



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANA ÉLIKA SILVEIRA BERTONCINI

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES DE LIPOPEPTÍDEOS BACTERIANOS**

GIOVANA ÉLIKA SILVEIRA BERTONCINI

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES DE LIPOPEPTÍDEOS BACTERIANOS**

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristiani Baldo da Rocha.

Londrina
2025

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

B462p Bertoncini, Giovana Elika Silveira.
PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE LIPOPEPTÍDEOS BACTERIANOS / Giovana Elika Silveira Bertoncini. - Londrina, 2025.
97 f.

Orientador: Cristiani Baldo da Rocha.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.
Inclui bibliografia.

1. Lipopeptídeos - Tese. 2. DPPH - Tese. 3. Antioxidante - Tese. 4. Filme - Tese. I. da Rocha, Cristiani Baldo . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 66

GIOVANA ÉLIKA SILVEIRA BERTONCINI

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES DE LIPOPEPTÍDEOS BACTERIANOS**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristiani Baldo da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^a Briani Gisele Bigotto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de julho de 2025.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Cristiani expresso minha mais profunda gratidão pela orientação, paciência e confiança ao longo desta jornada. Sua dedicação, apoio e ensinamentos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento como pesquisadora.

Aos membros da banca avaliadora, Prof^a Daniele Sartori e Dr^a Briani Gisele Bigotto agradeço imensamente por dedicarem seu tempo e conhecimento à análise deste projeto.

Aos meus colegas de bancada, Edna, Antônio, Hyan e Núbia, minha mais sincera gratidão, não apenas pela amizade, mas também pelo suporte prático e intelectual, por me auxiliarem no desenvolvimento do projeto no dia a dia, sem vocês não seria possível chegar aqui. Agradeço também à Beatriz, Mayara, Dâmaris, Thaísa e Bianca que compartilharam seu conhecimento, discutir resultados e oferecer apoio nos momentos de maior desafio. Assim como seus orientadores Prof^a Suzana, Prof^a Daniele, Prof Doumit e Prof^a Fabiana meu muito obrigado por contribuírem para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos, que estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis, obrigada pelas palavras de incentivo, pelos sorrisos compartilhados e por celebrarem cada pequena vitória comigo.

À minha família, representada pelo amor e apoio incondicional dos meus pais, Robinson e Elis, pela força e carinho da minha avó, Dona Adélia e das minhas tias, Beatriz e Patrícia, deixo meu mais profundo agradecimento. Vocês são minha base e minha inspiração para seguir em frente.

Por fim, ao meu marido, Víctor meu maior companheiro e incentivador, obrigada por caminhar ao meu lado em cada etapa desta trajetória. Seu amor, paciência e compreensão foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

A todos vocês, que de alguma forma contribuíram para esta conquista, meu mais sincero e profundo agradecimento.

BERTONCINI, Giovana Élika Silveira. **Produção e avaliação das propriedades antioxidantes de lipopeptídeos bacterianos**. 2025. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025).

RESUMO

Lipopeptídeos, metabólitos produzidos por espécies do gênero *Bacillus*, destacam-se por suas propriedades antioxidantes e seu potencial de aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A crescente demanda por antioxidantes naturais, em substituição aos sintéticos que podem representar riscos à saúde, ressalta a relevância de soluções biotecnológicas sustentáveis e renováveis. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo produzir, caracterizar e avaliar as propriedades antioxidantes de lipopeptídeos produzidos pela linhagem *Bacillus* sp. UELAsF1.483, e aplicar os lipopeptídeos em formulações filmogênicas. A linhagem foi cultivada em meio contendo glicose e ácido glutâmico, com 2% de inóculo, por até 96 horas, a 150 rpm e 37°C. A presença de biossurfactantes foi confirmada por meio de ensaios de índice de emulsificação e espalhamento de óleo. Os lipopeptídeos foram extraídos por precipitação ácida seguida de extração orgânica e submetidos às análises de suas características estruturais e ensaios de atividade antioxidante, e desenvolvimento de formulação filmogênica. Os resultados indicaram que o sobrenadante induziu dispersão na camada de óleo e formou emulsões estáveis com índices de emulsificação superiores a 50%, confirmando a presença de biossurfactantes com propriedades tensoativas e emulsificantes, especialmente após 72 de fermentação. A atividade antioxidante aumentou significativamente após 48 horas de cultivo, estabilizando entre 35–40% em 72 horas. Com base nesses resultados, o tempo de fermentação de 72 horas foi escolhido para os experimentos subsequentes. Nesse intervalo, a produção de biossurfactantes alcançou 0,45 g/L. A análises estruturais confirmou a presença de grupos funcionais típicos de lipopeptídeos, identificando tempos de retenção compatíveis com padrões descritos na literatura. O lipopeptídeo produzido foi denominado LP.F1483 e apresentou 47,26% de inibição de radicais DPPH, em baixas concentrações, além de apresentar atividade antioxidante total, equivalente ao Trolox, antioxidante de referência. Além disso, o lipopeptídeo LP.F1483 foi incorporado em filmes biodegradáveis à base de amido e gelatina, 0%, 2.5 mg, 5 mg e 25 mg/100g polímero. A solubilidade em água aumentou de forma dependente da concentração de LP.F1483, atingindo 56,97% nos filmes com maior teor do aditivo, o que evidencia a desestabilização da matriz polimérica e maior afinidade com a água. A análise por espectroscopia FT-IR confirmou a presença de interações típicas entre os componentes dos filmes e grupos funcionais relacionados ao lipopeptídeo. Por fim, a atividade antioxidante nos filmes foi observada apenas na formulação com 25 mg de LP.F1483, que apresentou 45,53% de inibição de radicais DPPH, demonstrando um efeito dose-dependente e o potencial desses materiais para uso como embalagens ativas ou cosméticos funcionais. Esses achados destacam o potencial de *Bacillus* sp. UELAsF1.483 como uma ferramenta biotecnológica promissora, contribuindo para o desenvolvimento de alternativas naturais aos antioxidantes sintéticos e abrindo novas perspectivas para inovações sustentáveis nas indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica.

Palavras-Chave: Lipopeptídeos; DPPH; Antioxidante; Filme.

BERTONCINI, Giovana Élika Silveira. **Production and evaluation of antioxidant properties of bacterial lipopeptides**. 2025. 84 f. Qualification Work (Master in Biotechnology – Center of Exact Sciences, State University of Londrina, Londrina, 2025).

ABSTRACT

Lipopeptides, metabolites produced by species of the genus *Bacillus*, stand out for their antioxidant properties and their potential for application in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. The growing demand for natural antioxidants, to replace synthetic ones that can pose health risks, highlights the relevance of sustainable and renewable biotechnological solutions. In this context, this study aimed to produce, characterize and evaluate the antioxidant properties of lipopeptides produced by the *Bacillus* sp. UELAsF1.483 strain, and to apply the lipopeptides in film-forming formulations. The strain was cultivated in a medium containing glucose and glutamic acid, with 2% inoculum, for up to 96 hours, at 150 rpm and 37°C. The presence of biosurfactants was confirmed by emulsification index and oil spreading tests. The lipopeptides were extracted by acid precipitation followed by organic extraction and subjected to analysis of their structural characteristics and antioxidant activity tests, and development of a film-forming formulation. The results indicated that the supernatant induced dispersion in the oil layer and formed stable emulsions with emulsification indices higher than 50%, confirming the presence of biosurfactants with surfactant and emulsifying properties, especially after 72 hours of fermentation. The antioxidant activity increased significantly after 48 hours of cultivation, stabilizing between 35–40% at 72 hours. Based on these results, the fermentation time of 72 hours was chosen for the subsequent experiments. In this interval, the production of biosurfactants reached 0.45 g/L. Structural analysis confirmed the presence of functional groups typical of lipopeptides, identifying retention times compatible with standards described in the literature. The lipopeptide produced was named LP.F1483 and presented 47.26% inhibition of DPPH radicals at low concentrations, in addition to presenting total antioxidant activity, equivalent to Trolox, the reference antioxidant. Furthermore, the lipopeptide LP.F1483 was incorporated into biodegradable films based on starch and gelatin, 0%, 2.5 mg, 5 mg and 25 mg/100g polymer. The water solubility increased in a concentration-dependent manner of LP.F1483, reaching 56.97% in the films with higher additive content, which evidences the destabilization of the polymer matrix and greater affinity with water. The FT-IR spectroscopy analysis confirmed the presence of typical interactions between the components of the films and functional groups related to the lipopeptide. Finally, the antioxidant activity in the films was observed only in the formulation with 25 mg of LP.F1483, which presented 45.53% inhibition of DPPH radicals, demonstrating a dose-dependent effect and the potential of these materials for use as active packaging or functional cosmetics. These findings highlight the potential of *Bacillus* sp. UELAsF1.483 as a promising biotechnological tool, contributing to the development of natural alternatives to synthetic antioxidants and opening new perspectives for sustainable innovations in the cosmetic, food and pharmaceutical industries.

Key-words: Lipopeptides; DPPH; Antioxidant; Films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos principais lipopeptídeos	23
Figura 2 – Dinâmica de Crescimento Celular do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. UELAsF1.483.....	48
Figura 3 – Consumo de Substrato do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. UELAsF1.483	49
Figura 4 – Variação de pH do cultivo de <i>Bacillus</i> sp. UELAsF1.483	50
Figura 5 – Índice de emulsificação de biossurfactantes de <i>Bacillus</i> sp. UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação (A). Emulsão formada no tempo de 72 horas de fermentação (B)	52
Figura 6 – Ensaio de espalhamento de óleo de biossurfactantes produzidos UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação (A). Ensaio de espalhamento de óleo (B), onde A (controle), B, C, D e E tempos de 24, 48, 72 e 96, respectivamente	54
Figura 7 – Atividade antioxidante de biossurfactantes de <i>Bacillus</i> sp. UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação	56
Figura 8 – Espectros de FT-IR da amostra LP.F1483 e do Padrão de Surfactina, mostrando as bandas de absorção características entre 4000 e 500 cm ⁻¹	59
Figura 9 – Cromatograma de CLAE da amostra LP.F1483	60
Figura 10 – Análise de viabilidade celular de LP.F1483 em células VERO	61
Figura 11 – Atividade antioxidante da amostra LP.F1483 avaliada pelo ensaio de DPPH	63
Figura 12 – Atividade antioxidante de LP.F1483 avaliada pelo ensaio de TRAP.....	65
Figura 13 -- Espessura dos filmes de LP.F1483	67
Figura 14 – Solubilidade em água dos filmes de LP.F1483.....	68
Figura 15 – FT-IR dos filmes F1,F2,F3, FC comparados com LP.F1483	70
Figura 16 – Atividade antioxidante dos filmes com LP.F1483 avaliada pelo ensaio de DPPH.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulações empregadas para o preparo de 100 g de solução filmogênica	44
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Atividade antioxidante de lipopeptídeos	32
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos gerais	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Biossurfactantes	17
3.1.1	Antioxidantes lipopeptídeos bacterianos: estrutura e biossíntese	18
3.1.2	Surfactinas	20
3.1.3	Iturinas	21
3.1.4	Fengicinas	21
3.2	Microrganismos produtores	24
3.3	Condições do processo fermentativo para a produção de lipopeptídeos	24
3.4	Estresse oxidativo	26
3.4.1	Espécies reativas de oxigênio e implicações à saúde	28
3.4.2	Antioxidantes	29
3.4.2.1	Antioxidantes sintéticos	30
3.4.2.2	Antioxidantes naturais	31
3.5	Atividades biológicas dos lipopeptídeos	32
3.5.1	Atividade antioxidante	33
3.5.2	Filmes	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Microrganismos	39
4.2	Produção de lipopeptídeos por <i>Bacillus</i> sp. UELASF1.483	39
4.2.1	Preparo do pré-inóculo	39
4.2.2	Preparo do inóculo	39
4.2.3	Processo fermentativo	40
4.3	Consumo de substrato e determinação do crescimento celular	40
4.4	Avaliação das propriedades biossurfactantes do extrato bruto	41

4.4.1	Índice de emulsificação	41
4.4.2	Ensaio de espalhamento de óleo	41
4.5	Extração e quantificação dos lipopeptídeos	42
4.6	Caracterização química do lipopeptídeo.....	42
4.6.1	Identificação do lipopeptídeo espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	42
4.7	Avaliação da citotoxicidade em cultura celular	43
4.8	Atividade antioxidante	43
4.8.1	Determinação da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical 2,2Difenil-1-Picril-Hidrazil (DPPH)	43
4.8.2	Avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP).....	44
4.9	Produção de filmes	45
4.10	Caracterização dos filmes	45
4.10.1	Espessura dos filmes formados	45
4.10.2	Solubilidade.....	46
4.10.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	46
4.10.4	Avaliação da atividade antioxidante por DPPH	46
4.11	Análises estatísticas	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1	Produção de lipopeptídeos por fermentação submersa	48
5.2	Avaliação das propriedades emulsificantes e tensoativas do extrato bruto	51
5.2.1	Determinação do índice de emulsificação.....	51
5.2.2	Capacidade de dispersão de óleo de biossurfactantes de <i>Bacillus</i> sp. UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação	53
5.3	Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto em diferentes tempos de fermentação	55
5.4	Extração dos biossurfactantes	56
5.5	Caracterização química do lipopeptídeo LP.F1483	59
5.6	Avaliação da citotoxicidade celular	61
5.7	Atividade antioxidante	63

5.7.1	Análise da atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DDPH).....	63
5.7.2	Análise da capacidade antioxidante total (TRAP)	65
5.8	Caracterização dos filmes	66
5.8.1	Espessura dos filmes formados	67
5.8.2	Solubilidade.....	68
5.8.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	70
5.8.4	Avaliação da atividade antioxidante dos filmes	72
6	CONCLUSÃO	74
	ANEXOS	75
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo em neutralizá-las. Essas espécies, geradas por processos naturais ou por estressores ambientais, como xenobióticos, podem danificar DNA, proteínas e lipídios, contribuindo para doenças como envelhecimento precoce, câncer, e doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e hepáticas.

Os antioxidantes são moléculas amplamente aplicadas nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia devido a sua capacidade de neutralizar o estresse oxidativo, a maioria dos antioxidantes disponíveis comercialmente são de origem sintética. Antioxidantes sintéticos como BHA (beta hidroxiácidos), BHT (hidroxitolueno butilado), PG (galato de propilo) e TBHQ (terc-butil hidroquinona), são amplamente utilizados devido à sua estabilidade, desempenho, baixo custo e disponibilidade. Porém, o consumo prolongado de antioxidantes sintéticos resultar em diversos problemas de saúde, como alergias, problemas gastrointestinais e aumento do risco de câncer.

Como uma alternativa que apresente as mesmas propriedades antioxidantes, os lipopeptídeos vêm se destacando como uma alternativa sustentável e segura em relação aos antioxidantes sintéticos. Esses compostos, produzidos principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*, podem ser utilizados para substituir antioxidantes sintéticos potencialmente tóxicos. Esses compostos apresentam alta capacidade de neutralizar radicais livres, protegendo células contra danos oxidativos e prevenindo o envelhecimento precoce da pele. Além disso, sua estrutura anfifílica permite a estabilização de membranas celulares, reduzindo os efeitos do estresse oxidativo. Sua produção por fermentação microbiana permite um processo escalável e ecologicamente viável, reduzindo a dependência de derivados petroquímicos e promovendo alternativas seguras e eficazes para a indústria cosmética e farmacêutica.

Os lipopeptídeos são um grupo heterogêneo de metabólitos secundários compostos por uma cadeia lipídica ligada a uma sequência peptídica. Existem várias classes e subclasses de lipopeptídeos e os principais representantes estão incluídos nas famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas. Os lipopeptídeos possuem diversas

propriedades biológicas, incluindo atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e cicatrizante, e são eficazes agentes emulsificantes e tensoativos. Especificamente, a surfactina, um lipopeptídeo amplamente estudado, tem demonstrado uma atividade antioxidante significativa, comparável à de antioxidantes sintéticos (BHA) e naturais (vitamina C) já bem estabelecidos na literatura, capaz de apresentar atividade antioxidante em ensaios de DPPH e FRAP.

Nesse contexto, esse trabalho foi motivado pela potencialidade de caracterizar um agente terapêutico versátil, capaz de atuar como um antioxidante eficaz, além de possuir propriedades emulsificantes e tensoativas. Ao explorar o potencial terapêutico dos antioxidantes naturais, pretende-se não apenas contribuir para o desenvolvimento de alternativas mais seguras e sustentáveis aos antioxidantes sintéticos, mas também explorar possibilidades de aplicações em setores variados, como a medicina, a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, abrindo novas possibilidades para inovações tecnológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Produzir, caracterizar, e avaliar as propriedades antioxidantes e aplicação em filmes de biopolímeros de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus* sp. UELAsF1.483

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Produzir lipopeptídeos por fermentação submersa;
- ❖ Realizar a extração orgânica dos lipopeptídeos;
- ❖ Caracterizar estruturalmente os lipopeptídeos;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade dos lipopeptídeos em cultura celular;
- ❖ Avaliar a capacidade emulsificante dos lipopeptídeos;
- ❖ Avaliar a capacidade de redução da tensão superficial dos lipopeptídeos;
- ❖ Avaliar o potencial antioxidante dos lipopeptídeos;
- ❖ Aplicar lipopeptídeos em filmes biopoliméricos de amido e gelatina;
- ❖ Caracterizar os filmes quanto aos aspectos físico-químicos e propriedades antioxidantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOSSURFACTANTES

Os biossurfactantes são compostos anfifílicos, capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases. São de origem biológica particularmente microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Os biossurfactantes são considerados mais ecológicos em comparação com seus equivalentes sintéticos, que são derivados de petroquímicos (Miao *et al.*, 2024). Sua biodegradabilidade minimiza a poluição e apoia práticas ecológicas em várias indústrias. Além disso, os biossurfactantes geralmente exibem baixa citotoxicidade, tornando-os mais seguros para a saúde humana e para o meio ambiente, sendo menos propensos a causar reações adversas em comparação com alguns surfactantes sintéticos que podem ter efeitos nocivos em altas concentrações (Akbari *et al.*, 2018).

Os biossurfactantes também são versáteis, podem ser utilizados em uma ampla gama de aplicações, incluindo biorremediação, ao aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de poluentes hidrofóbicos por meio de micelização, emulsificação e interação celular. Reduzindo a tensão superficial, formando micelas que encapsulam contaminantes como hidrocarbonetos e pesticidas, facilitando sua degradação microbiana. Além disso, podem complexar metais pesados (Pb^{2+} , Cd^{2+}), permitindo sua extração do solo. Algumas cepas, como *Bacillus* e *Pseudomonas*, aumentam a adesão microbiana aos poluentes e removem até 97% de hidrocarbonetos de alta massa molecular. São sustentáveis, biodegradáveis e eficazes em diversas condições ambientais, mas seu custo de produção ainda representa um desafio (Ławniczak; Marecik; Chrzanowski, 2013; Mulligan, 2021). Na agricultura, atuando como emulsificantes em formulações de pesticidas; e na indústria farmacêutica, servindo como sistemas de liberação de medicamentos devido à sua capacidade de encapsular compostos bioativos (Akbari *et al.*, 2018). Essas inúmeras aplicações se devem às propriedades emulsificantes, tensoativas e uma ampla gama de atividades biológicas específicas.

Os biossurfactantes também podem atuar de maneira sinérgica com outros compostos, melhorando sua eficácia em aplicações como produtos de limpeza e

farmacêuticos. Essa sinergia pode levar a um melhor desempenho na redução da tensão superficial e na estabilização de emulsões. Além disso, muitos biossurfactantes mantêm sua eficácia em uma ampla faixa de temperaturas e níveis de pH, tornando-os adequados para diversos processos industriais (Olasanmi; Thring, 2018).

Desta forma, o mercado de biossurfactantes está em rápida expansão, com projeções estimando um salto de US\$ 1,2 bilhão em 2022 para US\$ 2,3 bilhões até 2028, com uma taxa anual de crescimento composta de 11%. Esses compostos encontram aplicações em áreas como detergentes, indústria alimentícia, bebidas, agricultura e medicamentos. Esse avanço é evidente em regiões como Europa, América do Norte, Ásia-Pacífico e América do Sul, refletindo uma demanda crescente e perspectivas promissoras para o setor (“Biosurfactants Market worth \$2.3 billion by 2028”, 2022).

Os biossurfactantes estão divididos em várias classes, como glicolipídios, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipopeptídeos, com características estruturais e atividades biológicas específicas. Os lipopeptídeos são biossurfactantes produzidos principalmente por linhagens do gênero *Bacillus*. Possuem ampla gama de atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral e antioxidante. (Barros *et al.*, 2007).

3.1.1 Antioxidantes Lipopeptídeos Bacterianos: Estrutura e Biossíntese

Os lipopeptídeos são uma classe de moléculas anfífilas compostas por uma parte lipídica ligada a uma cadeia peptídica, eles são produzidos por diversos microrganismos, incluindo bactérias e fungos, e são reconhecidos por suas diversas atividades biológicas e aplicações industriais (Pilz *et al.*, 2023).

Os lipopeptídeos consistem em dois componentes principais: a parte peptídica, que geralmente é um peptídeo cíclico ou linear formado por aminoácidos, e a parte lipídica, que inclui uma ou mais cadeias de ácidos graxos que podem variar em comprimento e saturação. A estrutura única dos lipopeptídeos permite que eles exibam propriedades surfactantes, possibilitando a redução da tensão superficial entre diferentes substâncias, como óleo e água (Pilz *et al.*, 2023). Existem várias

classes e subclasses de lipopeptídeos e os principais representantes estão incluídos nas famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas (Figura 1) (Barros *et al.*, 2007).

