



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

ISABELLA SANTOS DE PAULA

**OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A
PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus subtilis***

**ARARAQUARA - SP
2024**

ISABELLA SANTOS DE PAULA

**OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A
PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus subtilis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para
obtenção do grau de Engenheira de
Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro de Baptista
Neto

ARARAQUARA – SP

2024

P324o

Paula, Isabella Santos de.

Otimização da composição do meio de cultivo para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* / Isabella Santos de Paula. – Araraquara, 2024.
83 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Álvaro de Baptista Neto.

1. Surfactina. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Vetor de oxigênio. 4. Meio de cultura. I. Baptista Neto, Álvaro de, orient. II. Título.

ISABELLA SANTOS DE PAULA

**OTIMIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO PARA A
PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus subtilis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela
em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Data da defesa: 09/12/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto

UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara

M.a. Vitória Fernanda Bertolazzi Zocca

UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara

M.e Vitor Teixeira Mazziero

UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara

M.e Júlio Gabriel Oliveira de Lima

UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri

UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora a quem tenho enorme fé e devoção e a quem tem me sustentado e me capacitado durante esses 5 anos da graduação, me concedendo força, sabedoria e conhecimento para ter chego até aqui.

Agradeço fielmente ao meus pais, Adriana e Alessandro que tudo fizeram por mim, por todo esforço, dedicação e incentivo que sempre foi concedido a sua única filha, motivo o qual tenho enorme estima e gratidão. Agradeço a todos da minha família, meus queridos avós Ademar e Maria Doraci, Francisco e Neusa (in memoria, mas que teve o privilégio de ver sua neta primogênita entrar na faculdade), meus tios e primos, que sempre contribuíram nessa jornada e me incentivaram aos estudos.

Agradeço ao meu trio de amigas, Ana Carolina Boralli, Bruna Lohane Prado e Maria Eduarda Figueiredo, que juntas formamos o quarteto da engenharia, compartilhando boas risadas, estudos, dificuldades, mas sempre apoiando umas a outras.

E claro, também agradeço muito, ao meu orientador Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto, por ter me aceito como sua aluna de iniciação científica, por toda orientação solícita, dedicação e paciência para com sua orientada, pelas correções e sugestões para que esse trabalho fosse feito e finalizado com excelência, finalizo esse trabalho com a escolha certa do meu orientador. Agradeço também com carinho a Prof. Dra Danielle Biscaro Pedrolli, que teve grande importância nesse trabalho, pois gentilmente cedeu o microrganismo que foi estudado, e sua aluna doutoranda Vitória Zocca, quem se dispôs a me ajudar no começo da minha iniciação científica.

Agradeço imensamente a Universidade Estadual Paulista, em especial a Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP em conjunto com o Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (DEBB), por todas as oportunidades e aprendizados que me proporcionaram ao longo desses anos para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

E também agradeço com muito estima a Pró-Reitoria de Pesquisa UNESP (PROPe), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro e científico para realização deste trabalho científico e também na contribuição do meu aprendizado.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com
classe e vencer com ousadia, pois o mundo
pertence a quem se atreve, e a vida é muito
bela para ser insignificante”

(Charlie Chaplin)

RESUMO

A surfactina é um biossurfactante produzido a partir de meios de cultura adequados para o cultivo de cepas de *Bacillus subtilis*, que apresentam alta capacidade de produção. Através desses cultivos, obtém-se caldos com significativa atividade surfactante, o que permite diversas aplicações industriais. Sua produção ocorre por meio de processos aeróbicos, nos quais são utilizados meios de cultivo de alta qualidade, com fontes adequadas de carbono e nitrogênio, além de parâmetros otimizados, como a velocidade de transferência de oxigênio, o pH e a quantidade de nutrientes adicionados ao longo do processo. Uma estratégia para melhorar a transferência de oxigênio no caldo de cultivo, sem a necessidade de aumentar a frequência de agitação ou a vazão de ar, é a utilização de vetores de oxigênio. Esta abordagem pode contribuir significativamente para a produção do biossurfactante, uma molécula que facilita a formação de espumas. Este estudo teve como objetivo investigar o processo de produção da surfactina utilizando uma linhagem bacteriana geneticamente modificada de *Bacillus subtilis*, visando a otimização do meio de cultura e a validação da composição otimizada por meio de um modelo. Além disso, o trabalho incluiu a avaliação do uso de vetores de oxigênio na produção de surfactina. Na primeira fase da pesquisa, foram realizados testes para avaliar a composição do meio de cultivo, além de uma análise preliminar para otimizar o processo. Na segunda fase, foram estudadas diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, a fim de identificar aquelas que mais influenciam a produção. Além disso, foram conduzidos experimentos planejados para testar diferentes concentrações dos principais componentes do meio de cultura PW. Dada a complexidade dos resultados, optou-se por otimizar o processo utilizando modelos de redes neurais. Finalmente, avaliou-se o uso de vetores de oxigênio, como n-dodecano e n-hexano, na produção de surfactina. Os resultados indicaram que a glicose é a fonte de carbono que promove a maior produção de surfactina. Em relação à análise estatística, nenhum modelo apresentou coeficiente de correlação ajustado, o que impossibilitou a otimização do processo por métodos estatísticos tradicionais. Consequentemente, a otimização foi realizada por meio de redes neurais, que geraram cinco composições candidatas. Apenas uma dessas composições foi confirmada experimentalmente, resultando em um aumento de 2,4 vezes na produção de surfactina. Por fim, observou-se que a adição de n-hexano, em pequenas concentrações, contribuiu positivamente para a produção de surfactina.

Palavras-chave: surfactina; *Bacillus subtilis*; vetor de oxigênio; meio de cultura.

ABSTRACT

Surfactin is a biosurfactant produced from culture media suitable for the growth of *Bacillus subtilis* strains, which demonstrate a high production capacity. Through these cultures, broths with significant surfactant activity are obtained, enabling various industrial applications. Its production occurs through aerobic processes using high-quality culture media with appropriate carbon and nitrogen sources, as well as optimized parameters such as oxygen transfer rate, pH, and the amount of nutrients added during the process. An effective strategy to improve oxygen transfer in the culture broth, without increasing agitation frequency or air flow rate, is the use of oxygen vectors. This approach can significantly enhance the production of the biosurfactant, a molecule that facilitates foam formation. This study aimed to investigate the production process of surfactin using a genetically modified *Bacillus subtilis* strain, focusing on culture medium optimization and the validation of the optimized composition through modeling. Additionally, the study evaluated the use of oxygen vectors in surfactin production. In the first phase of the research, tests were conducted to assess the composition of the culture medium, along with a preliminary analysis to optimize the process. In the second phase, different carbon and nitrogen sources were studied to identify those that most influence production. Furthermore, planned experiments were performed to test various concentrations of the main components of the PW culture medium. Given the complexity of the results, process optimization was carried out using neural network models. Finally, the use of oxygen vectors, such as n-dodecane and n-hexane, in surfactin production was evaluated. The results indicated that glucose is the carbon source that promotes the highest surfactin production. Regarding statistical analysis, none of the models presented an adjusted correlation coefficient sufficient for process optimization using traditional statistical methods. Consequently, optimization was performed using neural networks, which generated five candidate compositions. Only one of these compositions was experimentally validated, resulting in a 2.4-fold increase in surfactin production. Finally, it was observed that the addition of n-hexane, in small concentrations, positively contributed to surfactin production.

Keywords: surfactin; *Bacillus subtilis*; oxygen vector; culture media.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Placa de Petri após 24h de incubação da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> em meio LB sólido.....	31
Figura 2 - Frasco fermentado com meio LB após 48h de produção e 10% de inóculo	32
Figura 3- Concentração celular em relação às diferentes condições de produção em meio LB.....	32
Figura 4 - Resultado visual da produção de surfactina em meio LB após 48 horas de produção	33
Figura 5 - Frasco fermentado com meio PW após 24h de produção e diferentes porcentagens de inóculo.....	35
Figura 6 - Concentração celular em relação às diferentes condições de produção em meio PW.....	35
Figuras 7 (A e B) - Resultado visual da produção de surfactina em meio PW e meio Fosfato nos tempos de 24h e 48h, respectivamente	36
Figura 8 - Concentração de surfactina produzida em meio PW.....	37
Figura 9 - Frascos fermentados com meio Fosfato após 24h de produção e diferentes concentrações de inóculo	38
Figura 10 - Concentração celular em relação às diferentes condições de produção em meio Fosfato.....	38
Figura 11 - Concentração celular em diferentes fontes de carbono e nitrogênio em 24h e 48h.....	40
Figura 12 - Concentração de surfactina em diferentes fontes de carbono e nitrogênio em 24h e 48h	40
Figura 13 - Correlação entre o índice de emulsificação (%) e a concentração de surfactina (mg/L).....	42
Figura 14 - Resultado visual da produção de surfactina no planejamento experimental.....	43
Figura 15 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina.....	45
Figura 16 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h.....	48
Figura 17 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do	

planejamento experimental em 48h	49
Figura 18 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina.....	50
Figura 19 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 1 em 48h.....	51
Figura 20 - Gráfico de Pareto para valores de índice de emulsificação (IE%) obtidos pelo planejamento experimental 1 em 48h.....	51
Figura 21 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h	53
Figura 22 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h	53
Figura 23 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina.....	54
Figura 24 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 2 em 48h.....	55
Figura 25 - Gráfico de Pareto para valores de índice de emulsificação (IE%) obtidos pelo planejamento experimental 2 em 48h.....	55
Figura 26 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 24h	56
Figura 27 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 24h	57
Figura 28 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h	58
Figura 29 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h	58
Figura 30 - Correlação entre o índice de emulsificação (%) e a concentração de surfactina (mg/L).....	59
Figura 31 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 3 em 24h.....	60
Figura 32 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 3 em 48h.....	61
Figura 33 - Gráfico de Pareto para valores de índice de emulsificação (IE%) obtidos pelo planejamento experimental 3 em 48h.....	61
Figura 34 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento	

experimental em 24h	63
Figura 35 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 24h	63
Figura 36 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h	64
Figura 37 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h	65
Figura 38 - Correlação entre o índice de emulsificação (%) e a concentração de surfactina (mg/L).....	66
Figura 39 - Concentração celular da análise do uso de vetor de oxigênio em 24h	69
Figura 40 - Concentração de surfactina da análise do uso de vetor de oxigênio em 24h.....	70
Figura 41 - Concentração celular da análise do uso de vetor de oxigênio em 48h.	71
Figura 42 - Concentração de surfactina da análise do uso de vetor de oxigênio em 48h.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teste inicial de planejamento experimental com seus respectivos níveis de variação	26
Tabela 2 - Planejamento experimental 1 com seus respectivos níveis de variações	27
Tabela 3 - Planejamento experimental 2 com seus respectivos níveis de variações	28
Tabela 4 - Planejamento experimental 3 com seus respectivos níveis de variações	28
Tabela 5 - Concentração de surfactina em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio LB	34
Tabela 6 - Concentração de surfactina em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio Fosfato	39
Tabela 7 - Concentração de surfactina (mg/L) às diferentes condições de variações	44
Tabela 8 - Resultados da concentração de surfactina, índice de emulsificação e concentração celular.....	46
Tabela 9 - Análise estatística da concentração de surfactina (mg/L).....	47
Tabela 10 - Análise estatística do índice de emulsificação (IE%).....	47
Tabela 11 - Planejamento experimental com seus respectivos níveis de variações utilizando redes neurais artificiais.....	62
Tabela 12 - Valores do Somatório dos Erros ao Quadrado (SEQ) coeficiente de Pearson (R) obtido para cada uma das redes treinadas considerando a saída para Concentração de Surfactina e Índice de Emulsificação	67
Tabela 13 - Condição otimizada, valores previstos pela rede (Concentração de surfactina ou Índice de Emulsificação) e resultados experimentais obtidos.....	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Cp	Concentração de surfactina
DO	Densidade ptica
E(n)	Experimento
Ext Lev	Extrato de levedura
GL	Glicose
IE	ndice de emulsificação
LB	Lria Bertani
MF	Meio fosfato
PW	Meio PW

