérias	49
4.1.2	Vírus Herpes Simples 1 (HSV-1)	49
4.1.3	Células Vero (ATCC CCL 81)	49
4.2	MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	49
4.2.1	Meios e Condição de Cultivo Para Cultura de Células Vero (ATCC CCL81)	49
4.2.2	Meios e Condição de Cultivo Para Produção De Estoque Viral	50
4.2.3	Meio e Condição de Cultivo Para Produção De Estoque Bacteriano	50
4.2.4	Processo Fermentativo Para Produção De Biossurfactante	51
4.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE	51
4.3.1	Teste De Índice De Emulsificação	51
4.3.2	Efeito Da Composição Do Meio Na Produção de Biossurfactante	52
4.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE	53
4.4.1	Efeito do Tempo na Estabilidade dos Biossurfactantes	53
4.4.2	Estabilidade Frente a Variações De pH	53
4.4.3	Efeito da Temperatura em Diferentes Tempos de Aquecimento	53
4.4.4	Estabilidade Frente a Variações de Concentração de NaCl	53
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE EM DIFERENTES COMPOSTOS HIDROFÓBICOS	54
4.6	TESTE DE DISPERSÃO EM ÓLEO	54
4.7	EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DO BIOSURFACTANTE	54
4.8	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BIOSURFACTANTE	56
4.8.1	Espectroscopia No Infravermelho Por Transformada De Fourier (FT-IR)	56
4.8.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	57
4.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	57

4.9.1	Citotoxicidade	57
4.9.2	Análise de Atividade Antiviral <i>In Vitro</i>	58
4.9.3	Investigação do Mecanismo Antiviral <i>In Vitro</i>	59
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE	60
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	SELEÇÃO DO MICROORGANISMO PRODUTOR DE BIOSSURFACTANTE	62
5.2	PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	63
5.3	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE	65
5.3.1	Efeito do Tempo na Estabilidade dos Biossurfactantes	65
5.3.2	Estabilidade Frente a Variações De pH	66
5.3.3	Efeito da Temperatura em Diferentes Tempos de Aquecimento	69
5.3.4	Estabilidade Frente a Variações de Concentração de NaCl	71
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE EM DIFERENTES COMPOSTOS HIDROFÓBICOS	73
4.5	TESTE DE DISPERSÃO EM ÓLEO	76
5.6	EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	78
5.6.1	Extração	78
5.6.2	Análise por Espectroscopia de Infravermelho FT-IR	78
5.6.3	Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	79
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	80
5.7.1	Citotoxicidade	80
5.7.2	Avaliação Antiviral e Mecanismo de Ação do Biossurfactante	81
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDADE	83
6.	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos químicos caracterizados pela sua capacidade de diminuição da tensão superficial e pela sua atividade emulsificante. A maior parte dos surfactantes utilizados pelas indústrias tem a sua origem derivada do petróleo, sendo denominado de surfactante de origem química ou petroquímica (BJERK et al., 2021; FELIPE; DIAS, 2017).

Apesar de serem muito explorados em diversos campos e terem uma ótima eficácia nos produtos utilizados, nos últimos anos vem se buscando uma nova alternativa para os surfactantes de origem química. A utilização de produtos derivados do petróleo tem a grande desvantagem de serem derivados de uma fonte não renovável e que também traz grandes prejuízos para o meio ambiente (BJERK et al., 2021; NAUGHTON et al., 2019).

A produção, utilização e o descarte de surfactante de origem química geram grandes danos ao ambiente, principalmente aos corpos hídricos, pois quando são descartados nessas águas, acabam reduzindo a tensão superficial e assim diminuindo a taxa de evaporação, além de aumentar a solubilidade de compostos orgânicos ali presentes. Além disso, a formação de espuma que os surfactantes provocam, dificulta a penetração dos raios solares, reduz a solubilidade do oxigênio e como consequência acaba provocando a morte dos seres que habitam aquele ecossistema (FELIPE; DIAS, 2017).

Em virtude dos problemas causados pelos surfactantes sintéticos, nos últimos anos vem se destacando os biossurfactantes, que são uma alternativa para os surfactantes derivados do petróleo. Os biossurfactantes possuem as mesmas características físico-químicas dos surfactantes convencionais, além de terem mais benefícios, como estabilidade de suas propriedades e biodegradabilidade (MARCELINO, 2017).

Biossurfactantes ou biotensoativos são surfactantes de origem microbiana, que podem ser produzidos através do metabolismo de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. São compostos que possuem características anfipáticas, isto é, possuem em sua estrutura grupos hidrofóbicos (apolares) e hidrofílicos (polares) (ALMEIDA et al., 2020; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

A maior parte dos biossurfactantes citados na literatura é produzida por microrganismos como *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.* e *Candida sp.* isolados dos mais diversos ambientes. Neste estudo foi avaliado a produção de biossurfactantes por bactérias (*Acinetobacter rudis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas putida*) isoladas de alhos comercializados no norte do Paraná. A estabilidade da atividade emulsificante, a capacidade de emulsificação, propriedades biológicas (citotoxicidade, atividade antiviral e antioxidante) e a identidade química do biossurfactante foram também objetivos de estudo neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de produção e aplicação de biossurfactantes por bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* isoladas de alho roxo comercializado no norte do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar isolados bacterianos como produtores de biossurfactantes;
- Avaliar a produção de biossurfactantes bacterianos em fermentação submersa variando a composição do meio;
- Selecionar o microrganismo com maior potencial para produzir biossurfactantes;
- Aplicar métodos qualitativos de atividade emulsificante e dispersão em óleo para identificar microrganismos produtores de biossurfactantes;
- Avaliar a estabilidade da atividade emulsificante frente a variações de tempo, pH, salinidade e temperatura;
- Avaliar a capacidade do biossurfactante em emulsionar diferentes compostos hidrofóbicos;
- Avaliar as propriedades biológicas de atividade citotóxica, atividade antiviral e seu mecanismo de ação e atividade antioxidante;
- Caracterizar quimicamente os biossurfactantes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOSSURFACTANTES

3.1.1 Propriedades

Os biossurfactantes são surfactantes de origem microbiana que podem ser produzidos pelo metabolismo de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. São compostos com características anfipáticas, isto é, possuem em sua estrutura grupos hidrofóbicos (apolares) e hidrofílicos (polares) (BJERK et al., 2021; ALMEIDA et al., 2020; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

A produção desse metabólito está relacionada à sobrevivência e à adaptação, uma vez que, através da sua produção, o microrganismo pode aumentar a solubilidade de compostos, e dessa forma, ter maior disponibilidade e competitividade por nutrientes, permitindo o seu crescimento e aumentando as chances de sobrevivência no ambiente (FELIPE; DIAS, 2017; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Biossurfactantes possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial (ar-água) ou interfacial (óleo-água) e apresentam também atividade emulsificante. Além disso, são estáveis quando expostos a condições extremas de pH e temperatura, o que é uma grande vantagem, pois os surfactantes de origem química tornam-se inativos quando submetidos a variações extremas de temperatura, pH e salinidade (OLIVEIRA et al., 2022; BJERK et al., 2021; ALMEIDA et al., 2020; NAGY, 2018).

Biossurfactantes possuem baixa toxicidade e são mais biodegradáveis quando comparados com os surfactantes de origem química, além de poderem ser produzidos a partir de fontes renováveis e por diversos microrganismos (WANG et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2022; BJERK et al., 2021; ALMEIDA et al., 2020; NAGY, 2018).

Os surfactantes produzidos por microrganismos podem apresentar diferenças na estrutura, composição química e propriedades. E essas características físico-químicas podem ser influenciadas pelas condições do meio onde o microrganismo se desenvolve para produzir esse metabólito específico, como por exemplo, a natureza dos substratos, as concentrações de íons, o meio de cultura e condição utilizada durante o processo fermentativo (OLIVEIRA et al., 2022; ALMEIDA et al., 2020).

Como mencionado anteriormente, os biossurfactantes possuem a capacidade de diminuir a tensão superficial de um meio líquido. A tensão superficial é um fenômeno físico que ocorre na superfície de um líquido, devido ao desequilíbrio entre as forças de atração entre as moléculas da superfície, resultando na formação de uma camada elástica nessa superfície. As moléculas internas e superficiais do meio líquido diferem entre si pelas forças as quais são submetidas. As moléculas do interior sofrem uma atração por todas as moléculas que estão ao seu entorno, essa interação faz com que se tenha uma força de coesão nula no interior do meio. Já na superfície, ocorre uma desigualdade na força de coesão, as moléculas na superfície sofrem uma atração para a lateral e para o interior do meio, isso acaba gerando a tensão superficial (FIGURA 1A) (BATISTA, 2022; MARCELINO, 2017).

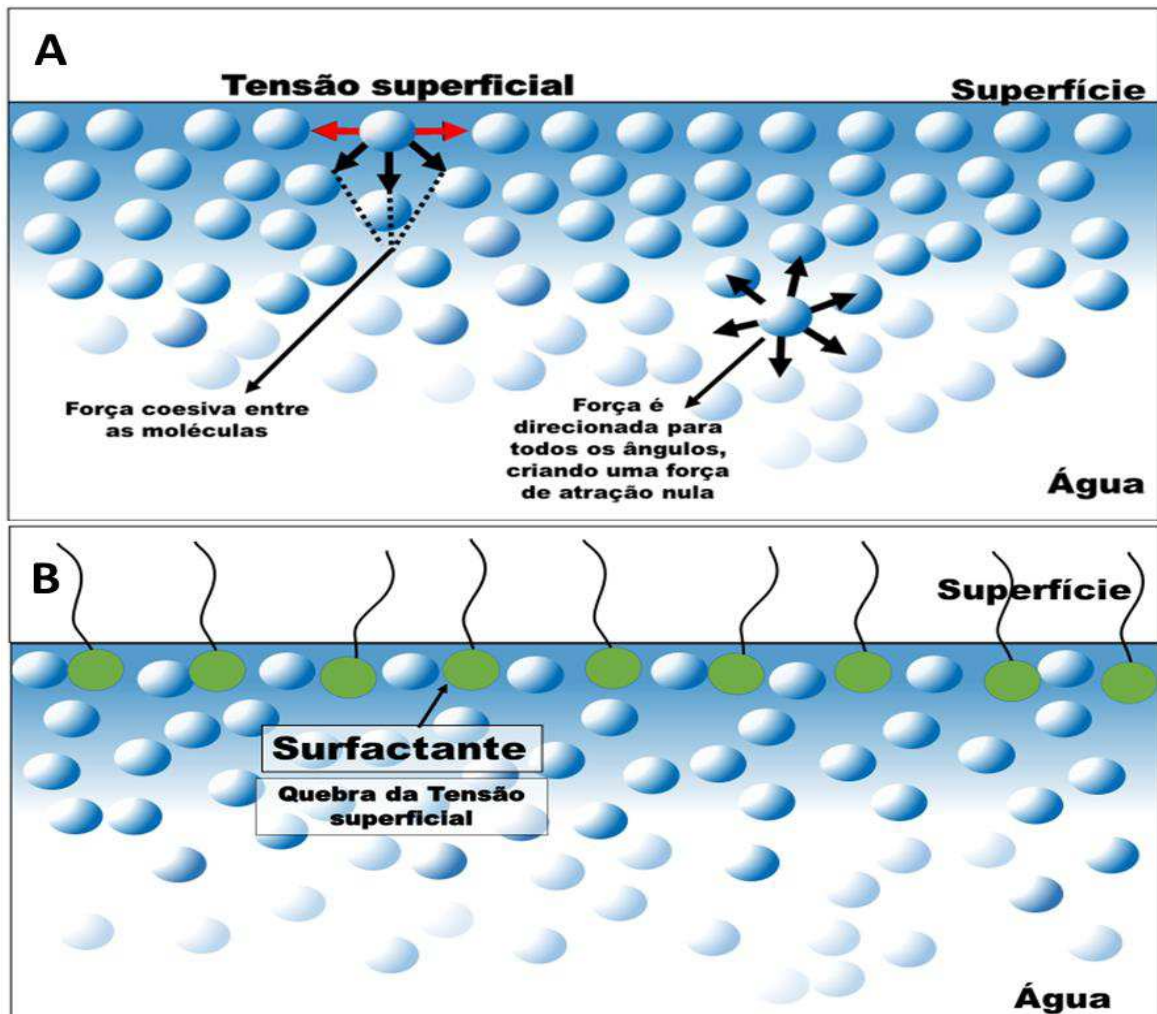
A presença de porções hidrofílica e hidrofóbica na estrutura dos biossurfactantes permite que ele se distribua pela superfície do líquido ou nas interfaces de compostos insolúveis. Esta distribuição pela interface provoca redução da força de coesão entre as moléculas do líquido, o que faz com que diminua a tensão superficial e interfacial (FIGURA 1B). É considerado um biossurfactante eficiente, aquele que for capaz de diminuir a tensão superficial da água de 72 miliNewton por metro (mN/m) para o valor para 30 mN/m (BJERK et al., 2021; NAGY, 2018).

O biossurfactante consegue reduzir a tensão superficial até chegar a um nível crítico, denominado Concentração Micelar Crítica (CMC), a qual é definida como a concentração mínima de biossurfactante necessária para a redução máxima da tensão superficial, situação na qual começa a formação de micelas (DURVAL et al., 2019; NAGY, 2018; FELIPE; DIAS, 2017; SANTOS; SILVA; COSTA, 2016).

A formação das micelas começa quando as moléculas de tensoativo se reúnem, formando uma estrutura que se adapta ao meio em que está presente. Em meio apolar, a parte hidrofóbica da molécula fica voltada para fora (Figura 2A). Já em meio polar, a parte hidrofílica fica voltada para fora da micela, como mostra a Figura 2B (DURVAL et al., 2019; NAGY, 2018; SANTOS; SILVA; COSTA, 2016).

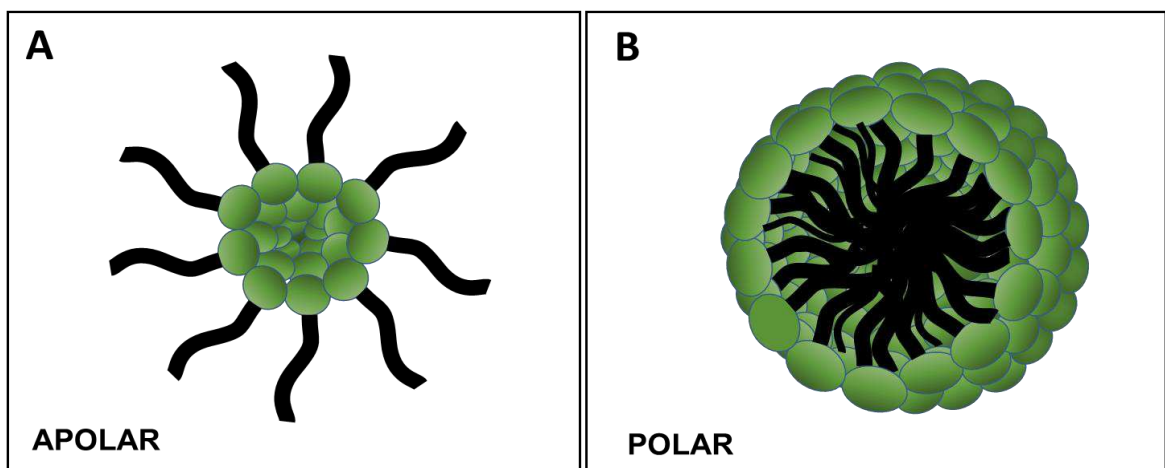
Em comparação aos surfactantes químicos, os surfactantes de origem microbiana são mais eficientes porque diminuem ainda mais a tensão superficial, apresentando valores menores de CMC. Dado que, para uma diminuição máxima da tensão superficial, é necessária uma quantidade menor de biossurfactante (DRAKONTIS; AMIN, 2020).

Figura 1 – Representação da força de atração entre as moléculas da superfície e moléculas internas em um meio fluido, sem biossurfactante (A) e após adição do biossurfactante (B)



Fonte: "Adaptado de" BATISTA (2022).

Figura 2 – Ilustração representativa da formação de micelas em meio apolar (A) e meio polar (B)



Fonte: Autoria própria.

A emulsão é um sistema polifásico, onde líquidos imiscíveis se encontram em uma fase fragmentada dispersa em uma fase contínua. Esse sistema possui uma estabilidade variável, e a partir de um dado tempo (minutos a alguns anos), as fases que o compõem se separam (MARCELINO, 2017; FRANZOL; REZENDE, 2015).

Alguns biossurfactantes possuem a propriedade de estabilizar emulsões, fazendo com que eles retardem a separação entre as fases imiscíveis, tendo assim uma ação emulsionante. E um importante parâmetro para avaliar essa ação emulsificante é através do Índice de Emulsificação (IE), sendo considerado um bom agente emulsificante aquele com capacidade de manter a estabilidade de substâncias com diferentes graus de polaridades com valores de IE acima de 50% após 24 horas (MAIA, 2017; MARCELINO, 2017; BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

3.1.2 Classificação

A porção polar dos biossurfactantes pode ser simples, sendo composta por um carboxilato ou um grupo hidroxil, ou também podendo ser composta por fosfato, carboidrato e aminoácidos. A porção apolar quase sempre é composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos (saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados) (NAGY, 2018; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

A classificação dos biossurfactantes ocorre de acordo com a sua estrutura e com o microrganismo produtor, assim são classificados em: glicolipídios, lipopeptídeos, fosfolipídios, compostos poliméricos e lipídios neutros (WANG et al., 2023; OLIVEIRA et al., 2022; ALMEIDA et al., 2020; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

3.1.2.1 Glicolipídios

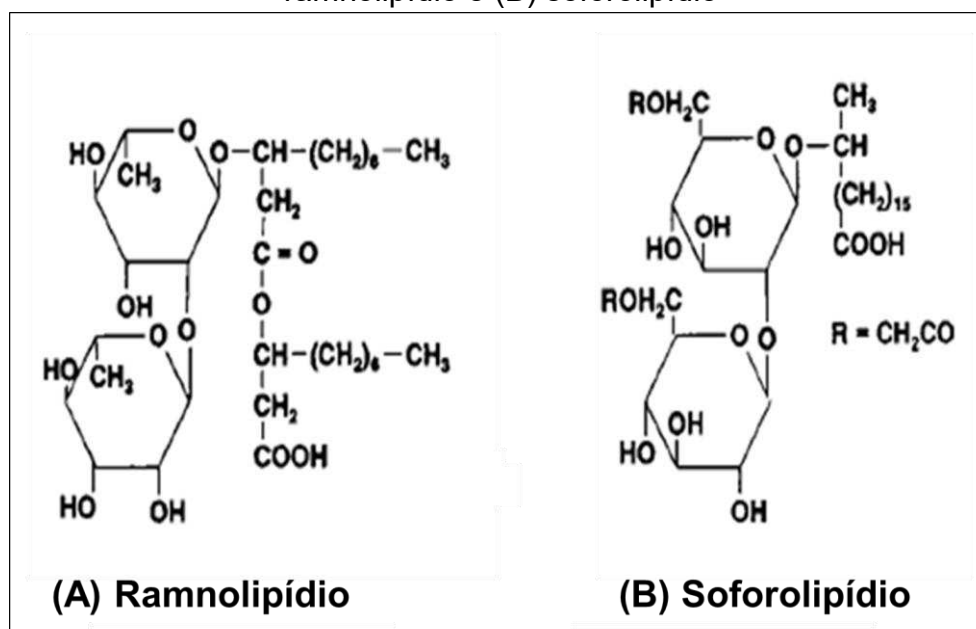
Glicolipídios correspondem a um dos grupos mais amplos de biossurfactantes, são compostos por ácidos graxos e carboidratos, tendo como principais exemplos os ramnolipídios, soforolipídios, manosileritritol lipídio e trealolipídios. As bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre os microrganismos mais descritos na literatura como produtoras de biossurfactantes desta classe, sendo

a *P. aeruginosa* a mais relatada como produtora de ramnolipídio (OLIVEIRA et al., 2022; RAHEEL et al., 2022; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

O ramnolipídio apresenta em sua estrutura unidades de ramnose ligadas a uma, duas ou três cadeias de ácido β -hidroxidecanóico, o qual pode apresentar comprimento variado de 8 a 22 carbonos (Figura 3A). Diferentes substratos usados no processo fermentativo para o desenvolvimento do microrganismo, como alcenos, citratos, glicose, frutose, azeite de oliva, entre outros, influenciam nas características físico-químicas dos ramnolipídios produzidos (OLIVEIRA et al., 2022; DRAKONTIS; AMIN, 2020; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Já os soforolipídios são produzidos por leveduras e apresentam em sua estrutura um dissacarídeo (soforose) ligado a um ácido graxo contendo um grupo hidroxil (Figura 3B). E a levedura *Starmerella bombicola* se destaca como principal produtora desse biossurfactante (TO et al., 2023; WANG et al., 2023; VIEIRA et al., 2021; BJERK et al., 2021).

Figura 3 - Estrutura dos principais biossurfactantes da classe dos glicolipídeos: (A) ramnolipídio e (B) soforolipídio



Fonte: Adaptado de DESAI; BANAT (1997).

3.1.2.2 Lipopeptídeos

Os lipopeptídeos são a classe de biossurfactante mais estudada. Esses biossurfactantes são compostos por porções lipídicas ligadas a uma cadeia peptídica,

com seus aminoácidos dispostos em forma cíclica (VALDÉS-VELASCO et al., 2022; BJERK et al., 2021).

Existem pelo menos 263 compostos lipopeptídeos que são reunidos em 31 famílias, sendo produzidos por 11 gêneros diferentes de bactérias e fungos. As bactérias do gênero *Bacillus* são as mais estudadas e relatadas como produtoras dessa classe. É possível que diferentes linhagens de bactérias possam produzir moléculas de biossurfactante com estruturas semelhantes, e uma mesma linhagem pode ser capaz de sintetizar simultaneamente lipopeptídeos pertencendo a diferentes famílias (ZHOU et al., 2020; SANTIAGO, 2019; COUTTE et al., 2017).

Essa classe de biossurfactantes apresentam propriedade emulsificante e a maioria dos lipopeptídeos possuem atividades antimicrobianas, quando interagem solubilizando a bicamada lipídica das membranas biológicas (SANTIAGO, 2019; COUTTE et al., 2017).