Os lipopeptídeos são considerados metabólitos secundários porque não são essenciais para o crescimento ou reprodução imediata dos microrganismos produtores, como o *Bacillus subtilis*, mas conferem vantagens adaptativas no ambiente. Como metabólitos secundários, sua produção geralmente ocorre em fases específicas do crescimento celular e é influenciada por condições ambientais. Seu principal benefício está na capacidade de atuar como biosurfactantes e agentes antimicrobianos, ajudando o microrganismo a competir por espaço e nutrientes, inibir patógenos concorrentes e facilitar a colonização de superfícies (Barros *et al.*, 2007).

Esses compostos desempenham funções essenciais para a sobrevivência das bactérias, incluindo a adaptação a condições ambientais adversas, a formação de biofilmes e esporulação, a regulação da motilidade e acesso a nutrientes, além de sua potente atividade antimicrobiana contra competidores. Também favorecem a transferência de material genético entre diferentes bactérias, permitindo a incorporação de novas características que aumentam a diversidade e a resiliência das populações bacterianas (Gutiérrez-Chávez; Benaud; Ferrari, 2021).

A biossíntese de lipopeptídeos, incluindo a surfactina, ocorre por meio de complexos caminhos bioquímicos, principalmente envolvendo sintases de peptídeos não ribossômicos (NRPS). A síntese de lipopeptídeos é realizada através por componentes metabólicos codificados por agrupamentos organizados de genes conhecidos como clusters de genes biossintéticos (BGCs). Esses clusters contêm os genes necessários para a síntese e regulação dos lipopeptídeos (Felnagle *et al.*, 2008; Gutiérrez-Chávez; Benaud; Ferrari, 2021).

As principais enzimas responsáveis pela síntese de lipopeptídeos são as NRPS (*Non-Ribosomal Peptide Synthetases*), que são proteínas multimodulares. Cada NRPS é composta por múltiplos domínios que desempenham funções específicas no processo de síntese. Os domínios-chave nas NRPS incluem o domínio de adenilação (A), que ativa aminoácidos formando aminoacil-adenilato; o domínio de proteína transportadora peptídica (PCP), que atua como transportadora para a cadeia peptídica em crescimento; e o domínio de condensação (C), que catalisa a formação de ligações peptídicas entre os aminoácidos (Théatre *et al.*, 2021).

A biossíntese da surfactina pode ser dividida em três etapas principais: a biossíntese de ácidos graxos, na qual os ácidos graxos são ativados para formar acil-CoA graxo por meio da ligase acil-CoA; a biossíntese de aminoácidos, onde aminoácidos específicos, como L-glutamato, L-aspartato, L-leucina e L-valina, são sintetizados e preparados para incorporação na cadeia peptídica; e a montagem do peptídeo, onde os aminoácidos ativados são montados no acil-CoA graxo por meio de uma série de reações de condensação mediadas pela NRPS, resultando em um precursor linear que é subsequentemente ciclado para formar a estrutura final do lipopeptídeo (Roongsawang; Washio; Morikawa, 2010).

A ciclagem do peptídeo linear é frequentemente catalisada por um domínio de tioesterase terminal (TE) no final do processo de síntese. Esta etapa é crucial, pois estabiliza a estrutura do lipopeptídeo e aumenta sua bioatividade (Gao *et al.*, 2016).

3.1.2 Surfactinas

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico produzido por certas espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, em particular *B. subtilis*. A surfactina foi identificada pela primeira vez em 1969 e é reconhecida por suas notáveis propriedades surfactantes, além de sua atividade antimicrobiana de amplo espectro (Pilz *et al.*, 2023).

A surfactina desempenha um papel crucial na sobrevivência do *B. subtilis* ao facilitar sua adaptação a condições ambientais adversas. Estudos recentes relatam sua atividade como molécula sinalizadora no *quorum sensing*, foi possível observar sua atividade na coordenação de processos vitais das bactérias, como a formação de biofilmes e a esporulação, tal propriedade garante a proteção e resistência em cenários de escassez de nutrientes. A molécula apresenta uma potente atividade antimicrobiana, mediada pela desestabilização de membranas celulares de competidores, protege a população bacteriana contra ameaças externas. (Rahman *et al.*, 2021; Zhen *et al.*, 2023).

A estrutura da surfactina consiste em uma cadeia de heptapeptídeos formada por sete aminoácidos, que são: L-glutâmico, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-aspartato, D-leucina e L-leucina. Este peptídeo forma uma estrutura de anel lactona com uma cadeia de ácido graxo β -hidroxilo que pode variar em comprimento, geralmente entre 12 e 16 átomos de carbono. (Hamley, 2015; Kanwar, 2017; Pilz *et al.*, 2023)

3.1.3 Iturinas

Iturinas são lipopeptídeos cíclicos descobertos no início da década de 1980 produzidos principalmente por cepas de *B. subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. As iturinas têm sido extensivamente estudadas por suas aplicações na agricultura, como biopesticidas e em produtos farmacêuticos para tratamentos de infecções (Yaraguppi *et al.*, 2023).

A variante mais estudada, a iturina A, é composta de sete aminoácidos (Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser) ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo β -amino, tipicamente entre 14 a 17 átomos de carbono de comprimento (Gao *et al.*, 2022). Elas atuam formando poros na membrana dos fungos, aumentando a permeabilidade ao potássio e levando à lise celular, com atividade dependente da presença de esteróis. Suas aplicações incluem o uso como biofungicidas na agricultura, biossurfactantes na indústria alimentícia e na recuperação de petróleo (Wan *et al.*, 2021; Yaraguppi *et al.*, 2022).

3.1.4 Fengicinas

Fengicina é um lipopeptídeo cíclico produzido por *B. subtilis*. O composto foi identificado pela primeira vez em 1986, reconhecendo *B. subtilis* como uma fonte de lipopeptídeos cíclicos bioativos com propriedades antifúngicas significativas (Vanittanakom *et al.*, 1986).

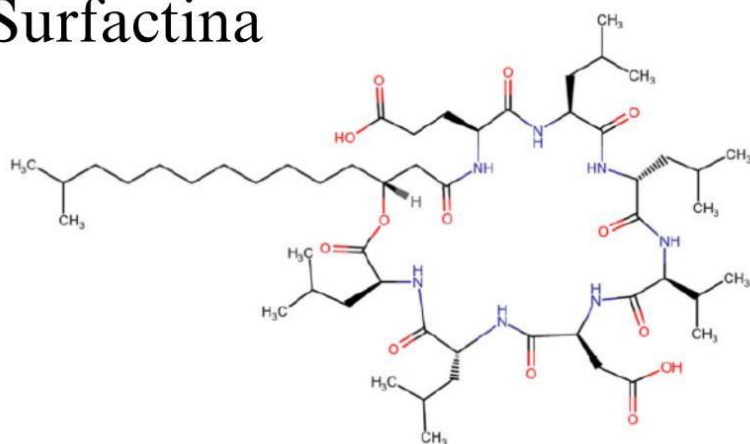
Estruturalmente, a fengicina é composta por uma sequência de aminoácidos específicos: D-alanina, L-soleucina, L-prolina, D-alo-treonina, três ácidos L-glutâmicos, D-tirosina, L-tirosina e D-ornitina. Existem duas variantes principais da fengicina: a fengicina A, que contém D-alanina, e a fengicina B, onde a D-alanina é substituída por D-valina. Ambas as variantes apresentam frações lipídicas variáveis que incluem ácidos graxos, como ácido anteiso-pentadecanoico (ai-C15), ácido isohexadecanoico (i-C16) e ácido n-hexadecanoico (n-C16) (Gimenez *et al.*, 2021).

A fengicina apresenta uma potente atividade antifúngica, atuando principalmente na desestabilização das membranas celulares dos fungos ao se ligar a esteróis e fosfolípidios, causando vazamento e lise celular. Além disso, pode interferir na síntese de DNA e na função de organelas. Sua eficácia é alta contra fungos filamentosos, como *Rhizopus stolonifer* e *Venturia* spp., com concentrações

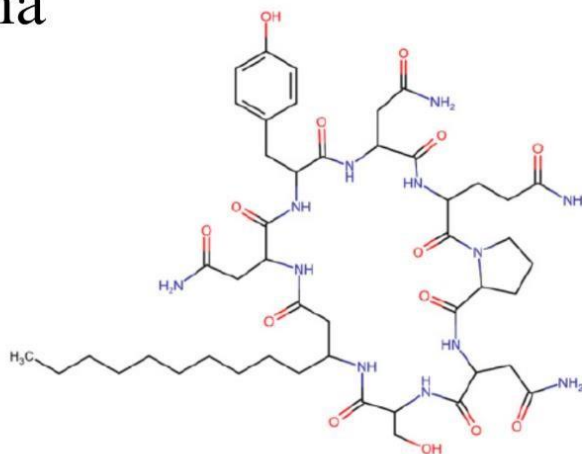
inibitórias comparáveis a fungicidas sintéticos, mas é inativa contra leveduras e bactérias devido à dependência de esteróis na membrana-alvo. (Vanittanakom *et al.*, 1986; Gimenez *et al.*, 2021).

Figura 1 – Estrutura química dos principais lipopeptídeos.

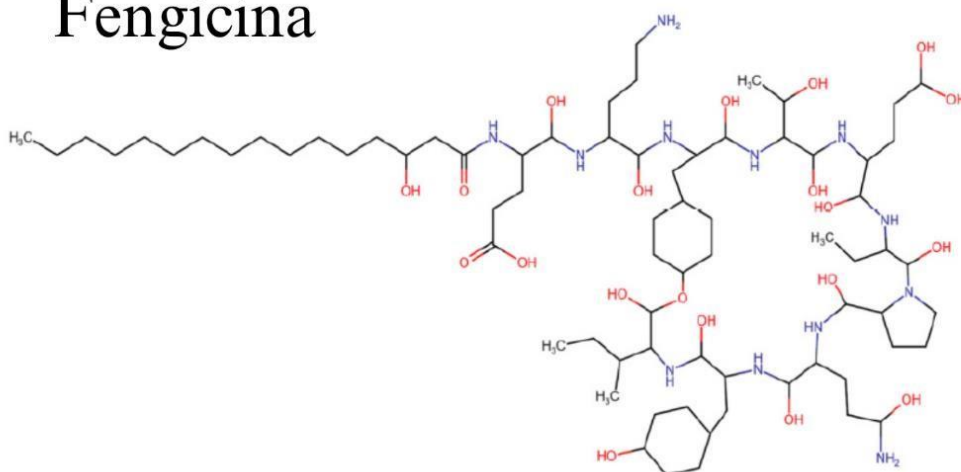
Surfactina



Iturina



Fengicina



Fonte: Pilz et al., 2023 (adaptado).

3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES

Os lipopeptídeos são moléculas que podem ser produzidas por diversos microrganismos, especialmente bactérias. Os principais produtores incluem o gênero *Bacillus*, que inclui mais de 200 espécies, principalmente isoladas do solo (Ghafoor; Hasnain, 2009). *Bacillus subtilis* é um dos principais produtores, mas outras espécies de *Bacillus* também são capazes de produzir lipopeptídeos. Ele é um bastonete Gram-positivo, com 2-6 µm de comprimento e 1 µm de diâmetro, capaz de formar esporos. Suas colônias podem ter formatos arredondados ou irregulares, com coloração que varia de creme a marrom, podendo sofrer alterações morfológicas conforme o meio de cultura utilizado (Rudner *et al.*, 1998).

O *B.subtilis* é mais conhecido por produzir surfactina, além de outros lipopeptídeos como iturinas e fengicinas. Outras espécies do gênero como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis*, também são produtores de iturinas e fengicinas (Qiao *et al.*, 2024).

No gênero *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* produz lipopeptídeos, que têm aplicações na agricultura e biorremediação (Vedaraman; Venkatesh, 2011; Qiao *et al.*, 2024). No gênero *Serratia*, espécies como *Serratia marcescens* produzem lipopeptídeos com propriedades antimicrobianas (Lyu *et al.*, 2022; Decker *et al.*, 2024).

Outros gêneros, como *Paenibacillus*, *Myxococcus*, *Cystobacter* e *Lysobacter*, também são conhecidos por produzir lipopeptídeos. Algumas espécies de cianobactérias também são produtoras de lipopeptídeos com potencial biotecnológico. Esses microrganismos representam valiosas fontes de compostos bioativos com aplicações em medicina, agricultura e remediação ambiental, e a exploração de cepas subutilizadas pode revelar novos produtores com propriedades únicas (Clements-Decker *et al.*, 2022)

3.3 CONDIÇÕES DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS

A seleção adequada das fontes de carbono e nitrogênio é um fator crítico para a produção de lipopeptídeos, uma vez que esses nutrientes são indispensáveis para o crescimento microbiano e para a biossíntese de metabólitos secundários. As fontes

de carbono, como glicose, sacarose, manitol e melaço de cana-de-açúcar, são essenciais para os processos celulares e influenciam o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos. No entanto, ao mesmo tempo em que apoiam o crescimento, certas fontes de carbono podem reprimir a atividade enzimática, limitando a produção de metabólitos secundários. Paralelamente, as fontes de nitrogênio, como ureia, triptona e caseína, fornecem os componentes necessários para a síntese de proteínas e enzimas. Uma proporção equilibrada de nitrogênio e carbono é vital para otimizar a fermentação, pois o nitrogênio excessivo pode dificultar a produção de metabólitos, enquanto o nitrogênio inadequado pode limitar o crescimento. A seleção e o gerenciamento cuidadosos dessas fontes são essenciais para maximizar a eficiência da fermentação e o rendimento do metabólito. (Tays *et al.*, 2018; Tutik Murniasih *et al.*, 2023).

Um estudo usando uma cepa de *Bacillus subtilis* destacou a otimização de fontes de carbono, nitrogênio e controle de aeração para maximizar a produção de biossurfactantes. A glicose foi identificada como a fonte de carbono mais eficaz, com uma concentração de 40 g/L, resultando em 4,29 g/L de biossurfactantes. Foi observado que, a glicose, quando usada concentrações mais altas reduziram a produção da molécula analisada, apesar do aumento da biomassa. Sugerindo que o excesso de glicose pode prejudicar a síntese de biossurfactantes. O controle da aeração também foi fundamental, com uma saturação de oxigênio de 30% sendo a mais benéfica para o crescimento e produção, enquanto níveis mais altos diminuíram os rendimentos (Ghribi; Ellouze-Chaabouni, 2011).

Outro estudo revelou que o uso de ácido glutâmico como fonte de nitrogênio, em combinação com extrato de levedura, aumentou significativamente a produção de surfactina e fengicina por *Bacillus mojavensis* A21. A combinação ideal foi 1 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de ácido glutâmico, o que levou à maior produção de lipopeptídeos (250 mg/L). Essas descobertas sugerem que o ácido glutâmico e o extrato de levedura impactam positivamente o metabolismo celular, aumentando o rendimento de lipopeptídeos. Isso ocorre porque o ácido glutâmico é uma fonte eficiente e acessível de nitrogênio, que pode ser utilizada no metabolismo da bactéria para a produção de peptídeos não ribossômicos, como os lipopeptídeos (Hmidet *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2023).

Diversos fatores físico-químicos influenciam diretamente a eficiência da produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*, especialmente no que se refere à otimização da fermentação. De acordo com Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008), o controle rigoroso do pH, da temperatura e da concentração de sais minerais no meio de cultivo é determinante para o aumento da produtividade de surfactina. Os autores observaram que a cepa *Bacillus subtilis* BS5 apresentou produção otimizada quando cultivada em meio de sais minerais (MSM), sob condições iniciais de pH levemente ácido (6,5–6,8), seguido por um aumento gradual ao longo do processo fermentativo, atingindo pH 8. Essa modulação do pH demonstrou-se crucial, uma vez que a elevação durante a fermentação resultou em um incremento significativo na produção do biossurfactante, passando de 1,25 g/L para 1,9 g/L. Além disso, a adição de traços de $ZnSO_4$, $FeCl_3$ e $MnSO_4$ ao meio promoveu um aumento expressivo na produtividade, triplicando os níveis de surfactina e atingindo concentrações de até 1,12 g/L. Esses resultados evidenciam a importância de um ambiente controlado e enriquecido para a maximização da biossíntese de surfactina, apontando para a relevância do ajuste fino dos parâmetros operacionais no processo fermentativo.

Outro estudo mostrou a influência da temperatura para a produção na biossíntese de lipopeptídeos, sendo o valor ótimo de 37°C para a produção de surfactina por *B.subtilis* (Amani *et al.*, 2013). Quanto ao tempo de fermentação, sua otimização pode impactar diretamente os resultados, com um tempo de 72 horas demonstrando rendimentos de até 0,5 g/L, resultados maiores que todos os outros tempos verificados (24 - 120 horas) (Vedaraman; Venkatesh, 2011).

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade do organismo de neutralizá-las ou reparar os danos causados por elas. (Li *et al.*, 2015; Pizzino *et al.*, 2017). As espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($-OH$) e o oxigênio singlete (O_2), são subprodutos metabólicos gerados por sistemas biológicos. No entanto, o aumento na produção de ROS pode causar danos às estruturas celulares resultando na progressão de doenças, incluindo câncer, diabetes, distúrbios metabólicos, aterosclerose e

enfermidades cardiovasculares (Li *et al.*, 2015; Pizzino *et al.*, 2017 (Pizzino *et al.*, 2017; Hoang *et al.*, 2021; Stoia *et al.*, 2022).

Quando a produção de ROS excede as defesas antioxidantes do corpo, pode levar a danos celulares, afetando lipídios, proteínas e DNA. Esse dano está associado a várias condições patológicas, incluindo doenças crônicas, distúrbios degenerativos e processos de envelhecimento. Por outro lado, o estresse oxidativo também pode desempenhar um papel nas vias de sinalização e pode ter aplicações terapêuticas em certas condições clínicas, como câncer (Li *et al.*, 2015; Pizzino *et al.*, 2017). A produção de ROS depende de reações enzimáticas e não enzimáticas. Reações enzimáticas que geram ROS incluem a cadeia respiratória, síntese de prostaglandinas, fagocitose e o sistema do citocromo P450. O radical superóxido (O_2^-) é gerado por NADPH oxidase, xantina oxidase e peroxidases. O H_2O_2 é produzido por várias enzimas oxidases. O radical hidroxila (OH^-), o mais reativo, é gerado pela reação do O_2^- com H_2O_2 e metais como Fe_{2+} (reação de Fenton). O óxido nítrico (NO^-), com funções fisiológicas importantes, é sintetizado pela oxidação da arginina à citrulina pela NOS. Reações não enzimáticas também podem gerar radicais livres, como a respiração mitocondrial e a exposição a radiações ionizantes. A formação de radicais livres pode ser desencadeada por fontes endógenas (como inflamação, infecções, estresse mental) e exógenas (poluentes, metais pesados, drogas e radiações) (Scandalios, 2005; Neha *et al.*, 2019; Irato; Santovito, 2021).

As mitocôndrias são as principais produtoras de ROS, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Por exemplo, o O_2^- pode ser formado durante a respiração celular, pelo metabolismo do ácido araquidônico através de lipoxigenases (LOX) e ciclooxigenases (COX), em células endoteliais e inflamatórias. Embora as mitocôndrias possuam mecanismos intrínsecos para eliminar ROS, isso não é suficiente para atender à necessidade de eliminação total dessas moléculas. Para se protegerem contra os danos causados por ROS, as células utilizam um sistema de defesa antioxidante baseado principalmente em enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (Dvořák *et al.*, 2021; Zandi; Schnug, 2022).

3.4.1 Espécies Reativas De Oxigênio E Implicações À Saúde

Entre as principais implicações para a saúde, o estresse oxidativo está fortemente ligado às doenças cardiovasculares, especialmente pela oxidação do colesterol LDL (*low density lipoprotein*), que contribui para a formação de placas ateroscleróticas. Isso pode resultar em hipertensão, ataques cardíacos e derrames, devido à redução do fluxo sanguíneo e ao aumento dos danos vasculares (Münzel *et al.*, 2010; Senoner; Dichtl, 2019).

No desenvolvimento do câncer, o estresse oxidativo prolongado pode causar danos ao DNA, aumentando o risco de mutações. As espécies reativas de oxigênio podem induzir alterações celulares que promovem a tumorigênese, tornando o estresse oxidativo um fator relevante em diversos tipos de câncer (Kryston *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2021).

Além disso, doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (ELA) têm sido associadas ao estresse oxidativo. O acúmulo de radicais livres pode causar danos aos neurônios, agravando o declínio cognitivo e os sintomas dessas condições (Barnes, 2022).

O estresse oxidativo também desempenha um papel crítico no desenvolvimento e progressão do diabetes, contribuindo para a resistência à insulina e complicações associadas, como nefropatia e neuropatia diabética. Ele também pode desencadear respostas inflamatórias, levando à inflamação crônica, que está implicada em doenças autoimunes e na síndrome de fadiga crônica (Ayed *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2017; Hmidet *et al.*, 2019; Yaribeygi *et al.*, 2020).

Além disso, há uma hipótese de que o estresse oxidativo contribui para o processo de envelhecimento, causando danos celulares cumulativos ao longo do tempo, afetando a função e a viabilidade celular, o que pode levar ao desenvolvimento de doenças relacionadas à idade. Fatores ambientais, como poluição e tabagismo, também aumentam os níveis de estresse oxidativo, exacerbando condições respiratórias como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), ao danificar os tecidos pulmonares (Barnes, 2022; Liu; Hua; Song, 2022).

3.4.2 Antioxidantes

Uma das funções principais dos antioxidantes é neutralizar os radicais livres, eliminando-os antes que possam causar danos aos componentes celulares, como DNA, proteínas e lipídios. Além disso, os antioxidantes são fundamentais para a saúde, estando associados à redução do risco de doenças crônicas, como doenças cardíacas, diabetes e câncer. Eles também desempenham um papel importante na preservação de alimentos, ajudando a evitar a deterioração e rancidez, prolongando assim a vida útil dos produtos (Tan *et al.*, 2018; Sharifi-Rad *et al.*, 2020; Petcu *et al.*, 2023).