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1.SURFACTANTES	14
2.2.BIOSSURFACTANTES	14
2.3. <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	16
2.4.SISTEMA DE PRODUÇÃO	17
2.5.VETORES DE OXIGÊNIO	18
3.OBJETIVO GERAL.....	20
3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4.METODOLOGIA.....	21
4.1.MICROORGANISMOS	21
4.2.PREPARO DO INÓCULO E DO MEIO DE CULTIVO	21
4.3.MÉTODOS ANALÍTICOS	22
4.3.1.Determinação de surfactina	22
4.3.2.Determinação da concentração celular	23
4.3.3.Determinação da atividade emulsificante e do índice de emulsificação	23
4.3.4.Avaliação de fontes de carbono e fontes de nitrogênio	23
4.3.5.Testes com vetores de oxigênio.....	23
5.ANALÍSE ESTATÍSTICA.....	25
6.PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO	26
6.1.TESTE INICIAL DE PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	26
6.2.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 1	27
6.3.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2	27
6.4.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3	28
6.5.VALIDAÇÃO DO TREINAMENTO DA REDE NEURONAL	29
7.ANÁLISE POR REDE NEURONAL	30
8.RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
8.1.AVALIAÇÃO EM MEIO LURIA - BERTANI (LB).....	31
8.2.PRODUÇÃO EM MEIO PW	35
8.3.PRODUÇÃO EM MEIO FOSFATO	37
8.4.VARIAÇÕES DE FONTE DE CARBONO E NITROGÊNIO	39
8.5.TESTE INICIAL DE PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	43
8.6.PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 1	48

8.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2.....	52
8.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 3.....	56
8.9 VALIDAÇÃO DO TREINAMENTO DE REDES NEURONAIS ARTIFICIAS.....	62
8.10 ADIÇÃO DE VETORES DE OXIGÊNIO	68
9. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

De modo geral, a maioria dos surfactantes comercializados atualmente são obtidos principalmente por síntese química a partir de derivados de petróleo, produtos não biodegradáveis e com alta toxicidade (Freitas *et al.*, 2016). São utilizados em diversos ramos como emulsificantes, detergentes, dispersantes e dentre outros exemplos, que são descartados no meio ambiente, afetando negativamente a biota terrestre e aquática (Akbari *et al.*, 2018; Turbekar *et al.*, 2014; Kashif *et al.*, 2022). No entanto, por uma questão de proteção ambiental e saúde humana, os surfactantes biológicos têm ganhado visibilidade.

Para contornar esta problemática, os surfactantes são moléculas de origem microbiana, assim denominados biossurfactantes, são promissores na utilização da recuperação e remoção em derramamentos de petróleo, tratamento de águas residuárias, e no emprego dos mais diversos ramos industriais, como nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos com seu ótimo desempenho emulsificante, bem como na agroindústria, devido sua ação bactericida e fungicida, além de contribuir efetivamente na remoção de metais pesados de solo e água contaminada (Vieira *et al.*, 2021).

Assim, considerando a alta demanda da produção de surfactantes e estimativas futuras de seu uso crescente, prevê-se alto grau de impacto ambiental se não optar pelos biossurfactantes. Além do mais, a importância de estudos voltados à engenharia genética, especificamente o sistema de comunicação celular *quorum sensing* e a interação deste sistema com a otimização da produção de bioprodutos têm crescido e se tornado significativamente atrativa, visto que é de grande interesse obter produtos biotecnológicos resistentes e termodinamicamente estáveis. Logo, se faz necessário o conhecimento das características principais do gênero *Bacillus* alterado geneticamente e suas aplicações dentro da indústria de bioprocessos que empregam novas descobertas e técnicas da biotecnologia.

Outro ponto importante na execução é a avaliação dos vetores de oxigênio para a transferência de oxigênio. Como o processo de produção é um processo aeróbio, há a necessidade de agitação e aeração contínua do meio de cultivo para a transferência de oxigênio. A introdução do oxigênio nos meios de fermentação se caracteriza como uma das práticas mais importante para a cultura dos microrganismos aeróbicos, desempenhando um papel essencial no crescimento e economia dos sistemas de fermentação em larga escala (Galaction *et al.*, 2008).

Como a surfactina favorece a formação de espuma, é importante buscar métodos alternativos, como a introdução de vetores de oxigênio, para aumentar a transferência de oxigênio, a fim de atender à demanda do processo, especialmente em situações onde o excesso de espuma possa prejudicar a produção.

Sendo assim, o presente projeto visa a avaliação e otimização da composição do meio de cultura por *Bacillus subtilis* bem como as condições operacionais para produção do biosurfactante baseado no sistema de comunicação celular *quorum sensing* que induz esta produção. Além disso, a introdução de vetores de oxigênio em processos aeróbios com problemas relacionados ao excesso de espuma pode ser uma estratégia importante para desenvolver métodos de produção mais eficientes e econômicos para a surfactina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Surfactantes

Os surfactantes são compostos de caráter anfifílico, constituídos por grupos hidrofílicos e hidrofóbicos podendo ser de origem biológica ou química. Sua função é diminuir a tensão superficial entre sistemas bifásicos, proporcionando efeitos de detergência, emulsificação, dispersão, umectação e até mesmo formação de espuma (Chater; Bibb, 1997; Santos *et al.*, 2016; Sarubbo *et al.*, 2016).

Sua aplicação tem se estabelecido fortemente em vários ramos industriais, como em formulações cosméticas, fármacos, alimentos, bebidas, tintas, fertilizantes, produtos de limpeza e sua importância em processos de biorremediação de solos e águas (Varjani; Upasani, 2017).

O amplo uso dos surfactantes sintéticos, estes oriundos de derivados de petróleo, gera uma grande problemática desde a sua produção até o seu descarte, no qual seus resíduos são descartados em estações de tratamento de esgoto, em cursos d'água, em sedimentos, podendo ser dispersos para vários ambientes terrestres ou aquáticos, assim impactando-os e sendo um dos graves contaminantes para tratamento de águas residuárias (Ying, 2006; Mungray; Kumar, 2009; Palmer; Hatley, 2018).

2.2. Biosurfactantes

Diferentemente dos surfactantes sintéticos, os biosurfactantes são oriundos de sistemas biológicos, sendo metabólitos secundários produzidos por diversos microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) geralmente na fase estacionária, sendo isolados a partir de técnicas convencionais de cultivo, conferindo ótimas atividades que são vantajosas aos surfactantes sintéticos, como alta biodegradabilidade (reduzindo os níveis de poluição), baixa toxicidade, seletividade e biocompatibilidade com diversos substratos, aplicabilidade em um amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, biodisponibilidade, além disso, podem apresentar atividade antimicrobiana, antibiofilme, anti-adesiva e podem se ligar a metais potencialmente tóxicos, sendo consideradas moléculas multifuncionais (Bezza; Chirwa, 2015; Almeida *et al.*, 2016; Giri *et al.*, 2019).

São classificados mediante as suas propriedades e origem, cujas classes são: lipopeptídeos, glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos, lipoproteínas e surfactantes

poliméricos (Desai; Banat, 1997). Todavia, a maioria da microbiota existente é ainda inexplorada, e a abordagem metagenômica é capaz de permitir o acesso ao material genético dessa microbiota presente em ambientes heterogêneos, sendo uma ferramenta útil para investigar o potencial biossintético de uma população bacteriana (Jackson *et al.*, 2015; Sierra-Garcia *et al.*, 2020).

Em razão de sua multifuncionalidade, os biossurfactantes apresentam várias características que os tornam aplicáveis em diversos ramos industriais, podendo desempenhar as mais diversas funções. Segundo informações da pesquisa da Allied Market Research (2019), o mercado global de surfactantes proporciona pouco mais de US\$ 43 bilhões, e tende a evoluir com taxa de crescimento anual de 5 % a 9 %, prevista para o período 2019-2025, sendo esperado alcançar US\$ 66 bilhões. Este cenário destaca a importância econômica em escala mundial do emprego de surfactantes atualmente e nos próximos anos (Santiago *et al.*, 2019).

Ao citar um exemplo de biossurfactante tem-se a surfactina pertencente a classe dos lipopeptídeos cíclicos, a qual foi identificada em 1968 a partir do meio de cultura da bactéria *Bacillus subtilis*, conferindo atividades surfactantes com alto poder emulsificante e redução da tensão superficial de sistemas bifásicos em concentrações muito baixas (Soo *et al.*, 2004; Arima; Kakinuma; Tamura, 1968).

A surfactina é estruturalmente constituída por um anel peptídico hidrofílico de sete aminoácidos e uma cadeia hidrofóbica de ácido graxo β -hidroxi com comprimento de 12 a 16 átomos de carbono (Binizars; Lukaszewicz; Janek, 2017).

Além de sua atividade surfactante, possui atividades biológicas como antimicrobianas, antivirais e antitumorais, proporcionando diferentes aplicações como recuperação de petróleo, biopesticidas, processamento de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Shaligram; Singhal, 2010).

As surfactinas podem ser obtidas mediante aos processos fermentativos com uso de substratos renováveis e de baixo custo, visando fornecer fonte de carbono e energia (farelo de trigo, águas residuais de mandioca, calda de maceração de milho, cascas de batata, melaço de cana de açúcar, de beterraba, óleo de farelo de arroz e óleo de girassol) e outros resíduos industriais e agrícolas, ricos em fontes de nitrogênio (farelo de soja e farinha de soja), vitaminas e minerais (levedura) (Acioly, 2009).

Para a produção da surfactina por cultivo microbiano há a necessidade da avaliação de inúmeros parâmetros tais como tempo de cultivo, velocidade de agitação, pH e nutrientes adicionados, com o objetivo de se obter compostos com estruturas e propriedades

distintas, tornando-os comparáveis e superiores aos surfactantes sintéticos em quesito de eficiência (Canet *et al.*, 2001).

2.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma bactéria gram-positiva capaz de formar endósporos e ilustre na diferenciação celular em razão de sua capacidade de se diferenciar em diversas células (Aguilar *et al.*, 2007; Veening *et al.*, 2008). O gênero *Bacillus* abrange mais de 200 espécies isoladas dos mais diversos ambientes, como fontes de água, associação com plantas, e principalmente de solos (Claus; Berkeley, 1986; Ghafoor; Hasnain, 2008). A condição de crescimento desta bactéria é preferencialmente aeróbia facultativa, podendo crescer também em anaerobiose a partir de nitratos, mas com crescimento bem limitado (Claus; Berkeley, 1986; Ghafoor; Hasnain, 2008; Ramos *et al.*, 2000; Fritze, 2017).