Os principais representantes dessa classe são a surfactina e iturina, que se distinguem entre si pelo comprimento da cadeia carbônica e a sequência de aminoácidos (SANTIAGO, 2019).

3.1.2.2.1 Iturina

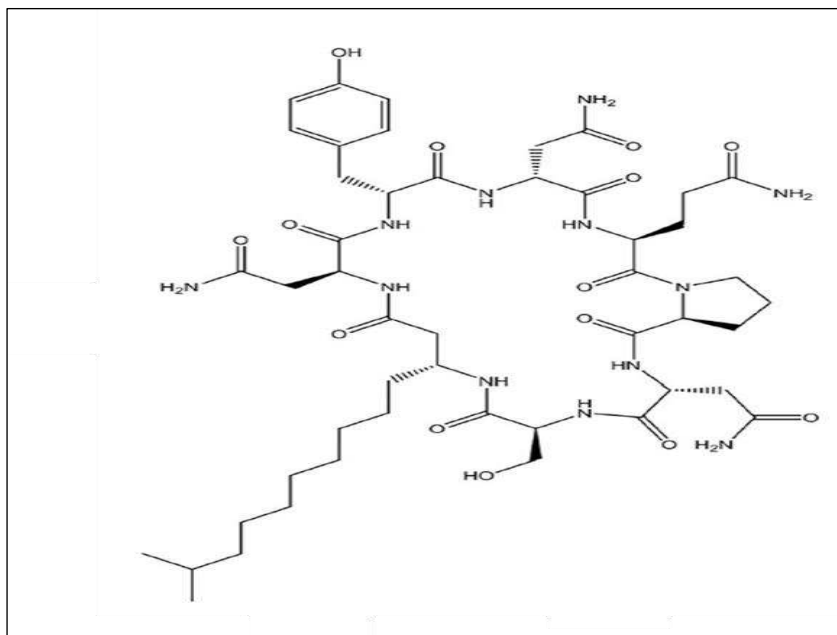
Iturina é uma família de lipopeptídeos cíclicos, que apresenta diferenças estruturais dentro dos seus membros da família, tendo uma estrutura peptídica cíclica composta por sete α -aminoácidos, um β -aminoácido e um ácido graxo com comprimento que varia de C14 a C17 (CAROLIN C; KUMAR; NGUEAGNI, 2021; MNIF; GHRIBI, 2015).

A família Iturina é composta pela Iturina A, D e E, e as variantes micosubtilina e bacilomicina (D, F, L). Essas moléculas se diferenciam pela posição e composição dos aminoácidos e no comprimento dos ácidos graxos (WAN et al., 2022).

A Iturina A é a variante mais estudada dentro dessa classe, pois apresenta excelente atividade antifúngica. A iturina A apresenta uma sequência de aminoácidos em seu heptapeptídeo composta por L-Asparagina, D-Tirosina, D-Asparagina, L-Glutamina, L-Prolina, D-Asparagina e L-Serina. Seu ácido graxo está ligado ao primeiro aminoácido e o anel peptídico ocorre pela união entre o primeiro e o último aminoácido por uma ligação amida (Figura 4) (WAN et al., 2022; ZHOU et al., 2020; GEISSLER et al., 2019).

As iturinas D e E, diferem da iturina A, pela presença de um grupo carboxila livre na iturina D e um grupo carboximetil na iturina E. Já as variantes bacilomicina D, F, L e micosubtilina apresentam diferenças nas sequências de aminoácidos dos heptapeptídeos (WAN et al., 2022; ZHOU et al., 2020).

Figura 4 - Estrutura química de congêneres representativos de iturina



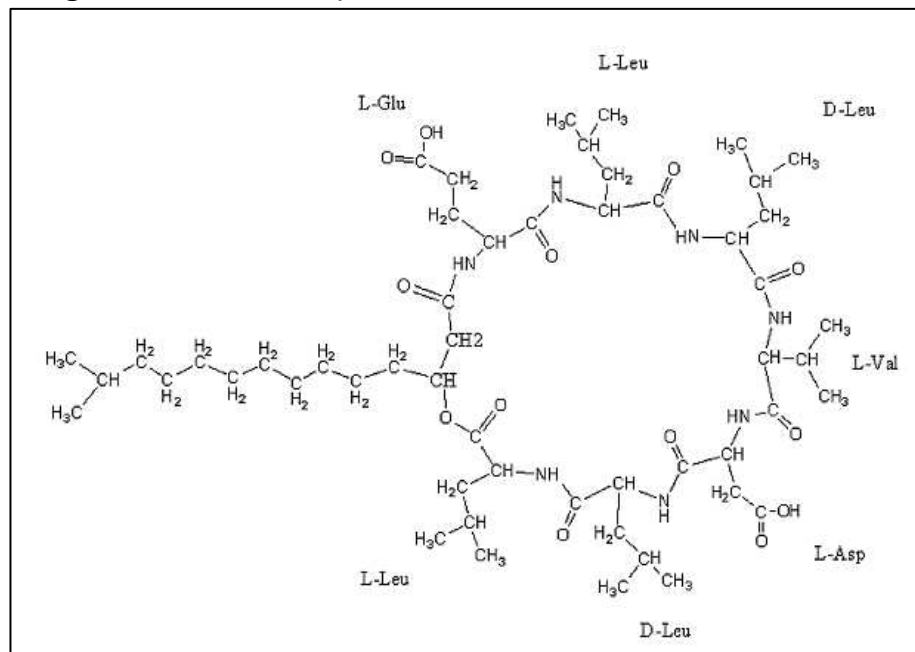
Fonte: GEISSLER et al. (2019).

3.1.2.2.2 Surfactina

A surfactina é um biossurfactante aniônico que pertence a classe dos lipopeptídeos cíclicos, sendo o biossurfactante mais estudado. A porção hidrofílica é composta por sete aminoácidos (L-glutâmico, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-aspartato, D-leucina e L-leucina) que formam um anel peptídico. O peptídeo cíclico está ligado a um ácido graxo de 13 a 15C. A presença dos aminoácidos L-glutâmico e L-aspartato, confere a surfactina duas cargas negativas em pH fisiológico, possuindo um pK entre 5,5 e 6,0, estando em pH 5,5 completamente protonada. A porção lipídica é composta por um ácido graxo β -hidroxilado contendo de 13 a 16 carbonos ligado ao primeiro aminoácido (Figura 5) (ALBORNOS; OYARZÚN; BURGESS, 2024; BJERK et al., 2021; GEISSLER et al., 2019; NAGY, 2018; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

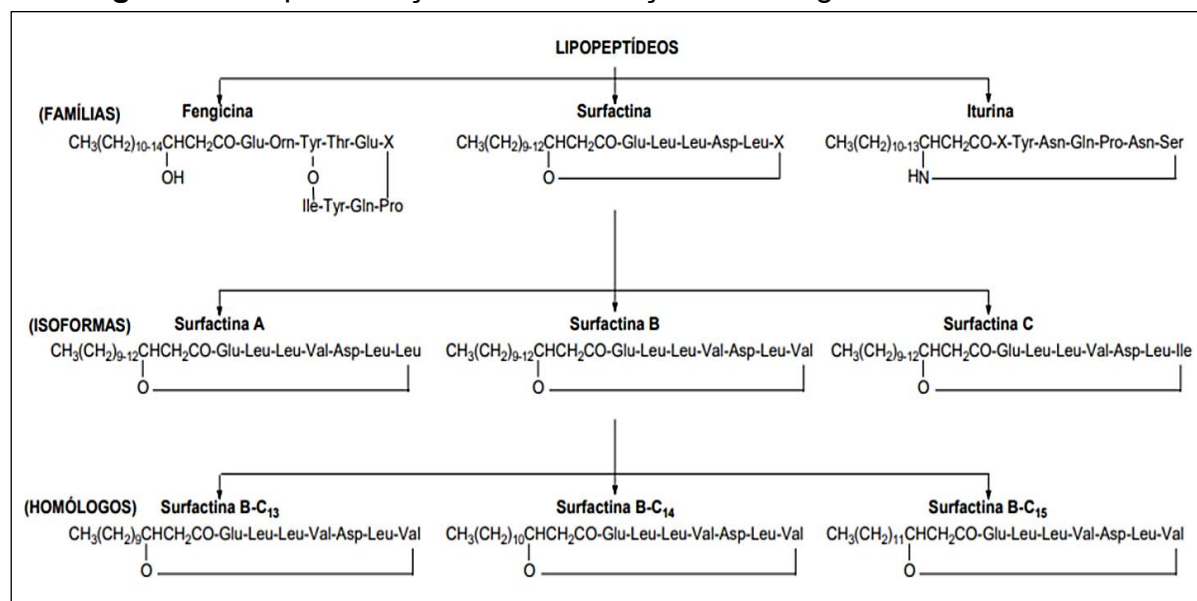
A surfactina pode ser dividida em isoformas, que apresentam diferentes composições de aminoácidos, e ter subdivisões em séries homólogas, que variam no número de carbono da cadeia lipídica (Figura 6). A surfactina possui mais de 30 congêneres diferentes e, embora as sequências de aminoácidos dos homólogos da surfactina sejam idênticas, suas atividades biológicas são distintas apenas devido às diferentes cadeias alquilas (GEISSLER et al., 2019; SANTIAGO, 2019).

Figura 5 - Estrutura química da isoforma da surfactina



Fonte: BARROS et al. (2007).

Figura 6 – Representação da classificação dos congêneres de surfactina



Fonte: GEISSLER et al. (2019).

3.1.2.2.3 Síntese de lipopeptídeos cíclicos

Os lipopeptídeos cíclicos produzidos por espécies de *Bacillus* são codificados por peptídeos sintetases não ribossômicos (Nonribosomal peptide synthetases - NRPSs), que são grandes complexos multienzimáticos organizados em módulos (Figura 7). Cada módulo é responsável por um ciclo de reação, no qual é incorporado um aminoácido específico em uma estrutura peptídica. Esses módulos são compostos por diferentes domínios, tais como: **o domínio de adenilação (A)** que consiste em um grande subdomínio N-terminal e um pequeno subdomínio C-terminal, que atuam juntos para reconhecer especificamente o substrato e ativá-lo através da ligação do AMP ao grupo hidroxila C-terminal; **o domínio de tilação (T)** onde o substrato ativado é unido ao PCP; o da **proteína transportadora de peptidil (PCP)** que passa o substrato para o domínio C; de **condensação (C)** que forma uma nova ligação peptídica entre dois módulos adjacentes e o **domínio de tioesterase (TE)** que libera o produto como peptídeo cíclico (QI et al., 2023; BONHOMME; DESSEN; MACHEBOEUF, 2021; THÉATRE et al., 2021; DEGEN et al., 2019; GEISLER et al., 2019).

O NRPS da surfactina é codificado pelo gene operon-*sfp* *srfA*, sendo a surfactina sintetizada por um complexo de três grandes subunidades de surfactina sintetase que consistem em três módulos de leitura *srfAA*, *srfAB* e *sr-fAC*. Essas subunidades NRPS são responsáveis por montar a cadeia peptídica, onde a subunidade *srfAA* é responsável pela incorporação do Glu, Leu e D-Leu; a *srfAB* é pela incorporação de Val, Asp e D-Leu e a *srfAC* pela incorporação de L-Leu. Existe também a subunidade *srfAD*, que não está diretamente envolvida no processo de alongamento da cadeia peptídica, que é responsável por sintetizar uma tioesterase externa do tipo II que possui a função de reciclar domínios da PCP mal iniciados (GEISLER et al., 2019; DHALI et al., 2017).

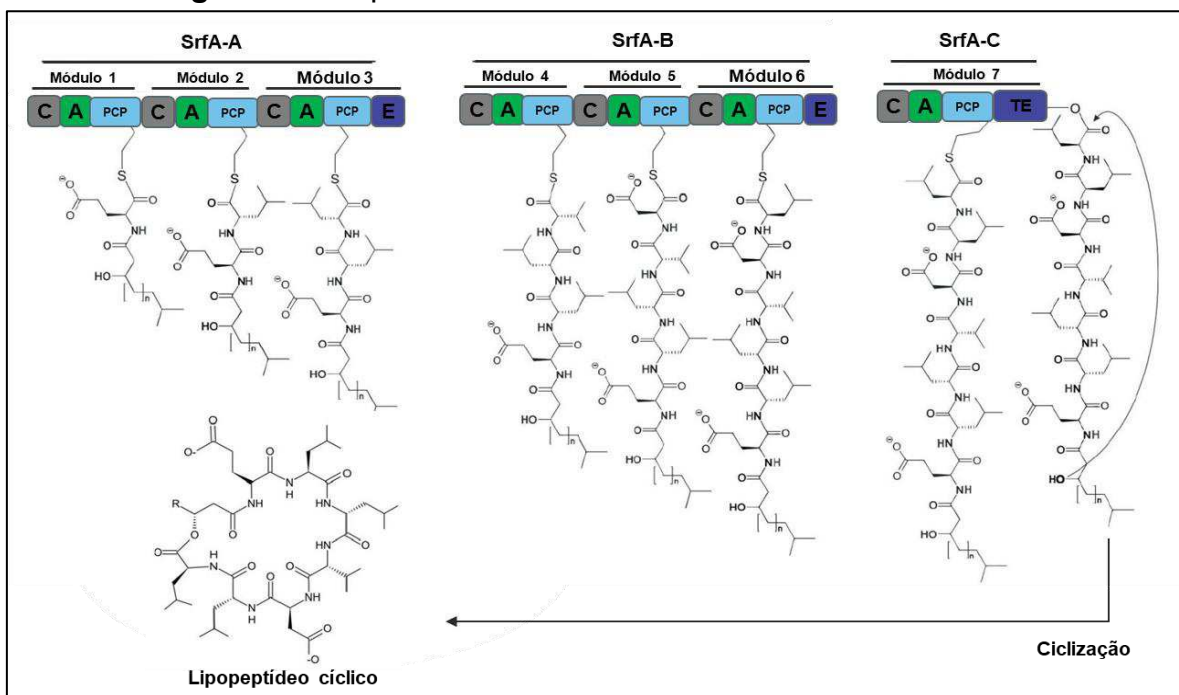
A porção lipídica das surfactinas e da maioria dos lipopeptídeos microbianos é introduzida diretamente no início da biossíntese, que começa com um ácido graxo ativado por CoA. O ácido graxo ativado, é reconhecido pelo domínio C do primeiro módulo da subunidade *srfAA*, que catalisa a acilação com o grupo amino do primeiro aminoácido a ser incorporado (THÉATRE et al., 2021; GEISLER et al., 2019).

A cadeia peptídica é alongada na subunidade *SrfAA*, *SrfAB* e *SrfAC*, na qual o domínio PCP passa o substrato para o domínio C, onde os aminoácidos são

fundidos através da formação de ligações peptídicas. O último módulo do *SrfAA* e *SrfAB* contêm adicionalmente um domínio de epimerização, que converte L-Leu em D-Leu. A última subunidade *SrfAC* é composta por um domínio TE que libera o lipopeptídeo e catalisa a reação entre o primeiro e o último aminoácido da cadeia peptídica formando uma macrolactona. A subunidade *SrfAD* possui um segundo domínio TE (enzima de reparo) que corrige domínios mal iniciados durante a montagem do NRPS. A liberação da molécula de surfactina do complexo enzimático finaliza a biossíntese da surfactina, então ela é excretada por difusão passiva pela membrana citoplasmática bacteriana (BONHOMME; DESSEN; MACHEBOEUF, 2021; THÉATRE et al., 2021; DEGEN et al., 2019; GEISLER et al., 2019).

É descrito que esse processo de produção da surfactina ocorra no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento microbiano (OLIVEIRA, 2006).

Figura 7 – Esquema da biossíntese de surfactina em *Bacillus*



Fonte: Adaptado de KOGLIN et al. (2008).

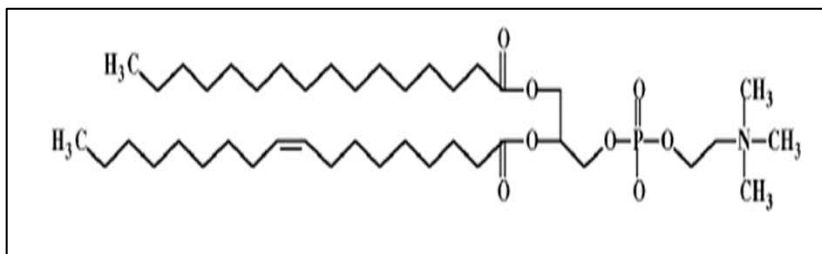
C: domínio de condensação; A: domínio de adenilação; PCP: domínio da proteína transportadora de peptídeo; E: domínio de epimerização; TE: domínio tioesterase.

3.1.2.3 Fosfolipídios

Os fosfolipídios são constituídos por ácidos graxos ou lipídios neutros e grupos fosfato (Figura 8). Esta classe de biosurfactante é produzida por leveduras e

bactérias que utilizam alcanos como fonte de carbono e energia para o crescimento (FELIPE; DIAS, 2017; FELIX, 2012).

Figura 8 - Estrutura química da molécula de fosfolipídios



Fonte: PILLING et al. (2015).

3.1.2.4 Biossurfactantes poliméricos

Os biossurfactantes poliméricos ou lipopolissacarídeos são caracterizados por ácidos graxos e polissacarídeos ligados covalentemente. Os lipopolissacarídeos mais conhecidos são o liposan e o emulsan (FELIPE; DIAS, 2017; FELIX, 2012; NITSCHKE; PASTORE, 2002).

O liposan é produzido pela *Candida lipolytica*, sendo composto por 83% de carboidratos e 17% de proteínas. Suas porções proteicas conferem-lhe propriedades emulsificantes. Já o emulsan é produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus*, sendo um polímero lipo-heteropolissacarídeo (ALIZADEH-SANI et al., 2018).

3.1.2.5 Biossurfactantes particulados

Os biossurfactantes particulados são vesículas extracelulares produzidas por algumas bactérias, essas vesículas apresentam elevada atividade tensoativa e hidrofobicidade superficial. Além disso, são capazes de transportar alcanos para o interior das células. As cianobactérias são um exemplo de microrganismos que apresentam essa alta hidrofobicidade superficial (FELIPE; DIAS, 2017; FELIX, 2012; ISLAS; MORENO; RODRÍGUEZ, 2010).

3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE BIOSSURFACTANTES

Os microrganismos que são capazes de produzir biossurfactantes podem habitar tanto a água (água doce, subterrânea e marinha) quanto a terra (solo,

sedimentos e lama). Os biossurfactantes podem ser encontrados até mesmo em ambientes extremos, com amplas faixas de temperatura, pH e salinidade (AKINTOKUN; ADEBAJO; AKINREMI, 2017).

Como mencionado anteriormente, as bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre os microrganismos mais descritos na literatura como produtores de glicolipídios, sendo a *P. aeruginosa* a mais relatada como produtora de ramnolipídio. Outras espécies de *Pseudomonas* também são relatadas como produtoras de ramnolipídios, como *P. chlororaphis*, *P. plantarii*, *P. putida* e *P. fluorescens* (OLIVEIRA et al., 2022; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Pseudomonas putida é uma espécie bacteriana saprofítica, flagelada, aeróbica, gram-negativa e que não produz esporos. É uma bactéria que possui um rápido crescimento em meios com carência de nutrientes, não apresenta ação patogênica e é usada em estudos ambientais porque é capaz de degradar muitos compostos aromáticos. O biossurfactante produzido pela *Pseudomonas putida* possui uma composição, estruturas e funções comparados aos ramnolipídios produzidos por espécies de *P. aeruginosa* (DIAS, 2019; RAZA; KHAN; KHALID, 2007).

Bactérias do gênero *Bacillus* têm sido muito estudadas e citadas devido sua capacidade de produção de biossurfactante. As espécies produtoras de metabólitos tensoativos mais relatadas são *Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*. Outras espécies que também são relatadas como produtoras são *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus salmalaya*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus brevis* e *Bacillus mojavensis* (DURVAL et al., 2019; BASIT et al., 2018).

Bacillus cereus é bacilo Gram-positivo formador de esporos e possui respiração aeróbica facultativa. É amplamente observado no ambiente e encontrado em matéria orgânica em decomposição, trato intestinal de invertebrados, em águas doces e marinhas e em vegetais (DURVAL et al., 2019; BOTTONE, 2010).

Devido a sua versatilidade metabólica, as bactérias do gênero *Acinetobacter* foram isoladas de diversas fontes ambientais como, amostras clínicas humanas e animais, lodo e água do mar. Algumas espécies possuem a característica de serem psicrotolerantes, tendo a capacidade de habitar ambientes com baixa temperatura. Bactérias do gênero *Acinetobacter* são conhecidas por terem a capacidade de sintetizar biossurfactantes poliméricos (MUJUMDAR; JOSHI; KARVE, 2019; VAZ-MOREIRA et al., 2011). O quadro 1 apresenta os biossurfactantes produzidos por diferentes microrganismos

Quadro 1 - Principais tipos de biossurfactantes e seus respectivos microrganismos produtores

Classe de Biossurfactante	Tipos	Microrganismos Produtores	Referências
Glicolipídios	Ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Serratia rubidea</i>	NAGY (2018); ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE (2013); RAZA; KHAN; KHALID (2007); NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Soforolipídios	<i>Candida bombicola</i>	SANTOS (2019b); SAJNA et al. (2015)
	Manosileritritol Lipídio	<i>Pseudozyma sp.</i>	SAJNA et al. (2015); BANAT et al. (2010)
	Trealolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycobacterium sp.</i>	BANAT et al. (2010); NITSCHKE; PASTORE (2002)
Lipopeptídeos	Polimixinas	<i>Paenibacillus sp.</i> <i>Bacillus polymyxa</i>	NAGY (2018); SAJNA et al. (2015); NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Subtilisinas	<i>Bacillus subtilis</i>	NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Surfactinas	<i>Bacillus subtilis</i>	NAGY (2018); SAJNA et al. (2015); ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE (2013); NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Liquenisinas	<i>Bacillus licheniformis</i>	SAJNA et al. (2015); BANAT et al. (2010)
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NAGY (2018); NITSCHKE; PASTORE (2002)
Fosfolipídios Ácidos graxos Lipídios neutros	Ácido graxo	<i>Corynebacterium lepus</i>	NAGY (2018); NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Fosfolipídios	<i>Nocardia erythropolis</i>	MARÇAL NAGY (2018); NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Lipídios neutros	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	MARÇAL NAGY (2018); NITSCHKE; PASTORE (2002)
Poliméricos	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NAGY (2018); SAJNA et al. (2015); NITSCHKE; PASTORE (2002)
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	NAGY (2018); SAJNA et al. (2015)
	Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NAGY (2018); NITSCHKE; PASTORE (2002)
Particulados	células	<i>Cianobacteria</i>	FELIPE; DIAS (2017); ISLAS; MORENO; RODRÍGUEZ (2010)
	vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	FELIPE; DIAS (2017); NITSCHKE; PASTORE (2002)

Fonte: Autoria própria.