O método DPPH, introduzido por Blois (1958), é um ensaio amplamente utilizado para medir a atividade antioxidante avaliando a capacidade de eliminação de radical livre estável DPPH (α , α -difeníl- β -picril-hidrazil). O método é baseado na capacidade dos antioxidantes de doar átomos de hidrogênio, reduzindo o radical DPPH de cor violeta (Z•) em uma forma incolor ou amarelo-claro (ZH), que pode ser quantitativamente medida pela absorvância a 517 nm após um tempo de reação de 30 minutos. (Kedare; Singh, 2011). O ensaio DPPH é simples, rápido e econômico, tornando-o adequado para analisar a atividade antioxidante em amostras biológicas. O ensaio funciona em metanol, etanol e acetona, e pode avaliar o potencial antioxidante de moléculas hidrofílicas e lipofílicas. No entanto, o método DPPH tem limitações. Ele é sensível à luz, oxigênio e pH. Sua interação com outros radicais pode complicar a análise. O método também tem dificuldades com amostras de plasma e sistemas de emulsão devido à interferência de proteínas e à partição de antioxidantes (Kedare; Singh, 2011).

O ensaio *Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP) também é um ensaio amplamente utilizado desenvolvido por Wayner *et al.* (1985) para avaliar a capacidade antioxidante, particularmente em amostras biológicas. Este ensaio mede o quão bem os antioxidantes podem neutralizar os radicais peroxil, que são gerados usando um iniciador radical como 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP). O processo envolve a geração de radicais por meio da decomposição de ABAP e o monitoramento da atividade antioxidante medindo a redução na quimioluminescência de um sistema baseado em luminol. O tempo de indução, ou a duração durante a qual a emissão de luz é suprimida, está diretamente relacionado à

concentração e eficiência do antioxidante. Esses resultados são comparados a um antioxidante padrão (Trolox), expressando os resultados em equivalentes de Trolox (Sadowska-Bartosz; Bartosz, 2022).

O método TRAP tornou-se uma referência para a avaliação da capacidade antioxidante e foi aprimorado ao longo do tempo para maior precisão. Esse método é amplamente utilizado para quantificar a eficácia antioxidante de diferentes amostras, permitindo comparações detalhadas entre substâncias. Seu foco na neutralização de radicais peroxil confere relevância biológica aos resultados, destacando sua aplicabilidade em diversos contextos experimentais (Oliveira *et al.*, 2014).

Estes dois ensaios são métodos comumente usados para avaliar a capacidade antioxidante, mas diferem em mecanismo, aplicação e relevância biológica. O ensaio TRAP mede como os antioxidantes neutralizam os radicais peroxil gerados pelo ABAP e foca na capacidade geral de captura de radicais, frequentemente usada em sistemas biológicos mais complexos. Ele oferece uma perspectiva biologicamente relevante ao imitar condições fisiológicas. Por outro lado, o ensaio DPPH avalia a redução de um radical livre estável, com mudanças na absorbância indicando capacidade antioxidante. Embora mais simples e rápido, o DPPH não tem a complexidade biológica do TRAP e é normalmente aplicado triagens iniciais de extratos naturais. No geral, o TRAP fornece uma análise mais abrangente para o comportamento antioxidante em contextos biológicos, enquanto o DPPH é adequado para ensaios rápidos e preliminares (Lucas-Abellán *et al.*, 2011; Sadowska-Bartosz; Bartosz, 2022).

3.4.2.1 Antioxidantes sintéticos

Antioxidantes sintéticos, amplamente utilizados na preservação de alimentos e em outras aplicações industriais, têm sido associados a vários efeitos colaterais e riscos à saúde. Altas doses de antioxidantes sintéticos, como BHA (butil-hidroxianisol) e BHT (butil-hidroxitolueno), estão ligadas a danos no DNA, o que pode causar mutações e aumentar o risco de câncer. Além disso, estudos em animais sugerem que a exposição prolongada a esses compostos pode promover a carcinogênese, afetando principalmente o fígado e outros órgãos.

Outro problema relacionado ao consumo de antioxidantes sintéticos são os efeitos gastrointestinais, que podem causar desconforto ou graves problemas

digestivos. Além disso, há relatos de reações alérgicas cutâneas, como erupções, associadas ao contato ou consumo desses compostos. O BHT é um composto que apresenta toxicidade hepática afetando especialmente em indivíduos com condições pré-existentes nesse órgão. Alguns antioxidantes sintéticos também podem interferir nas funções hormonais, levando a potenciais problemas de saúde reprodutiva ou outros distúrbios hormonais (Bergfeld *et al.*, 2023).

Além dos riscos à saúde humana, os antioxidantes sintéticos também representam uma ameaça ambiental. Eles tendem a persistir no meio ambiente, apresentando riscos à vida selvagem, especialmente aos organismos aquáticos, devido à sua baixa biodegradabilidade e potencial toxicidade em concentrações elevadas (RMOA, 2016; Pandey; Kumar, 2021).

3.4.2.2 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais, derivados principalmente de fontes vegetais e microbianas, oferecem inúmeros benefícios que promovem a saúde e o bem-estar. Suas vantagens incluem alta biodisponibilidade, baixa citotoxicidade, efeitos sinérgicos e impacto ambiental mínimo (Zehiroglu; Sarikaya, 2019). Além disso, são frequentemente mais biodisponíveis do que os sintéticos, sendo facilmente absorvidos e utilizados pelo corpo. Por exemplo, as vitaminas C e E, antioxidantes clássicos, juntamente com carotenoides e polifenóis encontrados em frutas e vegetais, são prontamente absorvidos durante a digestão, permitindo uma neutralização eficaz dos radicais livres no organismo (Rahaman *et al.*, 2023).

Os antioxidantes naturais também têm uma pegada ambiental menor em comparação com as alternativas sintéticas. Eles são frequentemente obtidos de recursos renováveis, como frutas, vegetais, ervas e especiarias, que podem ser cultivados de forma sustentável. Além disso, os processos de extração de antioxidantes naturais podem utilizar subprodutos agrícolas, reduzindo o desperdício e promovendo uma economia circular dentro dos sistemas alimentares (Pinilla-González *et al.*, 2024). Metabólitos microbianos, como os biossurfactantes, também são excelentes fontes de antioxidantes naturais, sendo produzidos por microrganismos a partir de processos biotecnológicos sustentáveis, com menor impacto ambiental e alta eficiência antioxidante.

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS LIPOPEPTÍDEOS

Os lipopeptídeos apresentam uma ampla gama de atividades biológicas que a tornam um composto significativo em diversas áreas, como medicina, agricultura e biotecnologia (Zhen *et al.*, 2023). Entre suas principais atividades biológicas, destaca-se a atividade antibacteriana, sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Bueno-Mancebo *et al.*, 2024). O mecanismo de ação da surfactina inclui a desestabilização das membranas celulares bacterianas, aumentando sua permeabilidade e levando à lise celular, além da inibição da síntese de proteínas nos patógenos, dificultando sua reprodução (Tavares *et al.*, 2020). A concentração inibitória mínima (CIM) da surfactina varia de 12 a 50 µg/ml, evidenciando sua potência como antibiótico (Li *et al.*, 2023).

Ademais, a surfactina demonstra atividade antiviral, especialmente contra vírus envelopados, como HIV e vírus do herpes simplex (HSV), atuando na degradação das membranas lipídicas virais e na formação de canais iônicos nos capsídeos virais, o que inibe a replicação viral (Yuan *et al.*, 2018). A surfactina também exibe propriedades antifúngicas, sendo eficaz contra vários patógenos fúngicos, incluindo fungos filamentosos e leveduras, o que a torna útil no controle de patógenos de plantas (Meena; Kanwar, 2015).

Os lipopeptídeos também exibem atividade emulsificante com ampla aplicação na indústria cosmética e alimentos, baseada na interação entre lipopeptídeos e os componentes das formulações. Essa interação se deve à estrutura anfifílica dos lipopeptídeos, que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. A parte hidrofóbica se liga a substâncias hidrofóbicas, enquanto a parte hidrofílica se liga a substâncias hidrofílicas, formando uma estrutura que garante a estabilidade da emulsão (Perez-Moral *et al.*, 2014). A concentração de micelas crítica (CCM) da surfactina, que mede a menor concentração necessária para a formação de micelas, é a mais baixa entre os surfactantes, o que aprimora suas propriedades de emulsificação, formação de espuma, adsorção e solubilização (Gupta *et al.*, 2019). Além disso, o lipopeptídeo MSA31, isolado da esponja marinha *Fasciospongia cavernosa* demonstrou a capacidade de estabilizar emulsões em produtos cosméticos (Kiran *et al.*, 2017).

Em aplicações biotecnológicas, a surfactina é empregada em biorremediação devido à sua capacidade de aumentar a solubilidade de poluentes hidrofóbicos, facilitando a limpeza de ambientes contaminados. Na indústria de alimentos, suas propriedades antimicrobianas são aproveitadas como conservante natural, ajudando a prolongar a vida útil dos produtos ao inibir o crescimento microbiano (Kiran *et al.*, 2017; Kumari *et al.*, 2023; Phulpoto *et al.*, 2023).

Além das suas conhecidas propriedades antimicrobianas, a surfactina também exibe uma notável atividade antioxidante. Estudos recentes indicam que lipopeptídeos como a surfactina são capazes de neutralizar radicais livres, protegendo as células contra o estresse oxidativo. Esse efeito antioxidante pode ser atribuído à sua estrutura química cíclica e à capacidade de interagir com espécies reativas de oxigênio (Zhao *et al.*, 2021).

3.5.1 Atividade Antioxidante

Essa atividade é essencial para neutralizar radicais livres e prevenir danos celulares, o que amplia o potencial de aplicação desses compostos em áreas como cosméticos, farmacologia e alimentos. O Quadro 1 mostra a atividade antioxidante de lipopeptídeos.

Quadro 1 - Atividade antioxidante de lipopeptídeos

Biossurfactante	Microrganismo produtor	Concentração	Método	Capacidade de inibição	Autor
Lipopeptídeos I4	<i>Bacillus mojavensis</i>	1 mg/mL	DPPH	69,25%	Ghazala <i>et al.</i> , 2022
Lipopeptídeos I4	<i>Bacillus mojavensis</i>	10 mg/mL	Atividade quelante de Fe ²⁺	76,21%	Ghazala <i>et al.</i> , 2022
Epiclicina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SJ100001	4 mg/mL	DPPH	94,99%	Ren <i>et al.</i> , 2022
Epiclicina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SJ100001	4 mg/mL	Poder de redução total (TRP)	50%	Ren <i>et al.</i> , 2022
Lipopeptídeo surfactante (LBS)	<i>Acinetobacter junii</i> B6	10 mg/mL	DPPH	100%	Ohadi <i>et al.</i> , 2017
Lipopeptídeos DCS1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	1 mg/mL	DPPH	80,6%	Jemil, <i>et al.</i> , 2017
Lipopeptídeos DCS1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	4 mg/mL	Atividade quelante de Fe ²⁺	79,8%	Jemil, <i>et al.</i> , 2017
Lipopeptídeos DCS1	<i>Bacillus methylotrophicus</i> DCS1	10 mg/mL	Ensaio de branqueamento de β-caroteno	72%	Jemil, <i>et al.</i> , 2017
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> 309	1 mg/mL	DPPH	11.67 ± 0.8 μM/g	Ciurko <i>et al.</i> , 2022
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> 309	1 mg/mL	ABTS	3.77 ± 0.22 μM/g	Ciurko <i>et al.</i> , 2022
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> 309	1 mg/mL	FRAP	0.76 ± 0.096 μM/g	Ciurko <i>et al.</i> , 2022
BS-VS16	<i>B. licheniformis</i> VS16	5 mg/mL	DPPH	73,5%	Giri <i>et al.</i> , 2019
BS-VSG4	<i>B. subtilis</i> VSG4	5 mg/mL	DPPH	69,1%	Giri <i>et al.</i> , 2019
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> SOPC5	2,5 mg/mL	DPPH	75,51%	Dai <i>et al.</i> , 2024
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> SOPC5	2,5 mg/mL	ABTS	85,50%	Dai <i>et al.</i> , 2024

Fonte: Autor, 2024.

A atividade antioxidante da surfactina, um dos lipopeptídeos mais estudados, já foi descrita em alguns trabalhos. A surfactina de *Bacillus amyloliquefaciens* apresentou atividade antioxidante e inibição da peroxidação lipídica, demonstrando eficácia semelhante a antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (Abdollahi *et al.*, 2020). Em um outro trabalho, a surfactina em uma concentração de 500 mg/L, demonstrou uma inibição máxima de DPPH de 22,88%. Além disso, os efeitos de eliminação de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH.), foram de 6%, 21% e 3%, respectivamente com a dose de surfactina em uma concentração de 250 mg/L (Dussert *et al.*, 2022).

A surfactina também aumentou a sobrevivência celular de fibroblastos embrionários após a exposição ao peróxido de hidrogênio (Lu *et al.*, 2016), intensificou a inibição da deterioração oxidativa dos lipídios da membrana (Zouari *et al.*, 2016) e aumentou o poder redutor do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) conforme sua concentração aumentava (Yalçın *et al.*, 2010). O efeito inibitório da surfactina sobre a peroxidação lipídica pode ser explicado pela presença de aminoácidos hidrofóbicos no anel peptídico e na cadeia acil, que melhoram sua solubilidade em meios hidrofóbicos (Wang *et al.*, 2020).

A atividade antioxidante dos lipopeptídeos de *Bacillus mojavensis* I4 foi avaliada utilizando diversos métodos. No ensaio DPPH, a eliminação de radicais livres de apresentou 69,25% a uma concentração de 1 mg/mL, com um IC50 de 0,36 mg/mL, indicando que possuem resíduos capazes de doar elétrons e neutralizar radicais livres. Em relação à atividade quelante de ferro (Fe^{2+}), os lipopeptídeos I4 atingiram 76,21% a 10 mg/mL. O IC50 para esse ensaio foi de 0,4 mg/mL, sugerindo que as diferenças estruturais entre os lipopeptídeos de *Bacillus* influenciam na atividade quelante. (Ghazala *et al.*, 2022).

A epiclicina, isolada de *Bacillus amyloliquefaciens* SJ100001, demonstrou uma atividade antioxidante significativa. No ensaio de DPPH, a epiclicina apresentou uma atividade dependente da dose, aumentando de 26,67% para 94,99% conforme a concentração variou de 0,125 mg/ml a 4,0 mg/ml, resultados comparáveis ao controle positivo (vitamina C, 1 mg/ml). Além disso, a epiclicina também demonstrou um poder redutor de ferro significativo, que aumentou com a concentração, alcançando metade da capacidade redutora do controle positivo a 4,0 mg/ml, indicando que a epiclicina possui um bom potencial antioxidante (Ren *et al.*, 2022).

O biossurfactante LBS apresentou uma atividade de eliminação de radicais livres DPPH dependente da dose, com a porcentagem de eliminação aumentando de 52% para 100% conforme a concentração variou de 0,05 a 10 mg/ml. Seu IC50 foi de 0,7 mg/ml, eficiente quando comparado ao controle positivo BHA, que apresentou IC50 de 1 mg/ml. Além disso, o LBS também exibiu um poder antioxidante redutor de ferro, atingindo uma capacidade redutora de 0,4 (OD700) a 10 mg/ml. (Ohadi *et al.*, 2017).

O ensaio de DPPH demonstrou que os lipopeptídeos DCS1 possuem atividade antioxidante eficaz e dependente da dose, com eliminação de 80,6% a 1 mg/mL e um IC50 de 357 µg/mL, sendo menos ativos que o BHA. O poder antioxidante redutor de ferro aumentou com a concentração, atingindo 3.0 (OD700) a 2 mg/mL. A atividade quelante de íons ferrosos alcançou 79,8% a 4 mg/mL. Além disso, o DCS1 inibiu a descoloração do β-caroteno, com um IC50 de 42 µg/mL, mostrando maior eficácia que outros lipopeptídeos (Jemil *et al.*, 2017).

A surfactina, produzida por *B. amyloliquefaciens* NS6, demonstrou poder antioxidante notável, apresentando capacidade de redução férrica (FRAP) e eliminação de radicais DPPH, comparável ao antioxidante BHA. Apesar de ser inferior ao ácido ascórbico, a surfactina foi duas vezes mais eficiente que os ramnolipídeos testados. No entanto, resultados divergentes foram observados em outros estudos, como o *B. subtilis* #309, que apresentou atividade antioxidante mínima nos ensaios FRAP, DPPH e ABTS. Essas diferenças são atribuídas à estrutura molecular da surfactina, com variações em aminoácidos como glutamato, aspartato, valina e leucina influenciando sua atividade antioxidante (Cieurko *et al.*, 2022).

Biossurfactantes derivados de *Bacillus* foram testados para atividade antioxidante, especificamente na eliminação de radicais DPPH e hidroxila, em concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL. A atividade mostrou-se dependente da concentração. O biossurfactante BS-VSG4, a 5,0 mg/mL, exibiu 69,1% de eliminação de radicais DPPH e 62,3% de eliminação de radicais hidroxila. Já o biossurfactante BS-VS16, na mesma concentração, apresentou uma maior capacidade antioxidante, com 73,5% e 68,9% de eliminação de radicais DPPH e hidroxila, respectivamente (Giri *et al.*, 2019).

A surfactina exibiu atividade antioxidante significativa, com eliminação de radicais DPPH variando de 15,66% a 75,51% e IC50 de 0,957 mg/mL, sendo menos

eficaz que a glutathiona, seu controle positivo. No ensaio de ABTS^{•+}, a surfactina eliminou até 85,50% dos radicais, com IC50 de 0,559 mg/mL. A fermentação de soja por *B.subtilis* também aumentou a capacidade antioxidante, possivelmente devido à produção de surfactina (Dai *et al.*, 2024).

Em conclusão, os estudos sobre a atividade antioxidante dos lipopeptídeos produzidos pelo gênero *Bacillus*, incluindo a surfactina, epiclicina e lipopeptídeos como I4 e DCS1, destacam o potencial promissor desses compostos como agentes antioxidantes eficazes. A surfactina, em particular, demonstrou uma capacidade significativa de eliminar radicais livres e inibir a peroxidação lipídica, apresentando resultados comparáveis a antioxidantes sintéticos. Os lipopeptídeos I4 e DCS1 também mostraram propriedades antioxidantes notáveis, com eficácia dependente da concentração, indicando que sua estrutura molecular pode influenciar diretamente a atividade antioxidante. Além disso, a fermentação de substratos como soja por *B. subtilis* não apenas aumenta a produção de surfactina, mas também potencializa as propriedades antioxidantes do extrato fermentado. Esses achados sublinham a importância dos lipopeptídeos derivados de *Bacillus* na busca por alternativas naturais e eficazes para combater o estresse oxidativo, com aplicações potenciais em diversas áreas, incluindo a indústria de alimentos e farmacêutica.

3.5.2 Filmes

A utilização de filmes biodegradáveis à base de biopolímeros como amido e gelatina tem ganhado destaque na área biomédica, especialmente para aplicação tópica, graças à sua capacidade de atuar como barreiras protetoras com propriedades bioativas. Dentre essas propriedades, a atividade antioxidante dos filmes tem se mostrado particularmente relevante para o tratamento de lesões cutâneas, onde o estresse oxidativo contribui para processos inflamatórios crônicos e retardo na cicatrização. A oxidação de lipídios celulares, causada pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), pode ser mitigada por sistemas poliméricos que liberam compostos antioxidantes, favorecendo a regeneração tecidual e a homeostase redox local (Ghani *et al.*, 2024; Yang *et al.*, 2024).

Tanto o amido quanto a gelatina oferecem uma matriz natural ideal para a incorporação de antioxidantes, dada sua biocompatibilidade e fácil modificação

química. No entanto, suas limitações em propriedades de barreira e estabilidade podem ser superadas pela adição de biossurfactantes com ação antioxidante, como os lipopeptídeos produzidos por cepas de *Bacillus* (ex.: surfactina, fengicina) e os soforolipídeos produzidos por *Starmarella bombicola*. Estudos demonstraram que esses compostos, além da já conhecida atividade antimicrobiana, apresentam capacidade de inibir a peroxidação lipídica, capturar radicais livres e proteger biomoléculas contra danos oxidativos (Cho *et al.*, 2022; Filipe *et al.*, 2022). A surfactina, por exemplo, demonstrou ação protetora significativa em modelos de membranas lipídicas oxidativas, enquanto soforolipídeos exibiram elevada capacidade antioxidante em ensaios com DPPH e ABTS (Colodro *et al.*, 2023; Ghani *et al.*, 2024).

Além disso, a associação desses biossurfactantes com biopolímeros gera filmes mais homogêneos e estáveis, favorecendo a liberação sustentada de compostos antioxidantes. Estudos como o de Hipólito *et al.* (2021) demonstraram que filmes de amido com soforolipídeos apresentaram não apenas propriedades mecânicas adequadas, mas também significativa atividade antioxidante, com redução de até 50% na oxidação de lipídios em ensaios acelerados. Similarmente, lipopeptídeos de *Bacillus subtilis* incorporados em filmes de gelatina aumentaram a capacidade antioxidante total (TAC) dos filmes em até 40%, conforme determinado por ensaios FRAP e ORAC (Colodro *et al.*, 2023).

Portanto, a incorporação de lipopeptídeos e soforolipídeos em filmes de amido e gelatina constitui uma estratégia promissora para o desenvolvimento de sistemas antioxidantes tópicos, com potencial de aplicação em curativos bioativos, sistemas de liberação controlada e recobrimentos dermatológicos sustentáveis. O avanço na caracterização desses sistemas aponta para uma nova geração de biomateriais com dupla funcionalidade: barreira física e atividade antioxidante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Bacillus sp. UELAsF1.483 (Cadastro Sisgen nº A5D7C66) foi previamente isolado a partir de estudo da microbiota de bulbos de alhos pós-colheita fresco, coletados na região metropolitana de Londrina-PR (Batistela, 2022). A linhagem foi cedida pela Prof^a. Dr^a. Daniele Sartori do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, UEL. A cepa foi criopreservada a -80 °C em glicerol.