Javaheri e colaboradores (1985) relataram diante de suas pesquisas que a cepa *Bacillus licheniformis* JF-2 pôde produzir anaerobicamente biossurfactante em condições nutricionais especiais, entretanto, houve dificuldade em sua replicação. Posteriormente, cepas do tipo selvagem e cepas modificadas geneticamente foram analisadas em cultivo em condições aeróbicas, e desta vez, relatou-se uma performance na produção do bioproduto (Javaheri *et al.*, 1985)

A *Bacillus subtilis* é uma bactéria que se desenvolve em ampla faixa de temperatura, entre 10 e 50°C, com temperatura ótima instalada entre 30 e 40°C e em pH de 5,5 e 8,5 com pH ótimo encontrado em torno da neutralidade, possuindo uma grande resistência a altas variações de temperatura e pH (Ghafoor; Hasnain, 2008; Cook; Korsten, 1996; Kloepper, 1997; Vasquez, 2016).

É considerado um microrganismo versátil no seu uso de nutrientes de crescimento, possuindo alto nível de produção de enzimas e secreção de compostos antimicrobianos, além de apresentar rápido crescimento, fácil manipulação genética laboratorial e ausência de patogenicidade (Shoda, 2000), como também possibilita alto rendimento na produção de bioprodutos (Asari *et al.*, 2016). Além disso, por possuir uma extensa descrição na literatura sobre grande parte do seu metabolismo e suas conversões metabólicas, é considerada uma bactéria GRAS (Generally recognized as safe) e tornou-se um “chassis” altamente relevante na biologia sintética (Park *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021).

2.4. Sistema de Produção

Entretanto, um obstáculo quanto ao seu uso majoritário é o baixo rendimento de produção, culminando em custos elevados de produção, o que os tornam ainda difíceis para substituir os surfactantes sintéticos (Zanotto *et al.*, 2019).

Para solucionar esta problemática, pesquisadores têm investido na engenharia genética com intuito de ampliar e otimizar a produção de surfactina, uma vez identificados os genes e suas interações associadas à produção de biosurfactantes, técnicas avançadas podem ser aplicadas como a inserção de genes sob a regulação de promotores fortes (Hu; Liu; Li, 2019; Allwood; Ellis; Goodacre, 2008; Dumas; Kinross; Nicholson, 2014).

Complementar a engenharia genética, conceitos do campo científico da metabolômica também devem ser considerados, o qual tende a caracterizar e analisar metabólitos produzidos por um tecido ou uma célula em determinadas condições de cultivo, mediante a este campo é possível a compreensão de processos biotecnológicos envolvidos, como no melhoramento genético, desenvolvimento de agentes de biocontrole, progressão de doenças e na resposta de um organismo a um tratamento, como também nos efeitos de estímulos ambientais (Ku *et al.*, 1997; Stachelhaus; Schneider; Marahiel, 1995).

De modo geral, certos microrganismos podem fornecer flexibilidade a manipulações genéticas, uma abordagem que culmina na modificação das condições de cultivo e crescimento do microrganismo com a presença de novas reações metabólicas provenientes das manipulações, objetivando à otimização da produção de metabólitos, em virtude ao curto ciclo de vida e a fácil adaptação no meio externo (Brexó; Sant'ana, 2017; Harrigan; Goodacre, 2003). As bactérias são exemplos de microrganismos hábeis em se diferenciar em subpopulações de células formando comunidades multicelulares complexas, tais subpopulações podem ser fenotipicamente distintas, apesar de geneticamente serem idênticas (Aguilar *et al.*, 2007; Veening *et al.*, 2008).

Estudos têm sido realizados para explicar o fenômeno molecular e singular das bactérias em sistemas de cultura de células baseado nas fases de crescimento, como no início da fase estacionária, em que *Bacillus subtilis* consegue se diferenciar em produtores de surfactina, podendo ou não ser células competentes e capazes de captar DNA do ambiente extracelular (Dubnau, 1991; Dubnau; Provvedi, 2000), ou então adentrar na fase de esporulação, considerada como fase resiliente aos impactos ambientais. Ainda, bactérias podem realizar a diferenciação em células produtoras de matriz que produzem

o biofilme (Piggot; Hilbert, 2004; Rudner; Losick, 2001; Vlamakis *et al.*, 2008). Quanto à fase exponencial, uma fração das células bacterianas podem desenvolver flagelos, se diferenciando em células móveis e o resultado final dessas subpopulações está associado à expressão gênica refletida nas diferenças morfológicas ou na interação receptor-receptor (Kearns, 2005).

Dado um cenário de estresse, devido a limitação de nutrientes (ausência de glicose no caldo de cultivo), a diferenciação celular em diversas subpopulações irá requerer determinado nível de comunicação célula-célula, que é dependente da densidade celular, chamada de sistema de detecção de *quorum sensing* (López *et al.*, 2009a).

Esta comunicação célula-célula normalmente se realiza com o auxílio de moléculas sinalizadoras nomeadas como auto-indutoras, que são produzidas e secretadas pelas células da comunidade bacteriana e, que por sua vez, podem induzir a uma diferenciação em diferentes tipos de células para adaptar as mudanças ambientais, alteração na expressão gênica e coordenação de mudanças comportamentais bacterianas (Camilli; Bassler, 2006).

Mediante a investigação de mecanismos de moléculas auto-indutoras de *Bacillus subtilis*, verifica-se que, após a produção da surfactina, ela age como uma molécula sinalizadora e ajuda a regular genes que atuam na diferenciação celular via *quorum sensing* mediante a necessidade de adaptação a condições adversas, desempenhando atividade significativa na diferenciação de diferentes subpopulações de células de *Bacillus subtilis* (López *et al.*, 2009a; Magnuson; Solomon; Grossman, 1994; Weir *et al.*, 1991; López *et al.*, 2009b; Krättschmar; Krause; Marahiel, 1989).

2.5. Vetores de Oxigênio

O método de introdução de oxigênio mediante a componentes definidos como vetores de oxigênio é considerado econômico, simples e prático. Vetores de oxigênio são líquidos orgânicos que apresentam alta solubilidade de oxigênio (n-hexano, n-dodecano, hexanol, n-heptano etc) e são usados para aumentar a velocidade de transferência de oxigênio, suprimindo a demanda de oxigênio decorrente a respiração celular (Clarke; Correia, 2008; Cascaval *et al.*, 2006).

Segundo estudos de Peng e colaboradores, ao aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido no meio, torna-se propício o crescimento de *Bacillus subtilis*, isto é possível

através de métodos como aumento da velocidade de agitação e inserção de vetores de oxigênios etc (Xu, P. *et al.*, 2020).

Nesse contexto, investigar os parâmetros associados à produção de surfactina bem como compreender o sistema *quorum sensing* e adição de vetores de oxigênio a produção, contribui na eficiência do bioproduto obtido, possibilitando o desenvolvimento de meios de cultivo específicos e otimizados voltados para esse tipo de produção, potencializando a capacidade do surfactante biológico em comparação com o sintético.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é a produção do biossurfactante, a surfactina, por uma linhagem de *Bacillus subtilis* modificada geneticamente e cedida pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Danielle Biscaro Pedrolli, avaliando a composição do meio de cultivo bem como a utilização de vetores de oxigênio.

3.1. Objetivos específicos

- i. Avaliar diferentes composições de meios de cultivo para a produção de surfactina;
- ii. Otimizar a composição do meio de cultivo adequado para produção do *Bacillus subtilis*;
- iii. Validação da composição otimizada pelo modelo;
- iv. Avaliação do uso de vetores de oxigênio para a produção de surfactina.

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos

Para realizar os ensaios, foram utilizadas cepas de *Bacillus subtilis*, cedida pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Danielle Biscaro Pedrolli do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia. As cepas foram armazenadas/congeladas a -80°C em solução crioprotetora de glicerol 20% v/v. Antes dos experimentos, o microrganismo foi semeado em meio Luria–Bertani (LB) sólido, crescendo a 30°C por 24 horas.

4.2. Preparo do inóculo e do meio de cultivo

Inicialmente, realizou a reativação do microrganismo em meio de cultura sólido LB (composição: 10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl e 20,0 g/L de ágar), cultivando-os em placas de Petri, mantidas em estufa de 30°C por 24h.

Após a reativação, foi realizado o pré-inóculo do microrganismo, transferindo as cepas da placa com uma alça para dois frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido LB (composição: 10 g/L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl) em cada um. Em seguida, os frascos foram mantidos em shaker sob uma agitação de 220 rpm a 37°C por 16h.

Após o crescimento do inóculo, iniciou-se a produção utilizando o meio de produção com adição de diferentes percentuais de concentração de inóculo 1%, 5% e 10% (v/v).

Foi preparado e avaliado o meio de cultura LB como previamente citado. Também, o meio de cultivo sintético, denominado meio Fosfato (composição: em uma solução tampão de fosfato a 100,0 mM e pH 7,0, foi adicionado 1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7 g/L de fonte de carbono, 4 g/L de fonte de nitrogênio e 1,0 mL/L de uma solução de estoque de sais (0,01 g/100mL de EDTA, 0,30 g/100mL de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/100mL de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/100mL de CaCl_2 , 0,01 g/100mL de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,01 g/100mL de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)). E também, o meio PW (composição: 70 g/L de fonte de carbono, 1 g/L de extrato de levedura, 25 g/L de fonte de nitrogênio, 0,333 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,5 mg/L CaCl_2 , 6 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 6 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Liu *et al*, 2021). Esses meios foram antecipadamente corrigidos para pH 7,0 com solução de NaOH de sódio 2 M a temperatura ambiente, procedendo-se a esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos (Valpuesta, 2008).

Também foram avaliadas diferentes fontes de carbono e nitrogênio, previamente já definidos, e depois, realizou-se alguns experimentos de acordo com diferentes planejamentos experimentais, em que se variava as concentrações de alguns componentes deste meio de cultura. Os frascos foram nomeados e incubados com agitação de 220 rpm a 37°C em um período total de 48h, sendo retiradas amostras em 6h, 24h e 48h.

Foram coletadas alíquotas de 2 mL dos frascos dos meios de cultura inoculados bem como a mesma quantidade de meio de cultura estéril para o branco, sendo parte destas alíquotas utilizadas para determinação da concentração celular. A outra parte das alíquotas foram transferidas para tubos de centrifugas de 2 mL e centrifugadas em uma força centrífuga de 17.000 g durante 10 minutos para a separação completa de fases. Após esse período, apenas o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de surfactina e o teste de índice de emulsificação.

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Determinação de surfactina

A determinação da surfactina foi realizada durante 3 períodos de análise de produção, iniciando as avaliações após 6h, 24h e 48h, e posteriormente, prevalecendo apenas em 24h e 48h de produção. Para determinar a surfactina, foi utilizado o método colorimétrico através do azul de bromotimol (BTB) como indicador de cor e o cloreto de cetilpiridínio (CPC) como mediador, formando o complexo (CPC-BTB). Inicialmente, cerca de 1,5 mL de amostra foi coletada e centrifugada e após esse período, em uma placa e 48 poços, realizou-se uma diluição de 1:4 e foi adicionado 100 µL de meio estéril e 800 µL do reagente CPC- BTB em um poço para realizar o branco e nos três poços seguintes adicionou-se 20 µL do sobrenadante, 80 µL de meio estéril e 800 µL do reagente, seguindo a mesma condição para cada meio que estava nos frascos. Essas amostras geraram uma resposta cromática instantaneamente visível (Yang, H.; Yu, H.; Shen, Z., 2015).

