

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**ANA PAULA DE PAIVA LIMA**

**OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO COM FARELO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE  
SURFACTINA PELA LINHAGEM *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2025**

**ANA PAULA DE PAIVA LIMA**

**OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO COM FARELO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE  
SURFACTINA NA LINHAGEM *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

Coorientadora: Amanda Tristão Santini

**VIÇOSA/MG**

**2025**

**ANA PAULA DE PAIVA LIMA**

**OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO COM FARELO DE SOJA PARA PRODUÇÃO DE  
SURFACTINA NA LINHAGEM *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA**


Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

Coorientadora: Amanda Tristão Santini


APROVADA: 03/07/2025

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 ANA PAULA DE PAIVA LIMA  
Data: 04/07/2025 20:46:25-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Ana Paula de Paiva Lima  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 MARCOS ROGERIO TOTOLA  
Data: 04/07/2025 18:03:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Marcos Rogério Tótola  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por sempre terem priorizado minha educação e me permitido realizar meus sonhos.

Ao meu irmão, pelo amor mais puro que já recebi.

À UFV e ao curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, por me mostrarem o mundo que sempre quis conhecer.

Ao meu professor e orientador Marcos Rogério Tótola, por ter me aceitado em seu laboratório e propiciado que me tornasse a cientista que sempre quis ser.

À minha coorientadora Amanda Tristão Santini, por ser muito mais que isso, pela paciência e disposição que sempre demonstrou ao me orientar e por ser minha referência como cientista.

Ao técnico Alex Gazolla de Castro, por assegurar a qualidade do meu trabalho e pela prontidão ao me auxiliar nos experimentos e análises.

Àquelas que foram fundamentais para que eu concluísse esse trabalho: Graziela, Jéssica e Ana Maria.

Ao professor Paulo Roberto Cecon, pela disposição e ajuda fornecida nas modelagens estatísticas.

Aos colegas de laboratório que sempre fizeram o trabalho ser mais leve e o laboratório ser um lugar de conforto: Yohanna, Maria, Ana, Júlia, Jomar, Mariana, Lívia e Luciana.

À república Narceja, por ser minha família e por nunca me deixar sozinha.

À Bruna, por sempre saber o que dizer e me mostrar quem eu realmente sou.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas, que contribuíram para a profissional que me torno agora.

Aos familiares e amigos que sempre me apoiaram nesta jornada.

A todos que tiveram um impacto em mim e me colocaram no lugar onde estou agora.

A mim mesma, por ter superado tudo.

## RESUMO

Os biossurfactantes microbianos são compostos biodegradáveis com alta eficiência e baixa toxicidade, sendo frequentemente utilizados como alternativas aos surfactantes sintéticos. Entretanto, um dos maiores empecilhos na utilização dos biossurfactantes é o elevado custo de produção. Uma das principais formas de diminuir este custo é o desenvolvimento de meios de cultura mais baratos, utilizando compostos residuais como fonte de carbono e nitrogênio. Neste sentido, os objetivos deste trabalho são: 1) otimizar as concentrações de farelo de soja e açúcar cristal em um meio de cultivo para a produção de biossurfactantes pela cepa modificada *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; 2) comparar a eficiência do método colorimétrico CPC-BTB de quantificação da surfactina com o método UPLC-MS/MS. Foram combinados o delineamento composto central rotacional com a metodologia de superfície de resposta, estabelecendo diferentes concentrações de farelo de soja e açúcar para os meios de cultivo, sendo as variáveis resposta a concentração de surfactina produzida e a Concentração Micelar Crítica (CMC). Além dos cultivos experimentais, foi realizado um cultivo controle com o meio de cultura padrão utilizado para a produção de biossurfactantes. As culturas foram incubadas a 35 °C e a 150 rpm por 90h, com indução por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 0,78mM e DO<sub>600</sub> inicial de 0,29. Os sobrenadantes das culturas foram purificados por precipitação ácida, liofilizados e submetidos à quantificação por UPLC-MS/MS. Os extratos gerados foram utilizados para a determinação da CMC. Também foram feitos ensaios de espalhamento de óleo e determinação do índice de emulsificação com óleo de soja e petróleo. Para o método CPC-BTB, foi estabelecida uma curva padrão empregando-se surfactina comercial (Sigma-Aldrich) e as concentrações de extrato bruto foram ajustadas para se enquadrar dentro dos limites da curva. Com exceção da unidade experimental 10, os valores de CMC obtidos foram consideravelmente baixos e próximos à CMC da surfactina pura. Nos testes de espalhamento de óleo, a amostra 10 teve resultado negativo, enquanto as demais amostras geraram valores semelhantes ao do controle. O índice de emulsificação não teve resultado significativo para o óleo de soja, entretanto teve resultado positivo em todas as amostras para o petróleo. O método CPC-BTB demonstrou-se ineficiente em quantificar a surfactina, porém útil na sua detecção. Os gráficos de superfície de resposta gerados retornaram um ponto de máximo para a produção de surfactina em 56,04 g L<sup>-1</sup> de soja, sem interferência do açúcar. Já para a CMC, o ponto de mínimo foi determinado em 38,95

g L<sup>-1</sup> de açúcar, sem interferência do farelo de soja. Esses resultados sugerem que há outros fatores interferindo na tensão superficial além da concentração de surfactina. Desse modo, o meio otimizado foi definido com concentrações de 56,04 g L<sup>-1</sup> de soja e 10 g L<sup>-1</sup> de açúcar, sendo um meio 14 vezes mais barato que o meio mineral padrão. Também foi estabelecido que meios com concentração superior a 82 g L<sup>-1</sup> de farelo de soja podem inibir a produção de surfactina.

Palavras-chave: surfactina; biossurfactantes; farelo de soja; *Bacillus subtilis*.

## ABSTRACT

Microbial biosurfactants are biodegradable compounds with high efficiency and low toxicity, and are frequently used as alternatives to synthetic surfactants. However, one of the biggest obstacles to the use of biosurfactants is the high production cost. One way to reduce this cost is the development of cheaper culture media, using residual compounds as carbon and nitrogen sources. In this sense, the aims of this project are: 1) to optimize the concentrations of soybean meal and crystal sugar in a culture medium for the production of biosurfactants by the modified strain *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA; 2) to compare the efficiency between the colorimetric CPC-BTB method and the UPLC-MS/MS for the quantification of surfactin. To achieve it, the central composite rotational design was combined with the response surface methodology, establishing different concentrations of soybean meal and commercial sugar for the culture media, with the response variables being the concentration of surfactin and the Critical Micellar Concentration (CMC). In addition to the experimental cultures, a control culture was performed with the standard culture medium used for the production of biosurfactants. The cultures were incubated at 35 °C and 150 rpm for 90 h, with induction by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 0.78 mM and initial OD<sub>600</sub> of 0.29. The culture supernatants were purified by acid precipitation, lyophilized and subjected to quantification by UPLC-MS/MS. The extracts were used to determine the CMC. Oil spreading tests and determination of the emulsification index (E<sub>24</sub>) with soybean oil and petroleum were also performed. For the CPC-BTB method, a standard curve was established using commercial surfactin (Sigma-Aldrich) and the crude extract concentrations were adjusted to fit within the limits of the curve. With the exception of experimental unit 10, the CMC values obtained were considerably low and close to the CMC of pure surfactin. In the oil spreading tests, sample 10 had a negative result, while the other samples generated values similar to the control. The emulsification index did not have a significant result for soybean oil, however it had a positive result in all samples for petroleum. The CPC-BTB method proved to be inefficient in quantifying surfactin, but useful in its detection. The response surface graphs generated returned a maximum point for surfactin production at 56.04 g L<sup>-1</sup> of soybean, without interference from sugar. For CMC, the minimum point was determined at 38.95 g L<sup>-1</sup> of sugar, without interference from soybean meal. These results suggest that there are other factors interfering with surface tension besides surfactin concentration. Thus, the optimized medium was defined with concentrations

of 56.04 g L<sup>-1</sup> of soybean and 10 g L<sup>-1</sup> of sugar, being a medium 14 times cheaper than the standard mineral medium. It was also established that media with concentrations higher than 82 g L<sup>-1</sup> of soybean meal can inhibit surfactin production.

Keywords: surfactin; biosurfactants; soybean meal; *Bacillus subtilis*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Surfactantes</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2</b>	<b>Biossurfactantes</b> .....	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Acessibilidade na produção de biossurfactantes</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>Microrganismo</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2</b>	<b>Meios de cultivo</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3</b>	<b>Delineamento Composto Central Rotacional</b> .....	<b>18</b>
<b>4.4</b>	<b>Síntese de surfactina</b> .....	<b>20</b>
<b>4.5</b>	<b>Obtenção do extrato bruto de surfactina</b> .....	<b>20</b>
<b>4.6</b>	<b>Quantificação da surfactina por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)</b> .....	<b>20</b>
<b>4.7</b>	<b>Quantificação da surfactina pelo método CPC-BTB</b> .....	<b>22</b>
<b>4.8</b>	<b>Teste de espalhamento de óleo</b> .....	<b>22</b>
<b>4.9</b>	<b>Determinação da Concentração micelar Crítica</b> .....	<b>23</b>
<b>4.10</b>	<b>Determinação do índice de emulsificação</b> .....	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Rendimento de extrato bruto</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2</b>	<b>Concentração micelar Crítica</b> .....	<b>24</b>
<b>5.3</b>	<b>Método CPC-BTB de quantificação da surfactina</b> .....	<b>26</b>
<b>5.4</b>	<b>Superfície de resposta</b> .....	<b>29</b>
<b>5.5</b>	<b>Espalhamento de óleo</b> .....	<b>31</b>
<b>5.6</b>	<b>Índice de emulsificação</b> .....	<b>32</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos anfipáticos sintéticos, com aplicação em diversos produtos da indústria, como detergentes, cosméticos, tintas, tecidos, medicamentos, pesticidas, entre outros. Porém, seu intenso uso leva a altas concentrações no ambiente, o que pode causar uma variedade de prejuízos: eutrofização, contaminação da água potável, efeitos tóxicos adversos em seres humanos e organismos aquáticos. Devido a estes riscos, são utilizadas diferentes técnicas de descontaminação, mas que não são eficientes o suficiente para sua remoção total, além de terem um custo elevado (BADMUS *et al.*, 2021).

Desse modo, a busca por alternativas mais brandas aos ambientes é de extrema importância. Neste ponto estão os biossurfactantes. Eles são compostos produzidos por microrganismos e possuem menor toxicidade, são biodegradáveis e podem ser sintetizados *in situ*. Além disso, a grande variedade de microrganismos retorna, também, uma grande variedade de biossurfactantes, permitindo a descoberta de moléculas novas que possam ter aplicações ainda inexploradas (SHEKHAR *et al.*, 2014).