4.2 PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR *Bacillus* sp. UELAsF1.483

4.2.1 Preparo Do Pré-Inóculo

Para preparar o cultivo do pré-inóculo, 50 µL de estoque da cepa criopreservada a -20 °C foi transferida para 5 mL de meio DYG'S contendo (g/L): glicose 2; peptona 1,5; extrato de levedura 2; KH₂PO₄ 0,5; MgSO₄ 0,5; e incubadas em shaker orbital a 150 rpm, 18 h a 37 °C (Morales-Borrell *et al.*, 2020).

4.2.2 Preparo Do Inóculo

Para preparo do inóculo, 750 µL do cultivo do pré-inóculo foram transferidos para frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio composto por (g/L): glicose 100; extrato de levedura 2; KH₂PO₄ 2; MgSO₄ (7H₂O) 0,5. Os frascos foram incubados em shaker orbital a 150 rpm, 24 h, a 37 °C. A concentração de células foi determinada por turbidimetria a λ= 600 nm, devendo atingir uma absorvância entre 0,600-0,800 (valor correspondente a fase logarítmica da curva de crescimento celular) (Morales-Borrell *et al.*, 2020).

4.2.3 Processo Fermentativo

O inóculo foi padronizado em 2% , a fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL de meio de fermentação composto de (g/L): glicose 20; ácido glutâmico 5; KH_2PO_4 1; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ 1; KCl 0,5; e solução mineral 1 mL ($\text{MnSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ 0,5 g/L; $\text{CuSO}_4 (5\text{H}_2\text{O})$ 0,16 g/L; $\text{FeSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ 0,015 g/L), incubados a 37°C em agitador rotativo (150 rpm) em diferentes tempos (24, 48, 72 e 96 horas). O cultivo foi interrompido através da centrifugação em 9.000rpm, 4°C e 15min, e o produto foi dividido em extrato bruto (sobrenadante livre de células do produto de fermentação) e o pellet (células bacterianas que passaram pelo processo de fermentação), o extrato bruto e o pellet foram utilizados para as análises subsequentes (Morales-Borrell *et al.*, 2020).

4.3 CONSUMO DE SUBSTRATO E DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

A quantificação do consumo de substrato foi realizada por meio do método de Somogyi-Nelson (Somogyi, 1937; Nelson, 1944), utilizando alíquotas de 5 mL do meio fermentado, previamente retiradas de frascos Erlenmeyer contendo meio fermentado após 24, 48, 72 e 96 horas, daqueles destinados à avaliação da biomassa, a fim de evitar interferências nos dados experimentais. Para a análise, as amostras foram submetidas a diluições de 10x, 20x e 40x, garantindo que os valores obtidos no espectrofotômetro permanecessem dentro da faixa de leitura ideal, a qual variou entre 0,3 e 0,8 de absorbância. O cálculo do consumo de glicose foi expresso em termos percentuais, considerando como 100% a concentração de glicose inicial no meio de cultivo. A partir dessa referência, foram determinadas as porcentagens remanescentes e, por subtração, a fração consumida em cada ponto de coleta, os valores foram expressos em porcentagem de consumo de glicose. Para a avaliação do crescimento celular, as amostras também foram coletadas de Erlenmeyers específicos, centrifugadas para obtenção do pellet celular, o qual foi ressuspenso em volume equivalente a do meio de fermentação inserido previamente em solução salina isotônica a 0,9% e posteriormente analisado em espectrofotômetro a 600 nm, as amostras também foram submetidas a diluições de 10x, garantindo que os valores obtidos no espectrofotômetro permanecessem dentro da faixa de leitura ideal, a qual

variou entre 0,3 e 0,8 de absorvância. Todas as análises foram conduzidas em triplicata, assegurando a reprodutibilidade dos resultados

4.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOSURFACTANTES DO EXTRATO BRUTO

4.4.1 Índice De Emulsificação

A análise de índice de emulsificação do extrato bruto foi realizada conforme descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Cerca de 2 mL do extrato bruto foram adicionados em 2 mL de querosene seguido de agitação em vórtex por 5 min. Em seguida, os tubos de ensaio foram deixados em repouso por 24 h e a altura da camada de emulsão foi medida. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O índice de emulsificação foi calculado como altura da emulsão dividida pela altura total do líquido multiplicado por 100 (Equação 1).

$$E (\%) = \frac{[\textit{altura da camada emulsionada (cm)}]}{\textit{altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

4.4.2 Ensaio De Espalhamento De Óleo

O extrato bruto livre de células foi submetido ao ensaio de espalhamento de óleo acordo com o método de Morikawa; Hirata; Imanaka, (2000), para detecção de atividade biosurfactante. Para isso, 200 µL de amostra de óleo lubrificante de óleo de motor usado foram adicionados em 20 mL de água destilada em uma placa de Petri. Em seguida, 100 µL do extrato bruto livre de células foram adicionados diretamente ao centro da placa (sobre o óleo) para determinar o efeito de espalhamento do óleo. As zonas de deslocamento de óleo foram observadas após 30 segundos e os diâmetros foram medidos usando um paquímetro.

4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS LIPOPEPTÍDEOS

O extrato bruto foi acidificado com HCl (6 M) até o pH 2, e incubado a 4°C, por 120 horas. O precipitado formado foi coletado por centrifugação (10.000 rpm, por 20 min, a 4°C). A extração lipopeptídica foi realizada duas vezes usando a mistura de acetato de clorofórmio e metanol (3:1, v/v). A fase orgânica foi coletada e o solvente evaporado em evaporador rotativo. A quantificação foi realizada por gravimetria. A amostra foi liofilizada e então armazenada a -20°C (Paiva *et al.*, 2024). O lipopeptídeo obtido foi denominado LP.F1483 e foi usado para análises de caracterização química, avaliação de tensão superficial, ensaios de citotoxicidade e atividade antioxidante.

4.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LIPOPEPTÍDEO

4.6.1 Identificação Do Lipopeptídeo Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FT-IR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O lipopeptídeo LP.F1483 liofilizado foi analisado por Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FT-IR) em aparelho Shimadzu FT-IR 8300, na faixa de espectro de 4000 a 400 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1} , utilizado o método de leitura da amostra em pastilha de brometo de potássio KBr (Akpa *et al.*, 2001). Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR e as análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Universidade Estadual de Londrina. Os resultados foram comparados com um padrão de surfactina de *Bacillus subtilis* com 98% de pureza foi usado (Sigma-Aldrich).

O lipopeptídeo LP.F1483 foi também avaliado por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência CLAE (Shimadzu), a amostra foi solubilizada em metanol 100%, e filtrada com Millex® 0,22 μm (MERCK Millipore). usando uma coluna C18 (Hiber, 250×4.6 mm, 5 μm) à 214 nm com monitor UV. A temperatura da coluna foi mantida em 25°C, com fase móvel composta por acetonitrila/água/TFA (80:20:0.01 [v/v/v]), em grau CLAE (Barale *et al.*, 2022). A taxa de fluxo utilizada foi 1mL/min e o volume de injeção de 50 μl . Os valores obtidos foram comparados com os dados da literatura.

4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CULTURA CELULAR

A citotoxicidade do LP.F1483 foi avaliada em células VERO (rim de macaco-verde africano (*Chlorocebus sabaeus*)) pelo método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células foram cultivadas em microplacas de 96 poços, a 37 °C, 5% CO₂, por 24h, até a formação da monocamada celular (correspondendo aproximadamente a 5 x 10⁴ células/poço inicialmente). As concentrações de lipopeptídeos foram utilizadas com base nos valores encontrados na literatura de valores de atividade antioxidante e concentração micelar crítica (31 a 500 µg/mL) foram adicionadas e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 72h. Foi adicionando 10 µl do MTT, incubado por 2h a 37 °C, 5% CO₂, e adição do diluente do MTT (90 µl), agitação por 15 minutos. O controle consistiu em células incubadas apenas com o meio DMEM. As análises foram realizadas em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro em λ= 570 nm. A porcentagem de Viabilidade Celular (% VC) foi calculada segundo a equação 2:

$$VC (\%) = \frac{(Média\ ABS\ Teste\ 570\ nm)}{(Média\ ABS\ Controle\ 570\ nm)} \times 100 \quad (Eq.2)$$

A citotoxicidade de 50% (CC₅₀), concentração do LP.F1483 que diminuiu a viabilidade de 50% das células, e analisada por regressão linear (Hochheim *et al.*, 2019).

4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.8.1 Determinação Da Atividade Doadora De Átomos De Hidrogênio Ao Radical 2,2Difenil-1-Picril-Hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito por Srikanth e colaboradores (2015). A atividade antioxidante foi testada com o extrato bruto obtido nos tempos de fermentação em 24, 48, 72 e 96 horas, e o extrato obtido da amostra controle (sem microrganismo) foi usada como controle. Além disso, a atividade antioxidante do LP.F1483 (diluído em água) foi

avaliada em diferentes concentrações (4 - 0,0625 mg/mL). O DPPH foi solubilizado em etanol a uma concentração de 0,004 g/L. A mistura reacional foi composta de 1 mL da solução de amostra e 0,3 mL da solução de DPPH. O controle consistiu em 1 mL da amostra + 0,3 mL de etanol. As amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz. Após, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm. A taxa de inibição (%) do radical livre foi calculada conforme a equação 3:

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{ABS do controle} - \text{ABS da amostra})}{\text{ABS do controle}} \times 100 \text{ (Eq.3)}$$

4.8.2 Avaliação Da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

A medida do TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*) foi determinada pela medida da intensidade de quimioluminescência do luminol induzida na presença de radicais peroxila formados pela decomposição térmica de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP). A mistura de reação (1 mL) foi constituída por ABAP (200 mM), luminol (215 µM) e Trolox (0,025 mM), com a adição da amostra contendo lipopeptídeo em diferentes concentrações (8 mg/mL- 0,5 mg/mL). Trolox (ácido 6hidroxi-2,5,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um análogo hidrossolúvel de α-tocoferol, foi utilizado como substância antioxidante de referência na concentração de 0,025 mM. Os tempos de incubação foram 15 minutos para ABAP (tempo necessário para a formação dos radicais livres), e 40 minutos para Trolox e o lipopeptídeo, até o decaimento da curva para as amostras. O Tempo de Indução (Tind) foi calculado alinhando os valores da amostra nos eixos x e y no zero, traçando uma linha paralela no gráfico e anotando o valor de x correspondente. O TRAP foi calculado conforme a equação 4 (Repetto *et al.*, 1996). O teste foi realizado no Laboratório de Fisiologia dos Radicais Livres, do Departamento de Patologia, CCB- UEL.

$$\text{Atividade Antioxidante } (\mu\text{M de Trolox}) = \frac{\text{Tind da amostra}}{\text{Tind de } 1 \mu\text{M de Trolox}} \text{ (Eq.4)}$$

4.9 PRODUÇÃO DE FILMES

Para a produção dos filmes foram utilizados dois tipos de polímeros distintos, o amido e a gelatina. Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting*, que envolve a preparação de uma solução filmogênica, que cuidadosamente é aplicada sobre um suporte para desidratação, e quando o solvente é evaporado leva à formação de um filme fino e uniforme sobre a superfície do suporte (Wilking, 2011).

Neste trabalho, soluções filmogênicas (5% m/m) foram preparadas pela mistura de amido e gelatina, na proporção 1:1 (g/g), diferentes concentrações de LP.F1483 (2,5 mg %100 g polímero, 5 mg % 100 g polímero e 25 mg% 100 g polímero (Tabela 1), empregando-se um plastificante, o glicerol, na concentração de 1 g/100 g polímero. Cerca de 30 g de solução filmogênica foram adicionadas à placas de acrílico com 60 mm de diâmetro, que foram submetidas a secagem em estufa a 25 °C por 24 h. Após a secagem, os filmes foram retirados das placas e condicionados sob umidade relativa de 58% em estufa incubadora.

Tabela 1 – Formulações empregadas para o preparo de 100 g de solução filmogênica.

Formulação	Zea Mays (Corn) Starch (g)	Gelatin (g)	Glycerin(g)	LP.F1483 (mg)	Aqua (g)
FC	2,5	2,5	1	-	94
F1	2,5	2,5	1	2,5	93,99
F2	2,5	2,5	1	5	93,99
F3	2,5	2,5	1	25	93,97

4.10 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.10.1 Espessura dos Filmes Formados

A espessura dos filmes de biopolímeros à base de amido e gelatina foi determinada utilizando um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. As amostras, previamente condicionadas em dessecador por 48 horas, foram medidas em cinco pontos distintos (centro e extremidades). A espessura final foi calculada como a média

aritmética dessas medições, acompanhada do desvio padrão para avaliar a uniformidade da espessura dos filmes.

4.10.2 Solubilidade

Para o teste de solubilidade, as amostras (2 x 2 cm) foram secas em estufa com circulação e renovação de ar a 60 °C por 24 h e foram pesadas o seu peso inicial em base seca. Em seguida, foram submersas em erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, fechados com folha de alumínio e agitados lentamente por 24 h a 25 °C em incubadora orbital. Após o período de imersão, as amostras foram retiradas dos erlenmeyers e secas novamente em estufa com circulação e renovação de ar a 60 °C por mais 24 h para a determinação do peso final do material que não foi solubilizado (Gontard, Guilbert, 1992).

4.10.3 Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FT-IR)

Primeiramente, as amostras foram secas em estufa a 40 °C por 12 h, e em seguida, foram pulverizadas e mantidas em dessecador contendo CaCl₂ por 7 dias. Após o período de 7 dias, foi adicionado brometo de potássio (KBr) e foram submetidas à alta pressão para a formação de pastilhas. Foi utilizado o espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu IR Prestige – 21 (Japão) do Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da UEL.

4.10.4 Avaliação Da Atividade Antioxidante Por DPPH

A avaliação da atividade antioxidante dos filmes foi utilizada a mesma metodologia descrita por Srikanth e colaboradores (2015). A atividade antioxidante foi avaliada com os filmes nas concentrações de 2,5%, 5% e 25% de LP.F1483. Os filmes inteiros foram previamente diluídos em 5 mL de água destilada a 60°C, e novamente diluídos a uma proporção de 1 filme solubilizado para 4 de água destilada a 60°C. As condições do preparo do DPPH e das análises foram mantidas as mesmas que na análise do extrato bruto e do lipopeptídeo liofilizado.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

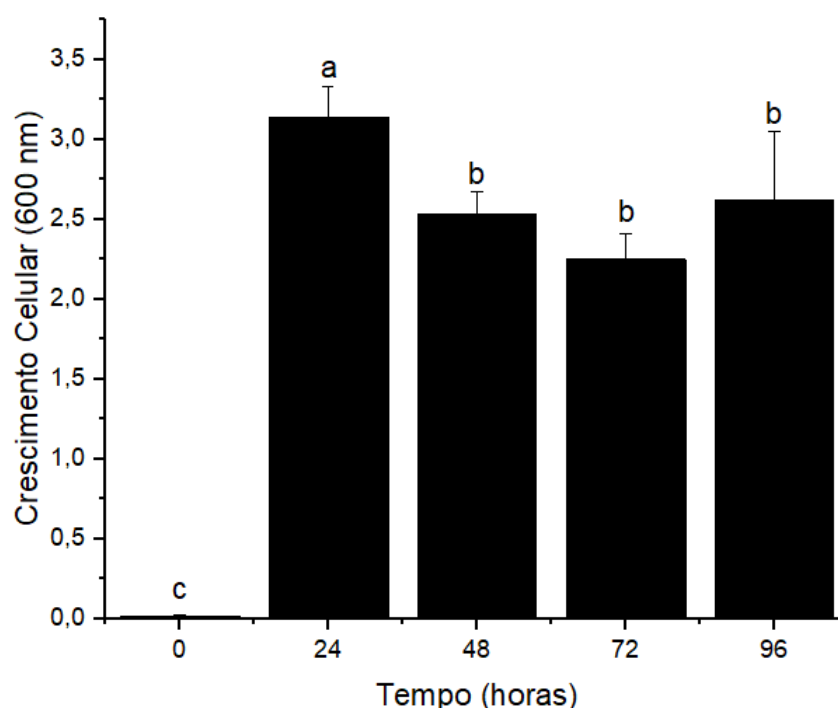
Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e foram analisados utilizando análise de variância de um fator (ANOVA). O teste post hoc de Tukey foi utilizado para determinar as diferenças entre os valores médios dos diferentes tratamentos ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R Studio (R Core Team, 2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar a produção de lipopeptídeos por fermentação submersa, utilizando a linhagem *Bacillus* sp. UELAsF1.483, em diferentes tempos de fermentação. A Figura 2 mostra o resultado do crescimento celular, o consumo de substrato (glicose) e o pH final do meio de cultivo de *Bacillus* sp. UELAsF1.483, ao longo de um período de 96 horas.

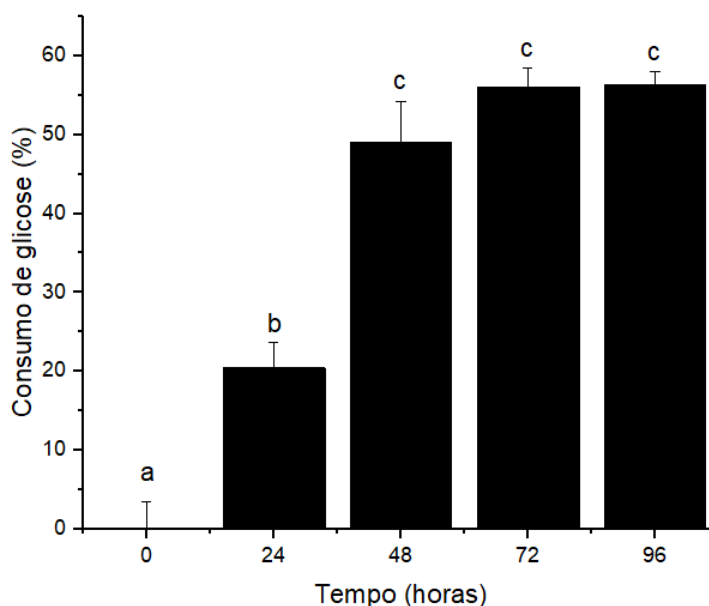
Figura 2- Dinâmica de Crescimento Celular do cultivo de *Bacillus* sp. UELAsF1.483



O crescimento celular foi monitorado em absorbância de 600 nm, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante separado e os pellets foram diluídos em água destilada em uma proporção de 1:10. A leitura em espectrofotômetro foi mantida entre 0,3-0,8 para conservar a integridade do resultado e técnica. Entre o tempo 0 e 24 horas, observou-se um aumento acentuado no crescimento celular, atingindo um pico em torno de 24 horas (valor estatístico (“a”), com valores de absorbância próximo de 3,0. Após esse ponto, a densidade celular decaiu, sem alterações significativas até

as 96 horas (valor estatístico “b”), o que sugere que a fase de crescimento exponencial foi seguida por uma fase estacionária, que é a fase em que há a produção do lipopeptídeo estudado neste trabalho. Os resultados obtidos são condizentes com os dados obtidos em literatura, que discutem que a fase estacionária pode variar dependendo da cepa de *Bacillus*. Sarwar *et al.*, (2018) relataram que diferentes cepas de *Bacillus* apresentavam curvas de crescimento quase idênticas, atingindo a fase estacionária em aproximadamente 24 horas. Suas densidades ópticas finais também foram semelhantes, com valores de densidade ótica de 0,7 (620nm) em ambos os meios LB (Luria Bertani) e Landy.

Figura 3- Consumo de Substrato do cultivo de *Bacillus* sp. UELAsF1.483

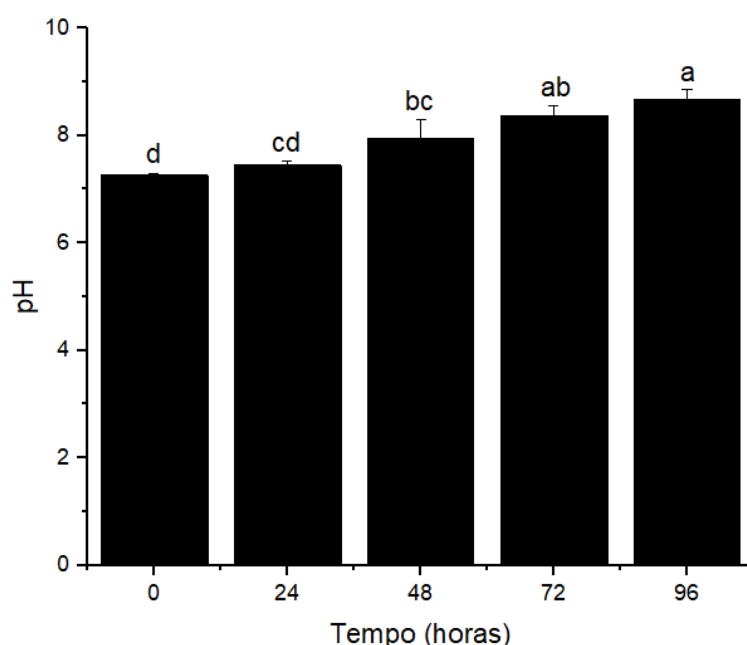


Neste presente estudo, a concentração de substrato residual foi quantificada utilizando o método de Somogyi-Nelson, que mede açúcares redutores, como a glicose, no caso. O teste foi realizado usando o sobrenadante citado no experimento anterior. Nas primeiras 24 horas de cultivo, observou-se um aumento no consumo de glicose, sugerindo que a linhagem utilizou rapidamente o substrato disponível durante a fase de crescimento exponencial. A partir de 24 horas, o consumo de glicose estacionou em suas análises estáticas (“c”), coincidindo com os resultados

observados no experimento de dinâmica do crescimento celular, onde a fase estacionária iniciou após as 24 horas.