Posteriormente, foi realizada a medida de absorbância em 600nm medida por um leitor de microplacas, obtendo os resultados em uma planilha. A quantificação e análise da concentração de surfactina produzida foi determinada mediante uma curva de calibração previamente já determinada. Além disso, esse método colorimétrico já é utilizado entre os demais pesquisadores do grupo, se mostrando um método eficiente.

4.3.2. Determinação da concentração celular

Determinou-se a concentração celular por densidade óptica através de leitura direta no espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Para isso, realizou-se uma diluição de 1:9, adicionando-se 1350 µL de meio estéril e 150 µL de meio inoculado para amostras e 1500 µL de meio estéril para o branco, em tubos “Eppendorf” de 2 mL. Posteriormente, transferiu-se para as cubetas para ser feita a leitura, realizando a análise da densidade óptica após 24h e 48h de produção.

4.3.3. Determinação da atividade emulsificante e do índice de emulsificação

A determinação da atividade emulsificante foi realizada em tubos de ensaio com tampa de rosca a partir de 2 mL do sobrenadante com adição de 2 mL de tolueno misturando em agitador vortex durante 2 minutos, deixando-os em repouso por 24h (Cooper; Goldenberg, 1997).

O índice de emulsificação foi realizado a partir da mesma mistura de sobrenadante e tolueno, mantendo-se em repouso por 24h mediante ao método descrito por Bicca e colaboradores (1999). O índice de emulsificação (E24) foi calculado conforme a Equação 1, a porcentagem da altura da camada emulsificada (cm) dividida pela altura total da coluna do líquido (cm) utilizando um paquímetro digital (Bicca; Colombo; Záchia,, 1999).

$$E = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad (1)$$

4.3.4. Avaliação de fontes de carbono e fontes de nitrogênio

No decorrer do trabalho, foram avaliadas 3 diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) separadas no meio PW e 3 fontes de nitrogênio (peptona, ureia e nitrato de amônio) adicionadas à fonte já existente no meio.

4.3.5. Testes com vetores de oxigênio

Para verificar a influência dos vetores de oxigênio no processo de produção de

surfactina foram realizados testes com 2 vetores de oxigênio (n-dodecano e n-hexano), pois não foi possível a realização da compra do reagente a ser utilizado (n-hexadodecano), tornando inviável a sua aplicação. Com isso, realizou-se os testes com os seguintes vetores de oxigênio e suas respectivas concentrações 1,5%, 6% e 10,5% para n-dodecano e 0,8%, 5,5% e 10,2% para n-hexano (Xu, P. *et al.*, 2020).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística, foi proposto a utilização de um modelo considerando o método de planejamento experimental com os pontos axiais. Após os testes, foi realizada a análise através do software Excel através da ferramenta de regressão múltipla. Após essa análise, foi determinado um modelo de segunda ordem considerando as variáveis significativas ($p < 0,05$). Com isso tornou-se possível avaliar quais variáveis (nutrientes) que influenciam na produção de surfactina e determinar um modelo que descreva a influência dessas variáveis na produção do bioproduto através de um modelo de segunda ordem. Com modelo determinado é possível determinar a composição ótima para a produção de surfactina.

6. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Tendo o meio de cultura e as condições de produção já definidas, como o meio PW e as condições de 10% de inóculo com 24h e 48h de produção, sendo a de 48h com maior taxa de produção, continuou-se o planejamento estatístico do meio de cultura, variando as concentrações das composições principais como a glicose, extrato de levedura, sulfato de magnésio e nitrato de sódio para validação otimizada do meio. Nesta etapa, foi realizada a mesma metodologia previamente citada.

Os resultados foram analisados pelo software Minitab 17 Statiscal e pela ferramenta de regressão múltipla disponível no Microsoft Excel 365.

6.1. Teste Inicial de Planejamentos Experimentais

Nesta etapa, iniciou-se a fase de otimização de meio de cultura especificamente ao planejamento experimental, correspondente ao meio PW nas condições de 48h de fermentação e 10% de inóculo. Portanto, este trabalho visou avaliar a concentração de glicose, extrato de levedura e $MgSO_4$ e, assim, analisar a influência desses parâmetros no crescimento do *Bacillus subtilis*, e por sua vez, na produção de surfactina.

Desse modo, optou-se por um planejamento completo 2^3 com triplicata do ponto central, gerando um total de 11 experimentos trabalhados em erlenmeyers. Assim, também se definiu a escolha do tipo de planejamento, sendo completo 2^3 , definindo-se os níveis de variação codificados -1, 0 e +1, para cada um dos três parâmetros. A Tabela 1 ilustra as variáveis e seus determinados níveis de variação.

Tabela 1 – Teste inicial de planejamento experimental com seus respectivos níveis de variação

Experimentos	Variáveis não codificadas			Variáveis codificadas		
	Glic	Ext. Lev	$MgSO_4$	Glic	Ext. Lev	$MgSO_4$
1	40	0	0	-1	-1	-1
1.1	40	0	0,8	-1	-1	1
1.2	40	2	0	-1	1	-1
1.3	40	2	0,8	-1	1	1
2	80	0	0	1	-1	-1
2.1	80	0	0,8	1	-1	1
2.2	80	2	0	1	1	-1
2.3	80	2	0,8	1	1	1
3	60	1	0,4	0	0	0
3.1	60	1	0,4	0	0	0
3.2	60	1	0,4	0	0	0

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

6.2. Planejamento Experimental 1

O primeiro planejamento experimental foi realizado com triplicata do ponto central, gerando um total de 11 experimentos trabalhados em erlenmeyers. Assim, também se definiu a escolha do tipo de planejamento, sendo completo 2^3 , definindo-se os níveis de variação codificados -1, 0 e +1, para cada um dos três parâmetros. Variou-se a concentração de glicose (g/L: 30, 60 e 90), extrato de levedura (g/L: 0, 2 e 4) e NaNO_3 (g/L: 10, 25 e 40). A Tabela 2 ilustra as variáveis e seus determinados níveis de variação.

Tabela 2 - Planejamento experimental 1 com seus respectivos níveis de variações

Experimentos	Variáveis não codificadas			Variáveis codificadas		
	Glic	Ext. Lev	NaNO_3	Glic	Ext. Lev	NaNO_3
1	30	0	10	-1	-1	-1
2	30	4	10	-1	-1	1
3	30	0	40	-1	1	-1
4	30	4	40	-1	1	1
5	90	0	10	1	-1	-1
6	90	4	10	1	-1	1
7	90	0	40	1	1	-1
8	90	4	40	1	1	1
9	60	2	25	0	0	0
10	60	2	25	0	0	0
11	60	2	25	0	0	0

Fonte: Acervo pessoal, 2024.

6.3. Planejamento Experimental 2

Realizou-se o segundo planejamento experimental com triplicata do ponto central, gerando um total de 11 experimentos trabalhados em erlenmeyers. Assim, também se definiu a escolha do tipo de planejamento, sendo completo 2^3 , definindo-se os níveis de variação codificados -1, 0 e +1, para cada um dos três parâmetros. Variou-se a concentração de glicose (g/L: 0, 15 e 30), extrato de levedura (g/L: 0, 2 e 4) e NaNO_3 (g/L: 0, 20 e 40). A Tabela 3 ilustra as variáveis e seus determinados níveis de variação.

Tabela 3 - Planejamento experimental 2 com seus respectivos níveis de variações

Experimentos	Variáveis não codificadas			Variáveis codificadas		
	Glic	Ext. Lev	NaNO ₃	Glic	Ext. Lev	NaNO ₃
1	0	0	0	-1	-1	-1
2	0	0	40	-1	-1	1
3	0	4	0	-1	1	-1
4	0	4	40	-1	1	1
5	30	0	0	1	-1	-1
6	30	0	40	1	-1	1
7	30	4	0	1	1	-1
8	30	4	40	1	1	1
9	15	2	20	0	0	0
10	15	2	20	0	0	0
11	15	2	20	0	0	0

Fonte: Acervo pessoal, 2024

6.4. Planejamento Experimental 3

Neste planejamento experimental, houve a modificação do processo de reativação do microrganismo, em que as placas contendo *Bacillus subtilis* ficaram na estufa de 12 a 16h. Depois, coletou-se as cepas e transferiu-as para o meio LB e só transferiu para o meio de produção até que se atingissem uma D.O de 0,3 a 0,5 uABS. Esta pequena alteração da metodologia foi feita para verificar eficácia na quantidade da concentração de surfactina e no crescimento celular. Os experimentos foram realizados com a concentração padrão do meio de cultura PW, sendo retirados pontos para análise 24h e 48h de produção, determinando a concentração de surfactina produzida e a concentração celular (DO 600nm).

Assim, definiu a escolha do tipo de planejamento, sendo completo 2^3 , definindo-se os níveis de variação codificados -1, 0 e +1, para cada um dos três parâmetros. Variou-se a concentração de glicose (g/L: 30, 60 e 90) e extrato de levedura (g/L: 0, 2 e 4), realizando triplicata para cada parâmetro, totalizando 15 ensaios. A Tabela 4 ilustra as variáveis e seus determinados níveis de variação.

Tabela 4 - Planejamento experimental 3 com seus respectivos níveis de variações

Experimentos	Variáveis não codificadas		Variáveis Codificadas		
	Glic.	Extr. Lev	Glic	Ext. Lev	Glic*Extr. Lev
1	30	0	-1	-1	1
2	30	4	-1	1	-1
3	90	0	1	-1	-1
4	90	4	1	1	1
5	60	2	0	0	0

Fonte: Acervo pessoal, 2024.

6.5. Validação do Treinamento da Rede Neuronal

Neste experimento, trata-se das propostas do treinamento da rede neuronal, no qual buscou-se conseguir uma otimização das concentrações das composições anteriores baseada ao total 12 redes neuronais, sendo 6 redes considerando com variáveis de saída para o índice de emulsificação e 6 redes para a concentração de surfactina, assim em ambos os casos variou-se de 1 a 6 o número de neurónios na camada oculta. Entre as redes seleccionadas e treinadas, seleccionou-se aquelas que apresentasse coeficiente de correlação de Pearson maior que 0,9.

7. ANÁLISE POR REDE NEURONAL

Os resultados do último grupo de experimentos utilizado para a otimização do meio de cultivo foram utilizados para o treinamento de redes neurais. Sendo assim, foram ajustadas redes neurais, contendo 2 entradas (concentrações de glicose e extrato de levedura), de 1 a 6 neurônios na camada intermediária e 1 neurônio na camada de saída (concentração de surfactina ou índice de emulsificação). Para o treinamento, foi utilizado o software Matlab 2023 sendo considerado a soma dos quadrados dos erros como função objetivo e as funções “Tansig” e “Pureline” como funções de ativações nas camadas de intermediária e de saída, respectivamente. Para o treinamento, foi utilizado o algoritmo de “Levenberg-Marquardt”. Para o treinamento, foram utilizados 70% dos resultados experimentais e para teste e validação da rede foi utilizado 15% cada um. A qualidade do ajuste foi avaliado considerando o Coeficiente de Correlação de Pearson e a Soma dos Quadrados do Erros de todos os valores experimentais.