Um dos maiores desafios na produção de biossurfactantes é o custo de produção. Para contornar esse problema é necessário compreender como o meio de cultivo afeta a capacidade dos microrganismos de produzirem os compostos. Para isso, é preciso determinar as melhores fontes de nitrogênio, carbono e nutrientes, bem como as melhores condições ambientais, como pH, temperatura e oxigenação, para que a produção atinja seu máximo. Além de otimizar o meio, buscar meios de cultivo alternativos, que sejam mais baratos, mas que mantenham a qualidade de produção, é essencial (REIS, 2017; FÉLIX, 2023). O uso de resíduos agroindustriais é recorrente, uma vez que o Brasil é um grande produtor agrícola e a geração de resíduos é intensa. Dessa forma, utilizá-los como fonte nutricional para a produção de biossurfactantes, além de reduzir o custo, contribui para diminuir a necessidade de processos de descarte (OLIVEIRA *et al.*, 2014)

O uso do farelo de soja em fermentação submersa para a produção de biossurfactantes foi explorada por Félix (2023), que cozinha e filtra o resíduo para compor o meio. Essa etapa adiciona gastos e maior demora na produção dos biossurfactantes, o que torna interessante a possibilidade de eliminá-la. Ramos (2017) faz isso em seu trabalho, onde investiga a produção de proteases. No entanto,

seu uso sem filtração ainda não foi testado para a produção de biossurfactantes, se mostrando uma possibilidade inexplorada de redução de gastos somada à diminuição de processos de descarte para o resíduo. Além do farelo de soja, o uso de açúcar cristal em substituição à glicose em meios de cultura também é uma forma de reduzir os custos da fermentação, podendo até apresentar maior eficiência que a própria glicose (GILIO, 2023).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar a eficiência da adição de diferentes concentrações de farelo de soja e açúcar cristal no meio de cultivo de *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrFA para aumento da produção de compostos biossurfactantes.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Surfactantes**

Surfactantes são compostos anfipáticos sintéticos com amplas áreas de aplicação: detergentes, cosméticos, tintas, polímeros, tecidos, pesticidas, medicamentos e recuperação de óleo. Eles são categorizados de acordo com seus grupos hidrofílicos, podendo ser aniônicos, catiônicos, anfotéricos ou não-iônicos. O mercado global de surfactantes foi avaliado em 42,1 bilhões de dólares em 2021, com alta projeção de crescimento para os anos seguintes (BADMUS *et al.*, 2021).

Entretanto, devido ao seu intenso uso, os surfactantes já foram identificados em águas residuais industriais ou domésticas em concentrações de 300 mg L<sup>-1</sup> e de 1 a 10 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Deste modo, há grande preocupação em relação à descarga de surfactantes no meio ambiente ou nas estações de tratamento de água, o que pode levar à contaminação da água potável (BADMUS *et al.*, 2021).

Os efeitos causados por essa contaminação são variados. Um deles é a própria toxicidade dos surfactantes, devido às porções hidrofóbicas em sua estrutura molecular. Além disso, eles também aumentam a solubilidade de poluentes orgânicos persistentes (POPs). Outro problema é a promoção de eutrofização nos corpos d'água, já que esses compostos aumentam a solubilidade de contaminantes, reduzindo a qualidade da água e a transferência de oxigênio (BADMUS *et al.*, 2021).

Em específico, o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), surfactante mais utilizado em detergentes, já foi relatado como causador de problemas respiratórios e irritações na pele de seres humanos, além de prejudicar o crescimento, metabolismo e reprodução de organismos aquáticos, impactar sua capacidade de suportarem

estresse, danificar a membrana celular e lisar complexo da proteína da clorofila (BADMUS *et al.*, 2021).

Diversas técnicas de descontaminação de ambientes contaminados com surfactantes sintéticos são empregadas, mas apresentam consideráveis empecilhos. Alguns dos métodos usados são processos físico-químicos, eletrocoagulação, filtração por membrana, eletro-oxidação, ultrafiltração, entre outros. Estas técnicas, em geral, não conseguem remover os surfactantes eficientemente se estes estiverem em altas concentrações e possuem um custo operacional elevado (BADMUS *et al.*, 2021).

## 2.2. Biossurfactantes

Como alternativa aos surfactantes sintéticos, estão os biossurfactantes. Eles são menos tóxicos, têm mais compatibilidade com o meio ambiente, são biodegradáveis, mantêm sua atividade em temperatura, pH e salinidade extrema, além de poderem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (SHEKHAR *et al.*, 2014).

Uma outra vantagem dos biossurfactantes é que podem ser produzidos *in situ*, permitindo o desenvolvimento de um tratamento de descontaminação de solos e efluentes industriais contaminados com óleo no próprio local afetado. A diversidade de microrganismos se estende por ambientes diversos e extremos, levando ao desenvolvimento de características fisiológicas únicas, que permitem a produção de metabólitos variados. Desse modo, novos compostos podem ser descobertos através do estudo dos microrganismos e suas características fisiológicas (SHEKHAR *et al.*, 2014). No quadro 1 estão listados os biossurfactantes conhecidos e suas respectivas espécies produtoras.

BIOSURFACTANTE	ESPÉCIES PRODUTORAS
Glicolipídeos	
Trehalolipídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Mycobacterium</i> sp.
Dimicolatos de trealose	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia</i> sp.

BIOSURFACTANTE	ESPÉCIES PRODUTORAS
Dicorinomicolatos de trealose	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Soforolipídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis</i> sp.
Celbiolipídeos	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>Ustilago maydis</i>
Lipopeptídeos e lipoproteínas	
Lipídio-peptídeo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Fengicina	<i>Bacillus</i> sp.
Artrofactina	<i>Arthrobacter</i> sp.
Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Brevibacterium brevis</i>
Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Brevibacterium polymyxa</i>
Liquenisina	<i>Bacillus licheniformis</i>
Lipídios ornitina	<i>Myroides</i> sp. SM1, <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Thiobacillus</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp., <i>Gluconobacter</i> sp.

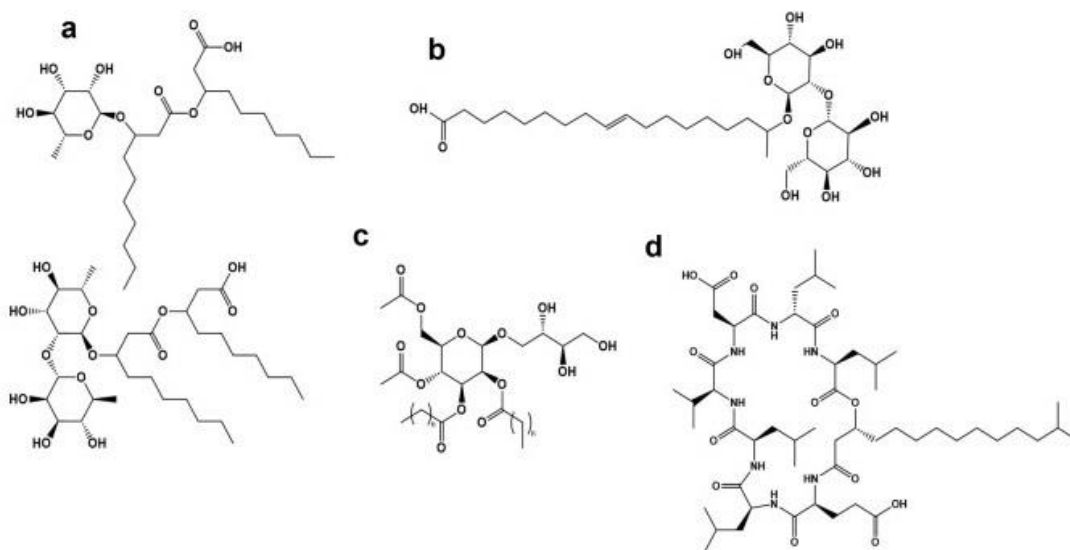
BIOSSURFACTANTE	ESPÉCIES PRODUTORAS
Ácidos graxos, fosfolipídios e lipídios neutros	
Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Sais biliares	<i>Myroides</i> sp.
Ácidos graxos	<i>Candida lepus</i> , <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Mycococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
Biosurfactantes poliméricos	
Emulsano	<i>Arethrobacter calcoaceticus</i>
Biodispersano	<i>Arethrobacter calcoaceticus</i>
Proteína lipídica manana	<i>Candida tropicalis</i>
Liposana	<i>Candida lipolytica</i>
Glicolipoproteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Debaryomyces polymorphus</i>
Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Biosurfactantes particulados	
Vesículas	<i>Arethrobacter calcoaceticus</i>

Quadro 1. Tipos de biosurfactantes e suas respectivas fontes. Fonte: SHEKHAR *et al.*, 2014.

Além da diversidade em tipos de biosurfactantes, uma mesma classe pode conter até 40 isoformas. Dentro dos grupos de biosurfactantes, há uma tendência à preservação da porção hidrofílica da molécula, enquanto a hidrofóbica acumula variações. As isoformas podem apresentar propriedades significativamente diferentes, o que expande ainda mais a diversidade dos biosurfactantes (SOBERÓN-

CHÁVEZ; MAIER, 2011). Na figura 1 estão ilustradas as estruturas químicas de alguns dos principais biossurfactantes estudados.

Figura 1 – Estruturas de alguns dos principais biossurfactantes comentados na literatura.



Fonte: HERNÁNDEZ *et al.*, 2023. **A:** Mono e di-ramnolípido. **B:** Soforolípido. **C:** Manosileritritol lípido-A. **D:** Sufactina.

Dentre esta diversidade, destaca-se a surfactina, um dos melhores tensoativos estudados até o momento, com capacidade de reduzir a tensão superficial da água de  $72\text{mN m}^{-1}$  para  $27\text{mN m}^{-1}$ . Além disso, esta molécula tem alta estabilidade e propriedades emulsificante, espumante e de dispersão, o que gera inúmeras possibilidades de aplicação. Possuindo diferentes isoformas, as propriedades da surfactina são muitas: atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral, antibiofilme, antitumoral, anti-inflamatória e hemolítica. Deste modo, o uso da surfactina é de grande interesse para o uso em cosméticos, produtos de limpeza, medicamentos, recuperação de petróleo, remoção de metais pesados do ambiente e aumento da taxa de degradação de hidrocarbonetos (ALMEIDA, 2022).