Dos Santos *et al.* (2019), mostraram que cepas de *Bacillus* sp. foram capazes de consumir glicose ao longo do tempo das 48 horas analisadas, indicando seu uso como fonte de carbono para o crescimento celular e a produção de enzimas extracelulares. Em um outro trabalho, observou-se que após 40 horas de cultivo, a glicose foi totalmente consumida, coincidindo com a produção máxima de biossurfactante (Fernandes *et al.*, 2007).

Figura 4- Variação de pH do cultivo de *Bacillus* sp. UELAsF1.483



Em nossos experimentos, o pH inicial e final do meio de cultura foi avaliado. O pH inicial do meio de cultivo foi corrigido em 7.0 com o auxílio de um pHmetro, apresentando valor estatístico de “d”. Durante a fermentação, observou-se que o pH teve um leve aumento durante as primeiras 24 e 48 horas, porém sem grandes alterações estatísticas significativas. Após esse período, houve uma leve tendência de aumento do pH ao longo do tempo, estabilizando em torno de 8,6 nas últimas medições (72 a 96 horas).

Esse aumento no pH pode estar relacionado à produção de metabólitos básicos ou à diminuição do substrato disponível, alterando o balanço ácido-básico do meio. Estudos analisaram o impacto do pH na produção de surfactina por *Bacillus subtilis*,

em diferentes meios. Nos experimentos realizados com *Bacillus subtilis* DSM10, a produção de surfactina foi maior quando não havia controle de pH, deixando o valor de pH alterar durante o processo fermentativo, alcançando 5 g/L, superando a produção com o pH mantido em 7 (Czinkóczy; Németh, 2020). Em culturas de *Bacillus subtilis* MZ-7, o pH se manteve estável em 7 até as primeiras 24 horas, e subiu até 8 após as 48 horas (Al-Ajlani *et al.*, 2007).

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho indicam um padrão típico de crescimento bacteriano em um meio com quantidades limitadas de substrato, onde o crescimento inicial e a rápida diminuição do substrato sugerem uma fase de metabolismo ativo entre as primeiras 24 a 48 horas. A transição para uma fase estacionária parece ser impulsionada pelo esgotamento de nutrientes. O leve aumento do pH ao longo do tempo pode sugerir mudanças no metabolismo celular, como a produção de compostos alcalinos à medida que os recursos energéticos diminuem. Essas análises podem ser utilizadas como preliminares para uma otimização das condições de cultivo visando melhorar parâmetros do processo fermentativo.

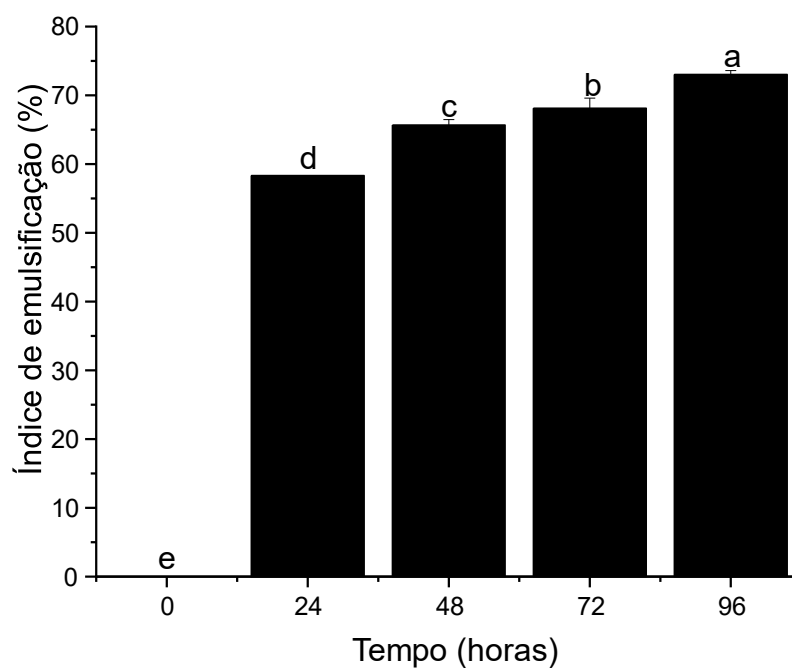
5.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES EMULSIFICANTES E TENSOATIVAS DO EXTRATO BRUTO

5.2.1 Determinação Do Índice De Emulsificação

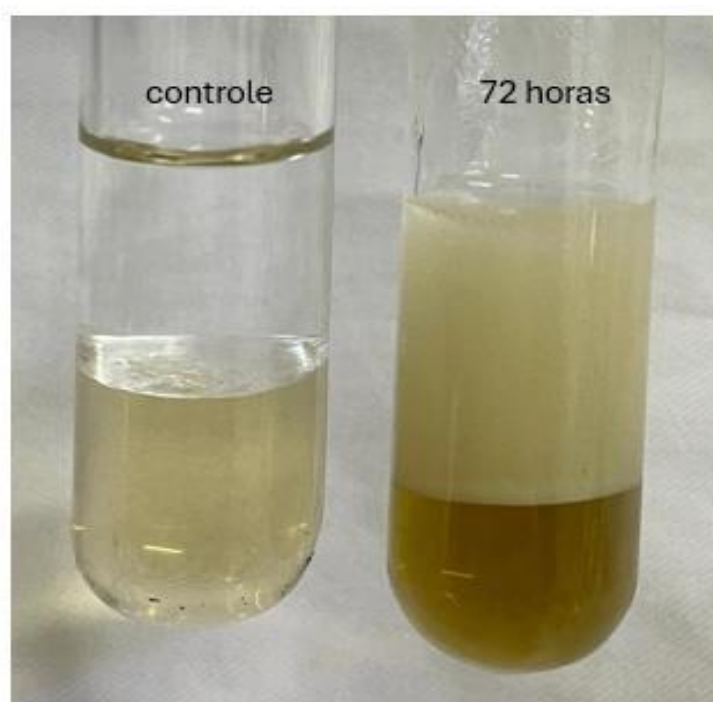
A figura 5A mostra o índice de emulsificação (%) do sobrenadante em diferentes tempos de fermentação. Os resultados mostram um aumento rápido nas primeiras 24 horas, alcançando aproximadamente 60% de emulsificação. Após esse período, o índice continuou crescendo de maneira mais lenta, mantendo-se em torno de 75 % até o final do experimento. A análise estatística mostrou que todos os valores de índices de emulsificação são estatisticamente diferentes entre si, reforçando o aumento da atividade emulsificante do biosurfactante em relação ao tempo. A emulsão formada no tempo de 72 horas, está mostrada na Figura 5B. De acordo com a literatura, um bom agente emulsificante é capaz de manter uma emulsão estável com valores de índice de emulsificação acima de 50%, após 24 horas (Felix *et al.*, 2019).

Figura 5 - Índice de emulsificação de biossurfactantes de *Bacillus* sp. UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação (A). Emulsão formada no tempo de 72 horas de fermentação (B).

A



B



No estudo de Akintayo *et al.* (2022), foram avaliadas 29 cepas produtoras de biossurfactante, sendo elas pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus* isolados de alimentos. Os pesquisadores fizeram análises dos índices de emulsificação usando a mesma metodologia do nosso trabalho, sendo os resultados obtidos os seguintes, os valores de emulsificação (E24%) variando de 9% a 68%. Já no estudo de Wu *et al.* (2022) avaliou a atividade emulsificante do surfactante produzido da cepa *B. subtilis* SL, o biossurfactante apresentou atividade emulsificante apreciável com óleo bruto, querosene, octano e cetano no experimento, cujo índice de emulsificação (EI24) é de 56%, 67%, 54% e 60%, respectivamente.

Os agentes emulsificantes são essenciais nas indústrias de cosméticos e alimentos, desempenhando um papel crucial na estabilização de misturas de óleo e água, melhoria de texturas e aumento da funcionalidade dos produtos. Nos cosméticos, eles evitam a separação em formulações como cremes e sérums, garantindo texturas consistentes e a entrega eficaz de ingredientes ativos, como vitaminas e hidratantes, na pele. Além disso, contribuem para a satisfação do usuário ao criar texturas suaves e atrativas, enquanto permitem formulações inovadoras adaptadas a diferentes preferências (Calvo *et al.*, 2020).

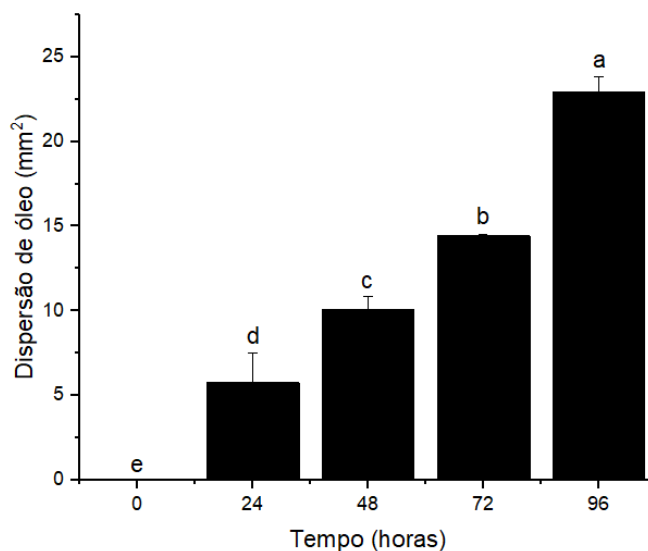
Na indústria alimentícia, os emulsificantes melhoram a textura dos produtos, distribuem sabores de forma uniforme e prolongam a vida útil, estabilizando emulsões em produtos como molhos e maioneses. Eles também previnem a separação, reduzem a aderência em produtos assados e facilitam a absorção de nutrientes lipossolúveis, contribuindo para benefícios nutricionais. Esses agentes continuam sendo fundamentais para melhorar a qualidade dos produtos e atender às demandas do mercado em constante evolução (Babirye, 2024).

5.2.2 Capacidade De Dispersão De Óleo De Biossurfactantes De *Bacillus* sp. UELAsF1.483 Produzidos Em Diferentes Tempos de Fermentação

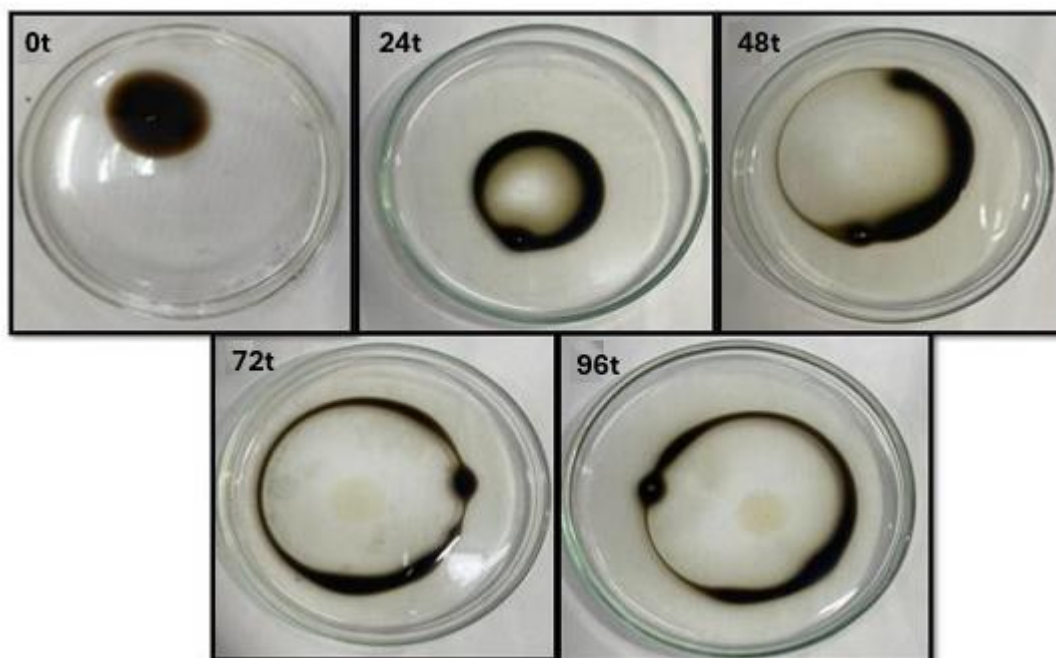
A dispersão de óleo apresentou um aumento progressivo ao longo das 96 horas. Sendo um crescimento exponencial até as 48 horas e um crescimento da dispersão de óleo menor as 96 horas, porém todos as gotas de dispersão foram estatisticamente distintas entre si (Fig. 6). Esses resultados indicam que o *Bacillus* sp. está produzindo biossurfactantes, que facilitam a dispersão do óleo na superfície do meio.

Figura 6- Ensaio de espalhamento de óleo de biossurfactantes produzidos UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação (A). Ensaio de espalhamento de óleo (B), nos tempos 0, 24 ,48, 72, 96 horas.

A



B



Os resultados são representados como médias de triplicatas \pm desvio padrão, sendo indicado as diferenças significativas em ANOVA seguida pelo teste de Tukey, p valor $< 0,05$. Grupos que compartilham a mesma letra (a, b, c, d, e) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, enquanto grupos com letras diferentes são significativamente distintos.

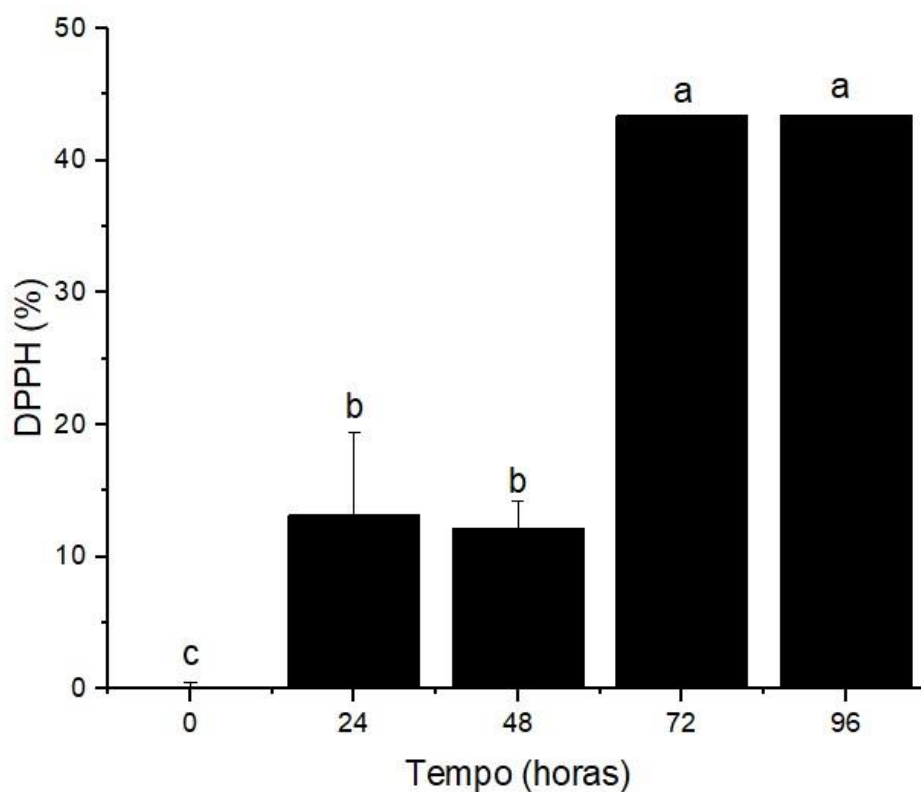
A análise estatística indicou que todos os grupos são significativamente diferentes entre si, com um aumento significativo ao passar de cada 24 horas.

Estudos prévios corroboram esses achados, diferentes concentrações de surfactina (bruta e purificada), ramnolipídio e SDS (Dodecil sulfato de sódio) foram testadas quanto à sua eficácia na dispersão de óleo. Os resultados mostram que a surfactina purificada proporcionou a maior dispersão de óleo, seguida pela surfactina bruta, ramnolipídio e, por último, o surfactante sintético SDS. Em todas as amostras, a dispersão aumentou proporcionalmente à concentração do surfactante, atingindo a maior área de dispersão com 600 mg/L: SDS (5,2 cm²), ramnolipídio (20,04 cm²), surfactina bruta (34,9 cm²) e purificada (41,2 cm²). A partir de 75 mg/L, a surfactina purificada alcançou sua concentração micelar crítica (CMC), após a qual aumentos de concentração não ampliam a dispersão. A surfactina, mesmo em forma bruta, mostrou-se mais eficaz que o SDS e o ramnolipídio, confirmando seu potencial como um dos biossurfactantes mais potentes (Degang *et al.*, 2023).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO

A atividade antioxidante foi avaliada no sobrenadante coletado nos diferentes tempos de fermentação, pelo método DPPH (Figura 7). O controle negativo utilizado foi o próprio meio de fermentação para evitar que metabólitos interferentes alterassem os resultados reais da atividade antioxidante, o valor obtido da leitura em espectrofotometria deste controle foram reduzidos dos valores das análises. As amostras foram submetidas por centrifugação previamente ao teste para sedimentar e separar possíveis impurezas interferentes. Os resultados mostraram presença de atividade antioxidante nas primeiras 24 horas, em níveis baixos (~10%) com um aumento significativo, atingindo aproximadamente 40% em 72 horas. A partir desse ponto, observou-se estabilização até o final do experimento. A análise estatística mostrou que as atividades antioxidantes dos tempos 72 e 96 horas (43%) são idênticos, assim como a atividade antioxidante de 24 e 48 horas, tiveram resultados estatisticamente idênticos entre si. Esse comportamento sugere que a produção de compostos antioxidantes ocorre principalmente na fase estacionária do crescimento bacteriano, mas pode decair com o tempo ou ser consumida pela própria cultura.

Figura 7- Atividade antioxidante de biossurfactantes de *Bacillus sp.* UELAsF1.483 produzidos em diferentes tempos de fermentação



Os resultados são representados como médias de triplicatas \pm desvio padrão, sendo indicado as diferenças significativas em ANOVA seguida pelo teste de Tukey, p valor $< 0,05$. Grupos que compartilham a mesma letra (a, b,c) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, enquanto grupos com letras diferentes são significativamente distintos.

5.4 EXTRAÇÃO DOS BIOSURFACTANTES

Com base nos resultados obtidos, o tempo de 72 horas foi selecionado para a extração dos biossurfactantes, pois apresentou os melhores índices de atividade antioxidante, que é o foco deste trabalho. Em 72 horas, o índice de emulsificação atingiu a valor de 68,11% ($\pm 1,48$), enquanto a dispersão de óleo alcançou a média de 32,44 mm² ($\pm 0,04$), ambos indicando alta eficiência do biossurfactante. Além disso, a atividade antioxidante já em extrato bruto apresentou o valor significativo de 43,39% reforçando o potencial multifuncional do produto.

A produção foi realizada em meio contendo glicose e ácido glutâmico como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Em comparação com outros estudos, os biossurfactantes de *Bacillus sp.* UELAsF1.483 apresentam produção semelhante com 0,45 g/L. Estudos realizados com diferentes cepas de *Bacillus* evidenciaram variações na produção de lipopeptídeos, como a surfactina. Pesquisas utilizando *Bacillus subtilis* MTCC 2423 como produtor de surfactina reportaram produção de cerca de 0,7 g/L com óleo de soja residual (WFSO) e 0,45 g/L com óleo de arroz residual (WFRBO) após 120 horas de cultivo bacteriano (Cieurko *et al.*, 2022). Em outro estudo, a surfactina produzida pela cepa de *B. subtilis* CMT-6 atingiu um pico de 1,702 g/L na maior concentração de biomassa avaliada (Deng *et al.*, 2022).

O uso de glicose e ácido glutâmico na produção de biossurfactantes tem recebido atenção em diversos estudos, que destacam sua eficácia como fontes essenciais de carbono e nitrogênio, respectivamente. A glicose é amplamente reconhecida como uma fonte de carbono eficiente devido à sua alta assimilação pelos microrganismos e rápida conversão em intermediários-chave pela glicólise. Por exemplo, ela gera glicose-6-fosfato (G6P), precursor de componentes hidrofílicos de biossurfactantes, e acetil-CoA, essencial para as frações hidrofóbicas. Estudos demonstram que a glicose frequentemente supera outras fontes de carbono, como glicerol e amido, na produção de biossurfactantes. Um exemplo notável é o *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7815, que alcançou um índice de emulsificação de 76,77% e baixa tensão superficial de 34,53 mN/m utilizando glicose como fonte de carbono (Nurfarahin; Mohamed; Phang, 2018).

O ácido glutâmico, por sua vez, é uma fonte de nitrogênio fundamental, pois participa da síntese de aminoácidos e proteínas cruciais para o crescimento e metabolismo microbiano. Sua presença estimula o aumento do rendimento de biossurfactantes ao promover maior crescimento e atividade celular. Por exemplo, em coproduções envolvendo *Bacillus velezensis*, o licor de maceração de milho, rico em aminoácidos como o ácido glutâmico, aumentou significativamente a produção simultânea de γ -PGA e surfactina (Correia *et al.*, 2024).

Esses resultados reforçam que a glicose e o ácido glutâmico desempenham papéis complementares na produção de biossurfactantes, oferecendo uma base eficiente para otimizar processos biotecnológicos.