Após o treinamento da rede, foi determinado o valor ótimo do processo utilizado na função “fmincon” do Matlab 2023, sendo obtido um valor ótimo para cada arquitetura de rede avaliada. Sendo assim, foram selecionados 5 candidatos para avaliar a sua produção experimentalmente.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1. Avaliação em meio Luria - Bertani (LB)

Para dar início às análises, fez-se necessário realizar o cultivo da bactéria *Bacillus subtilis*. Para isso, foi utilizado o meio LB sólido nas placas e foi feito o repique. Na Figura 1, é possível observar a aparência da placa após 24h de incubação.

Figura 1 - Placa de Petri após 24h de incubação da bactéria *Bacillus subtilis* em meio LB sólido



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Após a incubação, as cepas de *Bacillus subtilis* contidas na placa foram transferidas para os frascos contendo meio LB líquido.

Então, posterior às 16 horas da etapa do pré-inóculo, realizou a primeira tentativa de produção de surfactina em meio de cultura LB líquido. Na Figura 2, pode-se notar a aparência do frasco fermentado após 48h de produção com 10% de inóculo, maior percentual de inóculo e maior tempo de produção.

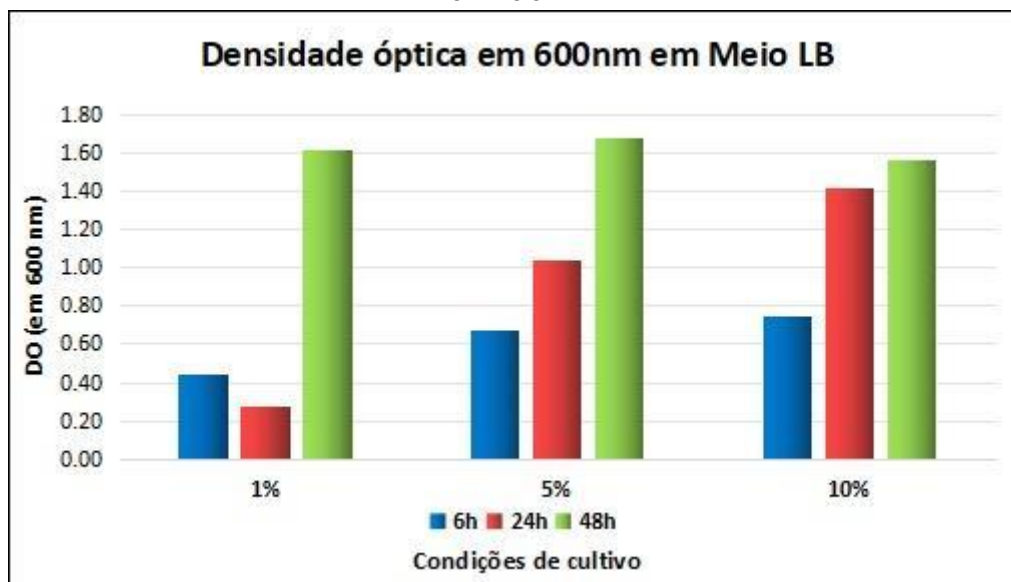
Figura 2 - Frasco fermentado com meio LB após 48h de produção e 10% de inóculo



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Mediante a cada tempo de produção para análise, determinou-se a densidade óptica em 600nm. O gráfico da Figura 3 mostra os resultados obtidos da concentração celular em relação às condições de produção.

Figura 3- Concentração celular em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio LB



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

O meio LB trata-se de um meio de cultura muito usual para o preparo de meios sólidos em placas de Petri, além disso também é utilizado para o cultivo e manutenção de cepas recombinantes (Tortora *et al.*, 2017.).

Este meio é referido como um meio complexo, uma vez que é composto de extrato

de levedura que fornece compostos orgânicos os quais contribuem no crescimento bacteriano. Dos componentes do meio, há também o NaCl que proporciona os íons sódio que são usados para o transporte e equilíbrio osmótico e a triptona que fornece os principais aminoácidos ao microrganismo, visando seu crescimento (Yang, H.; Yu, H.; Shen, Z., 2015).

Dessa forma, observa-se que o meio nutricional favoreceu o crescimento do microrganismo. Isso pode ser constatado ao analisar os valores de densidade óptica (D.O) obtidos ao longo do tempo de produção, correspondentes aos diferentes percentuais de inóculos. No meio de cultura testado, os valores de D.O aumentaram progressivamente, variando de um mínimo de 0,273 uABS a um máximo de 1,673 uABS.

Após a determinação da concentração celular, determinou a concentração de surfactina através do método colorimétrico. Na Figura 4, mostra o resultado visual após a reação entre o reagente BTB- CPC e o meio de cultivo, nota-se que a produção de surfactina foi nula.

Figura 4 - Resultado visual da produção de surfactina em meio LB após 48 horas de produção



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

O método colorimétrico BTB-CPC é comumente usado para quantificar a produção de surfactina em culturas de alto rendimento (concentração de surfactina em torno de 100- 500mg/L) (Fox *et al.*, 2000). Trata-se de um complexo verde, formado por um mediador chamado de CPC (cloreto de cetilpiridínio) e um indicador de cor chamado BTB (azul de bromotimol). Logo, na presença de surfactina, o CPC é instantaneamente removido do complexo CPC-BTB, criando uma mudança cromática de verde-claro para

azul (Kim *et al.*, 2020).

Após a adição do complexo de reagentes, a placa é direcionada para a leitora de placas para determinar a absorbância da surfactina em 600nm. E com o resultado obtido, determinou-se quantitativamente a concentração de surfactina, tomando-se como base a curva de calibração que foi previamente realizada. Desse modo, a partir da curva, pode-se calcular o quanto se produziu de surfactina no meio LB nas condições estudadas, obtendo o resultado conforme representado na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de surfactina em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio LB

Concentração de inóculo (%)	Concentração de Surfactina (mg/L)		
	6h	24h	48h
1	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0
10	0,0	0,0	0,0

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

A partir da Tabela 5 e dos resultados apresentados, é possível observar que não houve nenhuma produção de surfactina através do meio LB. Isso pode ser explicado pois um dos principais constituintes que contribuem na produção deste biossurfactante está contida em fontes de carbono, como a glicose, fator essencial que reflete no crescimento microbiano e por sua vez na produção do bioproduto (Sonenshein *et al.*, 1993). Assim, em culturas de *Bacillus subtilis* que visam a produção de surfactina, a glicose é comumente escolhida como fonte de carbono justamente por se caracterizar um substrato de rápido consumo bem como por apresentar facilidade da determinação analítica (Davis *et al.*, 1999).

No entanto, embora o meio LB tenha favorecido o crescimento microbiano, sua baixa concentração de fontes de carbono, especialmente glicose, não foi suficiente para atender às demandas energéticas e nutricionais necessárias para um maior crescimento de *Bacillus subtilis* e para sustentar uma produção eficiente de surfactina. Outra possibilidade é que o crescimento microbiano alcançado não tenha sido suficiente para induzir a produção de surfactina. Por este fato, torna-se um meio de cultura inviável para este tipo de produção.

8.2. Produção em meio PW

Também foram realizados cultivos com o meio nomeado como PW, sendo este considerado um meio sintético. Na Figura 5, pode-se notar a aparência dos frascos fermentados após 24h de produção com os devidos percentuais de inóculo.

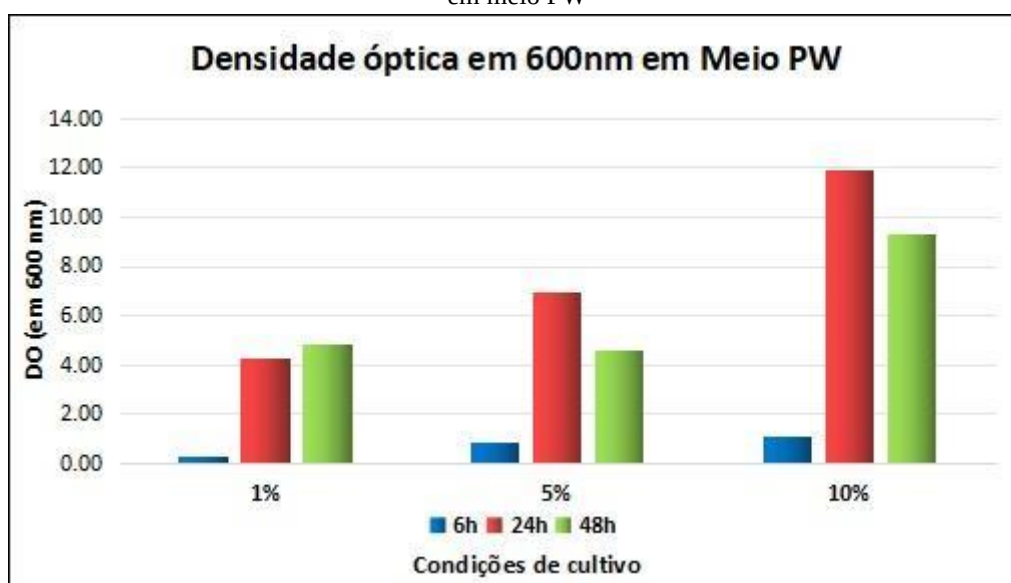
Figura 5 - Frasco fermentado com meio PW após 24h de produção e diferentes porcentagens de inóculo



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Mediante a cada tempo de produção para análise, determinou-se a densidade óptica em 600nm. O gráfico da Figura 6 mostra os resultados obtidos da concentração celular em relação às condições de produção.

Figura 6 - Concentração celular em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio PW



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Nota-se que a densidade óptica obtida ao decorrer do tempo de produção respectivos aos diferentes percentuais de inóculos para o microrganismo cultivado neste meio de cultura foram maiores, atingindo uma D.O no valor máximo de 11,94 uABS e mínimo de 0,274 uABS. Essa maior concentração celular deve-se à presença da fonte de carbono, glicose, na concentração de 60 g/L que foi preparada junto com outros nutrientes neste meio de cultura.

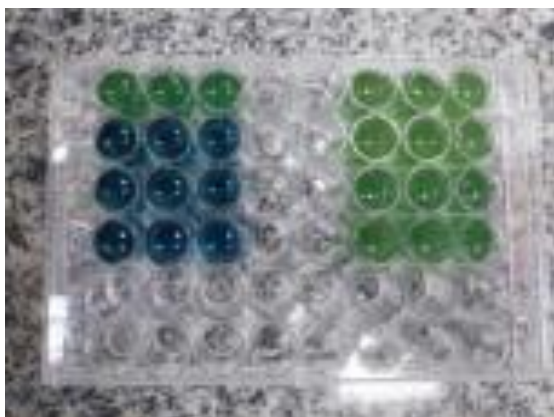
Como comentado anteriormente, a glicose, uma das principais fontes de carbono, contribui no suprimento nutricional e energético do microrganismo, estimulando seu crescimento. Além do mais o NaNO_3 , como fonte de nitrogênio, promove um ótimo papel no desenvolvimento do microrganismo em conjunto com incorporação do extrato de levedura. De acordo com pesquisadores, foi demonstrado que a produção de surfactina sofre forte influência do metabolismo de nitrogênio. Assim, esses autores sugerem que há uma correlação entre o aumento da produção de surfactina e o crescimento celular sob a limitação de nitrato (Davis *et al.*, 1999).