3.3 CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

As características químicas e estruturais do biossurfactante são resultantes das condições de cultivo do microrganismo, podendo ocorrer uma variação na

composição química e estrutural. Sua produção é influenciada por fatores como: a natureza dos substratos utilizados, concentrações de íons, meio de cultura e condição de fermentação aplicadas (OLIVEIRA et al., 2022; ALMEIDA et al., 2020; EHRHARDT, 2019).

Assim, conhecer as fontes de carbono e nitrogênio, bem como as condições de fermentação como temperatura, pH, agitação, oxigenação e concentração de nutrientes como fósforo, ferro e magnésio são de fundamental importância para se obter um bom desenvolvimento do microrganismo e conseqüentemente uma produção máxima de biossurfactante (EHRHARDT, 2019; NAGY, 2018; SANTOS et al., 2018).

A maioria dos microrganismos que são capazes de produzir biossurfactantes, é aeróbica e utilizam como fonte de carbono matéria-prima que contém carboidratos, hidrocarbonetos, óleos e gorduras ou até mesmo misturas desses compostos. E dependendo da fonte de carbono utilizada como nutriente, a síntese de biossurfactantes pode ser direcionada para uma das várias vias metabólicas envolvidas neste processo (BJERK et al., 2021; SANTOS et al., 2018).

O nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento celular, pois é extremamente importante na síntese de proteínas e enzimas. Várias fontes de nitrogênio podem ser utilizadas como substrato para a produção de biossurfactantes, alguns exemplos seriam a milhocina, peptona e extrato de levedura. A concentração ideal, varia conforme o meio de produção e o microrganismo que será utilizado. Além disso, diferentes cepas de um microrganismo podem apresentar preferência por diferentes fontes de nitrogênio (NAGY, 2018; DAS; MUKHERJEE, 2007).

Micronutrientes como cobre e zinco, possuem grande importância pois são nutrientes utilizados nos processos fisiológicos das células, sendo considerados metais essenciais. Mas, quando esses micronutrientes estão presentes em altas concentrações, podem formar complexos inespecíficos que são potencialmente tóxicos aos organismos (CASTRO et al., 2020).

Íons metálicos como chumbo, cádmio, mercúrio e níquel são elementos que possuem a capacidade de interferir nas vias metabólicas dos microrganismos. Esses elementos competem com os metais essenciais pelos sítios de ligação, e assim acabam afetando a fosforilação oxidativa e bloqueando enzimas no sistema de transporte de nutrientes, podendo, dessa forma, inviabilizar a atividade metabólica e levar a morte das células bacterianas. Assim, é importante ter controle e conhecimento

dos substratos utilizados nos processos fermentativos, para evitar possíveis contaminações com esses elementos e assim não prejudicar toda a produção (CASTRO et al., 2020).

A produção de biossurfactante pode ocorrer pelo cultivo do microrganismo em fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação submersa (FSm). Na FES o cultivo ocorre em um substrato sólido e com umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, tendo então a ausência de água livre. A FSm é constituída basicamente por água e os nutrientes dissolvidos no meio (FARINAS et al., 2014).

A FSm é o processo mais utilizado para a produção de biossurfactante, pois apresenta como vantagem um melhor controle dos parâmetros de cultivo. Entretanto, tem como desvantagens a formação de espuma e o aumento da viscosidade, o que causam uma diminuição na transferência de oxigênio, prejudicando a produtividade do processo, além de dificultar a separação e purificação do metabólito. Agentes antiespumantes têm sido usados para resolver essas questões, porém, geram um aumento nos custos de produção (VALDÉS-VELASCO et al., 2022; PINTO, 2008).

A FES tem como vantagem em relação ao método submerso uma maior transferência de oxigênio, não formar espuma e também possui a vantagem de baixo custo operacional e de consumo de energia. Contudo, apresenta como principais desvantagens a dificuldade de controle dos níveis de umidade, pH, oxigênio, além de que nem todo microrganismo consegue crescer em meio com baixa umidade (VALDÉS-VELASCO et al., 2022; PINTO, 2008).

3.3.1 Aproveitamento de Resíduos Como Fonte de Nutrientes

Um fator significativo que destaca os biossurfactantes, é o alto custo da sua produção em grande escala. Isso se deve aos baixos rendimentos pelos substratos utilizados, dependência de processos estéreis, insumos de alto custo, dificuldade no processo de recuperação e purificação dos biossurfactantes. Sendo assim, a produção de biossurfactantes por microrganismos acaba não conseguindo competir comercialmente com os surfactantes de origem química, pois o seu valor final acaba sendo mais caro (BANAT et al., 2014).

Reduzir o alto custo de produção utilizando matérias-primas mais baratas, é algo que vem sendo bem debatido e mostra que é um caminho promissor para o

desenvolvimento de qualquer processo biotecnológico e o caminho para sucesso na produção industrial de biossurfactantes (EHRHARDT, 2019).

A grande quantidade de resíduos gerados pelas indústrias, é uma questão preocupante para a sociedade. Milhares de toneladas de resíduos são gerados a cada ano no mundo todo, no Brasil o setor agrícola e industrial são responsáveis por uma imensa quantidade e variedade de resíduos (EHRHARDT, 2019; MARCELINO, 2017).

Assim, nos últimos anos vem-se aumentando os estudos para destinos mais sustentáveis desses resíduos. E um possível destino para esses resíduos, é a sua utilização como recurso energético para os microrganismos durante o processo fermentativo para a produção de biossurfactante (EHRHARDT, 2019; NAGY, 2018).

A utilização de matérias-primas de baixo custo para a produção de biossurfactantes traz o benefício da redução do custo produtivo, obtendo assim maior lucro e também a diminuição dos impactos ao meio ambiente graças ao aproveitamento desses resíduos. Assim, o reuso de resíduos se torna uma solução bem interessante para a produção de biossurfactantes em escala industrial (NAGY, 2018; SANTOS et al., 2018; MARCELINO, 2017).

Muitos resíduos contêm em sua composição uma rica quantidade de carboidratos, proteínas e lipídeos que podem ser utilizados como fonte energética para o crescimento de microrganismos e formação dos biossurfactantes. O ideal seria encontrar um substrato renovável composto pela maior quantidade de nutrientes necessários para que o microrganismo se desenvolva, assim resultando em um melhor rendimento de biossurfactante, sem a necessidade de adicionar diferentes compostos e em altas quantidades (BJERK et al., 2021; DURVAL et al., 2021; EHRHARDT, 2019).

O quadro 2 apresenta diferentes substratos que foram empregados para produção de biossurfactantes, sendo alguns deles resíduos como o óleo de soja residual de fritura, óleos automotivos usados e casca de abacaxi.

Quadro 2 - Microrganismos, substratos utilizados como fonte de nutrientes e condições de cultivo empregadas na produção de biossurfactantes

Microrganismos	Substratos	Condição	Referências
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Óleo de girassol	37°C / 120 rpm / 4 dias	AMANI; KARIMINEZHAD (2016)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Suco de caju	30°C/ 150 rpm / 5 dias	ROCHA et al. (2006)
<i>Bacillus cereus</i>	Óleo de soja residual de fritura	28°C / 250 rpm / 2 dias	DURVAL et al. (2021)
<i>Bacillus cereus</i>	Licor de maceração de milho	37°C / 150 rpm / 7 dias	BASIT et al. (2018)
<i>Bacillus licheniformis</i> AL 1.1	Melaço e fécula de mandioca	30°C/ 120 rpm / 3 dias	CORONEL-LEÓN et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis</i>	Casca de abacaxi	37°C / 150 rpm / 24 horas	EHRHARDT (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> UCP 0146	Manipueira	30°C / 150 rpm / 4 dias	MAIA (2017)
<i>Bacillus sp.</i>	Óleo (soja, fritura, diesel, lubrificante de motor novo e usado)	30°C / 200 rpm/ 7 dias	ALMEIDA et al. (2020)
<i>Candida guilliermondii</i>	Suco de caju Suco de abacaxi	30°C / 200 rpm / 4 dias	SANTOS et al. (2018)
<i>Cryptococcus victoriae</i>	Extrato de caju	Temperatura ambiente/ 100 rpm / 24 horas	NAGY (2018)
<i>Pseudomonas putida</i>	Hidrocarbonetos, óleos residuais de fritura, resíduo de óleo vegetal de refinaria e melaço	37°C / 100 rpm / 7 dias	RAZA; KHAN; KHALID (2007)
<i>Pseudomonas azotoformans</i> AJ15	Cascas de batata e bagaço de cana	35°C / 180 rpm / 3 dias	DAS; KUMAR (2018)
<i>Starmarella bombicola</i> ATCC 22214	Resíduos têxteis, resíduos de panificação e de alimentos mistos, óleo de milho usado, lipídios derivados de resíduos de alimentos hidrolisados e gordura	30°C / 200 rpm / 5 dias	KAUR et al. (2019)

Fonte: Autoria própria

3.4 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Na literatura são relatados diversos métodos utilizados para selecionar a melhor condição e os microrganismos capazes de produzir o biossurfactante. Na maioria das vezes, os testes são realizados antes da extração do biossurfactante

como uma forma de triagem para a confirmação da produção. Métodos esses, que na maioria das vezes são baseados nas propriedades físico-químicas dos biossurfactantes (EHRHARDT, 2019; AKINTOKUN; ADEBAJO; AKINREMI, 2017).

Essa avaliação decorre da combinação de métodos, na qual as propriedades dos metabólitos produzidos durante a fermentação são testadas, como o seu potencial em reduzir a tensão superficial, ensaio do colapso de gota, dispersão de óleo, atividade hemolítica, bem como sua capacidade em formar emulsões. Tais propriedades são fatores significativos para a escolha do microrganismo a ser utilizado e as suas futuras aplicações (EHRHARDT, 2019; AKINTOKUN; ADEBAJO; AKINREMI, 2017).

3.5 EXTRAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Ao final da etapa *up stream* do processo fermentativo, é possível realizar a extração e purificação do biossurfactante produzido. De acordo com o composto produzido é necessário utilizar diferentes técnicas de purificação (EHRHARDT, 2019).

A extração com solventes, como clorofórmio-metanol, butanol, acetato de etila, hexano, ácido acético e éter, é o método mais comumente utilizado. Outras técnicas empregadas são precipitação com sulfato de amônio, fracionamento por espuma e adsorção conforme demonstrado no quadro 3 (SANTOS et al., 2016).

A extração e purificação do biossurfactante ainda é uma questão difícil de se realizar, pois para a sua extração é necessário realizar várias etapas, o que diminui a recuperação e torna os custos de produção altos, inviabilizando economicamente a purificação do biossurfactante (FELIPE; DIAS, 2017).

Quadro 3 – Processos empregados na recuperação de biossurfactante e suas vantagens

Processo	Tipo de biossurfactante	Propriedade do biossurfactante responsável por separação	Vantagens
Precipitação ácida	Surfactina; Rhamnolipídeos	Biossurfactantes tornam-se insolúveis em baixos valores de pH	Baixo custo, eficiente na recuperação de biossurfactantes brutos
Extração com solventes orgânicos	Soforolipídios; Liposan; Rhamnolipídeos	Os biossurfactantes são solúveis em solventes orgânicos devido à extremidade hidrofóbica	Eficiente na recuperação de biossurfactante bruto e purificação parcial, natureza reutilizável
Precipitação de sulfato de amônio	Emulsan; Biodispersan; Lipopeptídeos	Salting-out de biossurfactantes poliméricos ou ricos em proteínas	Eficaz no isolamento de certos tipos de biossurfactantes poliméricos
Adsorção ao carvão ativado pela madeira	Glicolipídios; Lipopeptídeos	Os biossurfactantes são adsorvidos ao carvão ativado e podem ser dessorvidos usando solventes orgânicos	Biossurfactantes altamente puros, mais baratos, reutilização, recuperação de cultura contínua
Adsorção a resinas de poliestileno	Glicolipídios; Lipopeptídeos	Os biossurfactantes são adsorvidos a resinas de poliestireno e posteriormente dessorvidos usando solventes orgânicos	Biossurfactantes altamente puros, mais baratos, reutilização, recuperação de cultura contínua
Centrifugação	Glicolipídios;	Biossurfactantes insolúveis são precipitados devido à força centrífuga	Reutilizável, eficaz na recuperação de biossurfactantes brutos
Cromatografia de troca iônica	Glicolipídios;	Biossurfactantes carregados são ligados a resinas de troca e podem ser eluídos com tampão	Alta pureza, reutilização, recuperação rápida
Fracionamento de espuma	Lipopeptídeos	Forma do biossurfactante e partição em espuma	Útil em processos de recuperação contínua, alta pureza do produto
Ultrafiltração	Glicolipídios;	Os biossurfactantes formam micelas acima de sua concentração micelar crítica, que são aprisionadas por membranas poliméricas	Recuperação rápida em uma etapa, alto nível de pureza, reutilização

Fonte: (SANTOS et al., 2016).

3.6 APLICAÇÕES DE BIOSSURFACTANTES

Existem muitas áreas em que é possível explorar os biossurfactantes, como na agricultura, indústrias de bebidas e alimentícias, limpeza, biorremediação, indústria farmacêutica, cosméticas e meio ambiente (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

3.6.1 Biorremediação

A biorremediação é uma técnica biotecnológica que utiliza microrganismos, plantas ou seus produtos, com a finalidade de reduzir ou eliminar contaminantes presentes no ambiente (solo, sedimento ou água). O processo ocorre por biodegradação desses compostos, a partir da utilização desses poluentes como fontes de carbono e energia pelos microrganismos, gerando CO₂, água e minerais (BJERK et al., 2021; SANTOS, 2019a; NAGY, 2018).

Os biossurfactantes possuem propriedades que permitem sua aplicação em ambientes com derramamentos de petróleo (em solo e areia) e aceleram o processo de biorremediação, atuando no aumento da solubilidade e biodisponibilidade dos compostos contaminantes. A sua atuação na superfície celular favorece a interação entre os agentes poluentes e as células dos microrganismos, facilitando a degradação dos poluentes (BJERK et al., 2021; DURVAL et al., 2020; SANTOS, 2019a).

Outro fator importante na utilização desses metabólitos é que os biossurfactante são compostos com baixa toxicidade e biodegradáveis, diferente dos surfactantes de origem química, sendo assim um grande benefício (SANTOS, 2019a).

Santos (2019a), relata que a maioria das patentes de biossurfactantes destinados a biorremediação estão relacionadas com o processo de biodegradação de pesticidas e compostos orgânicos, como petróleo e seus derivados, e com a recuperação avançada de petróleo.

Um biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, utilizando como substrato manipueira (líquido extraído das raízes da mandioca quando ela é prensada no processo de fabricação da farinha) conseguiu fazer a adsorção do corante catiônico azul de metileno, removendo 62,2% do corante solubilizado em água após 12h. Esse biossurfactante também removeu 94,4% do óleo queimado de motor impregnado em solo arenoso (MAIA, 2017).

Das et al. (2018) relatam que o biossurfactante produzido por *Pseudomonas azotoformans* AJ15 é estável quando exposto em até 5% de NaCl, sugerindo que pode suportar alta salinidade, podendo ser usado para a remediação de solo com alta salinidade contaminado com petróleo.

3.6.2 Limpeza de Reservatórios de Óleo

O petróleo bruto contém compostos que durante a sua passagem pelas tubulações, podem precipitar e aderir às paredes de tubulações e tanques de reservatórios, formando assim as incrustações. Esse fenômeno químico gera grandes prejuízos para as indústrias petrolíferas, podendo causar problemas como a perda de eficiência, bloqueios e corrosão das tubulações. Sendo assim, é de extrema importância realizar a limpeza e manutenção das tubulações regularmente para evitar a formação dessas incrustações (SANTOS, 2019a; AMANI; KARIMINEZHAD, 2016).

Para a limpeza dessas tubulações são utilizados agentes químicos, sendo os surfactantes os agentes mais utilizados. Esses surfactantes possuem ação detergente e umectante que são capazes de fazer a limpeza dessas tubulações, porém a maioria dos surfactantes tem sua fonte derivada do petróleo, e assim, acaba trazendo prejuízos para o ambiente (AMANI; KARIMINEZHAD, 2016).

Biossurfactantes são alternativas que podem ser utilizadas para a limpeza de tubulações e tanques de armazenamento de óleo, pois podem atuar na diminuição da viscosidade através da formação de emulsão, permitindo a recuperação do óleo (SANTOS, 2019a; SILVA et al., 2014).

Um estudo realizado utilizando emulsan, produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* PTCC 1318, mostrou a eficiência desse biossurfactante quando aplicado em processos de remoção de resíduos de óleo bruto da superfície interna dos tubos, levando a recuperação de 100% óleo bruto da tubulação (AMANI; KARIMINEZHAD, 2016).

3.6.3 Área Farmacêutica

Diferentes classes de biossurfactantes já foram estudadas e apontadas como alternativas interessantes para serem usadas na área farmacêutica. Estudos mostram que a surfactina possui várias possíveis aplicações na área farmacêutica e biomédica,

atuando na inibição da formação de coágulos sanguíneos; na formação de canais iônicos em membranas e também por exibir atividade antimicrobiana devido a sua ação antibacteriana, antifúngica e antiviral (BJERK et al., 2021; NAGY, 2018; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

A bactéria *B. cereus* produziu um lipopeptídeo que exibiu atividade antibacteriana e antifúngica significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspegillus niger* e *Candida albicans* na concentração de 30 mg/mL (BASIT et al., 2018).

Os ramnolipídios da classe dos glicolipídios, também apresentam propriedades antimicrobianas, tendo uma ação permeabilizante que leva à ruptura da membrana plasmática da célula bacteriana (NAUGHTON et al., 2019).

OLIVEIRA et al. (2022) relataram que o biossurfactante produzido pela linhagem *Pseudomonas* sp. CCMICS 105 apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*.

KARLAPUDI et al. (2020) relatam que *Acinetobacter indicus* M6 produz biossurfactante capaz de remover até 82,5% de biofilme. Além disso o metabólito foi eficaz contra várias bactérias exibindo com ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Portanto, os biossurfactantes também apresentam um potencial antimicrobiano que os torna uma ferramenta promissora para o tratamento de infecções causadas por microrganismos patogênicos altamente resistentes.

3.6.4 Produtos Cosméticos e de Higiene

Produtos de higiene e cosméticos possuem em sua formulação surfactantes, empregados com a finalidade de agente umectante, solubilizante, dispersante e agente espumante, detergente, formadores de emulsão e antimicrobiano. Porém, o uso de produtos com surfactantes de origem química está relacionado com problemas de reações alérgicas e irritações na pele. Visando isso, a indústria de cosméticos vem buscando lançar no mercado produtos derivados de fontes biológicas, por meio do uso de ingredientes naturais como uma alternativa aos ingredientes de origem sintética (PEREIRA JUNIOR et al., 2022; BEZERRA et al., 2018).

Os biossurfactantes podem desempenhar um papel importante nesses produtos, pois suas propriedades e atividades biológicas os tornam compostos

adequados para uso em aplicações cosméticas. Os glicolipídios (soforolipídios, ramnolipídios e lipídios manosilertitol ou Mels) e os lipopeptídeos (surfactina) são os biossurfactantes mais utilizados em cosméticos (BEZERRA et al., 2018).

Pereira Junior et al. (2022) relata que das patentes que foram depositadas voltadas para cuidados pessoais, a maioria envolve formulações de produtos higiene bucal (pasta de dente e enxaguantes bucal), seguido por produtos de banho (sabonetes e xampus), cosméticos e produtos para manutenção do corpo.

3.6.5 Indústria Alimentícia

Atualmente a origem e composição dos alimentos tem despertado um interesse dos consumidores. Além disso, ocorreu um aumento dos consumidores interessados em produtos veganos, de origem orgânica e sem aditivos sintéticos. Visando isso, as indústrias vêm procurando comercializar produtos destinados a esse crescente público, utilizando os chamados ingredientes “verdes” em seus produtos (DURVAL et al., 2021).

Os biossurfactantes são compostos promissores para serem aplicados na área alimentícia e diferentes tipos de biossurfactantes podem ser explorados nesse campo. Os lipopeptídeos e glicolipídios são os que mais se destacam para utilização, isso devido às suas características que são desejáveis para aplicação na indústria alimentícia, como sua atividade antibacteriana contra uma variedade de espécies, atividade antioxidante e baixa citotoxicidade (DURVAL et al., 2021).

Outra propriedade que pode ser explorada é sua ação emulsificante, pois na indústria alimentícia os emulsificantes são ingredientes indispensáveis, principalmente em produtos que necessitam de maior estabilidade e maior tempo de prateleira. A emulsificação tem grande importância para a formação de consistência e também na solubilização de aromas (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

É relatado que os biossurfactantes mostraram benefícios nas características sensoriais quando adicionados em pães, melhorando a textura, volume e conservação. Também é descrito que devido a sua propriedade emulsificante, biossurfactantes são capazes de melhorar a viscosidade, textura, cremosidade e a emulsificação de gorduras de alimentos, como derivados da carne e de leite (DURVAL et al., 2021; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Em um estudo que desenvolveu uma formulação de cookies utilizando biossurfactante de *B. cereus*, não foi observado citotoxicidade, o que mostra o potencial dos biossurfactantes para incorporação em produtos alimentícios. O biossurfactante testado apresentou-se como um agente emulsificante eficaz para óleos vegetais, como os óleos de soja, milho e canola. Também mostrou uma considerável ação antioxidante, o que é uma ação desejável na indústria alimentícia, pois a oxidação é algo que pode ocorrer durante o processamento e/ou armazenamento dos alimentos, resultando na deterioração do seu valor nutricional, cor, sabor, textura e segurança (DURVAL et al., 2021).