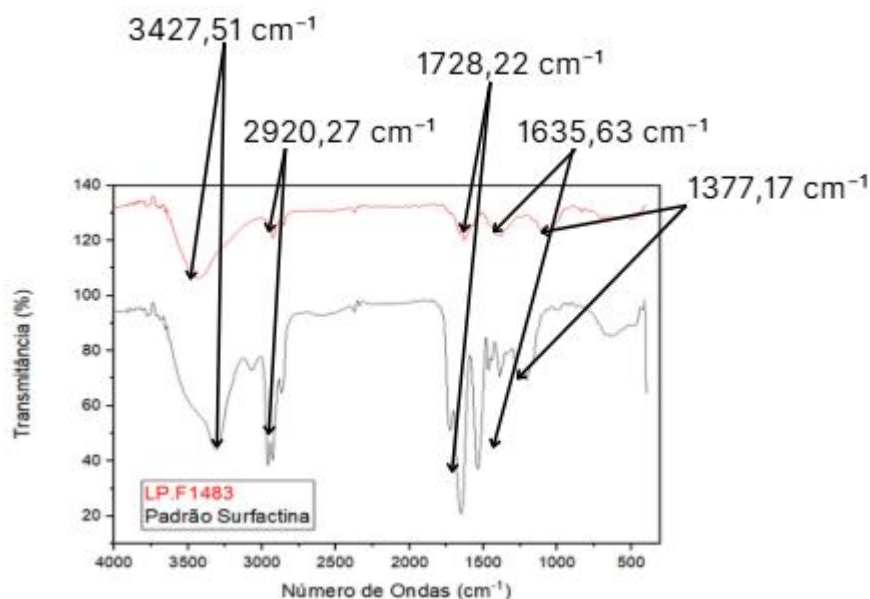
Após cada processo de extração, o biossurfactante foi seco e liofilizado. A pesagem das amostras e o cálculo de produção foram realizados após a liofilização. A produção do biossurfactante denominado LP.F1483 foi de $0,45 \pm 0,15$ g/L, e seu total produzido foi de 212 mg, produzido em 5 fermentações. Em um estudo recente, o *Bacillus subtilis* YPS-32 foi cultivado sob condições de fermentação otimizadas usando glicose (20 g/L) e ácido glutâmico (5 g/L). A produção de surfactina atingiu um máximo de 2,39 g/L após 42,8 horas de fermentação em um fermentador de 5 L. Esta produção foi significativamente maior em comparação com resultados anteriores obtidos usando meio Landy padrão, destacando a eficácia da otimização de fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biossurfactantes (Zhou *et al.*, 2023).

Outra investigação se concentrou no *Bacillus velezensis*, cultivado em meio contendo 10 g/L de glicose e 5 g/L de ácido glutâmico como únicas fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. As cepas examinadas produziram surfactina dentro da faixa de 2 a 5 mg/L, com a maior produção observada em quase 7 mg/L para uma cepa específica. Isso demonstra que, embora os rendimentos possam ser menores em comparação a outros estudos, a combinação desses substratos ainda é eficaz para produzir surfactina em certas cepas de *Bacillus* (Bartal *et al.*, 2023).

No geral, o uso de glicose e ácido glutâmico como substratos para a produção de surfactina não apenas apoia o crescimento microbiano, mas também otimiza a biossíntese desse composto valioso. As variações na produção entre diferentes estudos ressaltam a importância da seleção de cepas e das condições de fermentação para maximizar a produção de biossurfactantes a partir desses substratos.

5.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LIPOPEPTÍDEO LP.F1483

Figura 8- Espectros de FT-IR da amostra LP.F1483 e do padrão de surfactina, mostrando as bandas de absorção características entre 4000 e 500 cm^{-1} .

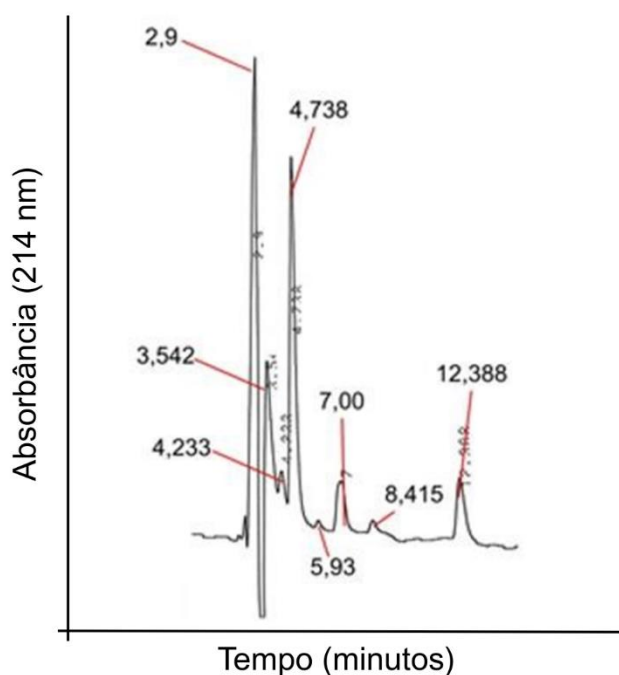


Os resultados da análise de FT-IR estão mostrados na Figura 8. A amostra LP.F1483 revelou picos de transmitância em: 1058,56, 1377,17, 1635,63, 1728,22, 2920,27 e 3427,51 cm^{-1} .

Em comparação com o padrão de surfactina, observaram-se picos de transmitância em: 1203,52, 1533,41, 1654,92, 1724,36, 2958,80 e 3315,63 cm^{-1} . De acordo com Janek *et al.* (2021), bandas entre 3300 e 3400 representam uma região característica de peptídeos, sendo marcada pelo estiramento da ligação N-H. Desta forma, o pico em 3427,51 cm^{-1} representa a presença de um grupo amina na amostra LP.F1483. O pico em 2920,27 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento C-H, enquanto o pico em 1728,22 cm^{-1} representa as vibrações de estiramento C=O. Já os picos em 1635,63 cm^{-1} e 1377,17 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento C=O e C-N da ligação amida, respectivamente. Portanto, com base na análise FT-IR, picos característicos de lipopeptídeos foram identificados na amostra LP.F1483,

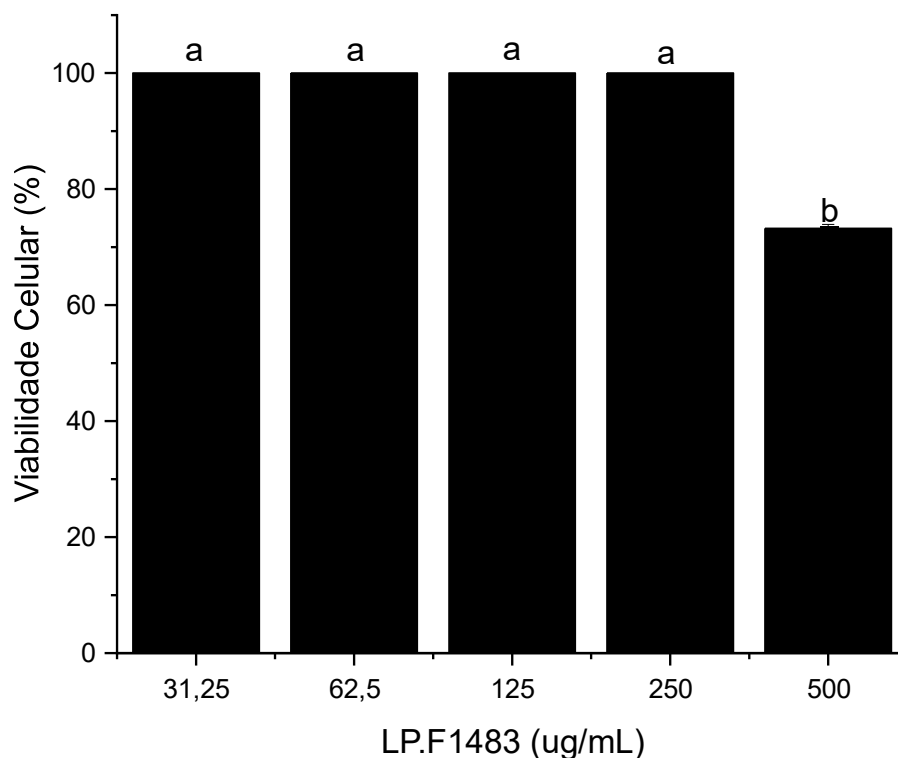
sugerindo que o biossurfactante produzido por *Bacillus sp.* UELAsF1.483 pertence à classe de lipopeptídeos.

Figura 9- Cromatograma de CLAE da amostra LP.F1483



As análises por CLAE da amostra LP.F1483 está mostrada na Figura 9. Os resultados mostraram picos de tempo de retenção da amostra em: 2.9, 3.542, 4.233, 4.738, 5.93, 7, 8.415 e 12.388 minutos. De acordo com Barale *et al.* (2022), uma isoforma de surfactina de *Bacillus velezensis* SK, apresentou picos de tempo de retenção nos tempos de 2.91, 4.02, 5.47, e 6.8 minutos, que foram similares aos encontrados neste presente trabalho. Por outro lado, tempos de retenção nos tempos de 8.415 e 12.388 minutos podem ser impurezas da amostra. Portanto, com base na análise CLAE, tempos de retenção característicos de lipopeptídeos da classe das surfactinas foram identificados na amostra LP.F1483, sugerindo que a linhagem *Bacillus sp.* UELAsF1.483 foi capaz de produzir um biossurfactante da classe de lipopeptídeos.

5.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR

Figura 10 - Análise de viabilidade celular de LP.F1483 em células VERO

Os resultados são representados como médias de triplicatas \pm desvio padrão, sendo indicado as diferenças significativas em ANOVA seguida pelo teste de Tukey, p valor $< 0,05$. Grupos que compartilham a mesma letra (a, b) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, enquanto grupos com letras diferentes são significativamente distintos.

Os resultados da análise de viabilidade celular nas diferentes concentrações de LP.F1483 (500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$) está mostrado na figura 10. Os resultados mostraram que nas concentrações de 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, observou-se viabilidades semelhantes, todas próximas de 100%, sem diferença estatística entre si. No entanto, a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ mostrou uma queda significativa na viabilidade celular, com uma média de 73,23% ($p < 0,001$) quando comparada a todas as outras concentrações. Esses resultados indicam que a viabilidade celular é significativamente afetada em 500 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as concentrações mais inferiores não impactam a viabilidade de maneira expressiva, mantendo-a em 100%.

Na literatura é possível observar artigos onde surfactina produzida por *Bacillus* demonstrou um efeito inibitório significativo no crescimento de células de câncer de cólon humano (LoVo), com uma redução de até 80% na viabilidade celular em doses elevadas (80 μ M por 24-48 horas).

Uma das principais vantagens dos biossurfactantes é seu perfil de baixa toxicidade, o que os torna adequados para uso em ambientes sensíveis onde a saúde humana e a segurança ecológica são primordiais. Derivados de fontes biológicas renováveis, os biossurfactantes exibem biodegradabilidade, garantindo que se decomponham em subprodutos inofensivos após o uso, minimizando assim o impacto ambiental. Uma vez que muitos surfactantes convencionais podem persistir no ambiente, levando à bioacumulação e toxicidade em ecossistemas aquáticos (Bjerk *et al.*, 2021; Kumari, Singha, Shukla, 2023).

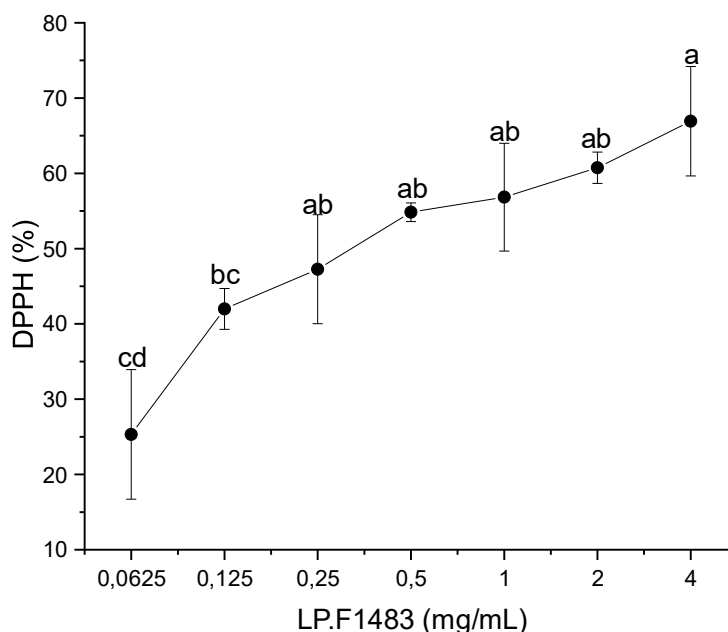
No contexto da biorremediação, os biossurfactantes aumentam a biodisponibilidade de poluentes hidrofóbicos como hidrocarbonetos, facilitando sua degradação por microrganismos. Sua natureza não tóxica permite a aplicação segura em locais contaminados sem prejudicar comunidades microbianas benéficas essenciais para uma remediação eficaz. Isso contrasta fortemente com surfactantes químicos, que podem inibir a atividade microbiana ou introduzir substâncias tóxicas adicionais no ambiente (Nikolova, Gutierrez, 2021; Parthipan *et al.*, 2022). Além disso, o uso de biossurfactantes não tóxicos é particularmente crítico nas indústrias alimentícia e cosmética, onde a segurança do produto é uma prioridade máxima. Nesses setores, os biossurfactantes podem funcionar como emulsificantes ou estabilizadores sem comprometer a integridade do produto ou a segurança do consumidor (Barbosa *et al.*, 2022).

No geral, a natureza não tóxica dos biossurfactantes aumenta seu apelo em várias aplicações em biotecnologia. Ao promover a sustentabilidade e a segurança, esses compostos representam um avanço significativo em relação aos surfactantes tradicionais, alinhando-se com a crescente demanda do consumidor por produtos ecologicamente corretos e conscientes da saúde. A ênfase na baixa toxicidade não apenas apoia a conformidade regulatória, mas também promove a confiança pública em inovações biotecnológicas que utilizam essas moléculas versáteis.

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.7.1 Análise Da Atividade Doadora De Átomos De Hidrogênio Ao Radical 2,2-Difenil1-Picril-Hidrazil (DPPH)

Figura 11- Atividade antioxidante de LP.F1483 avaliada pelo ensaio de DPPH.



Os resultados são representados como médias de triplicatas \pm desvio padrão, sendo indicado as diferenças significativas em ANOVA seguida pelo teste de Tukey, p valor $< 0,05$. Grupos que compartilham a mesma letra (a, b, c, d) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, enquanto grupos com letras diferentes são significativamente distintos.

A figura 11 apresenta a atividade antioxidante de LP.F1483, medida pelo ensaio de DPPH, que avalia a capacidade dos compostos em neutralizar radicais livres. A porcentagem de inibição do DPPH é exibida no eixo vertical, enquanto a concentração da amostra varia de 0 a 4 mg/mL no eixo horizontal. Observa-se que, com o aumento da concentração de LP.F1483, a porcentagem de inibição cresceu até a maior concentração de 4 mg/mL.

A atividade antioxidante de LP.F1483 apresentou diferenças significativas entre as concentrações, conforme a análise estatística de Tukey. As concentrações de 4 mg/mL a 0,25 mg/mL não diferiram estatisticamente (grupo "a" e "ab"), indicando que

a capacidade antioxidante é estatisticamente indistinta da maior concentração (66% de inibição de DPPH) a 0,25 mg/mL (44%).

Já em concentrações mais baixas (0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL), a capacidade antioxidante diminui significativamente, sendo classificadas nos grupos "bc" e "cd", respectivamente. A menor concentração (0,0625 mg/mL) apresentou a atividade antioxidante mais baixa, com 25,32%, diferindo estatisticamente de todas as demais concentrações.

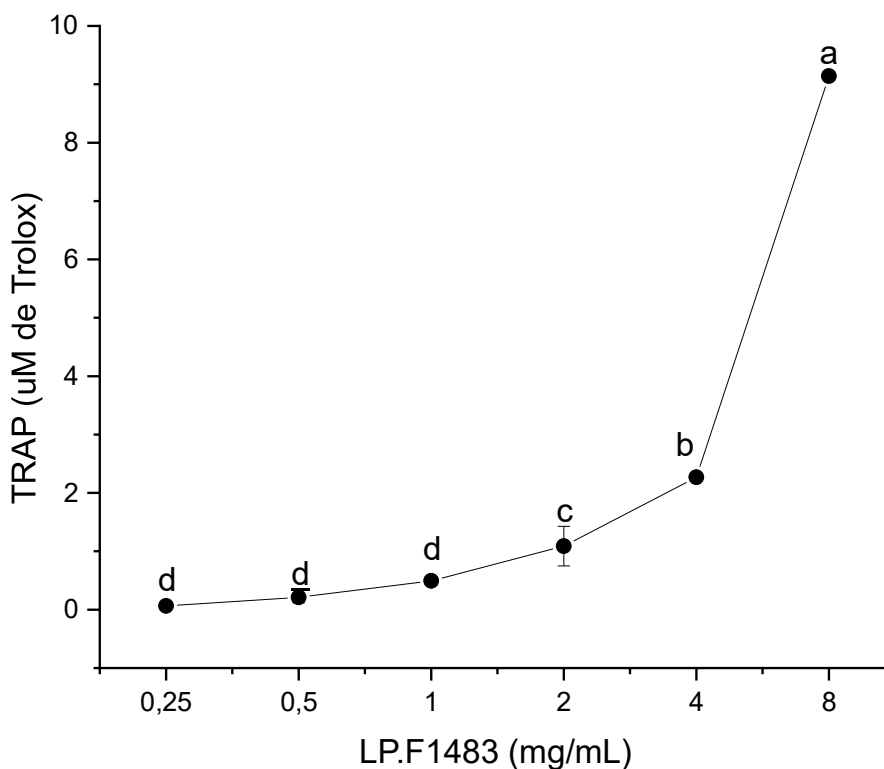
Esses resultados confirmam que a capacidade antioxidante da LP.F1483 e representa uma atividade positiva, já que em concentrações menores do lipopeptídeo ainda há uma atividade antioxidante considerável em relação a maior concentração testada.

Comparativamente, estudos com biossurfactantes de *Bacillus* em concentrações de 0,5 a 5,0 mg/mL indicaram atividade antioxidante dependente da concentração. O biossurfactante BS-VSG4 mostrou 69,1% de eliminação de radicais DPPH a 5,0 mg/mL, enquanto o BS-VS16, na mesma concentração, exibiu uma capacidade antioxidante superior, com 73,5% de eliminação (Giri *et al.*, 2019). Em outro estudo, a surfactina demonstrou atividade antioxidante variando de 15,66% a 75,51% e um IC50 (concentração inibitória média) de 0,957 mg/mL, embora com menor eficácia que a glutaciona, controle positivo (Dai *et al.*, 2024).

O principal mecanismo antioxidante da surfactina é a doação de hidrogênios para os radicais livres, estabilizando-os e convertendo-os em uma forma reduzida, o DPPH. Essa propriedade é atribuída à estrutura anfipática da molécula, que facilita sua interação com os radicais livres e interrompe reações oxidativas em cadeia. Desta forma, sugere-se que a atividade antioxidante da surfactina pode ser modulada pela presença de resíduos hidrofóbicos e pela capacidade de influenciar diretamente espécies reativas de oxigênio (ROS) em sistemas biológicos (Dussert *et al.*, 2022).

Esses resultados mostram que a amostra LP.F1483 apresenta uma capacidade antioxidante considerável reduzindo o radical DPPH, comparável a outros biossurfactantes relatados na literatura, exibindo uma eficiência expressiva em baixas concentrações e um perfil de saturação de atividade semelhante ao observado em biossurfactantes derivados de *Bacillus*.

5.7.2 Análise Da Capacidade Antioxidante Total (TRAP)

Figura 12- Atividade antioxidante da amostra LP.F1483 avaliada pelo ensaio de TRAP.

Os resultados são representados como médias de triplicatas \pm desvio padrão, sendo indicado as diferenças significativas em ANOVA seguida pelo teste de Tukey, p valor $< 0,05$. Grupos que compartilham a mesma letra (a, b,c,d) não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si, enquanto grupos com letras diferentes são significativamente distintos.

A figura 12 apresenta a capacidade antioxidante total de LP.F1483, avaliada pelo ensaio TRAP, em diferentes concentrações, variando de 0,25 a 8 mg/mL. O eixo vertical mostra a concentração equivalente de Trolox (μM de Trolox), enquanto o eixo horizontal indica a concentração da amostra LP.F1483 (mg/mL).

A análise estatística de Tukey revelou diferenças significativas entre as concentrações testadas. A maior atividade antioxidante foi observada na concentração de 8 mg/mL (9,84 μM de Trolox, grupo "a"). Conforme a concentração diminui, a capacidade antioxidante reduz significativamente, com as concentrações de 4 mg/mL (2,33 μM de Trolox, grupo "b") e 2 mg/mL (1,11 μM de Trolox, grupo "c") formando grupos estatisticamente distintos. Concentrações de 1 mg/mL ou menores

(0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL, grupo "d") apresentaram valores estatisticamente idênticos, próximos a zero.

A tendência observada indica que LP.F1483 exibe uma forte capacidade antioxidante em concentrações elevadas, mas essa capacidade diminui drasticamente em concentrações abaixo de 2 mg/mL, com uma eficácia antioxidante quase inexistente em 0,25 mg/mL. Esse comportamento sugere uma clara dependência da concentração para a atividade antioxidante. Os resultados reforçam que LP.F1483 possui um efeito antioxidante relevante apenas em concentrações altas, destacando sua limitação em aplicações que requerem baixas concentrações.

A capacidade antioxidante observada na amostra LP.F1483 e na surfactina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* NS6 compartilha a característica de depender da concentração e da composição molecular. Os resultados obtidos com LP.F1483 revelam uma atividade antioxidante significativa em concentrações mais elevadas (até 8 mg/mL), mas com uma rápida perda de eficácia em concentrações menores, indicando uma forte dependência da concentração para sua atividade antioxidante. Esse padrão também é observado em estudos sobre a surfactina, onde sua capacidade antioxidante varia conforme o ensaio (FRAP, DPPH) e é influenciada por sua estrutura molecular, especialmente pelos aminoácidos presentes (Cieurko *et al.*, 2022).

As variações na atividade antioxidante da surfactina entre diferentes cepas, como *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*, reforçam o papel crítico da composição molecular na eficácia antioxidante. De maneira semelhante, a diminuição da capacidade antioxidante da LP.F1483 em concentrações menores pode estar relacionada a limitações estruturais ou à disponibilidade de compostos ativos em diluições mais baixas (Cieurko *et al.*, 2022). Assim, tanto a amostra LP.F1483 quanto a surfactina destacam a importância da concentração e da composição molecular na determinação da eficácia antioxidante.