Dessa forma, segundo Agarry *et al* (2015) há a indicação de que o meio contendo glicose, extrato de levedura e nitrato de sódio nas concentrações ideais induzem e favorecem o crescimento celular e a produção de surfactina.

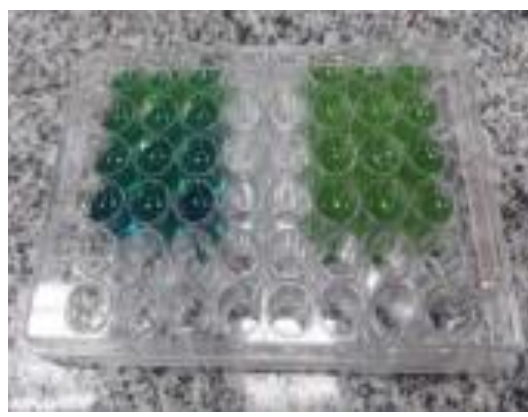
Após a determinação da concentração celular, determinou a concentração de surfactina através do método colorimétrico. Na Figura 7 mostra o resultado visual após a reação entre o reagente BTB- CPC no meio de cultivo PW (lado esquerdo) e meio Fosfato (lado direito), nota-se que a produção aconteceu entre 24h e 48h, respectivamente.

Figuras 7 (A e B) - Resultado visual da produção de surfactina em meio PW e meio Fosfato nos tempos de 24h e 48h, respectivamente

A)



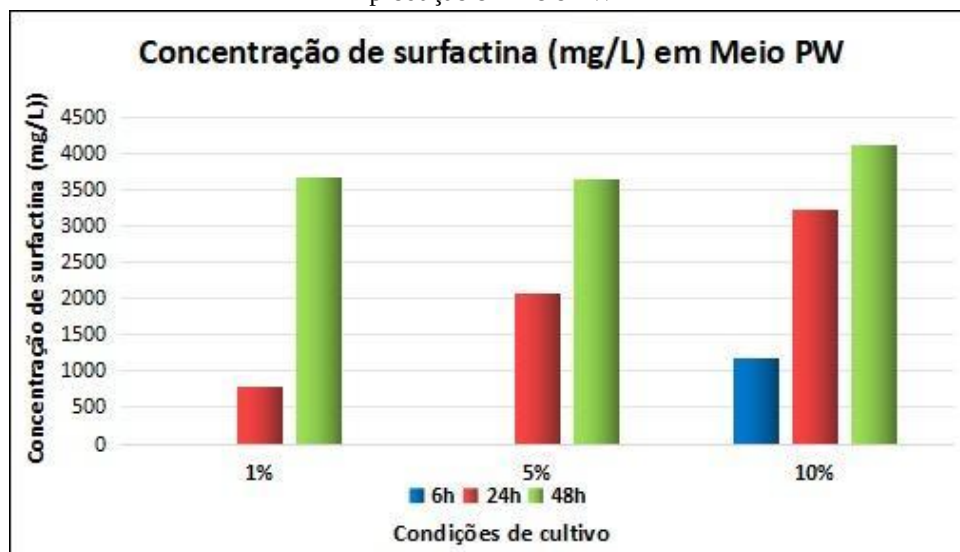
B)



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

A placa foi direcionada para a leitora de placas para determinar a absorbância da surfactina em 600 nm. Determinou-se quantitativamente a concentração de surfactina, tomando-se como base a curva de calibração que foi previamente realizada. Então calculou-se o quanto se produziu de surfactina no meio PW nas condições estudadas, obtendo o resultado conforme ilustrado no gráfico da Figura 8.

Figura 8 - Concentração de surfactina em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio PW



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

A partir desses resultados, pode-se compreender que o meio PW devido a sua composição nutricional contendo alta concentração de fonte de carbono e fonte de nitrogênio, contribuiu significativamente na produção de surfactina, obtendo concentrações de alto rendimento, principalmente em 48h de fermentação e com 10% de inóculo, correspondendo a um valor de 4 g/L do bioproduto.

Isso pode ser explicado, pois devido a um maior percentual de inóculo introduzido no meio de cultura, isto é, maior quantidade de microrganismo bem como devido a um maior tempo de fermentação, induziu ao consumo elevado de glicose no meio reacional, o que tornou o meio PW essencial para suprir as demandas energéticas e nutricionais que o microrganismo deve consumir para que consiga produzir a surfactina com eficiência (Davis *et al.*, 1999).

8.3. Produção em meio Fosfato

Novamente, após 16 horas de incubação, realizou o experimento da produção de

surfactina em meio de cultura nomeado pelo grupo de pesquisa como Meio Fosfato devido a sua composição com tampão Fosfato e solução de variáveis micro sais, sendo este também considerado um meio sintético. Na Figura 9, pode-se notar a aparência dos frascos fermentados após 24h de produção com os devidos percentuais de inóculo.

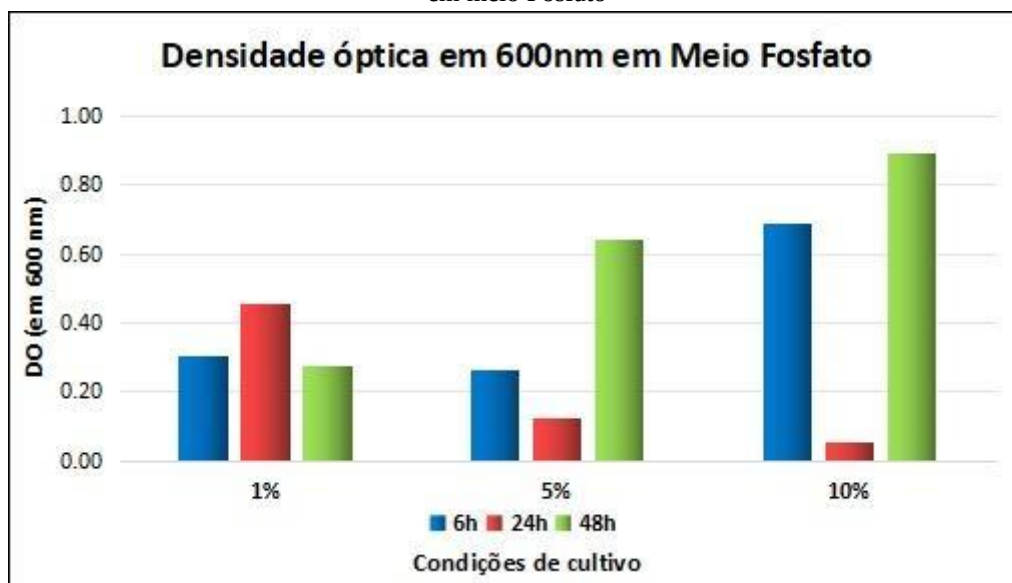
Figura 9 - Frascos fermentados com meio Fosfato após 24h de produção e diferentes concentrações de inóculo



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Mediante a cada tempo de produção para análise, determinou-se a densidade óptica em 600nm. O gráfico da Figura 10 mostra os resultados obtidos da concentração celular em relação às condições de produção.

Figura 10 - Concentração celular em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio Fosfato



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

O meio fosfato é constituído de uma pequena concentração de glicose de 7 g/L e

fonte de nitrogênio de 4 g/L, menor do que em comparação ao meio PW, entretanto, enriquecido por uma solução de micro sais. Apesar, de muitos microrganismos, como a *Bacillus subtilis*, conseguir se desenvolver em altas concentrações de sais, temperatura e pH, a concentração de glicose e NaNO_3 constituídos na composição do meio foram insuficientes para que o microrganismo pudesse atingir um maior crescimento.

Após a determinação da concentração celular, determinou a concentração de surfactina através do método colorimétrico. No gráfico da Figura 10, apresentada anteriormente, nota-se que o crescimento celular aconteceu majoritariamente com 10% de inóculo as 48h. Foi determinado o quanto se produziu de surfactina no meio Fosfato nas condições estudadas, obtendo o resultado conforme ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de surfactina em relação às diferentes porcentagens de inóculo e tempo de produção em meio Fosfato

Concentração de inóculo (%)	Concentração de Surfactina (mg/L)		
	6h	24h	48h
1	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0
10	0,0	0,0	0,0

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Com os resultados baixíssimos da DO, não era esperado uma produção de surfactina. Logo, pode-se compreender que o meio Fosfato assim como o meio LB devido a sua composição nutricional ser inferior comparado ao meio PW, tornou-se um meio inviável para suprir as demandas do microrganismo para que conseguisse produzir a surfactina com eficiência.

Ao analisar os gráficos e as tabelas anteriores, respectivas para cada meio de cultura, evidencia-se o diferencial do efeito produtivo que o meio PW promove sob os demais, o que o torna o melhor meio de cultura para ser definido e para dar continuidade aos experimentos seguintes voltados à otimização.

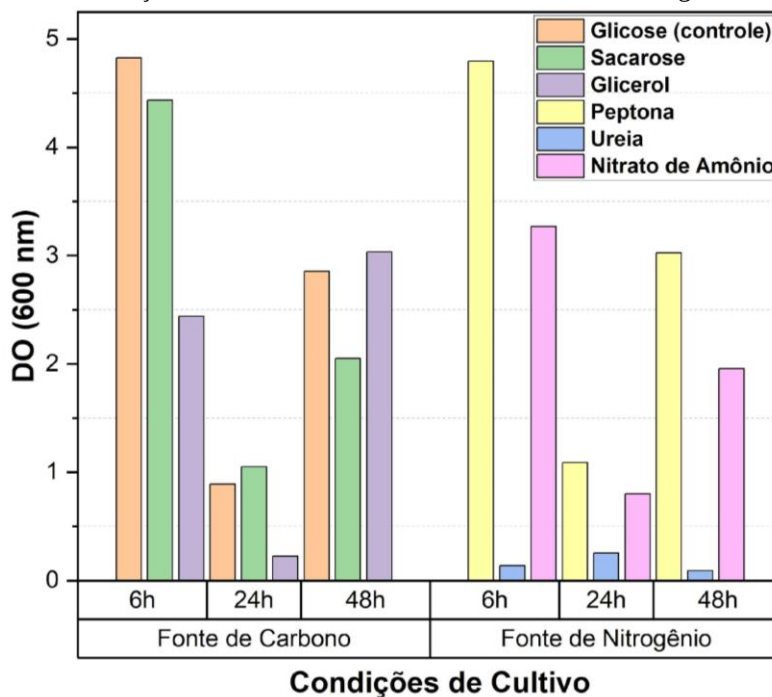
8.4. Variações de fonte de carbono e nitrogênio

Foram avaliadas 3 fontes de carbono (glicose, sacarose e glicerol) e 3 fontes de nitrogênio (uréia, peptona e nitrato de amônio) no meio de cultura PW a fim de verificar qual fonte poderia estimular maior produção de surfactina. Os experimentos foram realizados com a concentração padrão dos componentes do meio de cultura PW, sendo

retiradas amostras nos tempos de 6h, 24h e 48h de produção para a determinação da concentração de surfactina da concentração celular.