Os biossurfactantes podem ser caracterizados através de medições da tensão superficial, da atividade emulsificante, solubilidade, análise de cristalografia, perfil cromatográfico e estabilidade em diferentes temperaturas, salinidades e valores de pH (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAF; HASSOUNA, 2008). Quanto à quantificação, podem ser utilizadas técnicas cromatográficas, como cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (TREFILOV *et al.*, 2025). Entretanto, em função da dificuldade em quantificar de forma

rápida e precisa os biossurfactantes presentes em uma amostra biológica, sistemas de cromatografia associados à espectrometria de massas, que provê resultados mais precisos, são frequentemente utilizados (BINIARZ *et al.*, 2017; HEYD *et al.*, 2008). Nesse sentido, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa em tandem (UPLC-MS/MS) é preferível, promovendo melhor resolução e picos mais bem definidos, evitando a co-eluição dos demais compostos da amostra com a surfactina, gerando menor interferência dos mesmos durante a ionização (STEENE *et al.*, 2008).

Apesar da eficiência, a UPLC-MS/MS utiliza equipamentos caros e especializados, que necessitam de mão de obra especializada e manutenção frequente, o que limita sua usabilidade (INGHAM *et al.*, 2024). O método colorimétrico cloreto de cetilpiridínio-azul de bromotimol (CPC-BTB) se destaca nesse ponto, uma vez que utiliza apenas um leitor de microplaca e reagentes comuns. Este método, descrito por Zhou *et al.* (2023) e Yang, Yu e Shen (2015), apresentou precisão nas concentrações de surfactina de 100 mg L<sup>-1</sup> a 500 mg L<sup>-1</sup>, com confirmação por cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa.

### **2.3. Acessibilidade na produção de biossurfactantes**

Apesar dos benefícios, a produção de biossurfactantes apresenta rendimento baixo e custo elevado, se comparada a de surfactantes sintéticos. Para contornar isso, é essencial compreender como as condições de cultivo, incluindo o meio de cultura, afetam o metabolismo celular, uma vez que a produção de compostos microbianos é um processo complexo. Além do rendimento, o meio de fermentação também tem papel importante nas proporções de cada isoforma do biossurfactante produzido (REIS, 2017; FÉLIX, 2023).

Desse modo, a otimização do meio de cultura é um fator essencial para a produção satisfatória de biossurfactantes. Componentes do meio, como a fonte de nitrogênio, carbono e nutrientes, bem como condições como pH, temperatura e oxigenação influenciam diretamente na eficiência do cultivo. Ao otimizar as condições de cultivo, encontramos a melhor formulação de meio de cultura para se obter uma maior eficiência na produção de moléculas biossurfactantes (REIS, 2017).

Para reduzir o custo de produção dos biossurfactantes, é importante, também, buscar por fontes de nutrientes mais acessíveis (REIS, 2017; FÉLIX, 2023). Uma opção muito utilizada são resíduos agroindustriais. Esses resíduos têm alta

concentração de matéria orgânica e são encontrados facilmente, além de serem baratos e sua utilização em meios de cultura reduzir a necessidade de tratamento para descarte (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

O farelo de soja é um subproduto do processamento da soja, obtido a partir da moagem dos grãos de soja para a produção do óleo. O principal uso do farelo de soja é na alimentação animal, sendo usado como fonte de proteínas por aves, peixes e gado (COLDEBELLA; RADÜNZ NETO, 2002; GOUVEIA *et al.*, 2020; ZAMBOM *et al.*, 2001). Uma vez que é um produto de baixo valor agregado, tem potencial de manter baixos os custos de produção do meio de cultura (CAETANO, 2012).

No quadro 2 está descrita a composição centesimal do farelo de soja, sendo de maior importância neste trabalho as concentrações de lipídeos, carboidratos e proteínas. O farelo de soja mostra-se uma grande fonte de proteínas, sendo seu uso eficiente para prover uma grande diversidade de aminoácidos aos microrganismos. Massi (2014) utiliza o farelo combinado com outros resíduos agroindustriais, com maior riqueza de lipídeos e carboidratos, enquanto Félix (2023) o combina com açúcar comercial, a fim de equilibrar a quantidade de carbono presente.

	Umidade (%)	Cinzas (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Carboidratos (%)
Farelo de soja	24	4	5	47	14

Quadro 2. Composição centesimal do farelo de soja. Fonte: RAMOS, 2017.

O farelo de soja foi usado como substrato em fermentação sólida por Reis (2017), por Fleuri (2014) e por Massi (2014), sendo que esta o utilizou para a produção de biossurfactantes. Félix (2023) também usa o resíduo para a produção das de lipopeptídeos (surfactina, fengicina e iturina) por *Bacillus velezensis*, mas em fermentação submersa, realizando um processo de cozimento e filtração para remover as partículas do meio. Yoneda *et al.* (2006) patentearam um processo de produção de surfactina, usando um meio enriquecido com farinha de soja. Já Ramos (2017) utilizou o próprio farelo de soja sem nenhuma etapa de filtração, em um processo de fermentação submersa para explorar a produção de proteases, conseguindo eliminar uma etapa que consome tempo e gera mais gastos à produção de biomoléculas.

Além da filtração, outro método utilizado para o emprego de resíduos agroindustriais em meios de cultura é a moagem para redução do tamanho das

partículas. Com essa redução, as taxas de dissolução são maiores devido ao aumento da homogeneização da solução e da superfície de contato das partículas com o meio líquido. Além disso, a velocidade das reações químicas também aumenta com a diminuição do tamanho da partícula, bem como o acesso dos microrganismos aos componentes do meio (ISAAC, 2024; EGÍDIO *et al.*, 2020; SOUZA, 2020).

Além do farelo de soja, outro componente de baixo custo que pode ser utilizado em meios de cultura é o açúcar cristal, em substituição a carboidratos como a glicose. Ele foi usado por Félix (2023) juntamente ao farelo de soja, e também por Gilio (2023), apresentando, neste trabalho, desempenho superior à glicose quanto à produção de endósporos por *Bacillus velezensis* AP-3.

### 3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Analisar o desempenho de um meio de cultivo com farelo de soja sem filtração prévia para a produção de biossurfactantes;
- Adequar as concentrações de farelo de soja e açúcar no meio, de modo a obter a máxima eficiência de produção de biossurfactantes pela bactéria *Bacillus subtilis* LBBMA RI4912 IsrfA e baratear os custos de produção;
- Comparar os métodos de quantificação da surfactina por UPLC-MS/MS e por CPC-BTB.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA, uma cepa modificada pela troca do promotor nativo do operon *srfa*, que ativa a síntese de surfactina, por um promotor mais forte (*Pgrac*) que é induzido por Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A linhagem faz parte do acervo do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (ALMEIDA, 2022).

#### 4.2. Meios de cultivo

O meio de cultura foi descrito por Yoneda *et al.* (2006), sendo sua composição em g L<sup>-1</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> (0,05); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,005); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,0018); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,025); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,022); extrato de levedura (0,01); L-triptofano (0,01) e L-arginina (0,01), com as concentrações de farelo de soja e açúcar variáveis.

Um meio de cultura otimizado para a bactéria *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA por Almeida (2022) foi utilizado como controle para comparar a eficiência dos meios em estudo na produção da surfactina. Sua composição em g L<sup>-1</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (13,9); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,7); extrato de levedura (0,05); NaNO<sub>3</sub> (4,24) e glicose (40), acrescido de 50 mL da solução de micronutrientes composta por (g L<sup>-1</sup>): EDTA (0,5); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3,0); MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,5); NaCl (1,0); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,1); CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,1); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,01); Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01); Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se (0,01); Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01); NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,02).

O farelo de soja foi triturado em moinho laboratorial e peneirado em peneiras de mesh 32, para uniformizar as partículas e melhorar sua integração com o meio líquido. Com a moagem, foi adquirido um composto de granulometria similar ao da farinha de soja industrial, utilizado por Yoneda *et al.* (2006), que tem partículas com diâmetros médios em torno de 0,5 mm (DENTI *et al.*, 2021).

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 30min.

Figura 2 – Diferença de granulometria no farelo de soja.



Fonte: este trabalho. **A:** Antes da moagem; **B:** Depois da moagem.

### 4.3. Delineamento Composto Central Rotacional

Para otimizar a produção de surfactina em um meio mais barato, foram estudadas diferentes concentrações de açúcar e farelo de soja. Foi utilizado o método de Delineamento Composto Central Rotacional, com três repetições no ponto central. Os níveis das variáveis independentes foram determinados de acordo com os trabalhos de Yoneda *et al.* (2006), Almeida (2022) e Félix (2023) e estão dispostos no quadro 3. A matriz do planejamento experimental está descrita no quadro 4. As variáveis resposta utilizadas foram o rendimento de surfactina, determinado por UPLC-MS/MS

e o valor de CMC, determinado por regressão linear platô a partir de medidas da tensão superficial das amostras.

A relação entre as variáveis independentes e as respostas obtidas foi ajustada em uma equação polinomial de segunda ordem. Com o programa SAEG versão 9.1 (UFV, 2007), os coeficientes das equações foram calculados e os modelos ajustados foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Os gráficos de superfícies de resposta foram gerados pelo software SigmaPlot versão 11.0. As condições ótimas foram definidas derivando-se as equações obtidas e pela análise das superfícies de resposta.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Farelo de soja (g L <sup>-1</sup> )	10	23	55	82	100
Açúcar (g L <sup>-1</sup> )	10	14,4	25	35,6	40

Quadro 3. Níveis das variáveis independentes usadas no DCCR para investigação das concentrações ideais de nutrientes.

Unidade experimental	Variável 1	Variável 2	Ensaio	
			Soja (g L <sup>-1</sup> )	Açúcar cristal (g L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	23	14,4
2	-1	+1	23	35,6
3	+1	-1	82	14,4
4	+1	+1	82	35,6
5	0	-1,41	55	10
6	0	+1,41	55	40
7	0	0	55	25
8	0	0	55	25
9	0	0	55	25
10	+1,41	0	100	25
11	-1,41	0	10	25

Quadro 4. Matriz do DCCR para investigação das concentrações ideais de nutrientes.

#### **4.4. Síntese de surfactina**

A linhagem de *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA foi reativada em meio TSA (Difco™ Tryptic Soy Agar), sendo sua composição: hidrolisado pancreático de caseína (15 g L<sup>-1</sup>); hidrolisado papaico de soja (5 g L<sup>-1</sup>); cloreto de sódio (5 g L<sup>-1</sup>) e ágar bacteriológico (15 g L<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas overnight a 30°C.