5.8 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

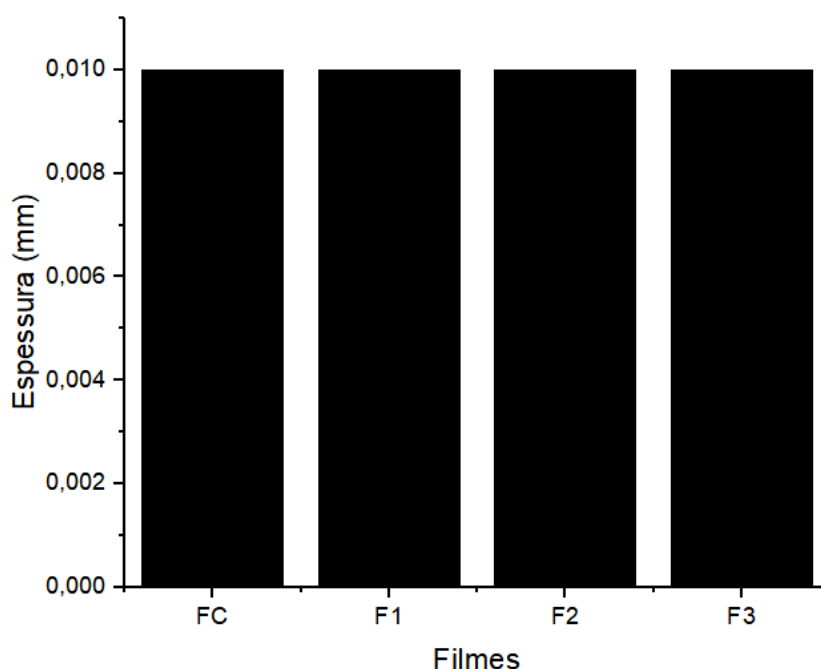
A caracterização dos filmes biodegradáveis é essencial para avaliar suas propriedades físico-químicas, estruturais e funcionais, garantindo sua aplicabilidade em diferentes setores, como alimentos, cosméticos e embalagens sustentáveis. A

adição de compostos bioativos, como biossurfactantes, pode modificar significativamente parâmetros como espessura, solubilidade, estrutura molecular e atividade antioxidante dos filmes. Assim, a análise detalhada dessas características permite entender os efeitos dos aditivos sobre a matriz polimérica e sua funcionalidade. Neste estudo, foram realizados ensaios de espessura, solubilidade em água, espectroscopia FT-IR e atividade antioxidante por DPPH para investigar o impacto da incorporação do extrato LP.F1483 em filmes formulados com amido e gelatina.

5.8.1 Espessura dos Filmes Formados

A espessura é um parâmetro fundamental para caracterizar filmes biodegradáveis, pois influencia diretamente suas propriedades mecânicas, barreira e a eficiência de liberação de compostos ativos (Figura 13).

Figura 13- Espessura dos filmes à base de amido e gelatina incorporados com o LP.F1483.

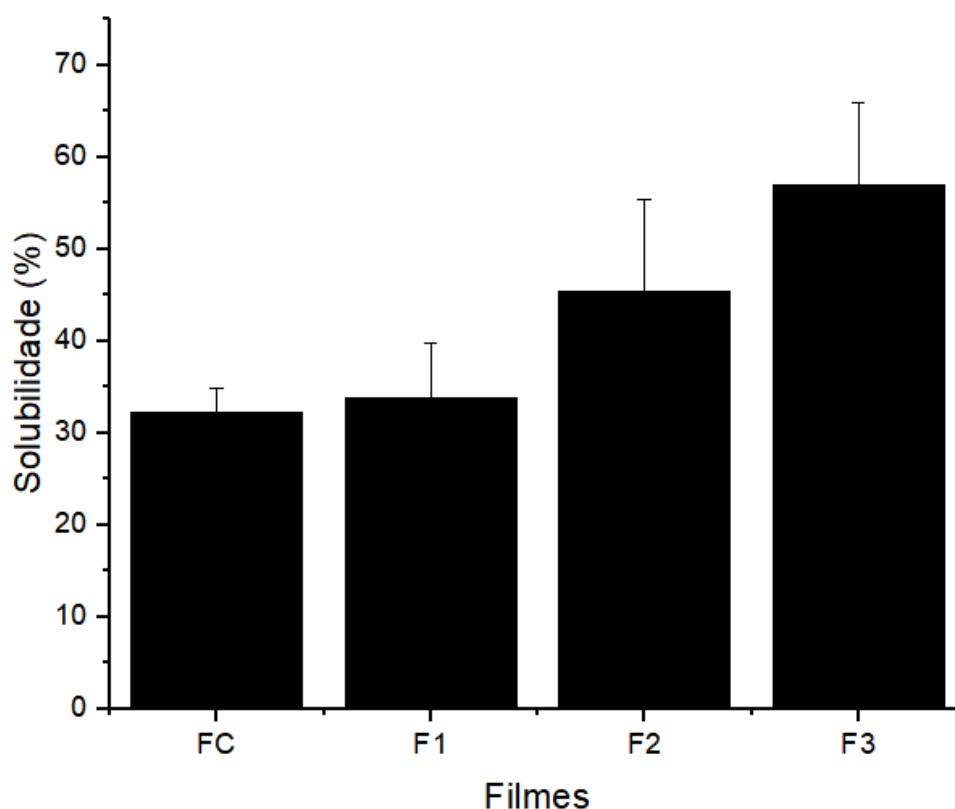


FC: Filme Controle; F1: Filme F1.483 2,5 mg% ; F2: Filme F1.483 5 mg%; F3: Filme F1.483 25 mg%.

Os resultados mostram que todos os filmes, incluindo o controle e os formulados com 2,5 mg (F1), 5 mg (F2) e 25 mg (F3) apresentaram a mesma espessura média de 0,01 mm, sem variação entre as medições (desvio padrão igual a zero). Esse padrão indica uniformidade na espessura dos filmes e alta reprodutibilidade do processo de fabricação, além de demonstrar que a adição dos diferentes teores de aditivo não influenciou a espessura final dos filmes.

5.8.2 Solubilidade

Figura 14- Solubilidade dos filmes à base de amido e gelatina incorporados com lipopeptídeo F1.483.



FC: Filme Controle; F1: Filme F1.483 2,5 mg% ; F2: Filme F1.483 5 mg%; F3: Filme F1.483 25 mg%.

Os resultados de solubilidade dos filmes contendo diferentes concentrações do aditivo LP.F1483 mostram claramente um aumento dependente da concentração na solubilidade em água. O filme controle apresentou cerca de 32,27% de solubilidade,

enquanto o filme com a maior concentração do aditivo (25 mg%) atingiu 56,97%. Essa tendência sugere que o aditivo desestabiliza a estrutura da matriz polimérica, aumentando a afinidade do filme com a água e, conseqüentemente, sua solubilidade.

Esse comportamento é confirmado por estudos com filmes compostos de amido e gelatina, nos quais a solubilidade é influenciada pelas interações entre as cadeias desses dois biopolímeros. Por exemplo, em filmes de amido–gelatina, o aumento da proporção de amido tende a reduzir a solubilidade devido às fortes ligações de hidrogênio intermoleculares, que conferem maior coesão à matriz e limitam a difusão de água (Bich Nguyet; Nguyen, 2020). Em contraste, a adição de gelatina — rica em aminoácidos hidrofílicos — tende a aumentar a solubilidade pela sua afinidade natural com a água (Pérez-Marroquin *et al.*, 2022).

Além disso, pesquisas com filmes biodegradáveis à base de amido de taro e gelatina de osso de pato demonstraram que o aumento da concentração de gelatina elevou significativamente a solubilidade em água (chegando a 64,60%). Isso foi atribuído à presença de grupos hidrofílicos como N–H e O–H na gelatina, que favorecem a absorção de água e rompem as forças intermoleculares na matriz do filme (Chochkov *et al.*, 2019).

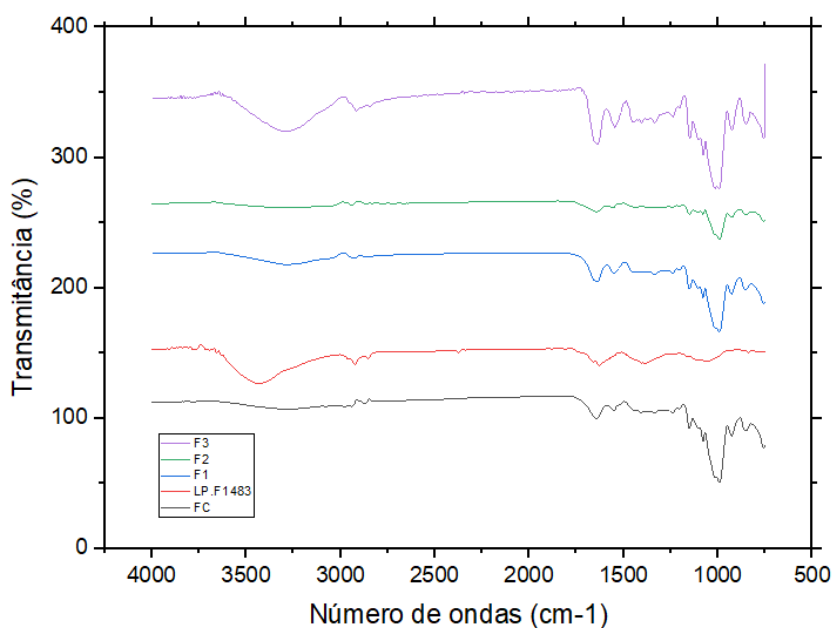
Estudos usando espectroscopia FT-IR por luz síncrotron mostraram que, em misturas de amido e gelatina, a gelatina forma uma fase contínua, com o amido disperso. Plasticizantes como o PEG podem atuar como compatibilizantes, influenciando a estrutura do filme e sua interação com a água (Carbohydrate Polymers, 2013). A compatibilidade parcial entre os componentes e as ligações de hidrogênio formadas reduzem a disponibilidade de grupos hidroxila livres, o que também pode modular a solubilidade.

Em resumo, o aumento da solubilidade observado com maiores concentrações do aditivo F1.483 é compatível com o que mostra a literatura: aditivos ricos em grupos hidrofílicos ou com ação plastificante tendem a desorganizar as interações poliméricas, aumentar a presença de grupos funcionais livres e ampliar a afinidade do filme com a água — elevando assim sua solubilidade.

5.8.3 Espectroscopia No Infravermelho Com Transformada De Fourier (FT-IR)

A FT-IR é uma técnica fundamental para a análise estrutural de materiais, permitindo identificar grupos funcionais e interações químicas presentes nos filmes desenvolvidos. Essa técnica é amplamente utilizada para caracterizar a incorporação de lipopeptídeos microbianos em matrizes poliméricas como amido e gelatina, fornecendo informações sobre as possíveis ligações e mudanças na estrutura molecular dos filmes. A Figura 15 mostra os espectros de FT-IR dos filmes à base de amido e gelatina com e sem a incorporação dos lipopeptídeos microbianos, evidenciando as alterações nas bandas características que indicam interações entre os componentes

Figura 15 – FT-IR dos filmes à base de amido e gelatina incorporados com LP.F1483.



FC: Filme Controle; F1: Filme F1.483 2,5 mg% ; F2: Filme F1.483 5 mg%; F3: Filme F1.483 25 mg%.

A análise dos espectros de FT-IR das amostras F1, F2, F3, do controle positivo (LP.F1483) e do controle negativo (FC) revelou características típicas de filmes biodegradáveis compostos por amido e gelatina. As bandas largas entre 3200 e 3400 cm^{-1} indicam a presença de grupos hidroxila e amida, sugerindo forte interação por ligações de hidrogênio, comuns em polissacarídeos e proteínas. As bandas na faixa

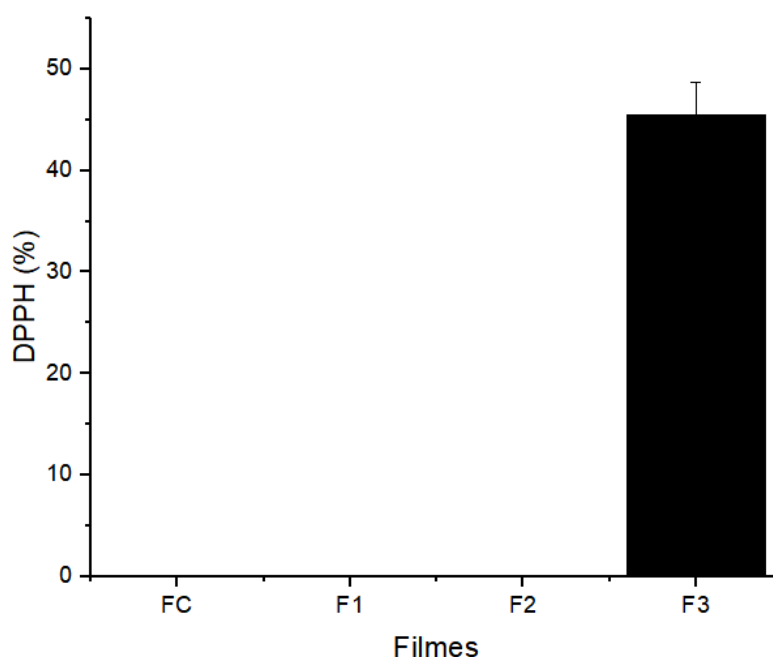
de 3000 a 2900 cm^{-1} estão associadas ao estiramento de ligações C–H de grupos metila e metileno, presentes tanto em biopolímeros quanto em biossurfactantes com cadeias lipídicas.

As bandas amida I e II, entre 1640 e 1500 cm^{-1} , confirmam a presença de componentes proteicos, como a gelatina. A região entre 1170 e 816 cm^{-1} apresenta picos atribuídos a ligações C–O e C–O–C, características da estrutura do amido. Um pico em 1731 cm^{-1} , observado apenas na amostra F3, sugere a presença de grupos ésteres, possivelmente derivados de plastificantes, sem evidência de reações químicas entre os componentes da mistura (Nur Hanani *et al.*, 2013; Osmorskaya *et al.*, 2023)

Esses resultados indicam que os filmes analisados contêm amido e gelatina com boa compatibilidade física, além de possíveis traços de biossurfactantes bacterianos. A interpretação espectral está de acordo com a literatura e confirma a eficácia da técnica de FT-IR na caracterização estrutural de materiais biodegradáveis.

5.8.4 Avaliação Da Atividade Antioxidante dos filmes

Figura 16- Atividade antioxidante dos filmes com LP.F1483 avaliada pelo ensaio de DPPH.



FC: Filme Controle; F1: Filme F1.483 2,5 mg% ; F2: Filme F1.483 5 mg%; F3: Filme F1.483 25 mg%.

Filmes com atividade antioxidante apresentam grande relevância na conservação de alimentos e produtos farmacêuticos, uma vez que contribuem para retardar os processos oxidativos, prolongando a vida útil e preservando a qualidade dos materiais embalados. A atividade antioxidante dos filmes desenvolvidos foi avaliada por meio do ensaio DPPH, método de triagem amplamente utilizado para quantificar a capacidade de captura de radicais livres, demonstrando assim o potencial antioxidante dos compostos incorporados. Os testes de atividade antioxidante utilizando o ensaio DPPH mostraram que apenas o filme com maior concentração do LP.F1483 (F3) apresentou atividade antioxidante significativa (45,53% ± 3,23%). As formulações com concentrações menores (F1 – 2,5 mg% e F2 – 5 mg%) e o controle (FC) não demonstraram efeito antioxidante detectável. Isso evidencia um efeito dose-dependente, ou seja, é necessária uma quantidade mínima de compostos ativos para que os filmes sejam eficazes na neutralização de radicais livres.

Estudos similares na literatura confirmam essa tendência. Filmes com extratos antioxidantes naturais, como bagaço de cervejaria, ácidos fenólicos e antioxidantes sintéticos, também apresentaram atividade significativa apenas em concentrações elevadas. Em diversos trabalhos, apenas formulações acima de determinados limiares (por exemplo, 200 µg/mL ou 5% p/p) mostraram capacidade real de inibir radicais DPPH (Benbettaieb *et al.*, 2018; Kim; Kimmel; Wang, 2023; Vieira *et al.*, 2024).

Portanto, os dados obtidos estão em consonância com o que é amplamente reportado: a eficácia antioxidante de filmes biodegradáveis depende diretamente da quantidade de composto ativo presente. Para aplicações práticas, como embalagens alimentícias com propriedades funcionais, é essencial considerar a concentração mínima necessária para garantir benefícios reais.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo revelaram o significativo potencial biotecnológico da linhagem *Bacillus* sp. UELAsF1.483, capaz de produzir biossurfactantes com propriedades emulsificantes, tensoativas e antioxidantes. A produção de biossurfactantes atingiu 0,45 g/L, e a análise estrutural por FT-IR confirmou a presença de grupos típicos de lipopeptídeos. A caracterização por CLAE corroborou esses achados, identificando tempos de retenção compatíveis com padrões descritos na literatura.

LP.F1483 apresentou potente atividade antioxidante, com 47,26% de inibição de radicais DPPH. Além disso, o lipopeptídeo apresentou atividade antioxidante total equivalente ao Trolox, um antioxidante de referência. Esses resultados destacam o LP.F1483 como um candidato promissor para aplicações industriais, como cosméticos, alimentos e produtos de limpeza, devido às suas propriedades emulsificantes e antioxidantes.

Os filmes formulados com LP.F1483 demonstraram desempenho promissor, especialmente quanto à solubilidade em água e atividade antioxidante. A espessura dos filmes permaneceu constante independentemente da concentração do aditivo, evidenciando uniformidade e reprodutibilidade do processo de fabricação. A solubilidade aumentou proporcionalmente à concentração de LP.F1483, o que indica maior afinidade com a água devido à presença de grupos hidrofílicos. Na análise por FT-IR, foram confirmadas interações físico-químicas entre os componentes do filme, sem formação de novos compostos químicos, e a presença de grupos funcionais compatíveis com amido, gelatina e biossurfactante.

O filme com maior concentração de LP.F1483 apresentou atividade antioxidante significativa (45,53%), reforçando a necessidade de concentrações mínimas do extrato para eficácia funcional. Esses resultados apontam para o potencial do LP.F1483 como aditivo ativo em embalagens biodegradáveis com propriedades funcionais, especialmente antioxidantes, alinhando-se às demandas atuais por materiais sustentáveis e eficientes na conservação de produtos cosméticos e alimentícios. Vale destacar que este é o primeiro relato da atividade antioxidante de lipopeptídeos aplicados a filmes, o que reforça a originalidade e relevância desta abordagem.

ANEXOS

Os resultados parciais obtidos neste trabalho foram usados para depósito de uma patente.

Patente: NOVO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO

POR *Bacillus* sp. UELAsF1.483

Autores: Cristiani Baldo da Rocha, **Giovana Élika Silveira Bertoncini**, Edna Suzana António Jinga Millan, Daniele Sartori, Hyan Gabriel Barbosa da Costa, Antonio Carlos da Silva Vieira, Nubia Natalia Lopes Cardoso, Dâmaris Cristine Landgraf

Protocolada em: 18/07/2024 (processo BR 10 2024 014796 0)

Resumo: Nesta invenção uma linhagem do gênero *Bacillus* (UELAsF1.483) isolada de amostras de alhos foi usada para a produção de um novo biossurfactante denominado LP.F1483. A fermentação foi realizada em meio contendo (g/L): glicose (20), ácido glutâmico (5), fosfato dipotássio (1), cloreto de potássio (0,5), sulfato de magnésio (1), e 1mL de solução mineral composta por (g/L) $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,16) e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,015 g/L). Os frascos foram incubados com 2% de inóculo à 37°C em agitador rotativo (150rpm) por 24, 48 e 72h. A interrupção da fermentação foi realizada por centrifugação à 9000 rpm, 4°C em 15 minutos. O sobrenadante foi usado para determinar o índice de emulsificação e consumo de substrato. A extração do biossurfactante foi realizada por solvente com clorofórmio e metanol (10:1 v/v). A quantificação foi realizada por gravimetria para caracterização química. Os resultados evidenciaram um maior índice de emulsificação no tempo de 48 horas (66,6%), seguido pelo tempo de 72 horas (58,3%). A amostra obtida no tempo de 48 horas foi submetida à análise de FT-IR que mostrou a presença de grupamentos químicos característicos de biossurfactantes da classe dos lipopeptídeos. Esses dados foram confirmados por análise em HPLC.

Contribuições com outros trabalhos do grupo resultaram nas seguintes publicações:

Patente: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Bacillus* sp. UELASF.466

Autores: Cristiani Baldo da Rocha, **Edna Suzana António Jinga Millan**, Giovana Élika Silveira Bertoncini, Daniele Sartori, Hyan Gabriel Barbosa da Costa, Antonio Carlos da Silva Vieira, Nubia Natalia Lopes Cardoso.

Protocolada em: 21/10/2024 (processo BR 10 2024 021773 0)

Título do livro: QUÍMICA E BIOQUÍMICA: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES 3

Título do capítulo: POTENCIAL TERAPÊUTICO DE LIPOPEPTÍDEOS MICROBIANOS CONTRA INFECÇÕES BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES

Autores: Edna Suzana António Jinga, Giovana Elika Silveira Bertoncini, Daniele Sartori, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, Cristiani Baldo da Rocha

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.987242106> ISBN:

978-65-258-2498-7

<https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/quimica-e-bioquimica-fundamentos-eaplicacoes-3>

Publicado em: Atena Editora, 2024.