Os biofilmes são complexos microbianos que se formam em uma superfície (aço inoxidável, polipropileno, borracha, madeira), sendo constituídos por uma única ou múltiplas espécies e a presença de mais de um tipo de microrganismo aumenta a resistência microbiana. Na área alimentícia biofilmes podem se desenvolver rapidamente e estão relacionados com efeitos danosos como a corrosão de superfícies metálicas, alteração das propriedades organolépticas além de patogenicidade (GALIÉ et al., 2018; CORONEL-LEÓN et al., 2016).

Uma boa opção para prevenir biofilmes seria o uso de biossurfactantes, pois, além de atuarem diretamente contra os patógenos devido à sua propriedade antimicrobiana, os biossurfactantes também podem atuar modificando a hidrofobicidade de uma superfície, interferindo no processo de adesão microbiana, sendo assim uma estratégia para inibição da formação de biofilme (GALIÉ et al., 2018; CORONEL-LEÓN et al., 2016; ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Coronel-León et al. (2016) relatam que a liquenisina, um lipopeptídeo produzido por *B. licheniformis* AL1.1, foi efetiva quando aplicada em uma superfície como pré-tratamento com o objetivo de evitar o desenvolvimento de biofilme de *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) e *C. albicans*. A liquenisina também foi eficiente na aplicação pós-tratamento de superfície na remoção de biofilmes de MRSA e *Yersinia enterocolitica*.

Alizadeh-Sani et al. (2018) também relatam que o biossurfactante derivado de *B. licheniformis* VS16 apresenta capacidade de inibição em até 54% da formação de biofilme pela bactéria *E. coli*. Além da ação antibiofilme, os autores também relatam que esse biossurfactante pode ser usado para prevenir a ingestão de alimentos contaminados com metais pesados. Isto porque o biossurfactante se mostrou eficiente

na remoção de cádmio de vegetais, retirando 60,98% do metal do gengibre, 52,83% do rabanete, 42,68% da batata e 41,16% das cenouras.

3.6.6 Área Agrícola

Na agricultura, uma aplicação para os biossurfactantes seria em formulação de adubos e agrodefensivos, agindo como espalhantes sobre a folha, melhorando a absorção de nutrientes pela planta (DRAKONTIS; AMIN, 2020; NAGY, 2018).

Os biossurfactantes também possuem atividade antimicrobiana contra patógenos de plantas, sendo assim, considerados agentes promissores de biocontrole. Como o biossurfactante produzido pela bactéria *P. putida* 267 que mostrou ter atividades zoosporicida e antifúngica contra fungos patogênicos de planta (RAHEEL et al., 2022; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013).

3.7 BIOSSURFACTANTES NO MERCADO MUNDIAL

Devido as suas características químicas e benefícios, o interesse por esse bioproduto aumentou muito, diversos estudos já foram publicados envolvendo os biossurfactantes. Estudos esses, que vão desde suas propriedades, condições de produção, substratos alternativos e até suas aplicações em diversas áreas.

Já existem no mercado global empresas especializadas em produzir e comercializar biossurfactantes ou produtos à base de biossurfactantes (Quadro 4), o que mostra como o investimento nesse produto biotecnológico é algo crescente no mundo todo.

A Evonik, um grupo industrial da Alemanha, é a primeira empresa no mundo a usar métodos biotecnológicos para produzir quantidades em escala industrial de biossurfactante. A empresa foi responsável por comercializar os primeiros limpadores domésticos contendo biossurfactantes, produtos esses que contêm soforolipídios produzidos por levedura (EVONIK INDUSTRIES AG, 2016).

O grupo Evonik em conjunto com a multinacional Unilever, investiram na primeira fábrica de produção de ramnolipídios sustentáveis para uso em produtos de limpeza e cuidados pessoais. Os ramnolipídios produzidos são de forma sustentável por meio de um processo de fermentação utilizando açúcar de milho europeu como

principal matéria-prima. A fábrica tem sede na Eslováquia e foi concluída em 2023 (EVONIK INDUSTRIES AG, 2022, 2024; UNILEVER, 2022).

A multinacional Unilever, se destaca como maior produtora de patentes sobre biossurfactantes na área de cuidados pessoais, tendo em 2021, registrado 70 patentes. E estabeleceu como uma meta a substituição do carbono fóssil de todas as suas formulações de produtos de limpeza por carbono renovável ou reciclado (PEREIRA JUNIOR et al., 2022; UNILEVER, 2022).

Quadro 4 – Empresas que comercializam biossurfactantes

Empresa	Nome comercial	Biossurfactante	Fonte biológica	Preço / Quantidade	Referências
SIGMA-ALDRICH®	Surfactin	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	R\$ 2.753,00 / 10g	SIGMA-ALDRICH (2024b)
	Rhamnolipids, 90%	Ramnolipidio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R\$ 898,00/ 10g	SIGMA-ALDRICH (2024a)
	Rhamnolipids, 95% (Di-Rhamnolipid dominant)	Ramnolipidio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R\$ 1.201,00 / 10g	SIGMA-ALDRICH (2024c)
	Fengycin	Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>	R\$ 3.913,00 / 5mg	SIGMA-ALDRICH (2024d)
	Iturin A from <i>Bacillus subtilis</i>	Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>	R\$ 1.522,00 / 1mg	SIGMA-ALDRICH (2024e)
PIONEER BIOTECH	Rhamnolipid/5MA	Ramnolipidio	<i>Pseudomonas sp.</i>	Não divulgado	PIONEER BIOTECH (2024)
BOC Sciences®	Rhamnolipid RL2	Ramnolipídio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>P. fluorescens</i>	Não divulgado	BOC SCIENCES (2024b)
	Surfactin	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Não divulgado	BOC SCIENCES (2024c)
	Iturin A from <i>Bacillus subtilis</i>	Iturina A	<i>Bacillus subtilis</i>	Não divulgado	BOC SCIENCES (2024a)
BIOSYNTH®	Rhamnolipid	Ramnolipidio	Não divulgado	R\$ 406,15 / 15mg	BIOSYNTH (2024c)
	Surfactin	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	R\$ 1.140,43 / 2mg	BIOSYNTH (2022a)
	Fengycin	Fengicina	Não divulgado	R\$ 1.627,65 / 1mg	BIOSYNTH (2024b)
MEDCHEMEXPRESS®	Surfactin	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	R\$ 844,54 / 10mg	MEDCHEMEXPRESS (2024a)
	Fengycin	Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>	R\$ 4.606,56 / 1mg	MEDCHEMEXPRESS (2024b)

Fonte: Autoria própria

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS E CÉLULAS

4.1.1 Bactérias

Os microrganismos avaliados para a produção de biossurfactantes foram isolados de bulbilhos de alho roxo comercializados no norte do Paraná. Neste estudo foram avaliados três isolados bacterianos: *Acinetobacter rudis* UELAsA2.81, *Bacillus cereus* UELAsF2.2 e *Pseudomonas putida* UELAsF3.102, que foram doados pela Prof^a. Dra. Daniele Sartori.

4.1.2 Vírus Herpes Simples 1 (HSV-1)

Para a avaliação da atividade antiviral foi utilizado o vírus herpes simples 1 cepa KOS (HSV-1 KOS) (sensível ao aciclovir) do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná. A manutenção do vírus foi realizada por meio da inoculação de HSV-1 KOS em células Vero (ATCC CCL 81) em cerca de 100µL de glicerol 10% (v/v). As culturas foram mantidas a -20 °C.

4.1.3 Células Vero (ATCC CCL 81)

Para a avaliação da atividade antiviral e da citotoxicidade do biossurfactante, foram utilizadas Células Vero (ATCC CCL 81) pertencentes ao Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná.

4.2 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

4.2.1 Meios e Condição de Cultivo Para Cultura de Células Vero (ATCC CCL 81)

As células Vero (ATCC CCL 81) foram cultivadas em frascos de cultivo celular de 75 cm² (1x10⁶ células/mL) e incubadas em estufa de atmosfera umedecida, a 37 °C com 5% de CO₂ (atmosférico). As células foram mantidas em meio DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle Medium), com alta glicose (DMEM high glucose - SIGMA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (BIO NUTRIENTES), 2 mmol/L de glutamina, 100 UI/mL de penicilina (NOVAFARMA), 100 µL de estreptomicina (SIGMA) e µg/mL de anfotericina B (NOVAFARMA). O subcultivo celular foi realizado com solução de tripsina/EDTA 0,25%, aproximadamente a cada 48 horas, quando as células ultrapassavam 95% de confluência (8×10^6).

4.2.2 Meios e Condição de Cultivo Para Produção de Estoque Viral

Para obtenção do estoque viral, células Vero foram semeadas em frascos de cultivo celular de 25 cm² e incubadas em estufa de atmosfera umedecida, a 37 °C com 5% de CO₂ (atmosférico), até alcançarem confluência adequada (85-90%), com aproximadamente 24 horas de incubação. Em seguida, o meio de cultivo foi retirado com a lavagem da monocamada celular com solução de tampão fosfato salino de Dulbecco (D-PBS). A monocamada celular foi exposta a 0,5 mL de suspensão viral (HSV-1) por um período de 1 hora. Após esse tempo, 4,5 mL de meio DMEM, sem soro fetal bovino (DMEM-SF), foram incorporados aos frascos, os quais foram novamente incubados nas mesmas condições, por tempo suficiente para observação de efeito citopático (ECP), em até 72 horas. O frasco de cultivo inoculado com HSV-1 teve seu conteúdo congelado a -20 °C, descongelados a 4 °C, coletados e centrifugados a 4 °C e 292 g. O sobrenadante foi então coletado, aliquotado e estocado a -80 °C.

4.2.3 Meio e Condição de Cultivo Para Produção de Estoque Bacteriano

Para este estudo, as bactérias foram cultivadas em meio Dyg's cuja composição é glicose 2,0 g/L, peptona 1,5 g/L, extrato de levedura 2,0 g/L, KH₂PO₄ 0,25 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,25 g/L. As culturas bacterianas em meio Dyg's foram estocadas em freezer (-20 °C) armazenadas em microtubos contendo o crescimento celular e glicerol na proporção de 1:1, para crioproteção. Meio Dyg's solidificado com ágar (18g/L) foi usado para obtenção de células viáveis (unidades formadoras de colônia).

4.2.4 Processo Fermentativo Para Produção de Biossurfactante

Foram preparados frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio Dyg's em pH 6 para a realização do processo fermentativo. Foi adicionado 2% do estoque para o preparo do pré-cultivo e incubado a 37 °C, 180 rpm por 12 horas. Em seguida, 50µL do pré-cultivo foi inoculado em placas de Petri contendo meio Dyg's e incubado por período de 14 a 16 horas a 37 °C. Após o crescimento das colônias, 5 UFC foram re-inoculadas para o preparo do inóculo, com incubação por 4 horas. O cultivo para a produção do biossurfactante foi realizado por meio da inoculação de 4% do inóculo, seguida de um período de 5 dias de incubação. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação, o cultivo foi centrifugado a 9960xg, 4 °C por 15 min., para obtenção do extrato bruto livre de células (EBLC).

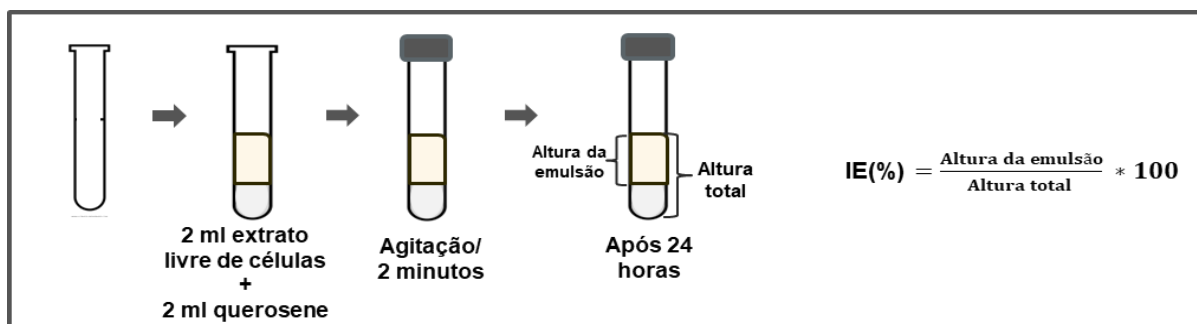
4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

4.3.1 Teste de Índice de Emulsificação

Para verificar a produção de biossurfactante produzido pelas bactérias, foi realizado o teste de índice de emulsificação de 24 horas (IE24). O teste foi realizado adicionando 2 mL do extrato bruto livre de células a 2 mL de querosene em um tubo de ensaio com tampa rosqueável e homogeneizados em vórtex (Phoemix AP 56), na velocidade máxima, por 2 minutos (COOPER; GOLDENBERG, 1987). Os testes foram realizados em triplicata. O resultado foi expresso em porcentagem, por meio da equação $IE (\%) = (AE/AT) * 100$, onde AE = altura da emulsão e AT = altura total (FIGURA 9).

A cepa que apresentou sobrenadante com a melhor atividade emulsificante através do teste de IE24, foi selecionada para a realização dos próximos ensaios.

Figura 9 – Representação do processo de avaliação do índice de emulsificação de 24 horas do biossurfactante



Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Efeito da Composição do Meio Na Produção de Biossurfactante

Foi avaliado se o microrganismo era capaz de produzir biossurfactante, em meio de cultivo com diferentes substratos. O quadro 5 apresenta a composição dos meios de cultivo testados. Bagaço de malte e o óleo de soja usado, foram utilizados para suplementar o meio Dyg's. Cada cultivo foi incubado nas condições de temperatura e agitação mencionados anteriormente.

Quadro 5 - Produção do biossurfactantes em diferentes meios de cultivo

Código	Meios de cultivos utilizados para a produção de biossurfactante
A	Meio de cultivo Dyg's
B	Dyg's sem glicose
C	Dyg's sem glicose + 2% de óleo de soja usado
D	Dyg's sem glicose e peptona + 2% de óleo de soja usado
E	Dyg's sem glicose e extrato de levedura + 2% de óleo de soja usado
F	Dyg's sem peptona, extrato de levedura e glicose + 2% de óleo de soja usado
G	Dyg's + 1% de bagaço de malte
H	Dyg's sem glicose + 1% de bagaço de malte
I	Dyg's sem peptona + 1% de bagaço de malte

Fonte: Autoria própria

Após a incubação, os sobrenadantes foram avaliados para o IE24 e os meios de cultivo que apresentaram os melhores resultados foram utilizados para os próximos testes.

4.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE

4.4.1 Efeito do Tempo na Estabilidade dos Biossurfactantes

A estabilidade das emulsões ao longo do tempo foi avaliada pelo teste de índice de emulsificação (IE). Após a primeira avaliação de IE24, todos os tubos do teste ficaram em repouso na bancada. Posteriormente, o cálculo do IE foi novamente determinado após 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias de repouso. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.2 Estabilidade Frente a Variações de pH

O EBLC teve seu pH ajustado para valores de 2, 4, 6, 8 e 10 com a adição de soluções de HCl 0,1 mol/L ou NaOH 0,1 mol/L. Posteriormente, foram adicionados 2 mL da solução de EBLC e 2 mL de querosene em um tubo com tampa, para a determinação do IE24 conforme descrito no item 4.3.1 (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.3 Efeito da Temperatura em Diferentes Tempos de Aquecimento

Tubos com tampa rosqueável, contendo 2 mL do EBLC foram submetidos a diferentes temperaturas de 28 °C, 46 °C, 64 °C, 82 °C e 100 °C em banho-maria. Cada temperatura avaliada foi aquecida por 15, 30 e 60 minutos. Após o aquecimento, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e realizou-se a determinação do IE24 conforme descrito no item 4.3.1. Os testes foram realizados em triplicata.

4.4.4 Estabilidade Frente a Variações de Concentração de NaCl

Foi determinada a estabilidade do biossurfactante quando exposto a diferentes concentrações de salinidade (NaCl). O teste foi realizado mediante a adição de NaCl ao EBLC de forma que a concentração salina final ficasse em 2, 4, 6, 8 e

10%. Posteriormente, realizou-se a determinação do IE24 conforme descrito no item 4.3.1 (BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE EM DIFERENTES COMPOSTOS HIDROFÓBICOS

Foi determinado o potencial de emulsificação do biossurfactante produzido pela bactéria em diferentes compostos hidrofóbicos. O teste foi realizado adicionando 2 mL do extrato livre de células a 2 mL do composto hidrofóbico, em um tubo com tampa rosqueável, para a determinação do índice de emulsificação. Os seguintes compostos hidrofóbicos foram utilizados: acetato de etila, azeite, clorofórmio, diclorometano, éter de petróleo, gasolina, hexano, óleo diesel, óleo diesel s10, óleo de soja usado de origem doméstica e tolueno. Os tubos foram mantidos em repouso à temperatura ambiente e o IE foi avaliado nos períodos de 24, 48, 120 e 336 horas (DURVAL et al., 2019; MARCELINO, 2017; BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008). Os testes foram realizados em triplicata.

4.6 TESTE DE DISPERSÃO EM ÓLEO

Para realização do teste de dispersão em óleo foram adaptadas as metodologias propostas por Degang et al., (2023) e Morikawa; Hirata; Imanaka, (2000). Em uma placa de Petri com 10 cm de diâmetro foram colocados 20 mL de água destilada. Em seguida, 200 µL de óleo de motor queimado foi adicionado na superfície da água para formar uma película de óleo. Na sequência, 100 µL do EBLC dos cultivos foram colocados suavemente no centro da película de óleo. Após 30 segundos, foi observado se houve a formação de um halo de deslocamento do óleo motor. Para avaliar o diâmetro da zona de deslocamento, foi utilizada uma régua. Foi utilizado como controle negativo o EBLC cultivo sem inóculo. Os testes foram realizados em triplicata.

4.7 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

O processo de extração e recuperação do biossurfactante foi adaptado da metodologia proposta por Durval et al., (2021). O meio de cultivo contendo Dyg's sem

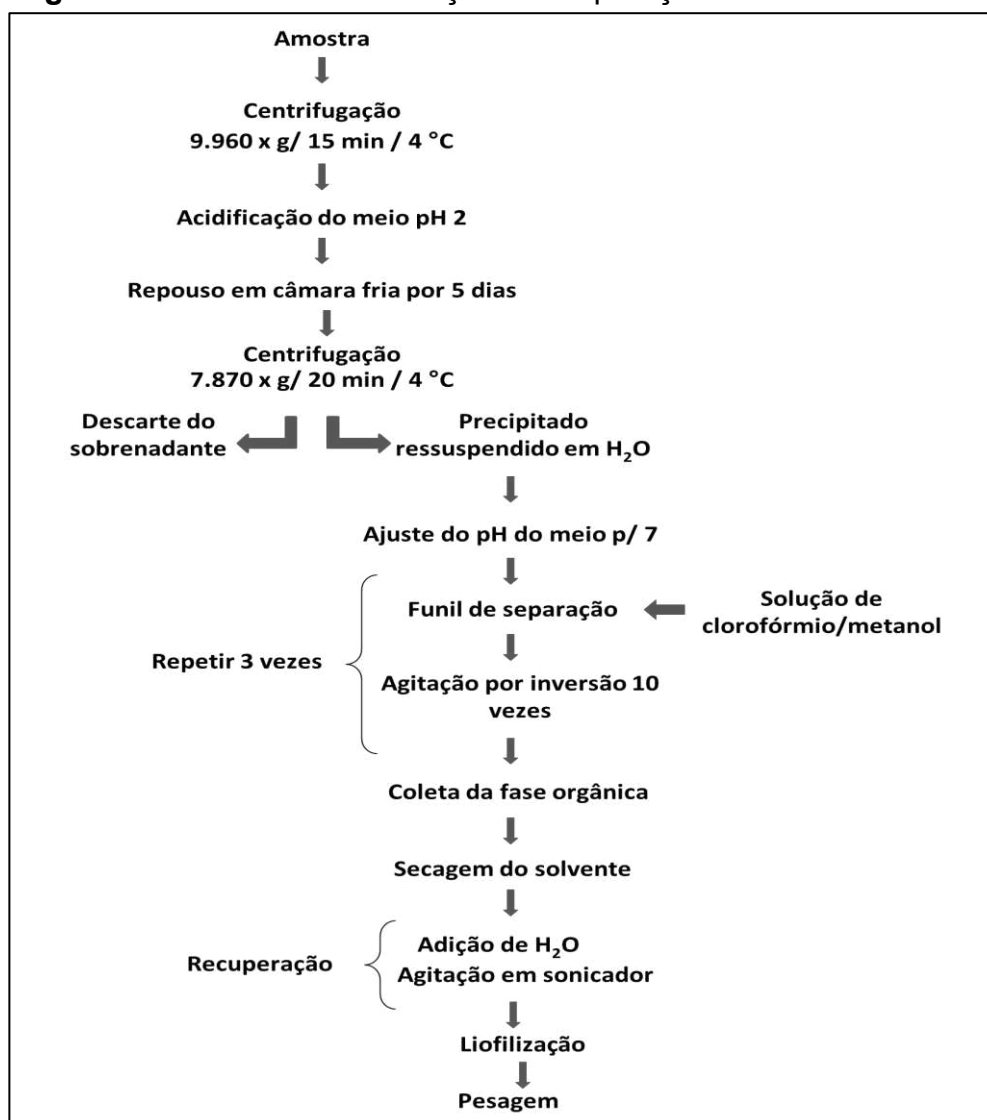
glicose (meio B) foi escolhido para realizar as etapas de extração e caracterização química. Após a interrupção do cultivo, a amostra foi centrifugada para obter o extrato bruto livre de células a 9.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O pH foi ajustado para 2, adicionando-se uma solução de HCl 0,1mol/L. Em seguida, a amostra permaneceu em repouso em câmara fria por 5 dias, para a precipitação do biossurfactante.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 7880xg/20 minutos para separar o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em H₂O destilada. O pH foi alterado para 7 utilizando uma solução de NaOH 0,1 mol/L.