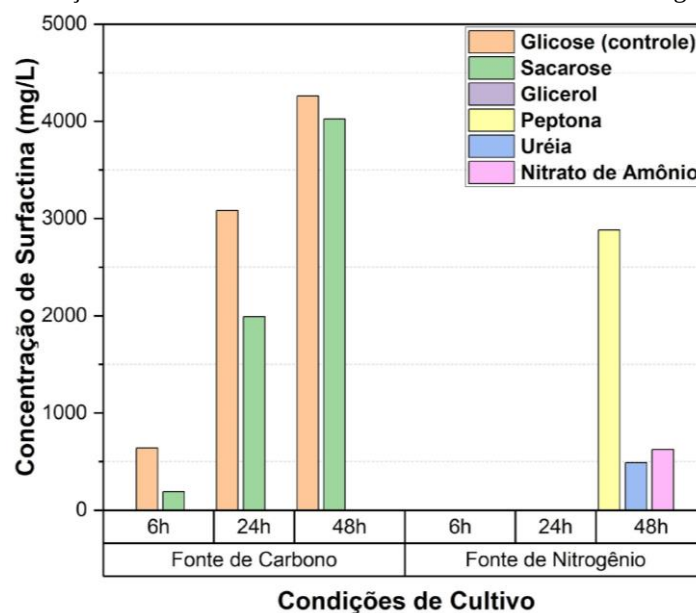
Os gráficos das Figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, a concentração celular e a concentração da surfactina dos experimentos nos períodos de 24h e 48h de produção.

Figura 11 - Concentração celular em diferentes fontes de carbono e nitrogênio em 24h e 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 12 - Concentração de surfactina em diferentes fontes de carbono e nitrogênio em 24h e 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Foi observado no gráfico da Figura 11, que dentre as fontes de carbono, a glicose foi a fonte que mais teve destaque no período de 6h com uma densidade óptica (DO) de 4,8 uABS e em 48h com densidade óptica de 2,8 uABS. Ainda que no tempo de 24h a sacarose sobressaiu, a diferença foi mínima, enfatizando a influência da glicose sobre o crescimento celular.

No gráfico da Figura 12, quanto à concentração de surfactina, a glicose foi a fonte que mais influenciou a produção do bioproduto nos três períodos analisados, dando ênfase no período de 48h com uma concentração de 4.261 mg/L. Isso pode ser explicado, pois quando a célula realiza a oxidação de uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$) para CO_2 e H_2O , acontece que a energia na molécula de glicose é então removida aos poucos, sendo posteriormente captada no ATP, que pode colaborar como fonte de energia para reações que requerem energia. Além do mais, a glicose possui muitos átomos de hidrogênio, contendo uma grande quantidade de energia potencial, além de ser uma fonte de carbono mais facilmente assimilável, e assim se tornando um nutriente valioso para os organismos, promovendo maior crescimento (Tortora *et al.*, 2017).

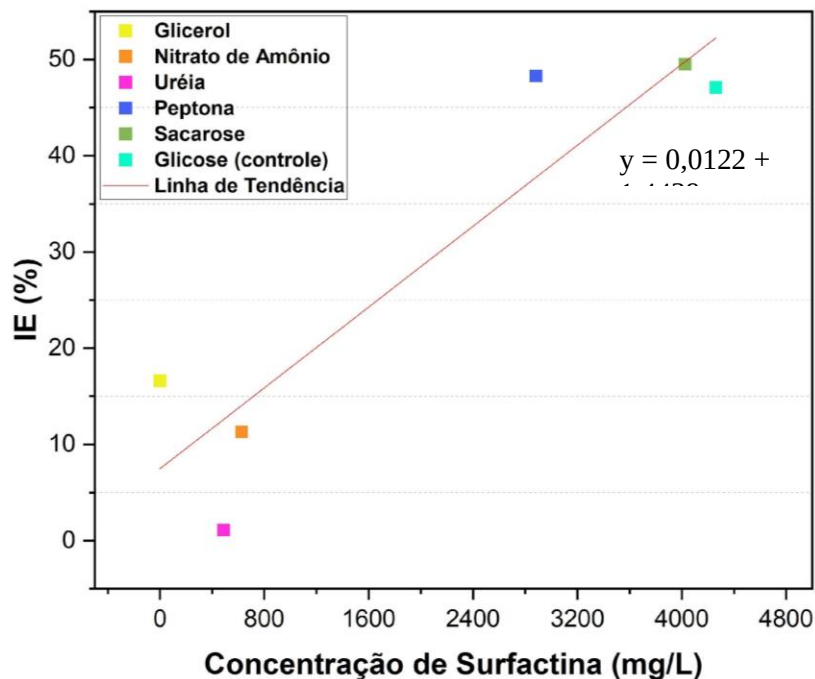
Quando se analisa as fontes de nitrogênio, observa-se que no gráfico da Figura 11, a peptona se destacou em relação às outras fontes, contribuindo na maior concentração celular nos três períodos analisados. A peptona é comumente utilizada para o crescimento de bactérias em laboratório. Trata-se de um hidrolisado proteico que contém os nutrientes essenciais e necessários para a proliferação microbiana (SpLabor, 2024).

No entanto, quanto à concentração de surfactina, a adição de mais uma fonte de nitrogênio junto ao nitrato de sódio não contribuiu para uma maior produção do bioproduto. Apenas em um período de 48h, a peptona pôde produzir uma concentração de surfactina de 2.882 mg/L, não havendo tanta diferença quanto ao experimento controle que tem apenas uma fonte de nitrogênio. Logo, notou-se que a peptona não surtiu efeito sobre o processo de crescimento, e por sua vez, não corroborou para uma produção de surfactina almejada. Isso pode estar relacionado com o excesso de fonte de nitrogênio que pode ter atrapalhado no aumento da produção da surfactina, uma vez que já foi demonstrado que a produção do bioproduto sofre forte influência do metabolismo de nitrogênio e que há uma correlação entre o aumento desta produção e o crescimento celular sob a limitação de nitrato (Davis *et al.*, 1999).

Sendo assim, a maior produção foi obtida quando se utilizou o meio PW (controle). Logo, ele foi utilizado como base para os experimentos visando a otimização da composição do meio de cultivo.

Demais análises também foram feitas, como a correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina. O gráfico da Figura 13 mostra essa correlação realizada no período de 48h.

Figura 13 - Correlação entre o índice de emulsificação (%) e a concentração de surfactina (mg/L)



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

A Figura 13, mostra um gráfico de dispersão com uma linha de tendência linear, a variável no eixo x corresponde a concentração de surfactina (mg/L) e no eixo y está o índice de emulsificação (%), cujo coeficiente de determinação (R^2) é de 0,8979, indicando que 89,79% da variação no IE pode ser explicada pela concentração de surfactina, representando uma correlação forte e um bom ajuste, mas também evidencia que o tipo de substância pode influenciar significativamente a eficiência (IE), assim como mostra os outliers.

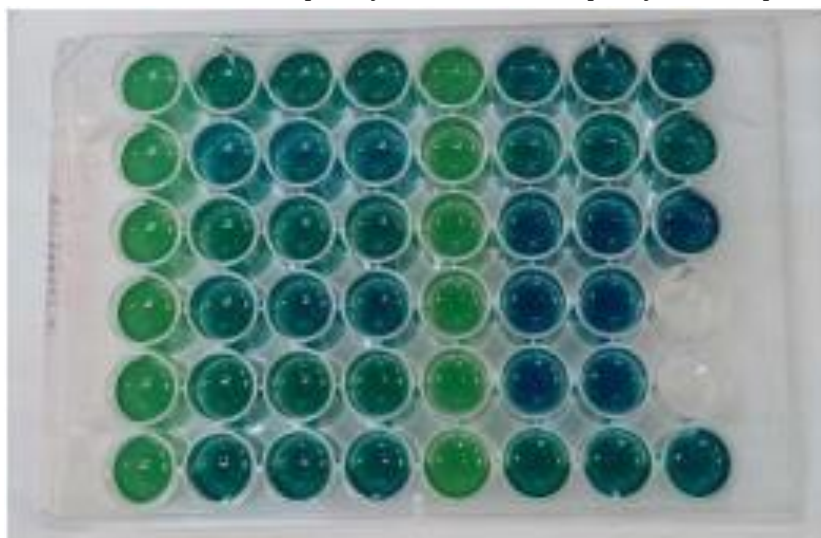
Algumas substâncias podem ter um desempenho melhor ao aumentar o IE, nota-se que os pontos referentes a sacarose, glicose e peptona apresentaram altos índices de emulsificação (IE%) superiores a 40% correspondendo aos componentes que mais produziram surfactina, apresentando valores de 49,5% (sacarose), 47,1% (glicose) e 48,3% (peptona). Quanto ao glicerol, uréia e nitrato de amônio, apresentaram pontos com IE inferior a 20%, o que se correlaciona com as baixas ou nulas produção de surfactina destas fontes, que se distanciam da linha de tendência. Segundo estudos, relata-se que uma emulsificação eficaz, ocorre quando o seu índice de emulsificação (IE) é superior a

40 %, certificando que o *Bacillus subtilis* é um bom produtor de biossurfactante (Maia, 2020).

8.5. Teste Inicial de Planejamentos Experimentais

Deu-se início aos experimentos seguindo as condições já estabelecidas de meio conforme Tabela 1, realizando a análise da surfactina e o tratamento de resultados estatísticos. A Figura 14 ilustra o resultado visual da produção de surfactina e a Tabela 7 mostra os resultados para as concentrações obtidas do bioproduto.

Figura 14 - Resultado visual da produção de surfactina no planejamento experimental



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Tabela 7 - Concentração de surfactina (mg/L) às diferentes condições de variações

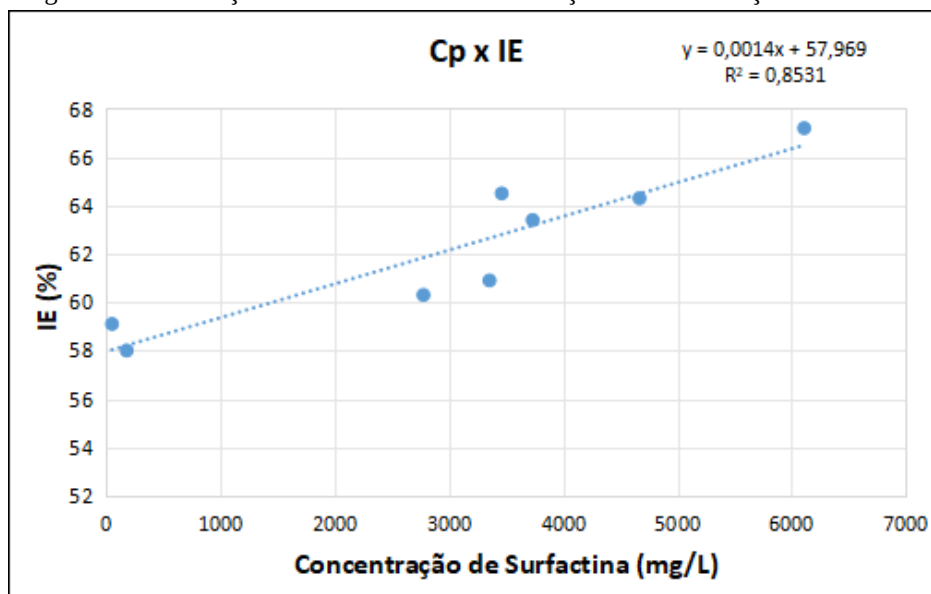
Meio Power	
Experimentos	Concentração de Surfactina (mg/L)
1	0
1.1	4667,86
1.2	46,43
1.3	0
2	0
2.1	175
2.2	2775
2.3	6110,71
3	3460,72
3.1	3353,57
3.2	3732,14

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Através dos resultados obtidos, nota-se que a maior concentração de surfactina sobressaiu no ponto 2, 8 e permaneceu significativo nos grupos controle. Para compreender qual composto induziu maior influência sobre a produção, foi feito um tratamento de dados estatísticos.