Título do livro: Ciências da saúde: bem-estar integral e qualidade de vida

Título do capítulo: Estreptoquinase microbiana: avanços e perspectivas no tratamento de doenças cardiovasculares

Autores: Beatriz Peres Sanches, Camila Cristina Valentim, Giulia Mian Assi, Janaina Mantovan, Giovana Elika Silveira Bertoncini, Cristiani Baldo

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.762241405> ISBN:

978-65-258-2576-2

<https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/ciencias-da-saude-bem-estar-integral-equalidade-de-vida>

Publicado em: Atena Editora, 2024.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A.H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305–325, fev. 2008.

ABDELRAOF, M. *et al.* Production and optimization of surfactin produced from locally isolated *Bacillus halotolerans* grown on agro-industrial wastes and its antimicrobial efficiency. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 1, jun. 2024.

ABDOLLAHI, S. *et al.* Evaluation of Anti-oxidant and Anti-biofilm Activities of Biogenic Surfactants Derived from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, n. Online First, 2020.

AKBARI, S. *et al.* Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 81–90, jan. 2018.

AKINTAYO O. *et al.* Exploration of surfactin production by newly isolated *Bacillus* and *Lysinibacillus* strains from food-related sources. **Letters in Applied Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 378–387, ago. 2022.

AKPA, E. *et al.* Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 551–561, 2001.

AL-AJLANI, M. *et al.* Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 17, 2007.

AMANI, H.; HAGHIGHI, M.; KESHTKAR, M. J. Production and Optimization of Microbial Surfactin by *Bacillus subtilis* for Ex Situ Enhanced Oil Recovery. **Petroleum Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 1249–1258, jun. 2013.

ANALYSIS OF THE MOST APPROPRIATE RISK MANAGEMENT OPTION (RMOA)

Analysis of the most appropriate risk management option (RMOA). [s.l: s.n.], 2016.

AYED, H.B. *et al.* Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavensis* A21. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 1023–1030, 2015.

BABIRYE, S. Physicochemical Properties and Functionalities of Food Emulsifiers. **Journal of Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–13, abr. 2024.

BARALE, S. S.; GHANE, S. G.; SONAWANE, K. D. Purification and characterization of antibacterial surfactin isoforms produced by *Bacillus velezensis* SK. **AMB Express**, v. 12, n. 1, jan. 2022.

BARBOSA, F. *et al.* Biosurfactants: Sustainable and Versatile Molecules. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022.

BARNES, P. J. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 965, maio 2022.

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, abr. 2007.

BARTAL, A. *et al.* Identifications of Surfactin-Type Biosurfactants Produced by *Bacillus* Species Isolated from Rhizosphere of Vegetables. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1172–1172, jan. 2023.

BATISTELA, T.E.R. Incidência e identificação de fungos e bactérias de *Alium sativum* fresco e armazenado, **Dissertação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina**, 2022.

BENBETTAIEB, N. *et al.* Antioxidant Activity and Release Kinetics of Caffeic and *p*-Coumaric Acids from Hydrocolloid-Based Active Films for Healthy Packaged Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 26, p. 6906–6916, 31 maio 2018.

BERGFELD, W. *et al.* **Safety Assessment of BHA as Used in Cosmetics The Expert Panel for Cosmetic Ingredient Safety members are: Chair.** [s.l: s.n.], 2023.

Biosurfactants Market worth \$2.3 billion by 2028. Disponível em: <<https://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biosurfactant.asp>>. Acesso em: 17 dez. 2024.

BICH NGUYET, L. T.; NGUYEN, V. T. Smart Starch-Gelatin Films Incorporated with Curcumin. **Oriental Journal Of Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1088–1095, 30 dez. 2020.

BJERK, T. R. *et al.* Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. **Bioengineering (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 8, 13 ago. 2021.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, abr. 1958.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUENO-MANCEBO, J. *et al.* Surfactin as an ingredient in cosmetic industry: Benefits and trends. **International Journal of Cosmetic Science**, v.0, p.1-15, 2024.

CALIRI, A.W.; TOMMASI, S.; BESARATINIA, A. Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 787, p. 108365, 2021.

CALVO, F. *et al.* Integrated design of emulsified cosmetic products: A review. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 161, p. 279–303, set. 2020.

CIURKO *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. 10824–10824, set. 2022.

CHEN, X. *et al.* A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 143, jun. 2022.

CHO, W. Y. *et al.* Sophorolipids—Bio-Based Antimicrobial Formulating Agents for Applications in Food and Health. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5556, 29 ago. 2022.

CHOCHKOV, R. *et al.* Effect of hydrocolloids on properties of dough and quality of gluten-free bread enriched with whey protein concentrate. **Food Technology Ukrainian Food Journal**. 2019, v. 8, [s.d.].

CLEMENTS-DECKER, T. *et al.* Underexplored bacteria as reservoirs of novel antimicrobial lipopeptides. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 1025979, out. 2022.

COLODRO M., V. *et al.* Antibacterial Activity of Bacillus Lipopeptides Vehiculized and Delivered by Biopolymeric Films. **Food and Bioprocess Technology**, v. 17, n. 2, p. 504–515, 28 jun. 2023.

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.

CORREIA, J. *et al.* Surfactin and poly- γ -glutamic acid co-production by *Bacillus velezensis* P#02 using a corn steep liquor-based medium. **Biochemical Engineering Journal**, v. 211, n. 1, p. 109461, ago. 2024.

CZINKÓCZKY, R.; NÉMETH, Á. The Effect of pH on Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* DSM10. **Hungarian Journal of Industry and Chemistry**, v. 48, n. 2, dez. 2020.

DAI, C. *et al.* Isolation of a surfactin-producing strain of *Bacillus subtilis* and evaluation of the probiotic potential and antioxidant activity of surfactin from fermented soybean meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, jun. 2024.

DECKER, T. *et al.* Antibacterial efficacy and membrane mechanism of action of the *Serratia*-derived non-ionic lipopeptide, serrawettin W2-FL10. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 7, p. e0295223, jul. 2024.

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

DENG, Q. *et al.* LC-MS and Transcriptome Analysis of Lipopeptide Biosynthesis by *Bacillus velezensis* CMT-6 Responding to Dissolved Oxygen. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 6822, 12 out. 2022.

DOS SANTOS, E. *et al.* Biosurfactant Production by *Bacillus* strains isolated from sugar cane mill wastewaters. **Environmental Sciences**, v. 62, n. 1678-4324, maio 2019.

DVOŘÁK, P. *et al.* Signaling Toward Reactive Oxygen Species-Scavenging Enzymes in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, fev. 2021.

DUSSERT, E., *et al.* Evaluation of Antiradical and Antioxidant Activities of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 914713, 2022.

EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. YU. Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance. **Acta Naturae**, v. 10, n. 4, p. 33–48, 2018.

FELIX, A. *et al.* Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oilcontaminated soil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 256–263, 2019.

FELNAGLE, E. A. *et al.* Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Production of Medically Relevant Natural Products. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 191–211, 2008.

FERNANDES, P. A. V. *et al.* Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1517-8382, p. 704–709, dez. 2007.

FILIPE, G. A. *et al.* Bioactive films for the control of skin pathogens with sophorolipids from *Starmerella bombicola*. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 10, p. 10809–10823, 21 nov. 2022.

GAO, L. *et al.* Enhanced production of iturin A by strengthening fatty acid synthesis modules in *Bacillus amyloliquefaciens*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 974460, set. 2022.

GAO, L. *et al.* Translocation of the thioesterase domain for the redesign of plipastatin synthetase. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, dez. 2016.

GHAFOOR, A.; HASMAIN, S. Production dynamics of *Bacillus subtilis* strain AG-1 and EAG-2, producing moderately alkaline proteases. *African Journal microbiology*, v. 3, n. 5, p. 258-263, 2009

GHANI, A. *et al.* Antioxidant, Antibacterial and Biodegradable Hydrogel Films from Carboxymethyl Tragacanth Gum and Clove Extract: Potential for Wound Dressings Application. **Carbohydrate polymer technologies and applications**, v. 7, p. 100428–100428, 1 jun. 2024.

GHAZALA, I. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of *Bacillus mojavensis* l4 lipopeptides and their potential application against the potato dry rot causative *Fusarium solani*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, jul. 2022.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1–6, 27 set. 2011.

GIMENEZ, D. *et al.* Fengycin A Analogues with Enhanced Chemical Stability and Antifungal Properties. **Organic Letters**, v. 23, n. 12, p. 4672–4676, jun. 2021.

GIRI, S. S. *et al.* Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 66–72, jul. 2019.

GIRI, S. S. *et al.* Immunomodulatory Role of Microbial Surfactants, with Special Emphasis on Fish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7004, set. 2020.

GUPTA, P.L.; RAJPUT, M.; OZA, T. Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 9, n. 4, p. 267–278, 2019.

GUTIÉRREZ-CHÁVEZ, C.; BENAUD, N.; FERRARI, B. C. The ecological roles of microbial lipopeptides: Where are we going? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 1400–1413, 2021.

HAMLEY, I.W. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. **Chemical Communications**, v. 51, n. 41, p. 8574–8583, 2015.

HIPÓLITO, A. *et al.* Active Biodegradable Cassava Starch Films Containing Sophorolipids Produced by *Starmerella bombicola* ATCC® 22214™. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, n. 10, p. 3199–3209, 13 mar. 2021.

HMIDET, N. *et al.* Enhancement of Surfactin and Fengycin Production by *Bacillus mojavensis* A21: Application for Diesel Biodegradation. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

HMIDET, N.; JEMIL, N.; OUERFELLI, M. Antioxidant properties of *Enterobacter cloacae* C3 lipopeptides in vitro and in model food emulsion. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 2, 2020.

HOANG, H.T.; MOON, J-Y.; LEE, Y. Natural Antioxidants from Plant Extracts in Skincare Cosmetics: Recent Applications, Challenges and Perspectives. **Cosmetics**, v. 8, n. 4, p. 106, 2021.

HOCHHEIM, S. *et al.* Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350, maio 2019.

IRATO, P.; SANTOVITO, G. Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. **Antioxidants**, v. 10, n. 4, p. 579, 9 abr. 2021.

JANEK, T. *et al.* Sustainable Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Using Crude Glycerol from Different Wastes. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3488–3488, 8 jun. 2021.

JEMIL, N.; AYED, H.B.; MANRESA, A. Antioxidant properties, antimicrobial and antiadhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 144, 2017.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Lipopeptides in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 32, n. 1, p. 1–8, 2010.

KANWAR, S. Lipopeptides: A Distinct Class of Antibiotics with Diverse Applications. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, v. 7, n. 2, 2017.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, fev. 2011.

KIM, S. *et al.* Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 865–871, fev. 2007.

KIM, Y.-T.; KIMMEL, R.; WANG, X. A New Method to Determine Antioxidant Activities of Biofilms Using a pH Indicator (Resazurin) Model System. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2092–2092, 23 fev. 2023.

KIRAN, G.S.; PRIYADHARSINI, S.; SAJAYAN, A. Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. and Its Application in Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1138, 2017.

KRYSTON, T. B. *et al.* Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1-2, p. 193–201, jun. 2011.

KUMARI, K.; BEHERA, H.T.; NAYAK, P.P. Amelioration of lipopeptide biosurfactants for enhanced antibacterial and biocompatibility through molecular antioxidant property by methoxy and carboxyl moieties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 161, p. 114493, 2023.

KUMARI, R.; L. PAIKHOMBA SINGHA; SHUKLA, P. Biotechnological potential of microbial bio-surfactants, their significance and diverse applications. **FEMS microbes**, v. 4, jan. 2023.

LARS LILGE *et al.* Surfactin Shows Relatively Low Antimicrobial Activity against *Bacillus subtilis* and Other Bacterial Model Organisms in the Absence of Synergistic Metabolites. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 779–779, abr. 2022.

ŁAWNICZAK, Ł.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, Ł. Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 6, p. 2327–2339, 12 fev. 2013.

LI, J.-Y. *et al.* Microbial Lipopeptide-Producing Strains and Their Metabolic Roles under Anaerobic Conditions. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2030, out. 2021.

LI, S.; TAN, H.Y.; WANG, N. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26087–26124, 2015.

LI, Z. *et al.* Antibacterial Activity of Surfactin and Synergistic Effect with Conventional Antibiotics Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Patients with Diabetic Foot Ulcers. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. Volume 16, p. 3727–3737, nov. 2023.

LIU, K.; HUA, S.; SONG, L. PM2.5 Exposure and Asthma Development: The Key Role of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. e3618806, abr. 2022.

LOURENÇO, S.C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V.D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132, 2019.

LU, J.K.; WANG, H.M.; XU, X.R. Applications of surfactin in cosmetic products. Patent US20160030322A1, 2016

LUCAS-ABELLÁN, C. *et al.* Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1255–1260, jun. 2011.

LYU, Z.-Y. *et al.* Improving the Yield and Quality of Daptomycin in *Streptomyces roseosporus* by Multilevel Metabolic Engineering. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 872397, 2022.

MANAARGADOO-CATIN, M. *et al.* Hemolysis by surfactants — A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 1–16, fev. 2016.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

MIAO, Y. *et al.* Sustainable biosurfactant production from secondary feedstock—recent advances, process optimization and perspectives. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, jan. 2024.

MORALES-BORRELL *et al.* Design of a culture medium for optimal growth of the bacterium *Pseudoxanthomonas indica* H32 allowing its production as biopesticide and biofertilizer. **AMB express**, v. 10, n. 1, 23 out. 2020.

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

MULLIGAN, C. N. Sustainable Remediation of Contaminated Soil Using Biosurfactants. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 15 mar. 2021.

MÜNZEL, T. *et al.* Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? **European Heart Journal**, v. 31, n. 22, p. 2741–2748, 25 out. 2010.

NEHA, K., *et al.* Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, 687-704, 2019.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, 153, 375-380, 1944.

NIKOLOVA, C.; GUTIERREZ, T. Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, fev. 2021.

NURFARAHIN, A.; MOHAMED, M.; PHANG, L. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—An Overview. **Molecules**, v. 23, n. 5, p. 1049, mai 2018.

NUR HANANI, Z. *et al.* Development and Characterization of Biodegradable Composite Films Based on Gelatin Derived from Beef, Pork and Fish Sources. **Foods**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2 jan. 2013.

OHADI, M. *et al.* Antioxidant Potential and Wound Healing Activity of Biosurfactant Produced by *Acinetobacter junii* B6. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 900–908, fev. 2018.

OLASANMI, I.; THRING, R. The Role of Biosurfactants in the Continued Drive for Environmental Sustainability. **Sustainability**, v. 10, n. 12, p. 4817, dez. 2018.

OLIVEIRA, S. DE *et al.* Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Química Nova**, v. 37, n. 3, 2014.

OSMORSKAYA, Z. *et al.* Characterization of biosurfactants produced by the *Bacillus amyloliquefaciens* BKMA B-12464. **E3S Web of Conferences**, v. 392, p. 01013, 2023.

PAIVA, W.K.V.D.; OLIVEIRA, L.B.S.; SILVA, M. C. N. Exploiting the biological activities of a lipopeptide extract produced by *Bacillus subtilis* UFPEDA 438 in light of the SARSCoV-2 pandemic. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103215, 2024.

PANDEY, H.; KUMAR, S. Butylated hydroxytoluene and Butylated hydroxyanisole induced cyto-genotoxicity in root cells of *Allium cepa* L. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07055, maio 2021.

PARTHIPAN, P. *et al.* Editorial: Biosurfactants—A next generation biomolecules for enhanced biodegradation of organic pollutants. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, ago. 2022.

PETCU, C. D. *et al.* Harnessing Natural Antioxidants for Enhancing Food Shelf Life: Exploring Sources and Applications in the Food Industry. **Foods**, v. 12, n. 17, p. 3176, jan. 2023.

PÉREZ-MARROQUIN, X. A. *et al.* Development of a biomaterial based on chayotextle starch (*Sechium Edule*)-gelatin blend. Molecular, mechanical, physical, barrier and structural properties. **Biotecnia**, v. 24, n. 3, p. 107–114, 17 out. 2022.

PEREZ-MORAL, N.; WATT, S.; WILDE, P. Comparative study of the stability of multiple emulsions containing a gelled or aqueous internal phase. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 215–222, 2014.

PHULPOTO, I. A. *et al.* A comprehensive study on microbial-surfactants from bioproduction scale-up toward electrokinetics remediation of environmental pollutants: Challenges and perspectives. **Chemosphere**, v. 311, p. 136979, jan. 2023.

PILZ, M.; CAVELIUS, P.; QOURA, F. Lipopeptides development in cosmetics and pharmaceutical applications: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 67, p. 108210, 2023.

PINILLA-GONZÁLEZ, V. *et al.* Tapping into Nature's Arsenal: Harnessing the Potential of Natural Antioxidants for Human Health and Disease Prevention. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 1999, 25 jun. 2024.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

QIAO, J. *et al.* Research advances in the identification of regulatory mechanisms of surfactin production by *Bacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, abr. 2024.

RAHAMAN, MD. M. *et al.* Natural antioxidants from some fruits, seeds, foods, natural products, and associated health benefits: An update. **Food Science & Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 1657–1670, jan. 2023.

RAHMAN, F. B. *et al.* Molecular genetics of surfactin and its effects on different subpopulations of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Reports**, v. 32, p. e00686, dez. 2021.

REN, L. *et al.* Extraction and characterization of cyclic lipopeptides with antifungal and antioxidant activities from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 6, p. 3573–3584, dez. 2022.

REPETTO, M.; REIDES, C.; GOMEZ CARRETERO, M.L. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 1996.

ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M. Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 141–172, dez. 2010.

RUDNER, R.; MARTSINKEVICH, O.; LEUNG, W.; JARVIS, E. D. Classification and genetic characterization of pattern-forming *Bacilli*. *Molecular Microbiology*. v. 27, p. 687–703, 1998

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Evaluation of The Antioxidant Capacity of Food Products: Methods, Applications and Limitations. **Processes**, v. 10, n. 10, p. 2031, out. 2022.

SARWAR, A. *et al.* Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198107, 4 jun. 2018.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, jul. 2005.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2090, set. 2019.

SHARMA, A. *et al.* Nitric oxide-mediated regulation of oxidative stress in plants under metal stress: a review on molecular and biochemical aspects. **Physiologia Plantarum**, 24 jul. 2019.

SHEBIS, Y. *et al.* Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food and Nutrition Sciences**, v. 04, n. 06, p. 643–649, 2013.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. 694, jul. 2020.

SOMOGYI, M. A reagent for the copper-iodometric determination of very small amounts of sugar. **Journal of Biological Chemistry**, v. 117, n. 2, p. 771–776, 1937.

STOIA, M.; OANCEA, S. Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. 638, 2022.

TAN, B. L. *et al.* Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1162, 16 out. 2018.

TAYS, C. *et al.* Combined Effects of Carbon and Nitrogen Source to Optimize Growth of Proteobacterial Methanotrophs. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 25 set. 2018.

TAVARES, T. D. *et al.* Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 314, jun. 2020.

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, mar. 2021.

TUTIK MURNIASIH *et al.* Optimization of Carbon and Nitrogen Source to Enhance Antibacterial Activity from a Sponge-derived *Bacillus tequilensis*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 24, n. 2, dez. 2023.

VANITTANAKOM, N. *et al.* Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **The Journal of Antibiotics**, v. 39, n. 7, p. 888–901, 1986.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 175–180, jun. 2011.

VIEIRA, A. *et al.* Biodegradable Active Packaging Based on an Antioxidant Extract from Brewer's Spent Grains: Development and Potential of Application. **ACS Sustainable Resource Management**, v. 1, n. 11, p. 2413–2419, 26 out. 2024.

VOLLENBROICH, D. *et al.* Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 1, p. 44–49, 1997.

WAYNER, D. D. M. *et al.* Quantitative measurement of the total, peroxy radical trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. **FEBS Letters**, v. 187, n. 1, p. 33–37, 22 jul. 1985.

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, 13 maio 2021.

WANG, S., *et al.* Evaluation of antiradical and antioxidant activities of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 11, p. 914713, 2020.

WANG, Y., *et al.* Protective effect of surfactin on copper sulfate-induced inflammation, oxidative stress, and hepatic injury in *zebrafish*. **Microbiology and Immunology**, v. 65, n. 10, p. 410–421, 2021.

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, maio 2022.

XU, X.; LIU, A.; HU, S. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. **Food Chemistry**, v. 353, p. 129488, 2021.

YALÇIN, E.; ÇAVUŞOĞLU, K. Structural Analysis and Antioxidant Activity of a Biosurfactant Obtained from *Bacillus subtilis* RWI. **Turkish Journal of Biochemistry**. v. 35, n. 3, p. 243–7, 2010.

YANG, Y. *et al.* Antibacterial and antioxidant phlorizin-loaded nanofiber film effectively promotes the healing of burn wounds. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 5 ago. 2024.

YARAGUPPI, D. A. *et al.* Iturin: A Promising Cyclic Lipopeptide with Diverse Applications. **Biomolecules**, v. 13, n. 10, p. 1515–1515, out. 2023.

YARIBEYGI, H. *et al.* Molecular Mechanisms Linking Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–13, mar. 2020.

YUAN, L. *et al.* Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped Viruses. **Journal of Virology**, v. 92, n. 21, p. e00809-18, nov. 2018.

ZHAO, F. *et al.* Anaerobic production of surfactin by a new *Bacillus subtilis* isolate and the in-situ emulsification and viscosity reduction effect towards enhanced oil recovery applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 201, n. 108508, p. 108508–108508, jun. 2021.

ZEHIROGLU, C.; SARIKAYA, S. B. O. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 11, p. 4757–4774, 2019.

ZANDI, P.; SCHNUG, E. Reactive Oxygen Species, Antioxidant Responses and Implications from a Microbial Modulation Perspective. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 155, jan. 2022.

ZHEN, C. *et al.* Chemical structure, properties and potential applications of surfactin, as well as advanced strategies for improving its microbial production. **AIMS microbiology**, v. 9, n. 2, p. 195–217, 1 jan. 2023.

ZHOU, Y. *et al.* Optimization of fermentation conditions for surfactin production by *B. subtilis* YPS-32. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1, abr. 2023.

ZOUARI, R.; MOALLA-REKIK, D.; SAHNOUN, Z. Evaluation of dermal wound healing and in vitro antioxidant efficiency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 878–891, 2016.