Em um funil de separação, foi adicionada a mesma proporção de amostra e solução orgânica de clorofórmio/metanol (3:1) e realizada uma agitação por meio da inversão do funil por 10 vezes. Após a separação das fases, foi coletada a fase orgânica. O processo de lavagem da amostra foi repetido três vezes. A fase orgânica foi colocada em um rotaevaporador a 60 °C, para evaporação dos solventes até um volume de aproximadamente 10 mL da solução. Em seguida, a solução foi colocada em tubo Falcon e deixada em uma capela de exaustão em temperatura ambiente para a completa evaporação dos solventes.

A recuperação do biossurfactante foi realizada após a adição de água destilada ao precipitado, seguida de agitação em um sonicador até a sua completa solubilização. Em seguida a solução com o biossurfactante foi liofilizada e depois teve sua massa aferida.

A figura 10 apresenta um fluxograma do processo de extração e recuperação do biossurfactante.

Figura 10 - Processo de extração e recuperação do biossurfactante

Fonte: Autoria própria.

4.8 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BIOSSURFACTANTE

4.8.1 Espectroscopia no Infravermelho Por Transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de infravermelho foram realizadas utilizando espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo com faixa de varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , 64 *scans* e resolução de 4 cm^{-1} . Para a leitura foram pesados 5 mg do biossurfactante liofilizado e 2,5 mg padrão de surfactina adquirido da Sigma - Aldrich Brasil Ltda. com 98% de pureza que foi utilizado como referência para a análise. O padrão e a amostra foram preparados na forma de pastilhas de KBr para a análise.

4.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para detecção do biossurfactante em HPLC SHIMATZU® LIQUID CROMATOGRAPH LC-10AD, com forno CTO-10A e detector UV SPD-10^a, foi adaptada a metodologia de AKPA et al., (2001). Foi utilizada uma coluna C18 (XTerra® RP-18, 5 µm, 3,9 x 150 mm) a 214 nm com monitor UV. A temperatura da coluna foi mantida em 25 °C, a fase móvel constituiu acetonitrila/água/TFA (80:20:0,05 [v/v/v]). Foram utilizados solventes em grau HPLC. A taxa de fluxo utilizada foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. O padrão de surfactina adquirido da Sigma - Aldrich Brasil Ltda. com 98% de pureza foi utilizado como referência para a análise. O biossurfactante liofilizado foi solubilizado em metanol, permanecendo na concentração de 0,1 µg/mL e depois filtrado em sistema de membrana. O padrão também foi solubilizado em metanol, permanecendo na concentração de 0,2 µg/mL, em seguida, agitado em sonicador por 10 minutos.

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

4.9.1 Citotoxicidade

A atividade citotóxica foi avaliada em células VERO (ATCC CCL81) através do Teste de Redução do Tetrazólio - MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) em cristais insolúveis de formazana, realizada através da atividade mitocondrial de células metabolicamente viáveis. As células Vero (2,5x10⁴ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições descritas no item 4.2.1. A amostra liofilizada foi solubilizada com 10% DMSO e 90% meio DMEM-SF (Meio de Eagle modificado por Dulbecco – sem soro fetal bovino). Foram realizadas diluições seriadas da amostra de biossurfactante, na base 1:2, (500 a 31,25 µg/mL), em DMEM-SF e adicionadas sobre as monocamadas, em quatro replicatas, com um volume final de 100 µL/poço. Os poços contendo apenas DMEM-SF (100 µL/poço) foram utilizados como controle. Após 72 horas de incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a monocamada foi lavada com 100 µL de D-PBS (Solução de tampão fosfato salino de Dulbecco). Foram adicionados 10 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço e incubado por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 900 µL de solução solubilizante (Isopropanol acidificado com HCl 0,01 M e 0,36 % de

Triton-X) e os cristais de formazana foram solubilizados mediante agitação em agitador orbital por 15 minutos e a absorbância avaliada por espectrofotômetro a 570nm e a 690nm. Os resultados em viabilidade celular foram utilizados para estipular a equação da reta e para encontrar a concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular (CC50) (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; WATANABE et al., 1994; REED; MUENCH, 1938). O resultado da viabilidade celular foi obtido através da equação exemplificada abaixo:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{(Abs_{T(570)} - Abs_{T(690)})}{(Abs_{cc(570)} - Abs_{cc(690)})} \times 100$$

Onde:

Abs_T = absorbância do grupo de tratamento

Abs_{cc} = absorbância do controle

4.9.2 Análise de Atividade Antiviral *In Vitro*

A atividade antiviral da amostra de biossurfactante contra o HSV-1 foi realizada através do teste de redução do MTT, conforme já descrito anteriormente. As células Vero ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições descritas no item 4.2.1, por 24 horas. Foram realizadas uma série de diluições da amostra, de base 1:2 (400 a 50 $\mu\text{g/mL}$) em DMEM-SF, e adicionadas na monocamada celular, e simultaneamente (tempo 0h) 10% de inóculo viral 10^{-2} de partículas virais do herpes simples 1 (HSV-1) (cepa KOS), em quatro replicatas, com um volume final de 100 $\mu\text{L/poço}$. Os poços apenas com DMEM-SF (controle celular – CC) e DMEM-SF inoculado com 10% de inóculo viral 10^{-2} de HSV (Vero) (controle viral - CV), foram utilizados para mensurar os parâmetros de 100 e 0% de inibição de HSV. As placas foram incubadas por 72 horas. Após esse período, a revelação do teste de redução do MTT e a obtenção do resultado em absorbância foi realizada como citado anteriormente (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018; WATANABE et al., 1994; REED; MUENCH, 1938). A percentual de inibição viral foi obtida através da equação demonstrada abaixo:

$$Inibição\ Viral\ (\%) = \frac{(Abs_T - Abs_{CV})}{(Abs_{CC} - Abs_{CV})} \times 100$$

Onde:

Abs_T = absorbância das células inoculadas e tratadas com as amostras

Abs_{CV} = absorbância do controle do vírus (células inoculadas com o vírus e não tratadas)

Abs_{CC} = absorbância do controle das células (células não inoculadas e não tratadas)

A concentração responsável por inibir em 50% a infectividade viral (IC_{50}) para cada composto foi determinada através da equação da reta. Este dado foi utilizado para o cálculo do índice de seletividade.

$$\text{Índice de seletividade} = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

4.9.3 Investigação do Mecanismo Antiviral *In Vitro*

Foi realizada uma avaliação do mecanismo de ação da atividade antiviral do biossurfactante. O ensaio teve como objetivo identificar uma possível capacidade de destruição ou inativação da partícula viral, levando a diminuição da infectividade viral, resultante do contato com o biossurfactante. Foi realizada alterações no tempo de administração da substância, com o objetivo de identificar em quais possíveis etapas do ciclo replicativo viral o efeito inibitório poderia ser exercido.

No ensaio virucida, foi verificado a capacidade do biossurfactante em inativar o HSV-1, levando a diminuição da infectividade viral, resultante do contato direto com a substância. Para isto, células Vero ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas nas condições já descritas, por 24 horas. As concentrações de 400, 200, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do biossurfactante, diluídas em DMEM-SF, foram incubadas com HSV-1, em um volume final de 100 μL , pelo período de 1 hora. Posteriormente, a suspensão contendo vírus e as concentrações variadas do biossurfactante foram diluídas a 10^{-2} vezes, em meio DMEM-SF, foi aplicada sobre as monocamadas em 4 replicatas, com um volume final de 100 $\mu\text{L/mL}$. Como controle

viral, uma alíquota pura de HSV-1 (Vero) foi diluída igualmente. A revelação pelo teste de redução de MTT para HSV-1, foi realizado como descrito anteriormente (DAS; KUMAR, 2018; REED; WATANABE et al., 1994; MUENCH, 1938).

Para a observação do efeito pré-infecção (pré-tratamento), a monocamada celular foi exposta ao biossurfactante por 1 horas, antes da inoculação viral, nas concentrações 400, 200, 100 e 50 µg/mL, em meio DMEM-SF, com volume final de 100 µL/poço. Após o período, os compostos foram removidos, com posterior lavagem celular com D-PBS e incubadas com meio DMEM-SF por 1h (pré-tratamento 1h). A infecção viral foi preparada através de diluições de 10^{-3} do estoque de HSV-1 em quatro replicatas, inoculadas sobre a monocamada com volume final de 100 µL/poço na placa, com posterior incubação, por 72 horas. Poços infectados e concomitantemente não tratados foram utilizados como CV (DAS; KUMAR, 2018; REED; WATANABE et al., 1994; MUENCH, 1938).

No tratamento pós-infecção (pós-tratamento), células Vero ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas em estufa de atmosfera umedecida, nas condições já descrita, por 24 horas. Posteriormente, as monocamadas foram infectadas com diluição de 10^{-3} em quatro replicatas, 100 µL/poço de HSV-1 (Vero) por 1 hora para adsorção viral. Os poços foram lavados com D-PBS, seguido de adição de meio de manutenção celular (DMEM-SF), até o início do tratamento de 1 hora. O meio de manutenção foi substituído pelo biossurfactante, nas concentrações de 400, 200, 100 e 50 µg/mL. Para o controle viral, poços foram infectados por 1 hora na mesma diluição e, em seguida, o conteúdo substituído por meio DMEM-SF. As placas foram incubadas nas concentrações supracitadas, por 72 horas. A revelação pelo teste de redução de MTT para HSV-1, foi realizado como descrito anteriormente (DAS; KUMAR, 2018; REED; WATANABE et al., 1994; MUENCH, 1938).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante da surfactina foi realizada de acordo com o proposto por NASCIMENTO et al. (2023), partindo-se de uma solução de surfactina na concentração de 1 mg/mL. A capacidade antioxidante contra o radical DPPH• (expresso como o percentual de DPPH• reduzido) e capacidade contra radicais

livres ABTS+ (expressos como percentual de inibição da atividade ABTS+) foram obtidos através da equação:

$$\%IA = [100 - (\text{absorbância da amostra} / \text{absorbância do controle})] \times 100$$

Onde:

Amostra = todos os reagentes com sobrenadante

Controle = todos os reagentes sem sobrenadante

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos listados nos itens 4.1.3 a 4.4 foram realizados em triplicata e submetidos a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados foram tratados com o auxílio do software OriginPro 2023 (Origin Corporation – Northampton, Massachusetts, United States).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DO MICRORGANISMO PRODUTOR DE BIOSSURFACTANTE

Metabólitos microbianos de interesse biotecnológico podem ser obtidos a partir de processos fermentativos como a fermentação em estado sólido e fermentação submersa, que foi o método de escolha, uma vez, uma vez que variáveis como a homogeneidade do meio, o pH e a transferência de calor são mais facilmente controladas e, dessa forma, a sua operação é mais simples (DECESARO et al., 2013).

Neste estudo, a produção de biossurfactante pelas bactérias foi avaliada por meio de um método indireto, no qual a presença do biossurfactante produzido no cultivo foi analisada por meio do teste de índice de emulsificação. Biossurfactantes apresentam como propriedade a atividade emulsificante, sendo assim, o teste de índice de emulsificação acaba sendo muito empregado para avaliar a produção de biossurfactantes por microrganismos (MAIA, 2017; MARCELINO, 2017; SILVA FILHO, 2019).

O teste de IE24 permitiu determinar se as bactérias foram capazes de produzir biossurfactante. A bactéria *Bacillus cereus* apresentou um IE24 de $58,53^a \pm 4,01\%$ e a *Pseudomonas putida* um IE24 de $32,87^b \pm 5,01\%$, enquanto a *Acinetobacter rudis* não produziu emulsão. É descrito que bons agentes emulsificantes, são capazes manter IE24 acima de 50% após 24 horas de análise, sendo assim, *B. cereus* foi a que apresentou o melhor resultado dentro das condições testadas (FRANÇA, 2014).

Foram encontrados trabalhos que relatam que essas espécies são produtoras de biossurfactantes, com exceção da bactéria *Acinetobacter rudis*. Como o *Bacillus cereus* BCS0 (DURVAL et al., 2019), *Bacillus cereus* UCP 1615 (DURVAL et al., 2021), *B. cereus* (MMIC 1, MMIC 2 e MMIC 3) (BASIT et al., 2018) e *Bacillus cereus* GX7 (WANG et al., 2024) que são relatados como produtores de biossurfactante da classe dos lipopeptídeos. As bactérias *Pseudomonas putida* (QIN; XU; JIA, 2022), *Pseudomonas putida* CB-100 (ÁNGELES; REFUGIO, 2013) e *Pseudomonas putida* 21BN (TULEVA; IVANOV; CHRISTOVA, 2002) são descritas como produtoras de biossurfactantes da classe dos glicolipídios. Não foram encontradas informações sobre a produção de biossurfactante por *Acinetobacter rudis*.

As próximas etapas foram realizadas com a bactéria *Bacillus cereus* e o seu respectivo biossurfactante.

5.2 PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

A bactéria *Bacillus cereus* foi inoculada em meios de cultivo com diferentes substratos com o objetivo de avaliar se o microrganismo era capaz de produzir biossurfactantes nesses meios. Na Tabela 1 encontram-se os resultados do IE24 com os respectivos EBLC. Os melhores resultados foram obtidos nos meios A ($64,87 \pm 2,2^a$), B ($62,13 \pm 0,7^a$), C ($60,8 \pm 1,6^a$), D ($60,43 \pm 0,6^a$) e E ($63,47 \pm 0,5^a$), onde todos apresentaram índice de emulsificação acima de 50% e não apresentaram diferença estatística, embora a composição do meio variasse (meio A = meio Dyg's total; meio B = meio Dyg's sem glicose; meio C = meio Dyg's sem glicose + óleo de soja usado; meio D = meio Dyg's sem glicose e peptona + óleo de soja usado; meio E = Dyg's sem glicose e extrato de levedura + óleo de soja usado).

No EBLC do cultivo contendo meio F não foi observado a formação de emulsão no teste IE24. Isso ocorreu porque não foi oferecido ao microrganismo nenhuma fonte de nitrogênio (N) (meio F = Dyg's sem glicose, peptona e extrato de levedura). Este resultado e os encontrados nos meios A, B, C, D e E, sugerem a importância da fonte de nitrogênio para a produção do biossurfactante, uma vez que apresentou nos meios onde foram encontrados os melhores índices de emulsificação, não faltou molécula nitrogenada para o metabolismo microbiano. Segundo Nazareth et al., (2021a), fontes de nitrogênio, como o extrato de levedura, podem aumentar o crescimento celular em 25% devido à presença de aminoácidos e outros compostos estimuladores do crescimento celular.

As bactérias podem otimizar o seu metabolismo por meio de sistemas regulatórios que permitem o uso sequencial das fontes de carbono e nitrogênio disponíveis. Além disso, os aminoácidos são importantes, pois são precursores da síntese do grupo heptapeptídeo da surfactina, portanto, o metabolismo do nitrogênio é essencial na produção dos lipopeptídeos (HERBST, 2021; NAZARETH et al., 2021a; WACKER et al., 2003).

Com o objetivo de utilizar uma fonte alternativa de nitrogênio para o microrganismo, o bagaço de malte foi testado, visto que se trata de um resíduo da indústria cervejeira rico em proteínas, além de ser uma fonte rica em carboidrato (HERBST, 2021; NAZARETH et al., 2021a).

Nos meios G, H e I, o meio Dyg's foi suplementado com 1% (p/v) de bagaço de malte seco, porém não houve crescimento microbiano sugerindo que este resíduo pode conter compostos que inibiram o crescimento microbiano, não servindo, portanto, como substrato para o isolado bacteriano que foi selecionado neste estudo.

A utilização de substratos de alto custo é um dos fatores limitantes que envolvem uso de biossurfactantes em larga escala. Neste estudo, o bagaço de malte não foi uma boa fonte de carbono e nitrogênio, enquanto o óleo de soja usado foi considerado uma boa fonte de carbono para o microrganismo, e conseqüentemente, para a produção de biossurfactantes, tendo a vantagem de ser uma fonte de carbono de baixo custo, o que impacta no custo de produção (DURVAL *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Avaliação da produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo através do teste IE24

Código	Meios de cultivos utilizados para a produção de biossurfactantes	IE24 (%)
A	Meio de cultivo Dyg's	64,87 ± 2,2 ^a
B	Dyg's sem glicose	62,13 ± 0,7 ^a
C	Dyg's sem glicose + 2% de óleo de soja usado	60,8 ± 1,6 ^a
D	Dyg's sem glicose e peptona + 2% de óleo de soja usado	60,43 ± 0,6 ^a
E	Dyg's sem glicose e extrato de levedura + 2% de óleo de soja usado	63,47 ± 0,5 ^a
F	Dyg's sem peptona, extrato de levedura e glicose + 2% de óleo de soja usado	0,0 ± 0,0 ^b
G	Dyg's + 1% de bagaço de malte	0,0 ± 0,0 ^b
H	Dyg's sem glicose + 1% de bagaço de malte	0,0 ± 0,0 ^b
I	Dyg's sem peptona + 1% de bagaço de malte	0,0 ± 0,0 ^b

Fonte: Autoria própria.

5.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE

Os biossurfactantes produzidos neste estudo foram avaliados quanto à estabilidade em diferentes períodos de tempos, temperaturas, pH e concentração de NaCl. Embora os biossurfactantes presente no EBLC produzidos nos meios A, B e C, não apresentassem diferença significativa no índice de emulsificação, os três biossurfactantes foram selecionados para avaliação da estabilidade da atividade emulsificante.

Estudos têm demonstrado que os biossurfactantes produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, os lipopeptídeos, principalmente do tipo surfactinas, são estáveis em diversas condições (DURVAL et al., 2019; BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

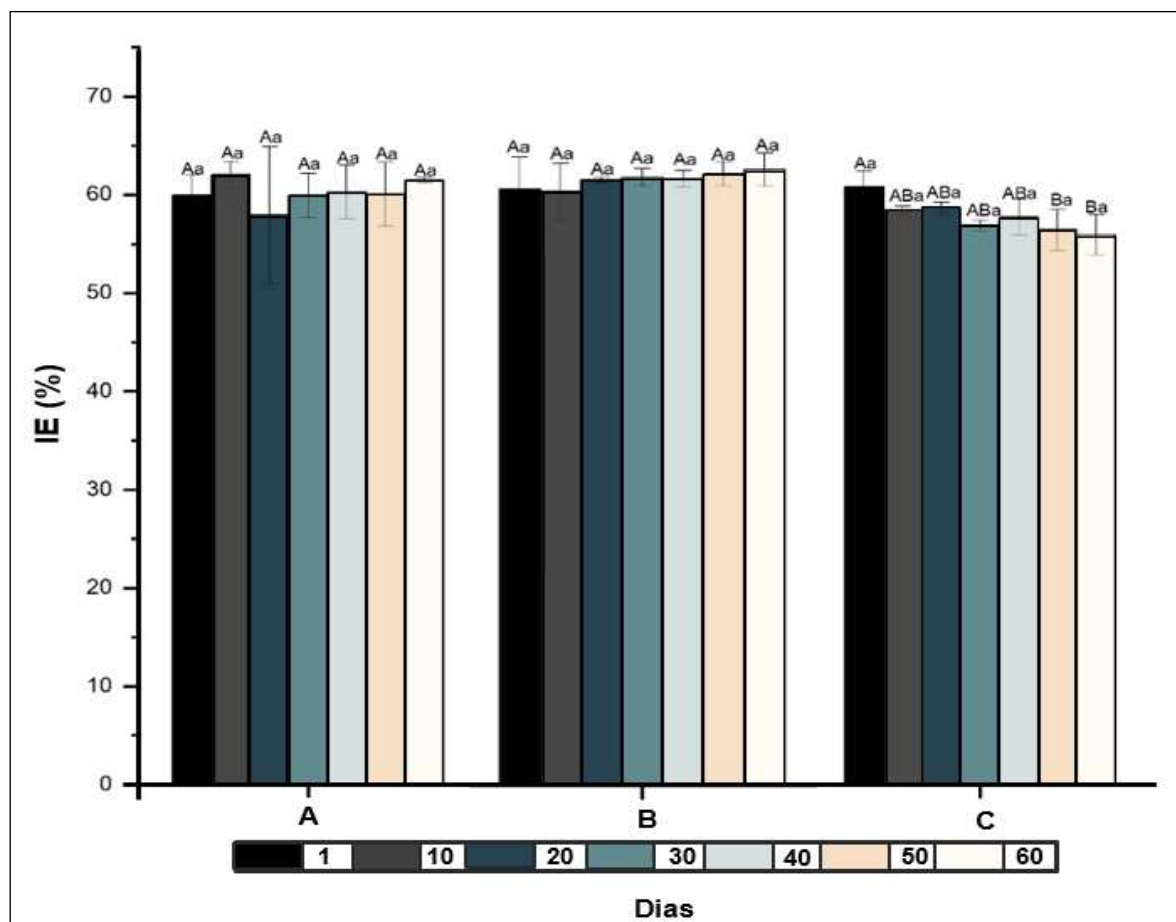
A análise da estabilidade de um biossurfactante é crucial para determinar suas futuras aplicações, uma vez que é necessário que ele permaneça estável em relação às variações ambientais, como a temperatura, pH, salinidade e tempo. A característica fundamental dos agentes emulsificantes é a de manter a estabilidade de emulsões de substâncias com diferentes graus de polaridade com valores de IE₂₄ acima de 50% (DURVAL et al., 2019; MAIA, 2017; BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008).

5.3.1 Efeito do tempo na estabilidade dos Biossurfactantes

Na Figura 11, é possível observar que o biossurfactante que emulsionou o querosene produziu um índice de emulsificação superior a 50% em todos os meios de cultivo testados e não apresentaram diferença estatística ao longo dos 60 dias avaliado.

Comparando os valores do meio A (meio Dyg's total) com o meio B (meio Dyg's sem glicose), não foi encontrada diferença significativa entre eles. E ao comparar os valores das emulsões do meio C (Dyg's sem glicose + 2% óleo de soja usado) com os valores dos meios A e B, não foi encontrada diferença significativa até 40 dias. A variação observada no meio C pode estar relacionada à presença de resquícios de óleo do cultivo no EBLC utilizado para avaliação do IE, o que pode afetar a atividade emulsificante.

Figura 11 – Avaliação da estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) ao longo de 60 dias



Fonte: Autoria própria.