Foram transferidas colônias isoladas da placa para três erlenmeyers de com meio TSB (Difco™ Tryptic Soy Broth), composto por hidrolisado pancreático de caseína (15 g L<sup>-1</sup>); hidrolisado papaico de soja (5 g L<sup>-1</sup>) e cloreto de sódio (5 g L<sup>-1</sup>), que foram incubados a 150 rpm e 35°C, por 24h. Em seguida, foram transferidas alíquotas da cultura para os meios descritos em 4.2, em DO inicial de 0,29 e foi adicionado IPTG a 0,78mM para induzir o promotor *Pgrac* (Almeida, 2022). As unidades experimentais 1 a 11 e o controle foram incubados a 150 rpm e a 35°C, por 90h, como descrito por Yoneda *et al.* (2006).

#### **4.5. Obtenção do extrato bruto de surfactina**

O extrato bruto enriquecido de surfactina foi produzido segundo descrito por Almeida (2022), com adaptações. A cultura foi centrifugada duas vezes a 7840 x g por 15 minutos, para garantir a remoção das partículas de soja e de células. O sobrenadante foi coletado e o pellet foi descartado.

A seguir, foi realizada precipitação ácida. Utilizando HCl 6M, o pH da solução foi ajustado para 2,0 e incubada a 4°C por aproximadamente 20h. Então, a solução foi centrifugada a 7840 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em água destilada, com ajuste do pH para 7,0 utilizando NaOH 6M. As amostras foram liofilizadas a seguir. O rendimento de cada amostra foi determinado pela diferença entre o peso dos frascos vazios e o peso obtido após a liofilização.

#### **4.6. Quantificação da surfactina por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UPLC-MS/MS)**

Para a quantificação, foi realizado o método UPLC-MS/MS, segundo descrito por Almeida (2022), com adaptações. Os extratos brutos foram solubilizados em água a uma concentração de 1000 mg L<sup>-1</sup> (solução estoque) e submetidos a centrifugação a 8609 x g por 15 minutos, para remoção de partículas. Em seguida, as amostras foram

diluídas em etanol 99,5% a 1:10, gerando uma concentração final de 100 mg L<sup>-1</sup>. As soluções foram filtradas em filtros de 0,22µm diretamente nos *vials*, que foram armazenados a -20°C. Uma curva padrão foi feita nas concentrações de 1 ng a 1000 ng de surfactina (Sigma-Aldrich). As soluções foram filtradas em filtros de 0,22µm diretamente nos *vials* e foram armazenadas a -20° C.

A quantificação da surfactina foi feita por meio de um cromatógrafo de fase líquida acoplado ao espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (modelo 6430 - Agilent), instalado no Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. Foram injetados 10µL de cada amostra e solução padrão no cromatógrafo líquido UPLC (modelo Agilent 1200 Infinity series). As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1.8 µm, 2.1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB-C18, 1.8µm (Agilent). O fluxo de eluição foi de 0,25 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 23 °C, e a fase móvel foi constituída de (A) ácido acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila, em um gradiente de tempo por %B de: 0/55; 1,5/70; 8/100; 14/100; 16/55; 18/55.

O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo com as seguintes condições: temperatura de gases a 300 °C, taxa de fluxo de nitrogênio em 10 L min<sup>-1</sup>, pressão do nebulizador a 35 psi e voltagem capilar de 4000 V. A detecção das moléculas de surfactina foi feita pelo método de monitoramento de reações múltiplas (MRM), monitorando as massas do íon precursor/fragmento estabelecidas a partir de testes de fragmentação de cada uma das 9 isoformas de surfactina.

Os dados foram processados utilizando-se o software MassHunter Workstation, para obtenção da área dos picos de cada isoforma. A transição entre íon precursor e íon produto que gerou maior intensidade de sinal foi escolhida para quantificar cada molécula. Foram elaboradas curvas padrão para cada íon precursor detectado, com base na abundância relativa de cada molécula no padrão. A abundância relativa de cada molécula foi calculada de acordo com a área encontrada para cada transição escolhida para a quantificação, sendo a soma das áreas de todas as transições, em cada ponto da curva, equivalente a 100%. A concentração de cada molécula de surfactina nas amostras foi determinada de acordo com sua curva padrão. A concentração final de surfactina corresponde ao somatório das concentrações de todas as moléculas detectadas.

#### 4.7. Quantificação da surfactina pelo método CPC-BTB

O método foi realizado como descrito por Yang, Yu e Shen (2015). Foram preparadas soluções de cloreto de hexadecilpiridínio monohidratado 0,1 mM (CPC), azul de bromotimol 0,1 M (BTB) e PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 8 (2,14 g L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e 15,35 de g L<sup>-1</sup> NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O). Ao abrigo da luz, foi preparada uma solução 1:1 de CPC e BTB, que foi incubada por 5 minutos. Para a curva padrão, foi utilizada uma solução estoque comercial de surfactina a 1000 mg L<sup>-1</sup>. O estoque foi diluído em PBS para atingir as seguintes concentrações (mg L<sup>-1</sup>): 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 e 0. Foram adicionados 200 µL de cada diluição a 800µL da solução CPC + BTB. A mistura foi homogeneizada e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Alíquotas de 280 µL de cada solução foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, em triplicata, e a leitura da absorvância foi realizada a 610 nm no Varioskan LUX Thermo Scientific. A partir da média dos valores de absorvância obtidos, foi realizada uma análise de regressão para modelar a relação entre a concentração e a absorvância.

As amostras em estudo foram quantificadas segundo o procedimento descrito acima e, para se enquadrar dentro dos limites da curva padrão, foram preparadas soluções a 2000 mg L<sup>-1</sup>. As respostas apresentadas são a média de três medições. Os valores obtidos foram comparados com os resultados do UPLC-MS/MS no programa SAEG versão 9.1 (UFV, 2007), estabelecendo a inclinação da reta (constante  $\beta_1$  na relação  $CPC = \beta_1 \times UPLC$ ). Os testes são considerados como equivalentes em valores de  $\beta_1$  com variação entre 0,9 e 1,1 (DIXON *et al.*, 2018).

#### 4.8. Teste de espalhamento de óleo

O teste foi realizado como descrito por Almeida (2022). Uma placa de Petri de 150 x 20 mm foi preenchida com 70 mL de água destilada. Foram adicionados 20 µL de petróleo extraído de Carmópolis - SE (Petrobras) à placa, levando à formação de fino filme de óleo sobre a água, seguido de 10 µL da solução estoque de extrato bruto. Após 30 segundos, o resultado foi verificado pela formação de halo no filme de óleo e uma régua foi usada para medir os diâmetros formados. Os resultados apresentados são a média de três repetições.

#### **4.9. Determinação da Concentração Micelar Crítica**

As soluções de extrato bruto de biossurfactantes foram submetidos a medições de tensão superficial pelo método da placa de Wilhelmy utilizando-se o tensiômetro Dataphysics DCAT 11EC, segundo recomendações do fabricante, com adaptações. A partir de um volume inicial de 20 mL a 1000 mg L<sup>-1</sup>, foi feita uma diluição serial com reposição isovolumétrica de 3 mL de água destilada. Os valores de tensão foram medidos a cada diluição, até que a concentração da solução chegasse a 1 mg L<sup>-1</sup>. Com os valores obtidos, foi feita uma regressão linear platô, para se encontrar o ponto de Concentração Micelar Crítica. Este ponto nos indica o valor mínimo da concentração do extrato bruto que é suficiente para reduzir de forma significativa a tensão superficial da água (FONSECA *et al.*, 2022).

#### **4.10. Determinação do índice de emulsificação**

O índice de emulsificação foi calculado segundo descrito por Almeida (2022), com adaptações. Foram preparadas diluições de 4 mL do extrato bruto nas concentrações da CMC, em duplicata. As soluções foram adicionadas a tubos de ensaio (10 cm x 15 mm) contendo 4 mL de óleo. Neste trabalho, foram utilizados óleo de soja e petróleo extraído de Carmópolis - SE (Petrobras). Os tubos foram fechados e agitados em um vórtex (Deluxe vortex mixer 045415 - Thermo Scientific) na velocidade máxima por 2 minutos. Os tubos foram incubados por 24h em temperatura ambiente e o índice de emulsificação foi calculado da seguinte forma:

$$EI_{24}(\%) = \frac{\text{altura da camada de emulsão}}{\text{altura total do líquido}} \times 100$$

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Rendimento de extrato bruto**

No quadro 5 estão descritos o rendimento de extrato bruto obtido após liofilização. Os valores de rendimento das unidades experimentais variaram entre 0,0098 g L<sup>-1</sup> e 0,0848 g L<sup>-1</sup>. A unidade 9, com 55 g L<sup>-1</sup> de soja e 25 g L<sup>-1</sup> de açúcar, foi a que gerou maior rendimento, sendo 2,52 vezes superior que o meio padrão, que gerou 0,0337 g L<sup>-1</sup> de extrato. A unidade experimental 10, que continha 100 g L<sup>-1</sup> de soja e 25 g L<sup>-1</sup> de açúcar, gerou o menor rendimento, de 0,0098 g L<sup>-1</sup>.

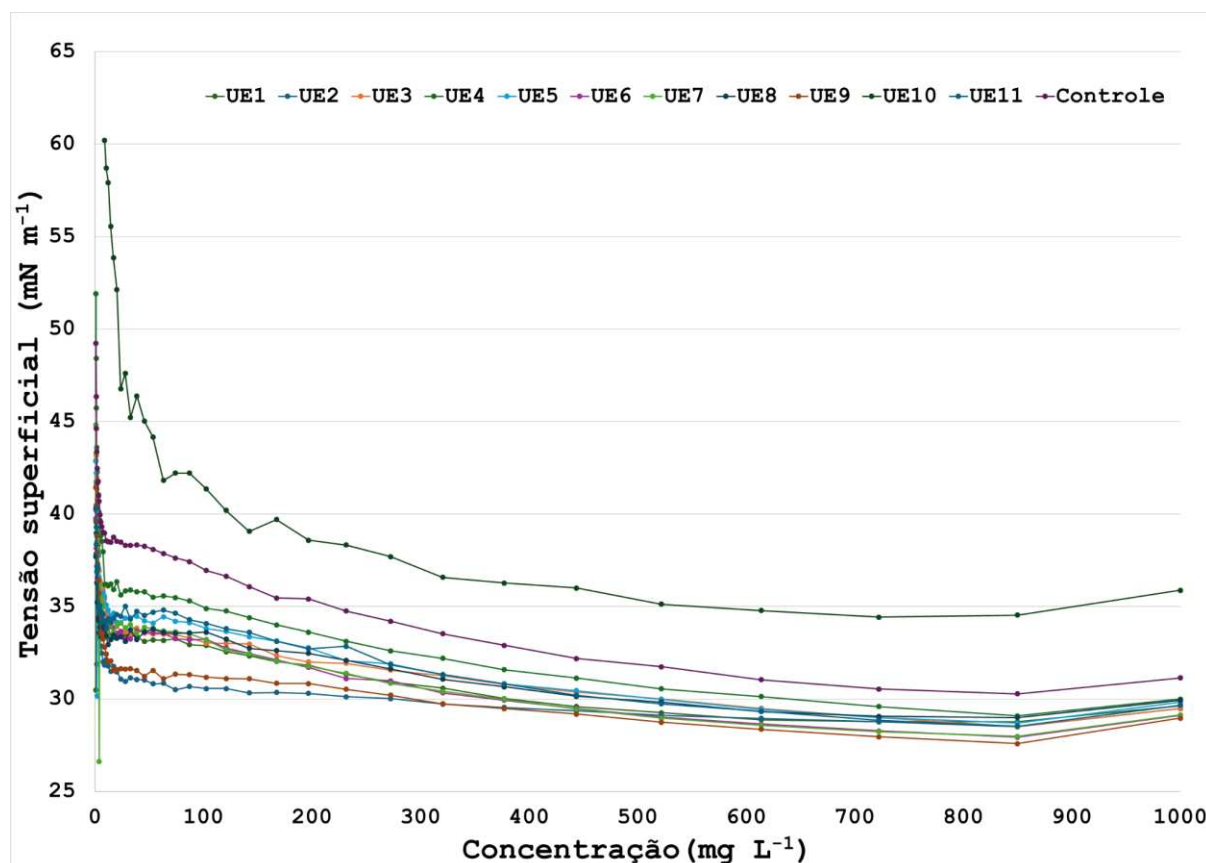
<b>Unidade experimental</b>	<b>Rendimento (g L<sup>-1</sup>)</b>
1	0,055
2	0,0526
3	0,0792
4	0,0293
5	0,0801
6	0,0696
7	0,0751
8	0,0692
9	0,0848
10	0,0098
11	0,0073
Controle	0,0337

Quadro 5. Rendimento do extrato em g L<sup>-1</sup>.

## **5.2. Concentração micelar Crítica**

Os valores de tensão superficial obtidos na diluição seriada para cada unidade experimental estão dispostos no gráfico da figura 3.

Figura 3 – Valores de tensão superficial obtidos de acordo com cada diluição das amostras.



Os valores de CMC determinados por regressão linear platô estão apresentados no quadro 6. Não foi possível determinar a CMC da amostra 10, uma vez que a amostra não apresentou capacidade de manter a tensão superficial baixa de forma significativa, o que sugere que a concentração inicial do extrato bruto usada nas análises ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) já estava abaixo da concentração da CMC.

Unidade Experimental	CMC ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	17,19780985
2	8,977364229
3	17,19780985
4	10,56160498
5	23,80319703
6	8,977364229
7	10,56160498
8	12,42541762

<b>Unidade Experimental</b>	<b>CMC (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>9</b>	17,19780985
<b>10</b>	-
<b>11</b>	10,561605
<b>Controle</b>	12,42541762

Quadro 6. Valores de CMC obtidos para cada unidade experimental.

### 5.3. Método CPC-BTB de quantificação da surfactina

Os valores de absorvância obtidos para cada concentração de surfactina da curva padrão estão apresentados no quadro 7.

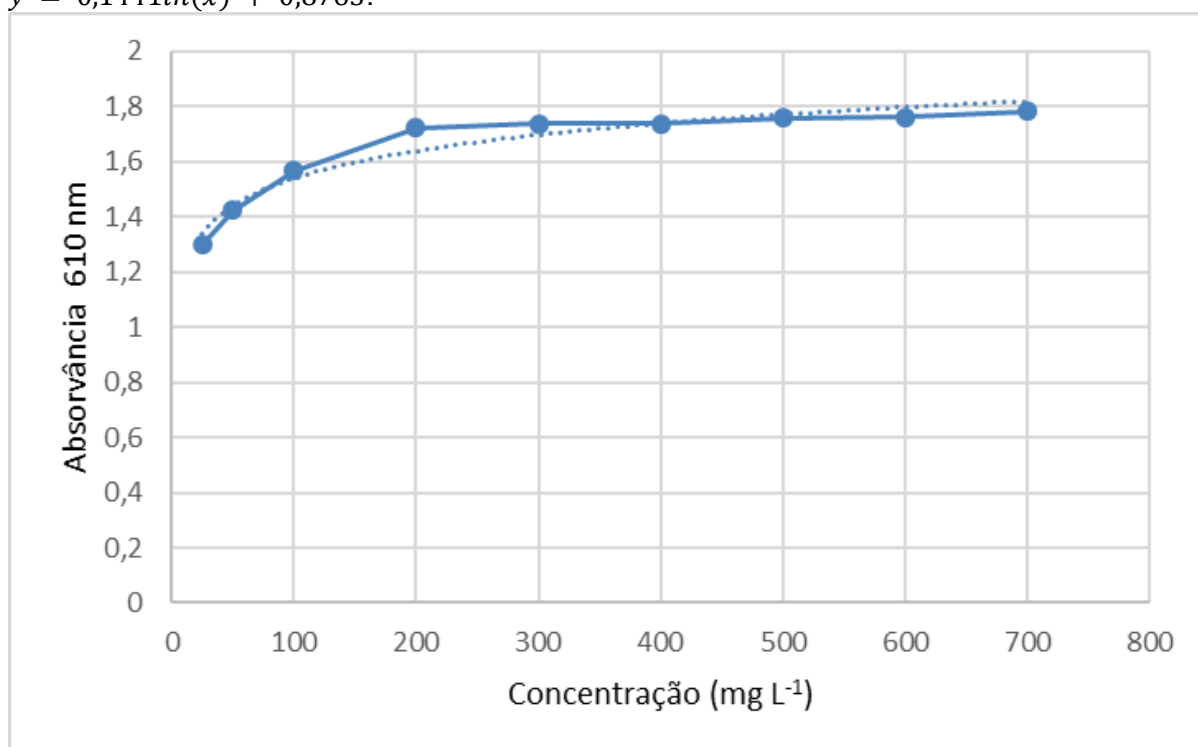
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Abs. 610nm</b>
25	1,29995
50	1,424
100	1,5662
200	1,7223
300	1,7372
400	1,73745
500	1,7581
600	1,76085
700	1,78175

Quadro 7. Dados de absorvância para a curva padrão de surfactina.

A partir da regressão dos dados obtidos, foi gerada a seguinte equação:

$y = 0,1441\ln(x) + 0,8763$ , com  $R^2 = 0,9423$ . O gráfico da equação está disposto na figura 4.

Figura 4 – Curva padrão de absorvância da surfactina comercial, gerada a partir da equação  $y = 0,1441\ln(x) + 0,8763$ .



No quadro 8 estão os valores de absorvância obtidos de cada amostra e os valores equivalentes de concentração, com comparação com os valores de quantificação obtidos por UPLC-MS/MS.

Quadro 8. Absorvâncias e concentrações de surfactina obtidas a partir das amostras em estudo.

Unidade	Abs. 610 nm	Concentração de surfactina CPC-BTB (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de surfactina UPLC-MS/MS (mg L <sup>-1</sup> )
1	1,4053	19,6468	4,775191
2	1,3977	18,63746	3,189253
3	1,3752	15,94319	5,325704
4	1,29125	8,903552	3,312586
5	1,386033	17,18799	4,782191
6	1,390867	17,77428	4,497271
7	1,410233	20,33107	4,271062
8	1,378367	16,29743	4,474

Unidade	Abs. 610 nm	Concentração de surfactina CPC-BTB (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração de surfactina UPLC-MS/MS (mg L <sup>-1</sup> )
9	1,387867	17,40807	4,746176
10*	1,056233	-	0
11	1,328733	11,54867	3,835768
Controle	1,3613	14,47714	3,463797

\*Não quantificável pelo método CPC-BTB. Devido à baixa concentração de surfactina na unidade 10, foi impossível quantificá-la. O valor de absorvância apresentado nesta amostra corresponde a uma concentração de 4000 mg L<sup>-1</sup> de extrato bruto.

Nas figuras 5 e 6 estão o resultado visual obtido com o método CPC-BTB e um gráfico comparativo dos resultados obtidos por ele e por UPLC-MS/MS.

Figura 5 – Resultados visuais do método CPC-BTB. Poços nas colunas de 1 a 11 correspondem às amostras 1 a 11, poços da coluna 12 correspondem ao controle.

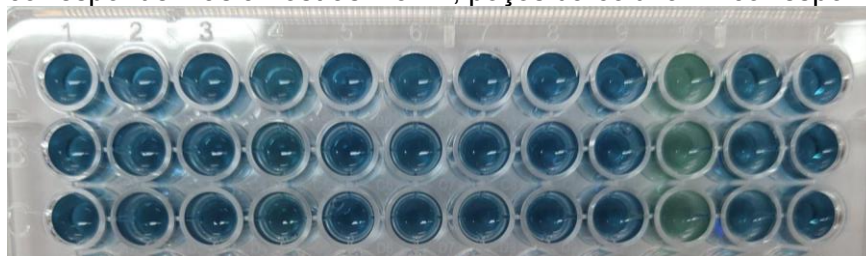
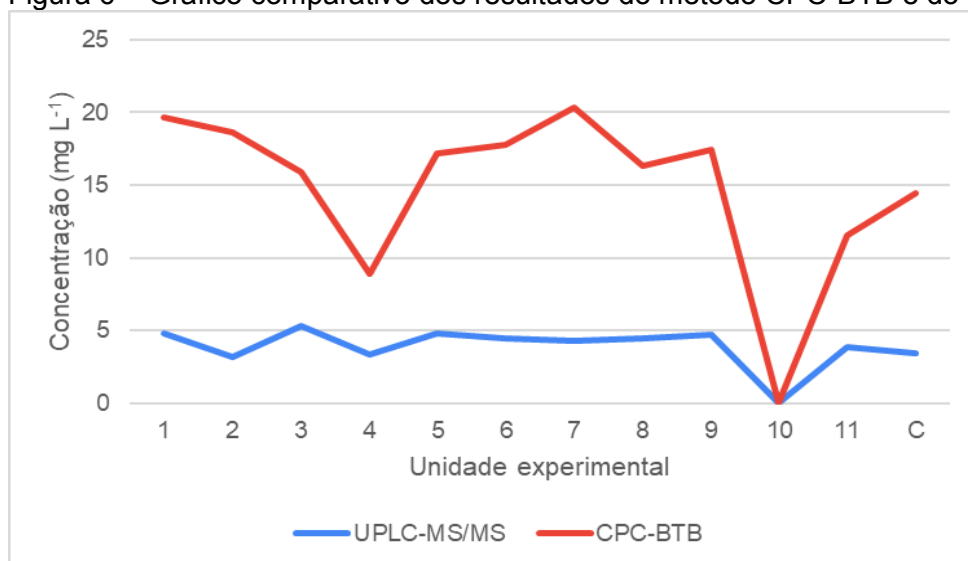


Figura 6 – Gráfico comparativo dos resultados do método CPC-BTB e do UPLC-MS/MS.