A = Dyg's total; B = Dyg's sem glicose; C = Dyg's sem glicose + óleo de soja usado. Barras acompanhadas de letras maiúsculas não diferem no teste de Tukey ($p < 0,05$) no mesmo tratamento. Barras acompanhadas de letras minúsculas não diferem no teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

5.3.2 Estudo de Estabilidade Frente a Variações de pH

Observa-se na Figura 12 que a estabilidade da atividade emulsificante quando exposta a variações de pH é afetada pelo tipo de meio utilizado para produzir o biossurfactante.

Avaliando separadamente, os biossurfactantes produzidos no meio A exibiram maior instabilidade, sendo encontrado uma pequena atividade emulsificante em extremos de pH (2 e 10). Também apresentou diferença significativa quando comparado com a amostra que não recebeu tratamento (controle em pH 7). Em pH 4, o querosene foi emulsificado mais que 50%, e não apresentou diferença significativa

com o controle, mas em pH 8, o metabólito microbiano perdeu totalmente a capacidade emulsificante.

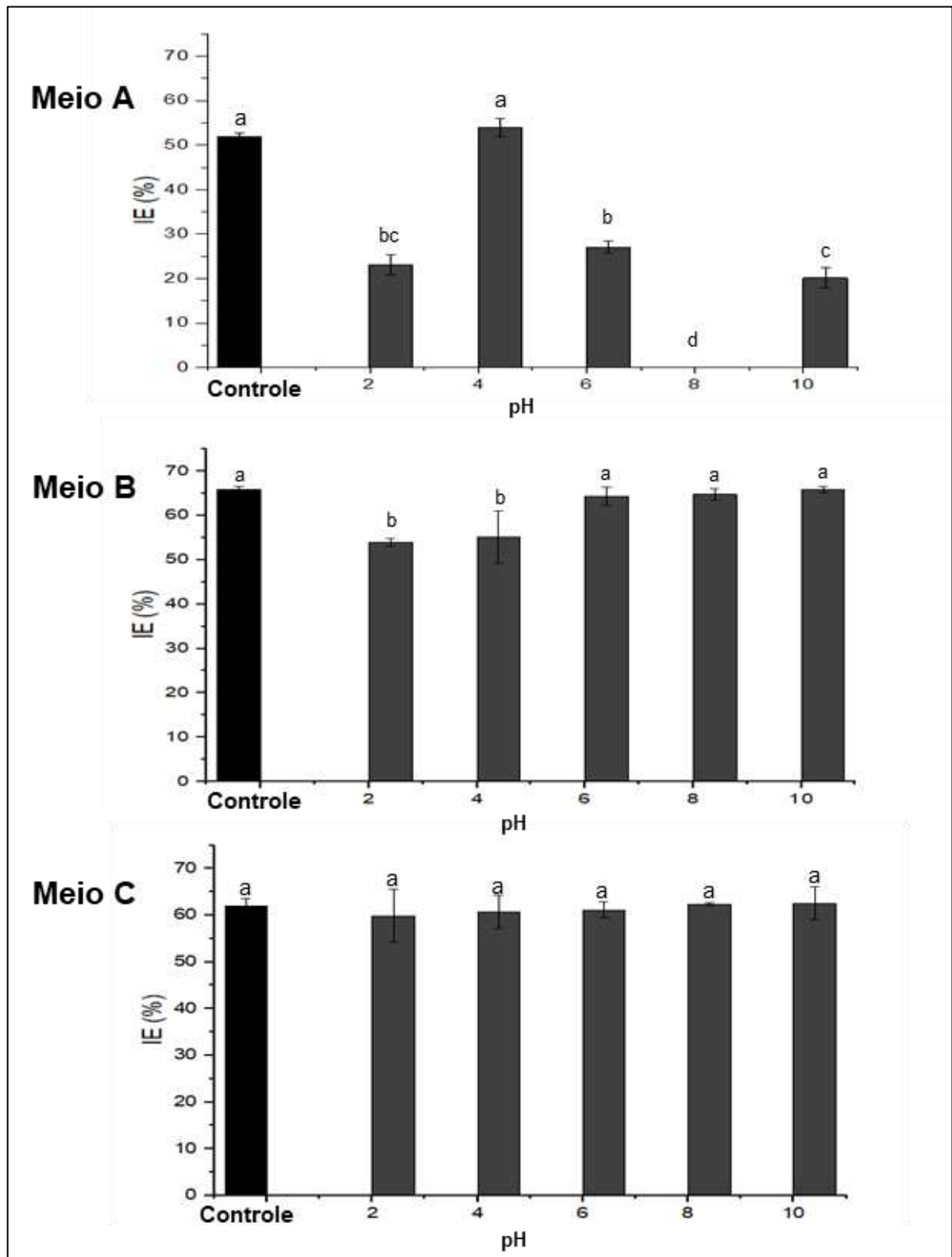
Os biossurfactantes dos meios B e C foram mais estáveis, frente às mudanças de pH. O biossurfactante produzido em meio B, apresentou-se estável em condições alcalinas, com um IE superior a 64% quando o pH variou de 6, a 10, e não apresentando diferença estatística com o controle. No entanto em meio ácido, foi observado uma redução no IE para 55% em pH 4 e 53,5% em pH 2 e apresentou diferença estatística com o controle. As emulsões do biossurfactante produzido em meio C, foram acima de 50% em todos os valores de pH testados e não apresentaram diferença significativa entre seus valores e quando comparado com o controle.

Wang et al. (2024) demonstraram que o biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* GX7 apresentou-se estável em pH superior a 6. Fernandes (2006) relata que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* R14 se manteve estável frente a variação de pH de 4 a 8, porém houve perda significativa da atividade emulsificante em pH 2. O biossurfactante produzido por *B. amyloliquefaciens* C11 não foi afetado por variações de pH entre 5 e 9, enquanto, em pH 4, o IE24 foi reduzido significativamente (SCHALCHLI et al., 2023).

Segundo Durval et al. (2019), biossurfactantes apresentam estabilidade da atividade emulsificante em diferentes valores de pH, principalmente em meios alcalinos. Podendo ser devido à melhor estabilidade das micelas de ácido graxo-surfactante na presença de NaOH. França (2014) relata que em um ambiente ácido, a surfactina é precipitada, pois a presença dos ácidos glutâmico e aspártico (aminoácidos) em sua estrutura, fazem com que o contato ácido cause a protonação da cadeia lateral destes aminoácidos, tornando a surfactina insolúvel em meio aquoso. Hoffmann et al. (2021) também relataram que em pH mais alcalino ocorre o aumento de carga negativa, causando a estabilização das gotículas da emulsão devido ao aumento nos grupos carboxila desprotonados.

Os resultados encontrados na literatura e neste estudo, mostram que o pH pode influenciar na estabilidade da atividade emulsificante, dependendo do meio onde o biossurfactante é produzido. E os biossurfactantes produzidos pelo gênero *Bacillus* que foram encontrados na literatura, apresentam maior estabilidade em valores de pH mais alcalino. Já neste estudo, a atividade emulsificante do biossurfactante produzido no meio C, foi mais estável em relação ao pH.

Figura 12 - Estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) frente a variações de pH



Fonte: Autoria própria.

A = Dyg's total; B = Dyg's sem glicose; C = Dyg's sem glicose + óleo de soja usado. Barras acompanhadas de letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

5.3.3 Efeito da Temperatura em Diferentes Tempos de Aquecimento

Na Figura 13, é possível observar que a temperatura não teve influência sobre a atividade emulsificante dos biossurfactantes produzidos nos meios de cultivo A, B e C.

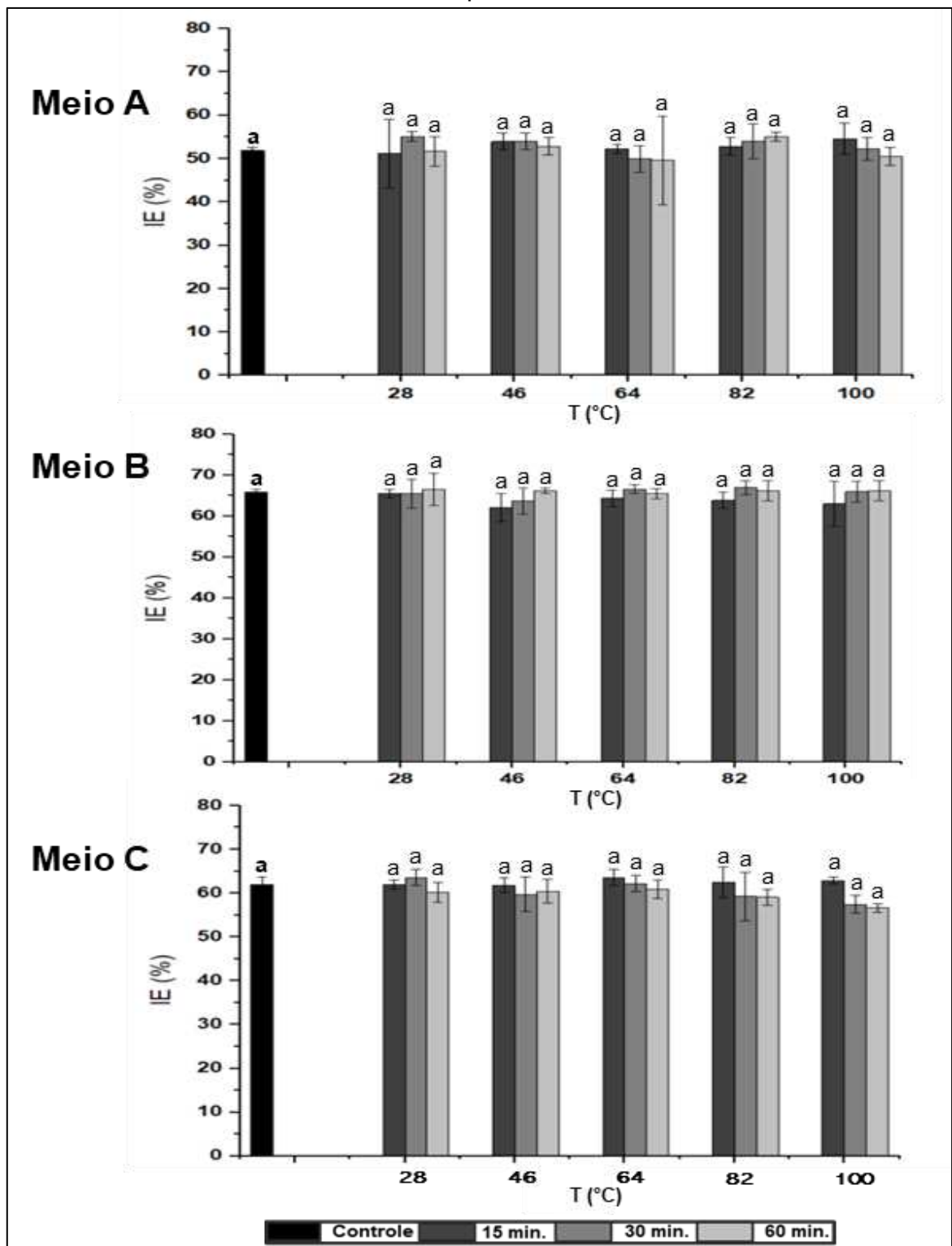
Os valores do IE entre as temperaturas e os tempos testados do meio A, não apresentaram diferença significativa, variando entre 49,5% e 55,1%.

A emulsão formada pelo biossurfactante do meio B, chegou a formar IE de até 67% e, entre as temperaturas e os tempos testados, não houve diferença significativa, tendo valores variando entre 62% e 67%.

O biossurfactante produzido no meio no qual havia lipídio (meio C) também não apresentou diferença significativa entre os valores de IE, ficando entre 56,6% e 63,7%.

Estudos confirmam a estabilidade dos biossurfactantes produzido por *Bacillus*, frente a variações de temperatura. Wang et al. (2024) relatam *Bacillus Cereus* GX7 produz um biossurfactante que atinge IE acima de 55% em temperaturas de 30 °C a 120 °C. Já o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* R14 se apresentou como termoestável a tratamentos com temperatura de 100 °C mesmo depois de 3 horas (FERNANDES, 2006). Um estudo com *B. amyloliquefaciens* C11 mostrou que o IE₂₄ não foi significativamente afetado pela temperatura na faixa de 30 °C a 80 °C (SCHALCHLI et al., 2023). França (2014) observou que a atividade emulsificante da surfactina produzida pela cepa ICA56, não apresentou variações quando submetida a temperaturas de 4 °C a 121 °C, por 30 minutos.

Figura 13 – Estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) frente a variações de temperatura em diferentes tempos



Fonte: Autoria própria

A = Dyg's total; B = Dyg's sem glicose; C = Dyg's sem glicose + óleo de soja usado.

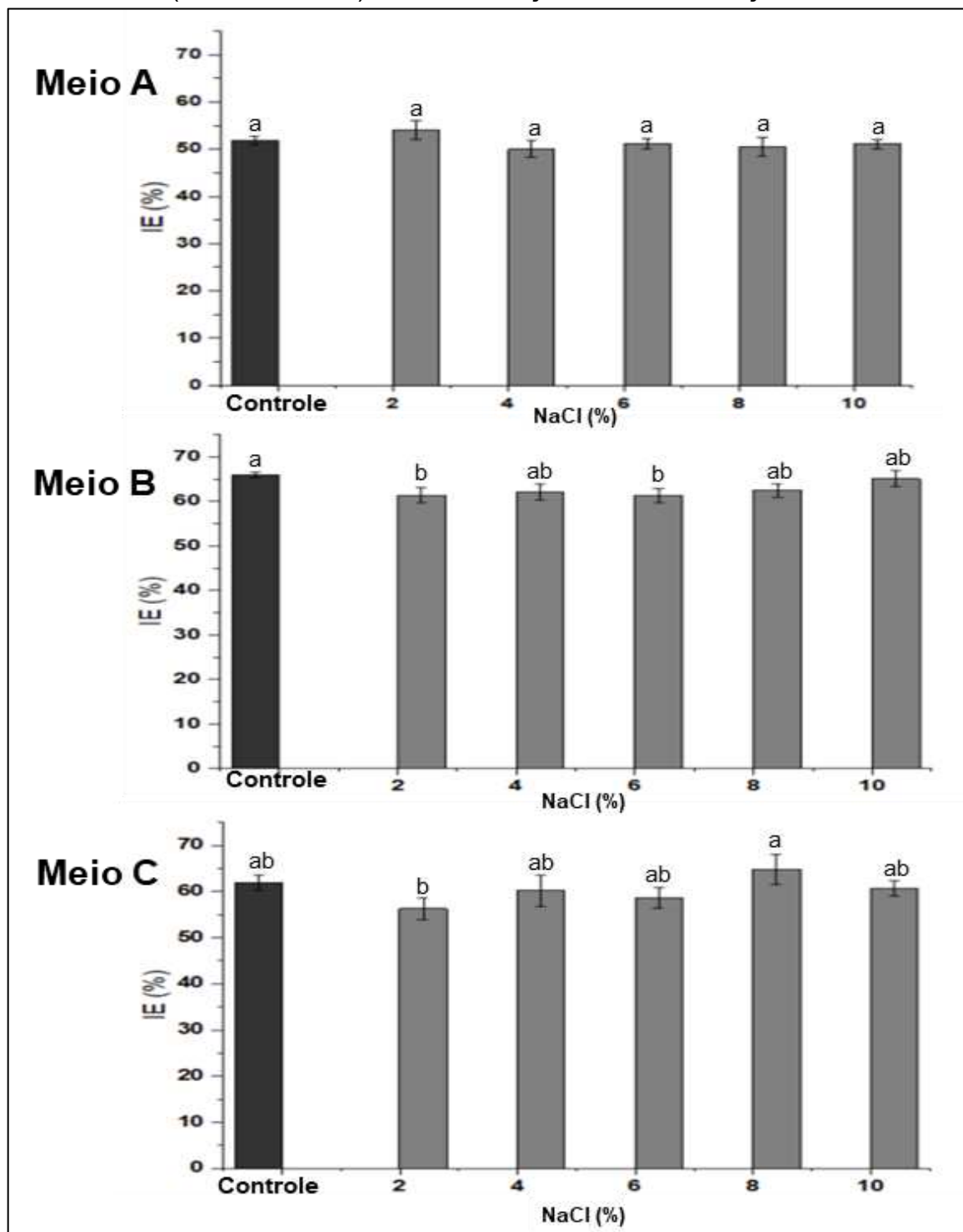
5.3.4 Estabilidade Frente a Variações de Concentração de NaCl

Na Figura 14, é possível observar que as variações de concentração de salinidade não tiveram influência significativa sobre a atividade emulsificante dos biossurfactantes produzidos nos meios A, B e C, permanecendo com um IE acima de 49,9%. O biossurfactante presente no EBLC do meio A se mostrou estável e não apresentou diferença significativa com o controle. O biossurfactante proveniente EBLC do meio B apresentou IE entre 61,3% e 65% e o do meio C, o IE ficou entre 58,5% e 64,7%.

Fernandes (2006) relata que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* R14 é estável a tratamentos com concentrações de até 20 % NaCl. O IE24 apresentado pela surfactina produzida pela cepa ICA56, teve uma redução à medida que a concentração de NaCl foi aumentando até 20%, porém os valores permaneceram acima de 50% (FRANÇA, 2014).

Os resultados obtidos na avaliação da estabilidade da atividade emulsificante frente a variações de salinidade e temperatura, mostram que o biossurfactante produzido pelo *Bacillus cereus* apresenta uma atividade emulsificante com boa tolerância a essas variações testadas, além de ter a capacidade de se manter estável por longos períodos. E dependendo do meio de cultivo onde o biossurfactante é produzido, sua atividade emulsificante apresenta estabilidade frente a variações de pH. Uma característica importante para futuras aplicações em diversos setores industriais, podendo ser explorado em cosméticos, alimentos, produtos farmacêuticos e biorremediação, onde são aplicações que apresentam condições extremas (WU *et al.*, 2022).

Figura 14 – Estabilidade da emulsão gerada pelo biossurfactante presente no extrato bruto (meios A, B e C) frente a variações de concentrações de salinidade



Fonte: Autoria própria.

A = Dyg's total; B = Dyg's sem glicose; C = Dyg's sem glicose + óleo de soja usado. Barras acompanhadas de letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE EM DIFERENTES COMPOSTOS HIDROFÓBICOS

Foi avaliado se o biossurfactante produzido pelo *Bacillus cereus* era capaz de emulsificar diferentes compostos hidrofóbicos através do teste do índice de emulsificação e se a emulsão formada era capaz de se manter estável ao longo do tempo, sendo avaliada após 24, 48, 120 e 336 horas de formação da camada emulsionada.

A Figura 15 apresenta os dados das emulsões formadas entre os biossurfactantes dos meios A = Dyg's total, B = Dyg's sem glicose e C = Dyg's sem glicose + 2% de óleo de soja usado e os diferentes compostos hidrofóbicos testados, comprovando a capacidade emulsificante do metabólito microbiano.

O biossurfactante proveniente do EBLC do meio A (Figura 15a), foi capaz de emulsificar a maioria dos compostos testados, sendo o acetato de etila o único que não apresentou emulsão. Os compostos que apresentaram IE24 acima de 50%, foram o azeite, óleo de soja usado e tolueno. E o clorofórmio, a gasolina e o óleo diesel formaram e emulsão estável ao longo de 336 horas. Com os outros compostos testados, houve a formação de emulsão, mas a atividade emulsificante foi diminuindo ao longo das 336 horas.

As emulsões mais estáveis do biossurfactante do meio B (Figura 15b), foram provenientes da interação ao clorofórmio, diclorometano, gasolina, hexano e tolueno. Com os outros compostos testados, houve a formação de emulsão, mas a atividade emulsificante foi diminuindo ao longo das 336 horas. O biossurfactante do meio B foi o que apresentou o melhor IE24 entre os meios, com valores de IE acima de 50% em quase todas as amostras.

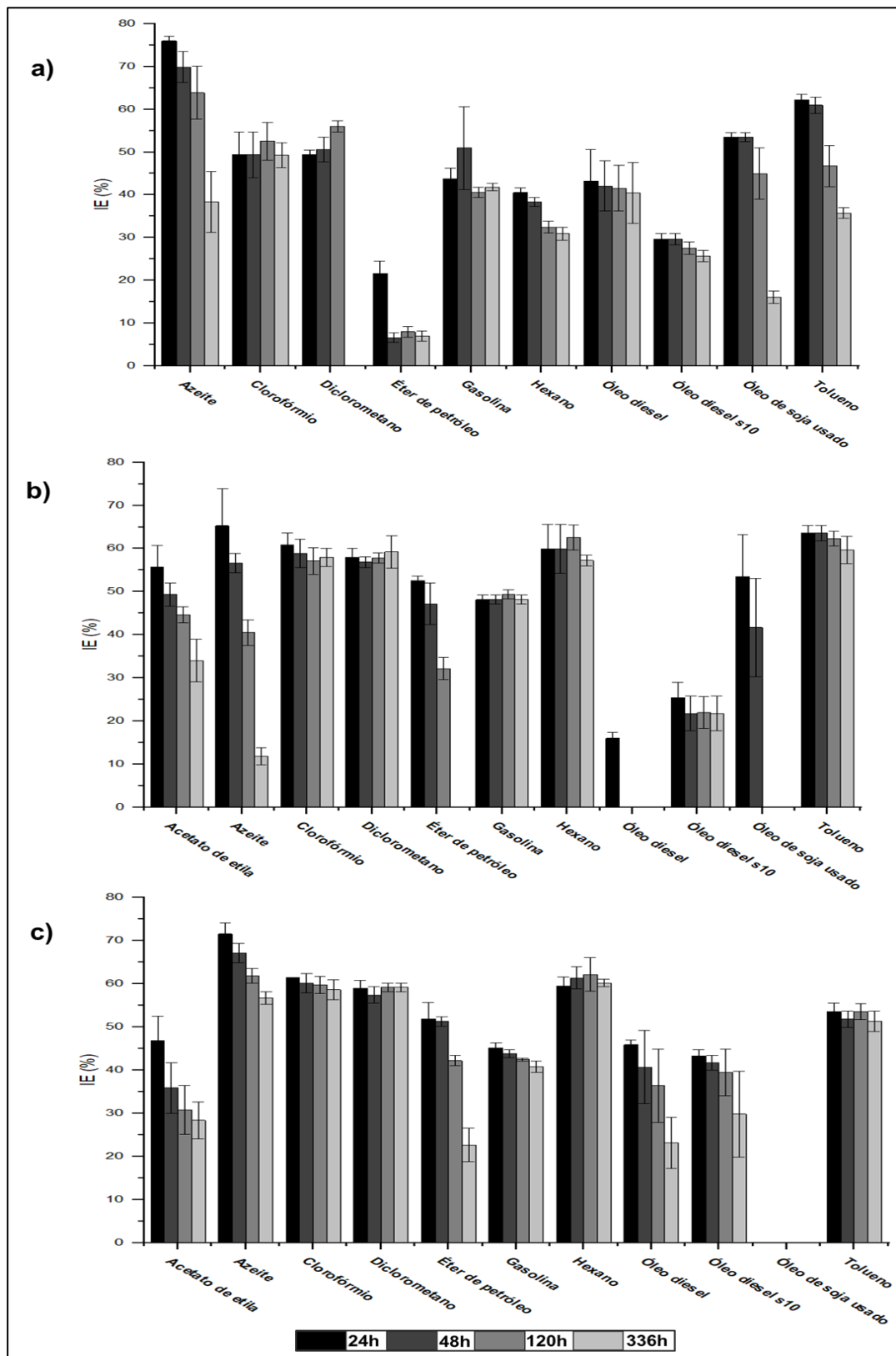
No meio C (Figura 15c), as emulsões que permaneceram estáveis ao longo do tempo testado, foram com clorofórmio, diclorometano, gasolina, hexano e tolueno. Com exceção do óleo de soja usado que não formou emulsão, todos os outros compostos hidrofóbicos apresentaram emulsão. Os compostos que apresentaram IE24 acima de 50% foram o azeite, clorofórmio, diclorometano, éter de petróleo, hexano e tolueno.