A constante  $\beta_1$  foi determinada como 3,753, gerando a equação  $\widehat{CPC} = 3,753 \times UPLC$ , com  $R^2 = 0,713$ . Desse modo, o método CPC-BTB variou em 265,3% a mais do que é aceitável, sendo rejeitada a equivalência entre os métodos.

#### 5.4. Superfície de resposta

No quadro 9 estão dispostas a matriz experimental e as respostas obtidas para cada combinação de variáveis independentes. A resposta de surfactina representa o rendimento obtido por litro de cultivo, com a concentração corrigida pelo rendimento de extrato bruto.

Unidade experimental	Soja (g L <sup>-1</sup> )	Açúcar (g L <sup>-1</sup> )	Respostas	
			CMC (mg L <sup>-1</sup> )	Surfactina (mg L <sup>-1</sup> )
1	23	14,4	17,19781	2,626354776
2	23	35,6	8,977364	1,677547248
3	82	14,4	17,19781	4,217957582
4	82	35,6	10,5616	0,970587733
5	55	10	23,8032	3,830535157
6	55	40	8,977364	3,130100852
7	55	25	10,5616	3,207567769
8	55	25	12,42542	3,096018201
9	55	25	17,19781	4,024757375
10	100	25	-	0
11	10	25	10,5616	0,280011074
C	-	-	12,42541762	1,167299497

Quadro 9. Matriz experimental do DCCR para avaliar as concentrações ideais de açúcar e farelo de soja para produção de surfactina e respostas obtidas.

Foram realizadas análises de regressão múltipla para gerar os modelos preditivos das respostas e função das variáveis independentes.

Como não foi possível determinar a CMC da amostra 10, para gerar a equação modelo com base na resposta da CMC, foram usados os valores obtidos com as

demais unidades experimentais. Considerando CAC=Concentração de açúcar, temos a equação:

$$\widehat{DMC} = 32,399 - 1,1787 \times CAC + 0,015129 \times CAC^2, \text{ com } R^2 = 0,8233$$

O ponto crítico da parábola foi determinado em 38,95 (concentração de açúcar) e  $\widehat{CMC}_{min} = 9,44$ .

Analisando a equação e observando o gráfico, conclui-se que não houve interferência da concentração do farelo de soja na determinação da CMC.

Quanto à concentração de surfactina e considerando CSO=concentração de soja e SUF=surfactina, temos a equação:

$$\widehat{SUF} = -0,9432 + 0,1588 \times CSO - 0,001417 \times CSO^2, \text{ com } R^2 = 0,5817.$$

O ponto crítico da parábola foi definido como 56,04 (concentração de soja) e  $\widehat{SUF}_{max} = 3,51$ .

Deste modo, para a produção de surfactina, não houve interferência da concentração de açúcar.

Os gráficos de superfície de resposta gerados para as respostas de CMC e surfactina estão apresentados nas figuras 7 e 8, respectivamente.

Figura 7 – Gráfico de superfície de resposta gerado pelo modelo ajustado a partir dos dados de CMC.

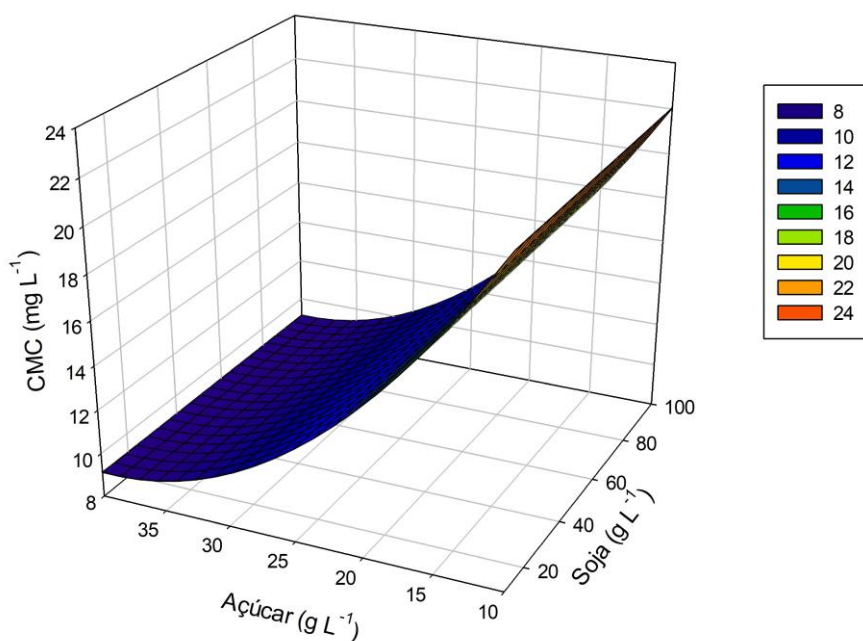
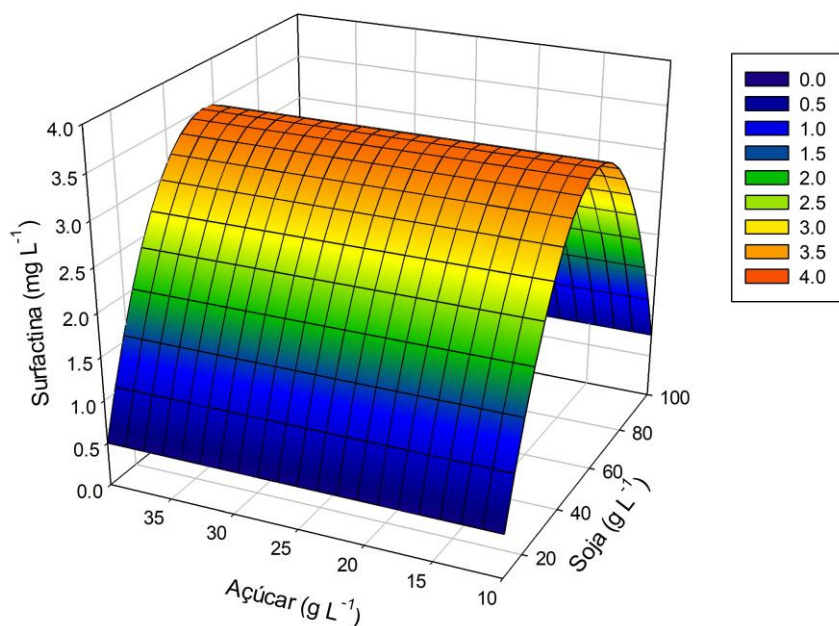


Figura 8 – Gráfico de superfície de resposta gerado pelo modelo ajustado a partir dos dados de produção de surfactina.



### 5.5. Espalhamento de óleo

Os resultados dos ensaios de espalhamento de óleo estão apresentados no quadro 10. Todas as amostras tiveram resultado positivo para a formação de halo, exceto a unidade 10. Os valores médios de diâmetros variaram entre 3,28 e 5,08 para as unidades experimentais, sendo de 4,57 o diâmetro médio gerado com o meio padrão.

Unidade	Diâmetro do halo (cm)
1	5,05
2	4,78
3	4,1
4	3,28
5	4,83
6	4,43
7	4,8
8	4,2
9	5,08

<b>Unidade</b>	<b>Diâmetro do halo (cm)</b>
<b>10</b>	-
<b>11</b>	4,97
<b>Controle</b>	4,57

Quadro 10. Valores obtidos no espalhamento de óleo.

### **5.6. Índice de emulsificação**

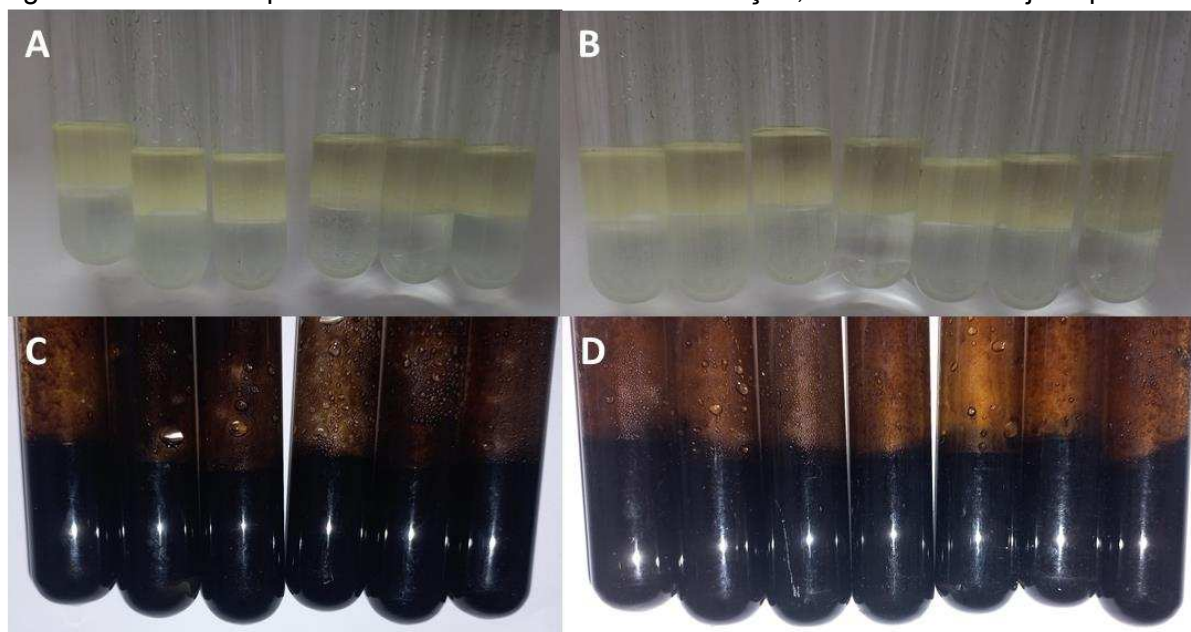
Os resultados de índice de emulsificação com óleo de soja e petróleo estão dispostos no quadro 11, não tendo sido obtidos valores significativos para o óleo de soja enquanto, para o petróleo, a emulsificação foi de 100% para todas as amostras.

<b>Amostra</b>	<b>IE<sub>24</sub> óleo de soja (%)</b>	<b>IE<sub>24</sub> petróleo (%)</b>
Branco	11,87286	100
1	4,497138	100
2	2,929688	100
3	3,182695	100
4	5,336584	100
5	0,342173	100
6	2,335944	100
7	2,119407	100
8	0,769016	100
9	2,673044	100
11	0,704323	100
Controle	1,282397	100

Quadro 11. Valores médios de índice de emulsificação para óleo de soja e petróleo.

Na figura 9 estão apresentadas fotos dos ensaios de emulsificação com óleo de soja e petróleo.

Figura 9 – Ensaio para cálculo do índice de emulsificação, com óleo de soja e petróleo.



**A:** Testes de emulsificação entre óleo de soja e água, respectivamente: branco, 1, 2, 3, 4 e 5; **B:** Testes de emulsificação entre óleo de soja e água, respectivamente: branco, 6, 7, 8, 9, 11 e controle; **C:** Testes de emulsificação entre petróleo e água, respectivamente: branco, 1, 2, 3, 4 e 5; **D:** Testes de emulsificação entre petróleo e água, respectivamente: branco, 6, 7, 8, 9, 11 e controle. Fonte: este trabalho.

## 6. DISCUSSÃO

O meio padrão (controle), embora seja composto por um maior número de reagentes, gerou uma produção de extrato bruto inferior a oito das onze unidades experimentais. Além disso, no ensaio de espalhamento de óleo, 6 das 11 unidades experimentais apresentaram valores de diâmetros maiores que o do meio padrão. Essas respostas sugerem um metabolismo mais ativo nessas amostras.

Quanto às medidas de tensão superficial, os valores obtidos na amostra 10 foram consideravelmente superiores aos das demais, iniciando com uma tensão acima de  $35 \text{ mN m}^{-1}$  a concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ , enquanto as demais iniciam em pelo menos  $31 \text{ mN m}^{-1}$ . Além disso, o controle apresentou valores de tensão maiores que todas as outras amostras, indicando que os cultivos com farelo de soja foram mais eficientes em reduzir a tensão superficial que o cultivo com o meio mineral padrão.

Foram obtidos valores de CMC significativamente baixos e próximos a CMC da surfactina pura, que é de aproximadamente  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , segundo Yeh *et al.* (2008). Isso indicaria a produção de um extrato bruto rico em surfactina, em especial nas amostras 2 e 6, com CMC abaixo de 9. Outro ponto importante é que as CMCs das amostras 2, 4, 6, 7, 8 e 11 são menores ou iguais à CMC da amostra produzida pelo meio

padrão (controle). Ou seja, embora bem mais barato, os meios dessas amostras conseguiram induzir uma produção de surfactina equivalente ou acima à gerada pelo meio mineral.

Entretanto, apesar destes resultados sugerirem uma alta produção de surfactina, a quantificação por UPLC-MS/MS retornou valores consideravelmente baixos da molécula, chegando a ser igual a 0 mg L<sup>-1</sup> na amostra 10. Além dos biosurfactantes, compostos hidrofóbicos e proteicos também podem agir sobre a tensão superficial, reduzindo a CMC (SIDIM E ACAR, 2013; WOJCIECHOWSKI, 2022). Levando isso em consideração, apesar da baixa concentração de lipídios (5%), há a possibilidade dos lipídios e proteínas presentes no farelo de soja terem sido liberados com a moagem, alterando os resultados de tensão superficial. Além disso, a moagem de resíduos de soja altera a solubilidade do composto e sua capacidade de se ligar ao óleo e de reter água, o que pode afetar a tensão superficial, caso as partículas não tenham sido totalmente removidas (LI *et al.*, 2020). Este resultado sugere que a tensão superficial pode não ser a melhor forma de identificar a produção de biosurfactantes, uma vez que uma amostra com a concentração de 0 mg L<sup>-1</sup> apresentou um valor de tensão inicial igual a metade da tensão superficial da água pura (35 mN m<sup>-1</sup>).

Apesar disso, os resultados da quantificação por UPLC-MS/MS revelaram que 8 dos 11 meios com farelo de soja estudados de fato produziram mais surfactina que o meio mineral padrão.

Na análise de superfície de resposta, os resultados mostraram influência apenas da concentração de açúcar sobre a CMC, enquanto na surfactina houve apenas influência do farelo de soja, o que reforça a hipótese de interferentes dos meios de cultivo estarem afetando os valores de tensão superficial. Deste modo, neste trabalho será priorizado o resultado obtido pela quantificação de surfactina por UPLC-MS/MS, pois é um método refinado que sofre menos com a ação de interferentes. Sendo assim, as concentrações otimizadas de farelo de soja e de açúcar para o meio de cultivo em estudo são, respectivamente: 56,04 g L<sup>-1</sup> e 10 g L<sup>-1</sup> (menor concentração utilizada).

A ausência de surfactina na unidade experimental 10, única que possui a concentração máxima de farelo de soja analisada neste trabalho (100 g L<sup>-1</sup>), sugere que, acima de certa quantidade, ele começa a inibir a produção de surfactina. Essa alteração no padrão de produção da molécula pode ser explicada pela alta carga

orgânica presente neste meio, que pode ter causado aumento da viscosidade do cultivo, o que dificulta a oxigenação (ROCHA-VALADEZ *et al.*, 2007) ou ainda ter estimulado um metabolismo sobrecarregado, acumulando substratos devido a conversão insuficiente (HILLER *et al.*, 2024).

O método colorimétrico CPC-BTB demonstrou-se ineficiente em quantificar a surfactina. Entretanto, seu uso é de interesse como forma de identificação da produção do biossurfactante, uma vez que não sofreu influência de contaminantes, como o que ocorreu com a tensão superficial.

Para a determinação do índice de emulsificação, a concentração da CMC não foi capaz de gerar um resultado significativo (acima de 50%) com o óleo de soja (FERNANDES *et al.*, 2024). Entretanto, com o petróleo, houve emulsificação em todas as amostras. Esse resultado era esperado, uma vez que as emulsões do tipo água em óleo são comuns no processo de recuperação do petróleo. Isso se dá pelo fato de o próprio petróleo possuir componentes com ação emulsificante, como asfaltenos e ácidos naftênicos (SOUZA, 2009). Os biossurfactantes poderiam agir, nesta emulsão, invertendo-a para o tipo óleo em água, restringindo a área de contato do óleo (FONSECA *et al.*, 2016). Nos estudos de Bhattacharya (2015), a taxa de emulsificação do caldo de cultura de *Ochrobactrum* sp. com óleo de motor demonstrou um coeficiente de correlação de 0,972 com a eficiência do microrganismo em degradar o óleo. Deste modo, uma vez que a concentração dos biossurfactantes utilizada no teste foi capaz de manter a emulsão, eles têm potencial de aplicação no desenvolvimento de métodos para a biodegradação do petróleo.

Nos quadros 12, 13 e 14 estão descritos os preços aproximados dos reagentes que compõem os meios de cultura utilizados neste estudo. Os preços foram coletados a partir de dados dispostos em sites de venda de reagentes químicos em escalas de 10g a 1kg, dependendo do reagente.

Quadro 12. Custo dos reagentes no meio otimizado.

Reagente	g L <sup>-1</sup> usada	Preço médio (R\$ g <sup>-1</sup> )	Custo (R\$ L <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub>	0,05	~0,15	0,0075
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,005	~0,05	0,00025
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0018	~0,05	0,00009
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,025	~0,08	0,002

Reagente	g L <sup>-1</sup> usada	Preço médio (R\$ g <sup>-1</sup> )	Custo (R\$ L <sup>-1</sup> )
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,022	~0,20	0,0044
Extrato de levedura	0,01	~0,60	0,006
L-triptofano	0,01	~1,00	0,01
L-arginina	0,01	~1,00	0,01
Farelo de soja	56,04	~0,005	0,2802
Açúcar	10	~0,005	0,05

Consultas realizadas no dia 07/06/2025.

Quadro 13. Custo dos reagentes usados no meio padrão (controle), sem a solução de micronutrientes.

Reagente	g L <sup>-1</sup> usada	Preço médio (R\$ g <sup>-1</sup> )	Custo por litro (R\$)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,9	~0,15	2,085
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,7	~0,15	0,405
Extrato de levedura	0,05	~0,60	0,03
NaNO <sub>3</sub>	4,24	~0,06	0,2544
Glicose (anidra)	40	~0,06	2,4

Consultas realizadas no dia 07/06/2025.

Quadro 14. Custo dos reagentes usados na solução de micronutrientes.

Reagente	g L <sup>-1</sup> na solução	g L <sup>-1</sup> no meio (50 mL)	Preço (R\$ g <sup>-1</sup> )	Custo (R\$ L <sup>-1</sup> )
EDTA	0,5	0,025	~0,18	0,0045
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,0	0,15	~0,05	0,0075
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,5	0,025	~0,08	0,002
NaCl	1,0	0,05	~0,04	0,002
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1	0,005	~0,05	0,00025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1	0,005	~0,34	0,0017
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	0,005	~0,15	0,00075
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1	0,005	~0,08	0,0004

Reagente	g L <sup>-1</sup> na solução	g L <sup>-1</sup> no meio (50 mL)	Preço (R\$ g <sup>-1</sup> )	Custo (R\$ L <sup>-1</sup> )
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01	0,0005	~0,10	0,00005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01	0,0005	~0,87	0,000435
Na <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Se	0,01	0,0005	~47,1	0,02355
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01	0,0005	~1,17	0,000585
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,02	0,001	~0,28	0,00028

Consultas realizadas no dia 07/06/2025.

Deste modo, o preço do meio mineral padrão é R\$5,2184 por litro, enquanto do meio otimizado com farelo de soja e açúcar é R\$0,3704. Ou seja, além de gerar maior produção de surfactina, o meio otimizado é mais de 14 vezes mais barato que o meio mineral padrão.

## 7. CONCLUSÃO

O meio otimizado com farelo de soja e açúcar demonstrou-se ainda mais eficiente que o meio mineral padrão na produção de biossurfactantes pelo *B. subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA. Ele obteve valores melhores de CMC, concentração de surfactina, rendimento bruto e espalhamento de óleo. Cabe ressaltar também, que seu custo é 14 vezes menor, o que abre portas para uma utilização mais ampla de biossurfactantes, em setores em que sua aplicação não era viável devido ao custo elevado. Além da redução do custo direto, neste trabalho não houve filtração prévia do farelo de soja, removendo uma etapa laboriosa e que adicionava custos à produção, o que não havia sido empregado até então para a produção de biossurfactantes.