Barros, Quadros e Pastore (2008) relatam que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* LB5a foi capaz emulsionar compostos hidrofóbicos como benzeno, hexano, octano, gasolina, diesel e óleo de soja. Já biossurfactante produzido pelo

Bacillus subtilis SL apresentou atividade de emulsificação com petróleo bruto (56%), querosene (67%), octano (54%) e cetano (60%) (WU et al., 2022). O biossurfactante produzido pelo *Bacillus cereus* UCP1615 foi capaz de emulsionar diferentes óleos vegetais (Milho, soja, amendoim e canola) (DURVAL et al., 2021). A surfactina produzida pela cepa ICA56 apresentou eficiência na emulsificação de compostos hidrofóbicos como: querosene (61,7%), hexadecano (64,5%), óleo de soja (66,7%), hexano (61,7%), gasolina (46,4%) e biodiesel de mamona (61,5%) (FRANÇA, 2014).

Um bom agente emulsificante apresenta capacidade de formar emulsão com hidrocarbonetos, além de manter IE24 acima de 50% em 24 horas de análise (FRANÇA, 2014). O biossurfactante produzido neste estudo pode ser considerado um bom agente emulsificante, pois foi capaz de produzir emulsões, principalmente nos meios B e C, onde apresentou IE24 superior a 50% na maioria dos compostos testados.

Figura 15 – Propriedade emulsificante dos biossurfactantes presente no extrato bruto livre de células dos meios A, B e C



Fonte: Autoria própria.

(a) = Meio A - Dyg's total; **(b)** = Meio B - Dyg's sem glucose; **(c)** = Meio C - Dyg's sem glicose + óleo de soja usado.

5.5 TESTE DE DISPERSÃO EM ÓLEO

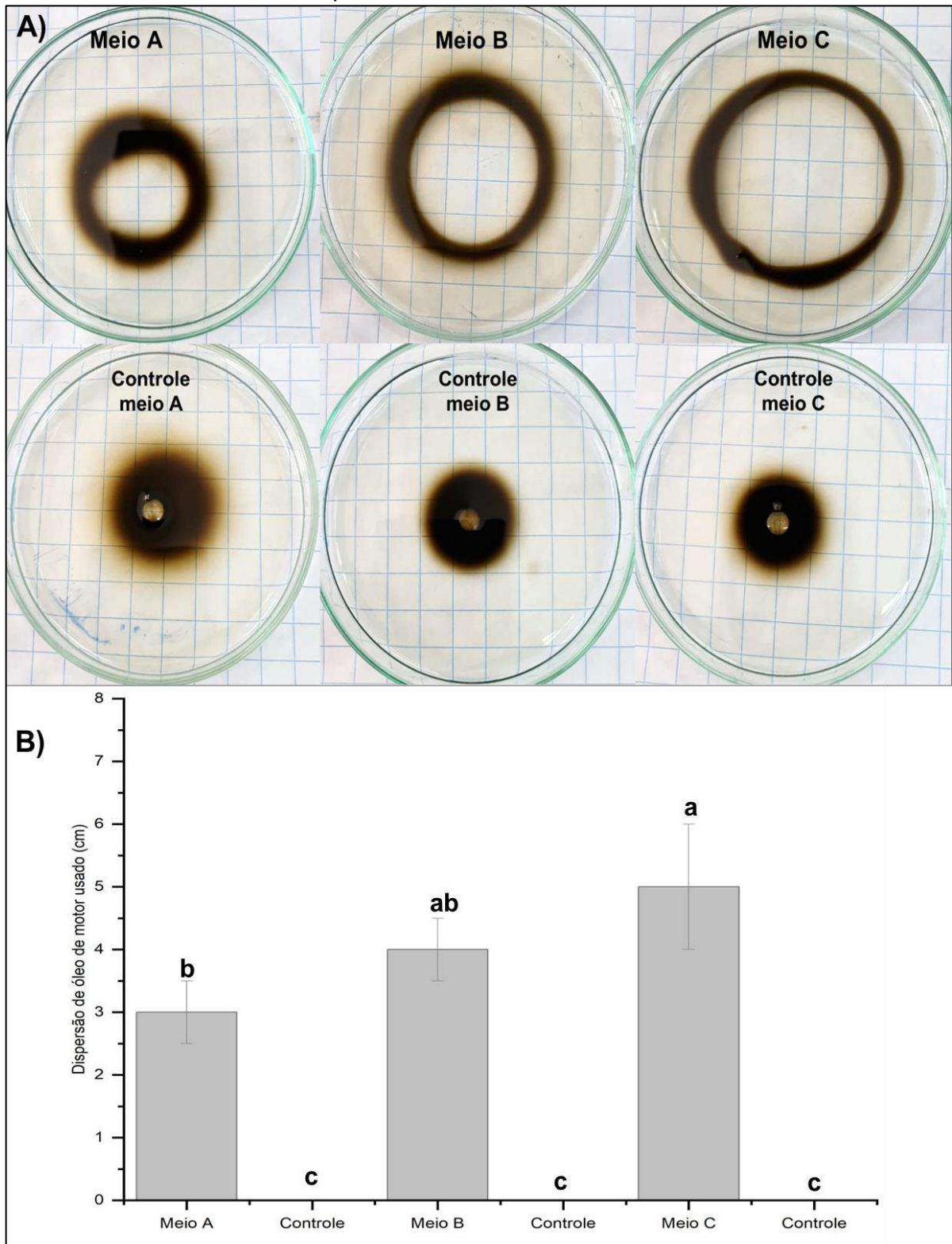
Para a realização do teste de dispersão em óleo de motor queimado, foram utilizados o EBLC produzido no meio A (Dyg's normal), B (Dyg's sem glicose) e C (Dyg's sem glicose + 2% de óleo de soja usado). Os resultados foram observados como apresentado na figura 16A, mostrando a presença de uma zona clara de dispersão no óleo de motor usado. A figura 16B apresenta os valores das médias encontradas ao medir as zonas de dispersão geradas pelo EBLC quando aplicados no óleo de motor queimado.

O biossurfactante do EBLC produzido em meio A apresentou uma dispersão de $3,0 \pm 0,5^b$ cm em óleo de motor usado. Já o biossurfactante proveniente do meio B apresentou uma dispersão de $4,0 \pm 1,0^a$ cm e o do meio C foi de $5,0 \pm 0,5^{ab}$ cm. Todos os controles não apresentaram dispersão.

Phulpoto et al. (2020) relatam que o biossurfactante produzido por *Bacillus nealsonii* S2MT apresentou uma zona de dispersão de $4,2 \pm 0,4$ cm em óleo. Degang et al. (2023) mostrou que a surfactina de origem de *B. subtilis* ATCC 6633, tanto na forma bruta quanto na purificada, foi mais eficaz na dispersão de óleo do que outros surfactantes (ramnolipídeo e pelo surfactante sintético SDS) testados, mesmo em concentrações mais baixas. O biossurfactante bruto produzido por *B. cereus* BCS0 foi capaz de dispersar 86% do óleo, na proporção 1:1 (DURVAL et al., 2019).

Essa atividade mostra uma possível aplicação na biorremediação, como dispersante em áreas contaminadas por óleo. Sendo desejável para essa aplicação, biossurfactantes com propriedades estáveis sob várias condições ambientais e capacidade de dispersão de óleo (DEGANG et al., 2023; DURVAL et al., 2019).

Figura 16 – Imagens do teste de dispersão em óleo de motor usado com biossurfactantes produzidos em diferentes meios de cultivos



Fonte: Autoria própria.

Meio A = Dyg's total; Meio B = Dyg's sem glicose; Meio C = Dyg's sem glicose + óleo de soja usado. Médias ($n = 3$) acompanhadas da mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.6 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

O sobrenadante do meio de cultivo contendo Dyg's sem glicose (meio B) foi selecionado para realizar a extração e caracterização química do biossurfactante. A seleção deste meio de cultivo, foi baseada nos resultados do IE24 e no custo de produção, uma vez que não apresenta um dos componentes da formulação original do Dyg's.

5.6.1 Extração

Para a extração do biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus cereus*, foi empregado método de extração ácida. Inicialmente, foi utilizado um volume de 1500 mL de extrato bruto livre de células do meio de cultivo Dyg's sem glicose (meio B) e ao final do processo de extração, foi obtido 579,8 mg de biossurfactante liofilizado que foi usado para caracterização química e avaliação das atividades biológicas.

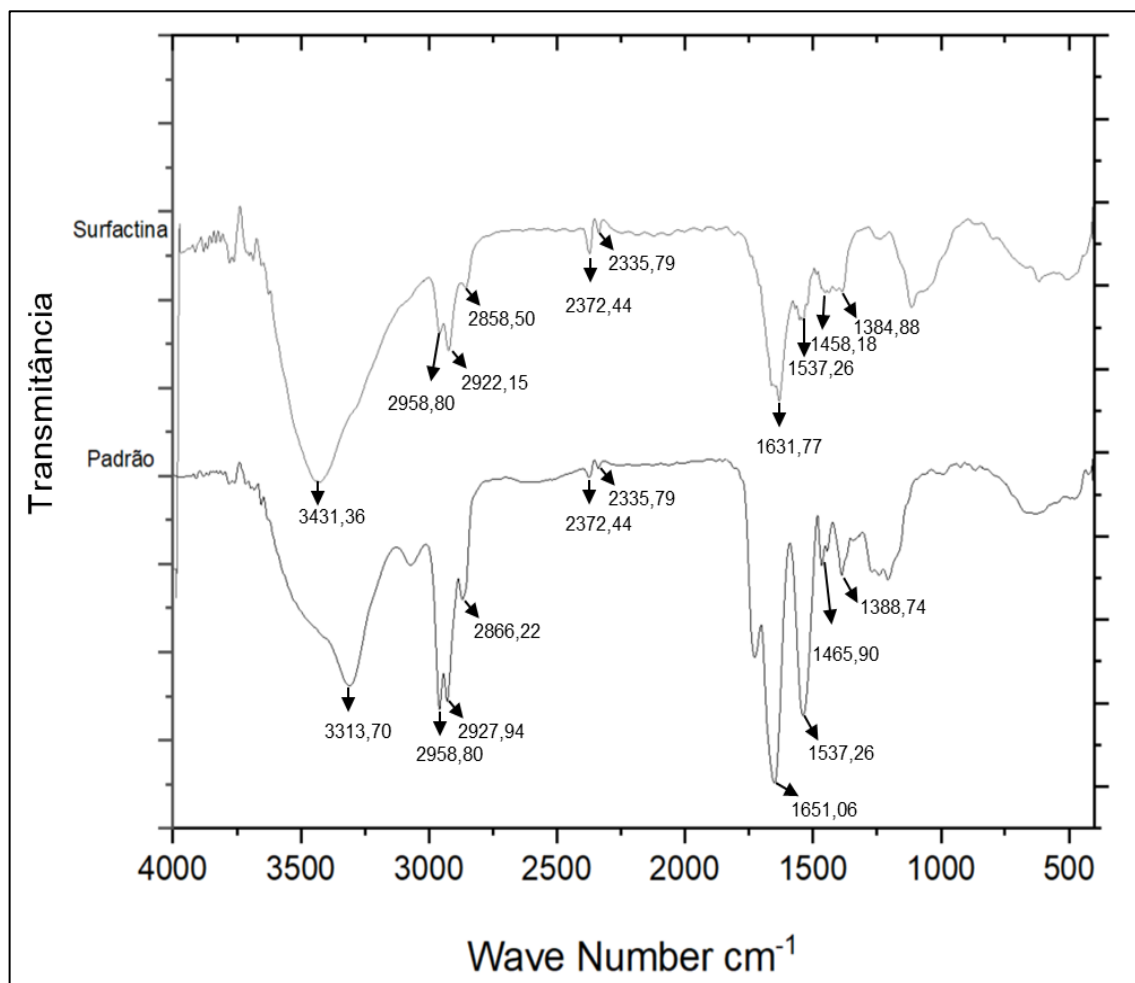
5.6.2 Análise por Espectroscopia de Infravermelho FT-IR

Na figura 17 é possível comparar os espectros de infravermelho obtidos na análise da amostra e do padrão de surfactina.

Bandas entre 3300 e 3400 cm^{-1} correspondentes a ligações de N-H e C-H, são características de compostos contendo carbono com grupo amino. As bandas em 2924 a 2800 cm^{-1} indicam a presença de cadeia alifática. Bandas em 1650 a 1700 cm^{-1} são referentes a alongamento da ligação CO-N (características de peptídeos). As bandas 1537,26 cm^{-1} referem-se a ligações de N-H combinadas com o estiramento da ligação C-N (WANG et al., 2024; CHAPRÃO et al., 2018; JOSHI; S.J., 2016; FARIA et al., 2011; FARIA, 2010; JHA; ROCHA, 2007;).

Os grupos funcionais identificados são semelhantes aos relatados por Wang et al. (2024); Maia et al. (2022), Nazareth et al. (2021), Jha, Joshi e S.J. (2016), e (Faria 2010) que avaliaram biossurfactante da classe dos lipopeptídeos (Surfactina) produzido pelo gênero da bactéria *Bacillus* e que foi comparada com a Surfactina de *Bacillus subtilis* $\geq 98,0\%$ (HPLC) Sigma-Aldrich. Dessa forma, nossos resultados sugerem que o biossurfactante produzido por *B. cereus* pertence a classe dos lipopeptídeos, sendo do tipo surfactina.

Figura 17 – Espectro FT-IR do biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* e padrão de surfactina de *Bacillus subtilis* $\geq 98,0\%$ (HPLC) Sigma-Aldrich

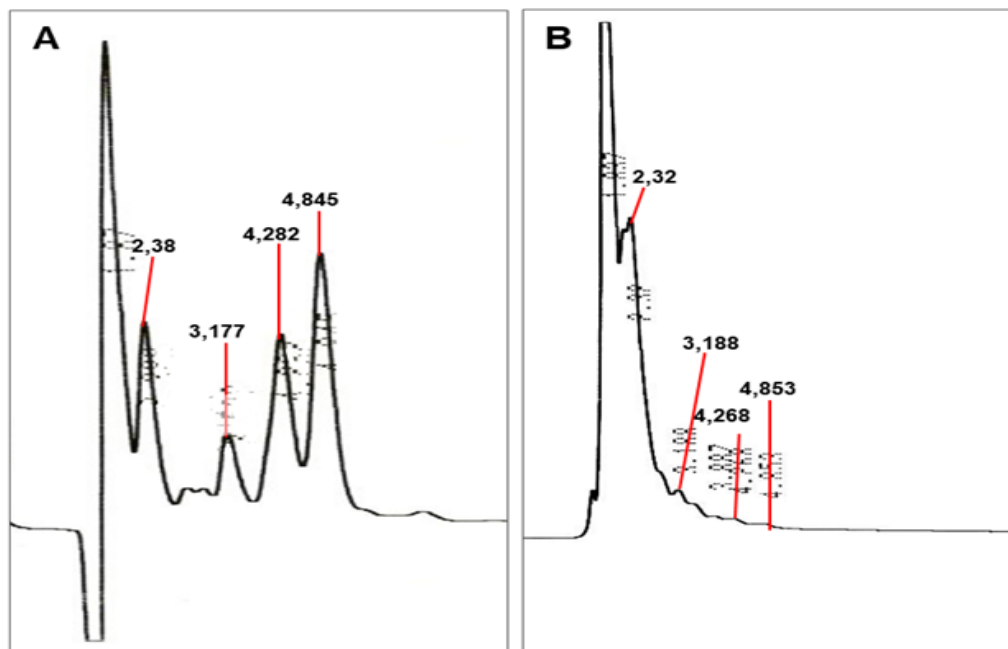


Fonte: Autoria própria

5.7.2 Análise de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

O cromatograma do biossurfactante de *Bacillus cereus* (Figura 18A) apresentou tempos de retenção semelhantes aos do padrão surfactina de *Bacillus subtilis* $\geq 98,0\%$ (HPLC) Sigma-Aldrich (Figura 18B). A correlação dos picos da Figura 18(B) com 18(A), aproxima a identidade do biossurfactante produzido pela bactéria com a amostra padrão de surfactina.

Figura 18 – Cromatogramas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do biossurfactante (A) padrão Surfactina de *Bacillus subtilis* ≥98,0% (HPLC) Sigma-Aldrich e (B) produzido por *Bacillus cereus*



Padrão de surfactina (A)		Amostra (B)	
Pico	Tempo	Pico	Tempo
1	1.8	1	1.8
2	2.4	2	2.3
3	2.9	3	3.2
4	3.2	4	3.9
5	3.5	5	4.3
6	4.3	6	4.8
7	4.8		

Fonte: Autoria própria

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

4.8.1 Citotoxicidade

Foi realizada a avaliação de citotoxicidade do biossurfactante produzido por *B. cereus* cultivado em meio B (Dyg's sem glicose). Diferentes concentrações do biossurfactante (31, 62, 125, 250 e 500 µg/mL) foram testadas em células Vero (ATCC CCL81) para avaliação da viabilidade celular.

A análise revelou que, na maior concentração de biossurfactante testado (500 µg/mL), foram obtidas 70,42% de células viáveis (Tabela 2). Também foi determinada a concentração citotóxica de 50% (CC50), a qual é definida como a concentração de um agente que causa 50% de mortalidade das células submetidas a um teste de toxicidade. Na avaliação do biossurfactante, o CC50 foi >500 µg/mL, uma vez que, nessa concentração, mais de 50% das células permaneceram viáveis.

Tabela 2 – Resultados da avaliação da atividade citotóxica do biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus cereus* em células VERO ATCC CCL81

Atividade citotóxica do biossurfactante em células VERO (ATCC CCL81)					
Concentração biossurfactante (ug/mL)	31,25	62,5	125	250	500
células viáveis (%)	79,14	76,48	75,59	71,5	70,42

Fonte: Autoria própria

A avaliação de citotoxicidade está entre os primeiros bioensaios *in vitro* usados para prever a toxicidade de uma substância, sendo realizado em laboratórios em todo o mundo para classificar compostos e avaliar a segurança (DURVAL et al., 2021).

Basit et al. (2018) relatam que o biossurfactante produzido por cepas de *Bacillus cereus* apresentaram 63% de viabilidade celular até a concentração 10mg/mL, sendo considerado não tóxico ou seguro. No estudo de Durval et al. (2021), os autores relatam que *Bacillus cereus* UCP 1615, não apresentou citotoxicidade para linhagem de células Vero, tendo uma viabilidade celular de 54% quando expostas a maior concentração (400 µg/mL). Os dados encontrados na literatura mostram valores de viabilidade celular mais baixos que os encontrados neste estudo, uma vez que o biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus cereus* UELAsF2.2 quando testado em diferentes concentrações teve a viabilidade celular acima de 70%.

5.8.2 Avaliação Antiviral E Mecanismo De Ação Do Biossurfactante

A atividade antiviral foi avaliada contra o vírus herpes simples 1 (HSV-1) (cepa KOS), que é um vírus que causa infecções líticas, causando a destruição das células. O método do MTT, que foi empregado para avaliar a atividade antiviral do

biossurfactante, é utilizado para quantificar a viabilidade celular na presença do agente viral (FRÖHNER, 2003).

As concentrações de 400, 200, 100 e 50 µg/mL de biossurfactante, foram testadas em diferentes tempos de contato com a célula Vero e o vírus e depois determinada a viabilidade celular. A tabela 3 mostra os valores encontrados na avaliação.

No tempo 0h, a amostra, as células e as partículas do vírus foram incubadas simultaneamente e na concentração máxima testada (400 µg/mL), foi observado 100% de inibição viral.

No efeito virucida, o biossurfactante ficou em contato com o vírus por 1 hora, para avaliar a ação da substância diretamente na partícula viral. E após 1 hora de exposição, o teste revelou que na maior concentração testada, foi inibido 41,76% da replicação do vírus.

No efeito pré-infecção, as células Vero foram expostas ao biossurfactante por 1 hora, antes da inoculação viral. O teste revelou que na concentração máxima testada de 400 µg/mL, 14,80% do HSV - 1 foi inibido.

E no efeito pós-infecção, as células Vero foram infectadas com o HSV - 1 por 1 hora e depois expostos as concentrações de biossurfactante. O teste revelou que na concentração máxima testada de 400 µg/mL, 15,80% do HSV - 1 foi inibido.