A tensão superficial apresentou-se uma resposta sensível a contaminantes quando se trabalha com meios complexos. O método CPC-BTB, embora inadequado para a quantificação da surfactina, demonstrou-se menos suscetível aos interferentes que a tensão superficial, sendo uma opção de uso para a detecção da surfactina.

O uso de farelo de soja em concentrações acima de 82 g L<sup>-1</sup> demonstrou-se inibidor da produção de surfactina. Um estudo mais aprofundado das características da interação química entre o farelo de soja e o meio de cultivo, bem como dos

componentes envolvidos na síntese da surfactina, é necessário para determinar o processo exato que impediu sua produção.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

53° CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 2023, Brasília. **Anais do 53° CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2023. 751 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1161662/1/PC-LV-CNPB-05022024-INOUE-NAGATA.pdf>. Acesso em: 08/06/2025.

ABDEL-MAWGOUD, Ahmad Mohammad; ABOULWAFI, Mohammad Mabrouk; HASSOUNA, Nadia Abdel-Haleem. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 150, n. 3, p. 289-303, 25 abr. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z>.

ALMEIDA, Michelle Fernandes. **Produção de surfactina pela linhagem geneticamente modificada *Bacillus subtilis* LBBMA RI4914 IsrfA utilizando glicerol como fonte de carbono**. 2022. 135 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2022. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/b43b05a2-8ad1-436b-aacf-43acfe9e39c9>. Acesso em: 10 maio 2025.

BADMUS, Suaibu O. *et al.* Environmental risks and toxicity of surfactants: overview of analysis, assessment, and remediation techniques. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 44, p. 62085-62104, 29 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-16483-w>

BARION MASSI, Juliana. **Farelo de soja e casca de arroz para a produção de lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**. 2014. 127 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/items/a1e81219-ead59-4ef1-bb52-cd0ddf3b3448/full>. Acesso em: 10 maio 2025.

BHATTACHARYA, Munna *et al.* Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1. **3 Biotech**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 807-817, 3 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-015-0282-9>.

BINIARZ, Piotr *et al.* Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 101, n. 11, p. 4747-4759, 22 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8272-y>.

CAETANO, Flávia de Faria. **Aproveitamento do farelo de soja no desenvolvimento de meios e processos para a obtenção de produtos proteicos e derivados**. 2012. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-27092012-092030/>. Acesso em: 20 jun. 2025.

COLDEBELLA, Ivanir José; RADÜNZ NETO, João. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, [S.L.], v. 32, n. 3, p. 499-503, jun. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782002000300021>.

CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO E GÁS, 4., 2007, Campinas. **IV PD PETRO**. Campinas: Unicamp, 2007. Disponível em: [https://www.portalabpg.org.br/site\\_portugues/anais/anais4/trabalhos.htm](https://www.portalabpg.org.br/site_portugues/anais/anais4/trabalhos.htm). Acesso em: 26 jun. 2025.

DELEU, Magali *et al.* Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [S.L.], v. 1828, n. 2, p. 801-815, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.007>.

DENTI, Andressa Franco *et al.* Distribuição granulométrica e caracterização de partículas de farinha de soja. In: SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, 11., 2021, Passo Fundo. **11º Simpósio de alimentos**. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2021. Disponível em: <https://www.upf.br/simposiosial/trabalhos-cientificos/anais/xi-sial-2021>. Acesso em: 18 jun. 2025.

DIXON, Philip M. *et al.* A Primer on the Use of Equivalence Testing for Evaluating Measurement Agreement. **Medicine & Science In Sports & Exercise**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 837-845, abr. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1249/mss.0000000000001481>.

EGÍDIO, Karina Estrela *et al.* Estudo granulométrico do resíduo da palha de feijão para efeito benéfico no processo de obtenção do bioetanol. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1-18, 8 set. 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7891>

FÉLIX, Jéssica da Silva. **Otimização da produção de lipopeptídeos por *Bacillus velezensis* visando ao controle de fungos fitopatogênicos**. 2023. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2023. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/8d168441-79d0-49b5-960f-932f6cde0fbf/full>. Acesso em: 10 maio 2025.

FERNANDES, P. L.; RODRIGUES, E. M.; MCINERNEY, M. J.; TÓTOLA, M. R. **Microbial enhanced oil recovery**: Use of metabolic products of *Bacillus subtilis* RI4914 in non-consolidated porous media and influence of environmental parameters. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, [s. l.], vol. 697, 20 set. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2024.134431>.

FLEURI, Luciana Francisco. *et al.* Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. *Food Sci Biotechnol* 23, 1199–1205 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0164-7>

FONSECA, Marchielle Bortole *et al.* Geração de emulsões de petróleo A/O e O/A sem a adição de surfactante. **Latin American Journal Of Energy Research**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 10-16, 20 set. 2016. Latin American Journal of Energy Research. <http://dx.doi.org/10.21712/lajer.2016.v3.n1.p10-16>.

FONSECA, Tainã Crisia de Souza *et al.* Multifunctional, stable and low-cost lipopeptide biosurfactant produced by *Enterobacter cloacae* UCP 1597. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 11, n. 15, p. 1-18, 9 nov. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i15.36353>

GILIO, Luana Aparecida. **Meios de cultura para produção de endósporos por *Bacillus velezensis***. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2023. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/56664>. Acesso em: 10 jun. 2025.

GOUVEIA, Alison Batista Vieira Silva *et al.* Subprodutos da soja na alimentação de aves: revisão. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 1-28, 22 maio 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4187>.

HERNÁNDEZ, Marcos López *et al.* Proteins and biosurfactants: structures, functions, and recent applications. **Current Opinion In Colloid & Interface Science**, [S.L.], v. 68, p. 101746, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2023.101746>.

HEYD, M. *et al.* Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, [S.L.], v. 391, n. 5, p. 1579-1590, 6 mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-007-1828-4>.

HILLER, Eric *et al.* The influence of growth rate-controlling feeding strategy on the surfactin production in *Bacillus subtilis* bioreactor processes. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 23, n. 1, 30 set. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-024-02531-w>.

INGHAM, Benjamin *et al.* Determining the accuracy and suitability of common analytical techniques for sophorolipid biosurfactants. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 51, n. 0, p. 1-1, 21 jun. 2024. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jimb/kuae021>.

ISAAC, Ephraim. Effect of Particle Size on the Dissolution Rate of Solids in Liquids in Ethiopia. **European Journal Of Physical Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 44-54, 21 maio 2024.

LI, Guanghui; *et al.* Effect of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of soybean residue powder. **Food Science & Nutrition**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 1208-1214, 27 jan. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.1409>.

RAMOS, André Santos Ferreira Tavares. **Farelo de soja como substrato para a produção de proteases por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade

Estadual de Londrina, Londrina, 2017. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/items/40b4ba28-f77e-4abe-8966-d81f355d1053>. Acesso em: 10 maio 2025.

REIS, Cristiane Bianchi Loureiro dos. **Produção de quitinases e biossurfactantes fúngicos por processos fermentativos**. 2017. 78 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/13545>. Acesso em: 10 maio 2025.

ROCHA-VALADEZ, J. A. *et al.* A fermentation system designed to independently evaluate mixing and/or oxygen tension effects in microbial processes: development, application and performance. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 115-122, 17 jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-006-0108-6>.

SHEKHAR, Sudhanshu *et al.* Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: a review. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology**, [S.L.], v. 45, n. 14, p. 1522-1554, 26 set. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2014.955631>.

SIDIM, Taliha; ACAR, Gökhan. Alcohols Effect on Critic Micelle Concentration of Polysorbate 20 and Cetyl Trimethyl Ammonium Bromine Mixed Solutions. **Journal Of Surfactants And Detergents**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 601-607, 5 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1007/s11743-012-1429-x>.

Soberón-Chávez, G., Maier, R.M. (2011). Biosurfactants: A General Overview. In: Soberón-Chávez, G. (eds) Biosurfactants. Microbiology Monographs, vol 20. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_1)

SOUZA, Joyce Faria de. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção e aplicação de enzimas, extração de amido e produção de leveduras fibrolíticas a partir de resíduos agroindustriais**. 2020. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/entities/publication/3fad0097-44fc-4949-a5c0-f0008e67b45d>. Acesso em: 22 maio 2025.

SOUZA, Troner Assenheimer de. **Inversão de emulsões de petróleo usando partículas sólidas**. 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/22636>. Acesso em: 04 jul. 2025.

STEENE, Jet C. van de *et al.* Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. **Journal Of The American Society For Mass Spectrometry**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 713-718, 1 maio 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2008.01.013>.

TREFILOV, V. S. *et al.* Instrumental Approaches to the Detection and Quantification of Surfactin. **Russian Journal Of Bioorganic Chemistry**, [S.L.], v. 51, n. 2, p. 465-

490, abr. 2025. Pleiades Publishing Ltd.  
<http://dx.doi.org/10.1134/s1068162024606517>.

WALTER, Vanessa; SYLDATK, Christoph; HAUSMANN, Rudolf. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], p. 1-13, 2010. Springer New York.  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1).

WOJCIECHOWSKI, Kamil. Surface tension of native and modified plant seed proteins. **Advances In Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 302, p. 0-0, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2022.102641>.

YANG, Huan; YU, Huimin; SHEN, Zhongyao. A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. **Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 42, n. 8, p. 1139-1147, 1 ago. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-015-1635-4>.

YEH, Mao-Sung *et al.* Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. **Biotechnology Progress**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 1329-1334, 5 set. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp050040c>.

YONEDA, Tadashi *et al.* **Production process of surfactin**. USA n. US 7,011,969 B2. Depósito: 28 set. 2001. Concessão: 14 mar. 2006.

ZAMBOM, Maximiliane Alavarse; SANTOS, Geraldo Tadeu dos; MODESTO, Elisa Cristina; ALCALDE, Claudete Regina; GONÇALVES, Geane Dias; SILVA, Daniele Cristina da; SILVA, Karina Toledo da; FAUSTINO, Josiane Oliveira. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, [S.L.], v. 23, p. 937, 9 maio 2008. Universidade Estadual de Maringá.  
<http://dx.doi.org/10.4025/actascianimsci.v23i0.2648>.

ZHOU, Yingjun *et al.* Optimization of fermentation conditions for surfactin production by *B. subtilis* YPS-32. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 0-0, 26 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-023-02838-5>.