Os resultados mostram que o biossurfactante produzido pelo *B. cereus* apresenta atividade antiviral e seu mecanismo de ação ocorre na partícula de vírus, fora da célula. Segundo Barros et al. (2007) a ruptura total dos envelopes lipídicos virais e parcial dos capsídeos causado pela surfactina, sugere que a sua ação antiviral seja devida à interação físico-química com os lipídios virais.

A concentração de biossurfactante que provoca 50% de inibição viral (IC₅₀) foi determinada em 53µg/mL considerando a dose de 500µg/mL (Tabela 2) como CC₅₀ o índice de seletividade (IS), que é a dose máxima capaz de inibir 50% do vírus, sem ter ação toxica, > 9,43.

Segundo Faria (2010), a surfactina produzida por *B. subtilis* LSFM-05 foi capaz de inibir a infectividade do vírus BoHV-1 (Bovine Herpes vírus -1). E seu mecanismo ação, ocorreu pela desestruturação dos componentes lipídicos e glicoprotéicos que constituem o envelope viral do vírus.

Basit et al. (2018) mostraram que os biossurfactantes provenientes das cepas *B. cereus* apresentaram atividade antiviral *in vitro* contra o vírus da doença de New

Castle (NDV), e à medida que a concentração de biossurfactante aumentava, o percentual de redução do título viral também aumentava.

Tabela 3 – Resultado da avaliação do percentual de inibição do HSV-1 pelo biossurfactante produzido pela bactéria *Bacillus cereus*

Percentual de inibição do vírus HSV-1 pelo biossurfactante (%)				
Concentração biossurfactante (µg/mL)	400	200	100	50
0 horas	100	91,37	62,94	37,45
Efeito virucida	41,76	26,70	14,59	0,00
Efeito pré-infecção	14,80	12,43	12,43	0,48
Efeito pós-infecção	15,80	14,31	13,13	0,06

Fonte: Autoria própria

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação pode ocorrer durante o processamento e/ou armazenamento de produto (como alimentos, cosméticos e medicamentos) onde causam a sua deterioração, gerando alterações da cor, sabor, textura e até a segurança. A utilização de agentes antioxidantes para controle de processo de oxidação é um método muito eficaz (DURVAL et al., 2021).

Neste estudo, na avaliação da atividade antioxidante do biossurfactante produzido por *B. cereus* foram obtidos os valores de 24,44% $\pm$ 3,6 de inibição do radical DPPH•, 2,589% $\pm$ 0,9 de inibição do radical ABTS+ e presença de 0,374 $\pm$ 0.002 mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g com uma concentração de 1mg/mL.

Os resultados apresentados por Cieurko et al. (2022) mostram que a surfactina produzida por *B. subtilis* #309 apresentou traços de atividade antioxidante, com valores de 11,67 $\pm$ 0,8 para DPPH• e 3,77 $\pm$ 0,22 para ABTS+ na concentração de 1 mg/mL.

Durval et al. (2021) relatam que o biossurfactante produzido *Bacillus cereus* UCP 1615 não apresentou potencial antioxidante suficiente para servir como único agente antioxidante, tendo uma inibição oxidativa em relação à capacidade de

sequestro de DPPH• de 28,45%, na maior concentração testada (40 mg/mL). E na avaliação com base no sequestro de ABTS+, o índice obtido na maior concentração de biossurfactante foi de 36,67%.

Basit et al. (2018) avaliaram o potencial antioxidante de biossurfactantes proveniente das cepas *B. cereus* MMIC1, MMIC 2 e MMIC 3, os resultados mostram que a atividade de eliminação do DPPH• foi encontrada na faixa de 27% a 63% com uma concentração de 0,5 a 2,0 mg/mL, indicando que o poder redutor dos biossurfactantes é dependente da dose.

A capacidade de redução dos biossurfactantes lipopeptídicos, no que diz respeito à atividade do DPPH•, pode estar relacionada à presença de grupos hidroxila em sua estrutura. E o número de grupos hidroxila na estrutura da surfactina está relacionado à presença dos aminoácidos glutamato e aspartato em seu anel peptídico, sendo esses aminoácidos constantes em todos homólogos de surfactina (CIURKO et al., 2022).

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram a possibilidade de produção de biossurfactantes, por meio de bactérias isoladas de alho roxo comercializado no norte do Paraná, sendo a cultura *Bacillus cereus* UELAsF2.2 a mais promissora para tal atividade. Com a presente pesquisa também foi possível demonstrar que a cultura *Bacillus cereus* UELAsF2.2 pode produzir biossurfactante em meios de cultivo com diferentes composições, com destaque para o meio com óleo de soja usado e o meio sem glicose, meios estes que surgem como alternativa para a produção de surfactantes, tendo em vista o custo elevado de tal produção. As análises de caracterização química mostraram que o biossurfactante produzido pela bactéria é uma surfactina, que pertence a classe dos lipopeptídeos. Além disso, demonstrou-se que a composição do meio de cultivo pode influenciar na atividade emulsificante frente ao pH. No que tange potenciais aplicações, o biossurfactante produzido apresentou atividade emulsificante, estável por 60 dias e frente a variações de temperatura e salinidade, capacidade de emulsionar diferentes compostos hidrofóbicos e de dispersar óleo de motor usado, além de possuir atividades biológicas (antiviral e antioxidante) e não apresentar citotoxicidade em células Vero (ATCC CCL81).

REFERÊNCIAS

- AKINTOKUN, A. K.; ADEBAJO, S. O.; AKINREMI, C. A. Potential Biosurfactant-producing Bacteria from Pharmaceutical Wastewater using Simple Screening Methods in South-West, Nigeria. **Applied Environmental Research**, v. 39, n. 2, p. 41–54, 2017.
- AKPA, E. *et al.* Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91–93, n. 1–9, p. 551–562, 2001.
- ALIZADEH-SANI, M. *et al.* Bioemulsifiers Derived from Microorganisms: Applications in the Drug and Food Industry. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 2, p. 191–199, 2018.
- ALMEIDA, G. A. M. *et al.* Produção de biossurfactante por *Lysinibacillus sp.* e *Bacillus sp.* a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. **Revista Matéria**, v. 25, n. 4, p. 1-10, 2020.
- AMANI, H.; KARIMINEZHAD, H. Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation. **Petroleum Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 216–222, 2016.
- ÁNGELES, M.T.; REFUGIO, R.V. In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 595–605, 2013.
- ARAUJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 848–858, 2013.
- BANAT, I. M. *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BANAT, I. M. *et al.* Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 10, 2014.
- BARROS, F. F. C. *et al.* Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P. DE; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979–985, 2008.

BASIT, M. *et al.* Biosurfactants production potential of native strains of *Bacillus cereus* and their antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 31, n. 1, p. 251–256, 2018.

BATISTA, C. Tensão Superficial da Água. **Toda Matéria**. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/tensao-superficial-agua/>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

BEZERRA, K. G. O. *et al.* Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 6, p. 1482–1493, 2018.

BIOSYNTH. **Surfactin**. Disponível em: <<https://www.biosynth.com/p/FS172608/24730-31-2-surfactin>>. Acesso em: 5 mar. 2024a.

BIOSYNTH. **Fengycin**. Disponível em: <<https://www.biosynth.com/p/AF35268/102577-03-7-fengycin>>. Acesso em: 5 mar. 2024b.

BIOSYNTH. **Rhamnolipid**. Disponível em: <<https://www.biosynth.com/p/DR45784/rhamnolipid>>. Acesso em: 5 mar. 2024c.

BJERK, T. R. *et al.* Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. **Bioengineering**, v. 8, n. 8, p. 1–18, 2021.

BOC SCIENCES. **Iturina A de *Bacillus subtilis***. Disponível em: <<https://www.bocsci.com/product/iturin-a-from-bacillus-subtilis-cas-52229-90-0-189466.html?nid=84>>. Acesso em: 5 mar. 2024a.

BOC SCIENCES. **Ramnolipídeo RL2**. Disponível em: <<https://www.bocsci.com/product/rhamnolipid-rl2-cas-4348-76-9-278277.html?nid=1335>>. Acesso em: 5 mar. 2024b.

BOC SCIENCES. **Surfactin**. Disponível em: <<https://www.bocsci.com/product/surfactin-cas-24730-31-2-151681.html?nid=1335>>. Acesso em: 5 mar. 2024c.

BONHOMME, S.; DESSEN, A.; MACHEBOEUF, P. The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activities. **Open Biology**, v. 11, n. 5, 2021.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 382–398, 2010.

CAROLIN C, F.; KUMAR, P. S.; NGUEAGNI, P. T. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 407, p. 1-15, 2021.

CASTRO, D. C. M. *et al.* Tolerância a metais pesados e produção de surfactante por *Pseudomonas fluorescens* Slim15. **Scientia Plena**, v. 16, n. 10, p. 1-9, 2020.

CHAPRÃO, M. J. *et al.* Production of a biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* UCP1616 for use in the bioremediation of oil-contaminated environments. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 10, p. 1310–1322, 2018.

CIURKO, D. *et al.* Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil Wastes by *Bacillus subtilis* and Its Potential Application as Antioxidant and ACE Inhibitor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 1-19, 2022.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224–229, 1987.

CORONEL-LEÓN, J. *et al.* Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 1, p. 99–111, 2016.

COUTTE, F. *et al.* Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, 2017.

DAS, A. J.; KUMAR, R. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 233–240, 2018.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1191–1199, 2007.

DECESARO, A. *et al.* Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947–954, 2013.

DEGANG, L. *et al.* Oil displacement properties of surfactin: a comparative study. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 60, n. 5, p. 414–418, 2023.

DEGEN, A. *et al.* Context-dependent activity of A domains in the tyrocidine synthetase. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5119, 2019.

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

DHALI, D. *et al.* Genetic engineering of the branched fatty acid metabolic pathway of *Bacillus subtilis* for the overproduction of surfactin C₁₄ isoform. **Biotechnology Journal**, v. 12, n. 7, 2017.

DIAS, F. M. S. **Construção de linhagens de *Pseudomonas putida* capazes de produzir compostos aromáticos por meio de vias metabólicas sintéticas**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, São Paulo - SP, 2019.

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

DURVAL, I. J. B. *et al.* Studies on Biosurfactants Produced using *Bacillus cereus* Isolated from Seawater with Biotechnological Potential for Marine Oil-Spill Bioremediation. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 22, n. 2, p. 349–363, 2019.

DURVAL, I. J. B. *et al.* Production, characterization, evaluation and toxicity assessment of a *Bacillus cereus* UCP 1615 biosurfactant for marine oil spills bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 157, p. 349-363, 2020.

DURVAL, I. J. B. *et al.* Application of a Biosurfactant Produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 from Waste Frying Oil as an Emulsifier in a Cookie Formulation. **Fermentation**, v. 7, n. 3, p. 189, 2021.

EHRHARDT, D. D. **Caracterização do resíduo do abacaxi e sua utilização no processo de produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis***. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas, campus Campinas, como requisito para obtenção do título de doutor em Engenharia Química, Campinas - SP, 2019.

EVONIK INDUSTRIES AG. **Evonik commercializes biosurfactants**. 2022. Disponível em: <<https://corporate.evonik.com/en/media/press-releases/corporate/evonik-commercializes-biosurfactants-101537.html>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

EVONIK INDUSTRIES AG. **Evonik pioneers industrial-scale manufacturing of biosurfactants**. 2016. Disponível em: <<https://personal-care.evonik.com/en/evonik-pioneers-industrial-scale-manufacturing-of-biosurfactants-168535.html>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

EVONIK INDUSTRIES AG. **Evonik manufactures first product from world's first industrial-scale rhamnolipid biosurfactant plant**. Disponível em: <https://corporate.evonik.com/en/investor-relations/evonik-manufactures-first->

product-from-worlds-first-industrial-scale-rhamnolipid-biosurfactant-plant-233304.html. Acesso em: 22 fev. 2024.

FARIA, A. F. Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade de Campinas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Campinas – SP, 2010.

FARIA, A. F. *et al.* Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951–1957, 2011.

FARINAS, C. S. *et al.* Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. **Embrapa Instrumentação**. Brasília – DF, [s.n.]. p. 211–241, 2014.

FELIPE, L. O.; DIAS, S. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 3, p. 228–236, 2017.

FELIX, A. F. N. Caracterização e estudo da aplicabilidade do biossurfactante produzido por *bacillus subtilis* LAMI005 a partir do suco de caju. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Fortaleza - CE, 2012.

FERNANDES, P. A. V. Produção, extração e caracterização de surfactante por *Bacillus subtilis* R14. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Recife - PE, 2006.

FRANÇA, Í. W. L. Estudo da produção e aplicabilidade de biossurfactante bacteriano produzido por *Cepa* isolada de manguezal cearense.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Fortaleza - CE, 2014.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v. 25, p. 1–9, 2015.

FRÖHNER, C. R. A. Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*. Dissertação de Mestrado apresentado ao

Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal do Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Farmácia. Florianópolis - SC, 2003.

GALIÉ, S. *et al.* Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p 1-18, 2018.

GEISSLER, M. *et al.* Lipopeptide Biosurfactants From *Bacillus Species*. **Biobased Surfactants**. Chapter 6, Elsevier, p. 205–240, 2019.

HERBST, G. **Obtenção e caracterização de extratos de bagaço de malte via degradação por líquidos pressurizados**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia química. Curitiba – PR, 2021.

HOFFMANN, M. *et al.* Surfactin from *Bacillus subtilis* displays promising characteristics as O/W-emulsifier for food formulations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 203, p. 111749, 2021.

ISLAS, D. J.; MORENO, S. A. M.; RODRÍGUEZ, J. N. G. Biosurfactant properties, applications and production: A review. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 26, n. 1, p. 65–84, 2010.

JHA, S. S.; JOSHI, S. J.; S.J., G. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 955–964, 2016.

KARLAPUDI, A. P. *et al.* Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from an *Acinetobacter* M6 strain. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 223–227, 2020.

KAUR, G. *et al.* Efficient sophorolipids production using food waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 232, p. 1–11, 2019.

KOGLIN, A. *et al.* Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 907–911, 2008.

KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. 469-471, 2018.

MAIA, P. C. DE V. S. *et al.* Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* UCP 0999 using cassava wastewater (CWW) and waste frying oil (WFO) as renewable substrates. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. 1-11, 2022.

MAIA, P. C. V. S. **Produção e aplicação de bioemulsificante isolado de *Bacillus subtilis* UCP 0146 por fermentação submersa em manipueira**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais, da Universidade Católica de

Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Recife - PE, 2017.

MARCELINO, P. R. F. **Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, da Universidade de São Paulo, campus Lorena, como requisito para obtenção do título doutor em Ciências, Lorena – SP, 2017.

MEDCHEMEXPRESS. **Surfactin**. Disponível em: <<https://www.medchemexpress.com/surfactin.html>>. Acesso em: 5 mar. 2024a.

MEDCHEMEXPRESS. **Fengycin**. Disponível em: <<https://www.medchemexpress.com/fengycin.html>>. Acesso em: 5 mar. 2024b.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. **Peptide Science**, v. 104, n. 3, p. 129–147, 2015.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1488, n. 3, p. 211–218, 2000.

MUJUMDAR, S.; JOSHI, P.; KARVE, N. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter spp.*: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 277–287, 2019.

NAGY, G. M. **Produção de biossurfactante de baixo custo a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Uberlândia - MG, 2018.

NASCIMENTO, R. R. *et al.* Acacia gum candy with *Limosilactobacillus reuteri* and lemongrass essential oil: Effect of storage time on physicochemical characteristics and probiotic survival. **Food Bioscience**, v. 56, p. 103128, 1 dez. 2023.

NAUGHTON, P. J. *et al.* Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 12–28, 2019.

NAZARETH, T. C. *et al.* Bioconversion of low-cost brewery waste to biosurfactant: An improvement of surfactin production by culture medium optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 172, p. 1-10, 2021a.

NAZARETH, T. C. *et al.* A low-cost brewery waste as a carbon source in bio-surfactant production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 11, p. 2269–2276, 2021b.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.

OLIVEIRA, T. S. *et al.* Atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Pseudomonas sp.* CCMICS 105. **Scientia Plena**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2022.

PEREIRA JUNIOR, A. J. *et al.* Mapeamento de especialidades químicas que utilizam biossurfactantes em produtos de cuidados pessoais como alternativa mais sustentável. **Gestão e sustentabilidade ambiental**, p. 157–174, 2022.

PHULPOTO, I. A. *et al.* Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and it's potential for oil contaminated soil remediation. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 145, 2020.

PILLING, S. *et al.* Aula 2 - Moléculas anfifílicas, fosfolipídios, micelas, vesículas e protocélulas. Ácido nonanóico em meteoritos. **P&D**, São José dos Campos, 2015. Disponível em: <[https://www1.univap.br/spilling/AB/Aula_2 Moléculas Anfifílicas.pdf](https://www1.univap.br/spilling/AB/Aula_2%20Moleculas%20Anfifilicas.pdf)> Acesso em: 02 fev. 2024.

PINTO, M. H. **Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Rio Grande, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rio Grande - RS, 2008.

PIONEER BIOTECH. **Rhamnolipid Biosurfactant**. Disponível em: <<https://www.pioneer-biotech.com/animal-extract/cosmetics/rhamnolipid-biosurfactant.html>>. Acesso em: 5 mar. 2024.

QI, X. *et al.* A review on surfactin: molecular regulation of biosynthesis. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 9, p. 313, 2023.

QIN, R.; XU, T.; JIA, X. Engineering *Pseudomonas putida* To Produce Rhamnolipid Biosurfactants for Promoting Phenanthrene Biodegradation by a Two-Species Microbial Consortium. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2022.

RAHEEL, M. *et al.* Biological control activity of biosurfactant against plant pathogens. **Applications of Biosurfactant in Agriculture**. Elsevier, cap. 2, p. 17–28, 2022.

RAZA, Z. A.; KHAN, M. S.; KHALID, Z. M. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 686–692, 2007.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating Fifty per cent endponints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

ROCHA, M. V. P. *et al.* Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1295–1299, 2006.

ROCHA, M. V. P. **PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Fortaleza - CE, 2007.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–1016, 2013.

SAJNA, K. V. *et al.* White Biotechnology in Biosurfactants. **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. Elsevier, cap. 14, p. 499–521, 2015.

SANTIAGO, M. R. F. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria de petróleo**. Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de doutor. Rio de Janeiro - RJ, 2019.

SANTOS, A. P. P.; SILVA, M. D. D. S.; COSTA, E. V. L. Biossurfactantes: Uma alternativa para o mercado industrial. **Fronteiras**, v. 5, n. 1, p. 88–103, 2016.

SANTOS, D. *et al.* Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

SANTOS, S. C. Biossurfactantes: potenciais agentes biorremediadores. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 5, p. 1531–1540, 2019a.

SANTOS, E. M. S. **Produção de biossurfactante por *Candida sphaerica* UCP 0995 para aplicação na remoção de poluentes ambientais gerados pela indústria de petróleo**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais, da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Recife - PE, 2019b.

SANTOS, S. F. M. *et al.* Avaliação da produção de biossurfactante a partir de diferentes fontes de carbono por *Candida guilliermondii*. **REVISTA SAÚDE & CIÊNCIA ONLINE**, v. 7, n. 2, p. 413–425, 2018.

SCHALCHLI, H. *et al.* Production and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C11 for enhancing the solubility of pesticides. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 6, p. 1-11, 2023.

SIGMA-ALDRICH. **R90 - Rhamnolipids**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/r90>>. Acesso em: 5 mar. 2024a.

SIGMA-ALDRICH. **Surfactin**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/s3523>>. Acesso em: 5 mar. 2024b.

SIGMA-ALDRICH. **Rhamnolipids, 95% (Di-Rhamnolipid dominant)**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/r95dd>>. Acesso em: 5 mar. 2024c.

SIGMA-ALDRICH. **Fengycin**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/smb00292>>. Acesso em: 5 mar. 2024d.

SIGMA-ALDRICH. **Iturin A from *Bacillus subtilis***. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/i1774>>. Acesso em: 5 mar. 2024e.

SILVA FILHO, U. R. DA. **Produção, extração, purificação e potencial atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Bacillus safensis* MF326565 isolado de solo canavieiro**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia. João Pessoa - PB, 2019.

SILVA, R. *et al.* Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12523–12542, 2014.

THÉATRE, A. *et al.* The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus spp.*: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

TO, M. H. *et al.* Optimal preparation of food waste to increase its utility for sophorolipid production by *Starmerella bombicola*. **Bioresource Technology**, v. 379, p. 1-10, 2023.

TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3–4, p. 356–360, 2002.

UNILEVER. **Building a clean green foam-production machine**. Disponível em: <<https://www.unilever.com/news/news-search/2022/building-a-clean-green-foamproduction-machine/>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

VALDÉS-VELASCO, L. M. *et al.* Relationship between lipopeptide biosurfactant and primary metabolite production by *Bacillus* strains in solid-state and submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 1-9, 2022.

VAZ-MOREIRA, I. *et al.* *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 2837–2843, 2011.

VIEIRA, D. P. *et al.* Soforolipídios: Síntese, aplicações e desafios para o desenvolvimento de uma economia mais sustentável. **Metodologias e Aprendizado**, v. 4, p. 45–59, 2021.

WACKER, I. *et al.* The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: regulation of the *gltAB* operon by the catabolite control protein CcpA. **Microbiology**, v. 149, n. 10, p. 3001–3009, 2003.

WAN, C. *et al.* Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 29, p. 7976–7988, 2022.

WANG, H. *et al.* Study on the production of Sophorolipid by *Starmerella bombicola* yeast using waste fried oil fermentation. **Bioscience Reports**, 8 dez. 2023.

WANG, X. *et al.* Analysis of surfactant production by *Bacillus cereus* GX7 and optimization of fermentation conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 233, p. 1-9, 2024.

WATANABE, W. *et al.* MTT colorimetric assay system for the screening of anti-orthomyxo-and anti-paramyxoviral agents. **Journal of Virological Methods**, v. 48, n. 2–3, p. 257–265, 1994.

WU, B. *et al.* Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SL and its potential for enhanced oil recovery in low permeability reservoirs. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022.

ZHOU, S. *et al.* Structural and Functional Insights into Iturin W, a Novel Lipopeptide Produced by the Deep-Sea Bacterium *Bacillus* sp. Strain wsm-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 21, 15 out. 2020.