Assim como os resultados obtidos para a concentração de surfactina, notou-se que para maiores concentrações de MgSO_4 e extrato de levedura a uma concentração de 1 g/L obteve-se bons resultados para o IE, da mesma forma, que quanto maior a concentração de glicose e extrato de levedura, foi apresentado resultados significativos para o IE, indicando correlação entre esses dois parâmetros. Essa correlação será discutida a seguir com dados estatísticos. O gráfico da Figura 15 ilustra essa correlação.

Figura 15 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina



Fonte: Acervo pessoal, 2023.

O gráfico da Figura 15 mostrou um coeficiente de determinação no valor de 0,8531, ou seja, mostra que cerca de 85,31% da variação no IE está correlacionada com a concentração de surfactina. De tal modo, existe um crescimento positivo do índice de emulsificação à medida que a concentração de surfactina aumenta, ainda que haja uma dispersão nos pontos. Tal resultado, mostra que as duas metodologias utilizadas para aferir a concentração de surfactina possuem tendência similares e por isso foram utilizadas nas análises (Jönk *et al.*, 2015).

Ressalta-se que em alguns casos, a concentração de surfactina pode ser determinada indiretamente pelo índice de emulsificação e já relatada em alguns artigos, como já ocorreu em pesquisas feitas em linhagens bacterianas isoladas de amostra rochosa de reservatório de petróleo para a produção de biossurfactante em um período de 24h como descreve Argentin (2016).

Na Tabela 8, é retratado os valores obtidos para a concentração de surfactina, os percentuais do índice de emulsificação e a concentração celular.

Tabela 8 - Resultados da concentração de surfactina, índice de emulsificação e concentração celular

Cp (mg/L)	IE (%)	DO 600nm
0,0	53,9	0,73
4667,86	64,30	0,56
46,43	59,10	0,67
0,0	43,2	0,49
0,0	20,5	0,87
175,0	58,0	0,75
2775,0	60,3	1,05
6110,71	67,20	1,03
3460,72	64,50	0,73
3353,57	60,90	0,71
3732,14	63,40	0,67

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

A correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina pode ser consideravelmente aceitável, uma vez que se avalia que conforme a concentração de surfactina aumenta, maior será o índice de emulsificação. De acordo com Gong (2009), em suas pesquisas foram relatadas que o índice de emulsificação da surfactina obtida a partir da *Bacillus subtilis* E8 chegou próximo a 68%. Por outro lado, em um estudo feito por Abdel - Mawgoud e colaboradores (2008b), foi analisado as propriedades emulsificantes do biossurfactante produzido a partir de *Bacillus subtilis* BS5 em meio contendo melaço e obteve índices de emulsificação entre 59% a 62%, o que torna semelhante aos resultados obtidos neste trabalho (Abdel – Mawgoud; Aboulwafa; Hassouna, 2008b; Youssef *et al.*, 2004),

Ainda segundo a literatura, a emulsão é considerada eficaz quando atinge índice de emulsificação em um percentual maior de 40% (Argentin, 2016). Portanto, os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios dentro das condições trabalhadas. No entanto, notou-se que não houve correlação entre a concentração celular e a concentração de surfactina. As Tabelas 9 e 10 retratam as análises estatísticas da concentração de surfactina e do índice de emulsificação, respectivamente.

Tabela 9 - Análise estatística da concentração de surfactina (mg/L)

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	2211,039	463,684	4,768	0,018	735,391	3686,687	735,391	3686,687
GL	543,304	543,717	0,999	0,391	-1187,047	2273,655	-1187,047	2273,655
EL	511,161	543,717	0,940	0,417	-1219,190	2241,512	-1219,190	2241,512
MgSO ₄	1016,518	543,717	1,870	0,158	-713,833	2746,868	-713,833	2746,868
GL*EL	1666,518	543,717	3,065	0,055	-63,833	3396,868	-63,833	3396,868
GL*MgSO ₄	-138,839	543,717	-0,255	0,815	-1869,190	1591,512	-1869,190	1591,512
EL*MgSO ₄	-194,196	543,717	-0,357	0,745	-1924,547	1536,155	-1924,547	1536,155
GL*EL*MgSO ₄	984,375	543,717	1,810	0,168	-745,976	2714,726	-745,976	2714,726

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

Tabela 10 - Análise estatística do índice de emulsificação (IE%)

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	55,936	2,515	22,240	0,000	47,932	63,941	47,932	63,941
GL	-1,813	2,949	-0,615	0,582	-11,198	7,573	-11,198	7,573
EL	4,138	2,949	1,403	0,255	-5,248	13,523	-5,248	13,523
MgSO ₄	4,863	2,949	1,649	0,198	-4,523	14,248	-4,523	14,248
GL*EL	8,112	2,949	2,751	0,071	-1,273	17,498	-1,273	17,498
GL*MgSO ₄	6,237	2,949	2,115	0,125	-3,148	15,623	-3,148	15,623
EL*MgSO ₄	-7,113	2,949	-2,412	0,095	-16,498	2,273	-16,498	2,273
GL*EL*MgSO ₄	-0,537	2,949	-0,182	0,867	-9,923	8,848	-9,923	8,848

Fonte: Acervo pessoal, 2023.

As tabelas 9 e 10 refletem os coeficientes e estatísticas resultantes de uma análise de regressão múltipla, onde foram modeladas interações entre diferentes variáveis (GL, EL, MgSO₄ e suas combinações) para prever o comportamento de uma variável dependente como a concentração de surfactina (mg/L) e o IE (%). Em relação aos modelos, somente os resultados em relação a concentração de surfactina apresentou um valor de R² maior que 0,7, mostrando que o modelo não apresentou um bom ajuste. Em relação ao IE, o ajuste foi ruim, apresentando um R² inferior a 0,5.

Através dos resultados estatísticos obtidos, é possível notar para a Tabela 9, que a interação GL*EL tem um coeficiente de 1666,518, sugerindo que, com um aumento conjunto nos valores de GL e EL, há um efeito positivo considerável sobre a variável dependente, aumentando também a concentração de surfactina (mg/L). Por outro lado, a interação GL*MgSO₄ é negativa (-138,839), o que implica que o efeito combinado de GL e MgSO₄ reduz a variável dependente. Para a Tabela 10, as interações GL*EL com um coeficiente de 8,112 e GL*MgSO₄ com 6,237, sugerem um efeito positivo considerável sobre a variável dependente, neste caso, o IE%. Já as outras interações, apresentam valores negativos, não indicando significância.

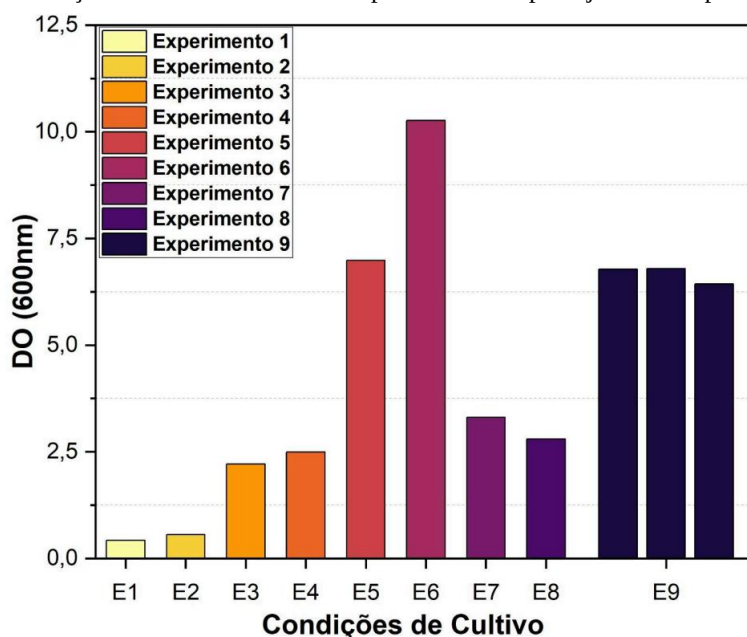
Ademais, tanto para análise de Cp quanto para a IE, a glicose quando multiplicada pelo extrato de levedura possui influência significativa na faixa estudada com 90% de confiança. Entretanto, quando analisada com 95% de confiança, somente a interseção

possui correlação acima de 95% (célula em amarelo) e os itens marcados em azul possuem correlação acima de 90%, assim nota-se que nenhuma variável foi significativa.

8.6. Planejamento Experimental 1

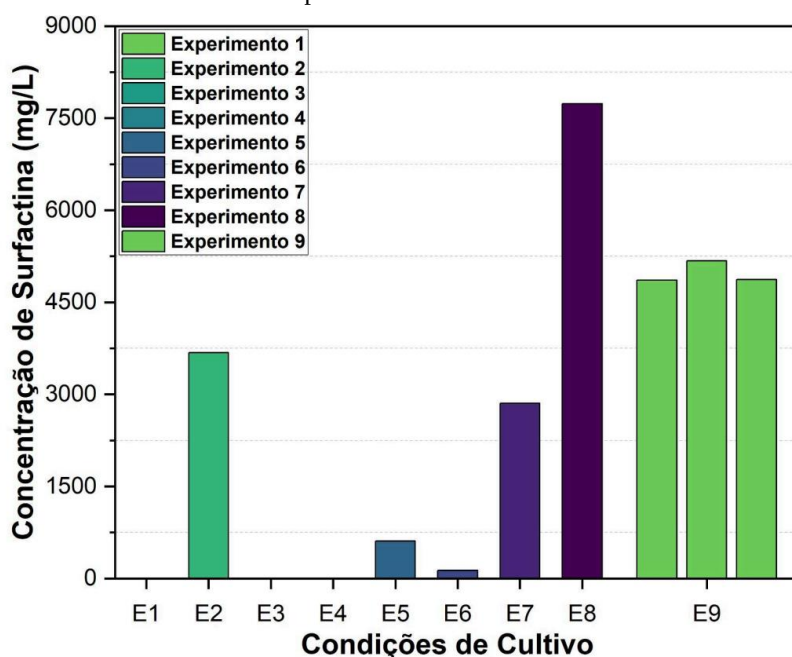
Deu-se início aos experimentos seguindo as condições já estabelecidas de meio conforme Tabela 2, tempo de fermentação, concentração de inóculo, realizando assim a análise da surfactina, concentração celular e o tratamento de resultados estatísticos. Os gráficos das Figuras 16 e 17 ilustram os resultados obtidos da concentração celular e da concentração da surfactina, respectivamente, em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h.

Figura 16 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental 1 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 17 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental 1 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

No gráfico da Figura 16, foi notado que o experimento E6, o qual tem a seguinte concentração dos componentes, 90 g/L de glicose, 4 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaNO_3 apresentou o maior resultado para a concentração celular, obtendo densidade óptica em torno de 10,0 uABS. O experimento E9 (triplicata) é a concentração controle do meio PW, também apresentando concentração celular satisfatória com densidade óptica (DO) de 6,7 uABS, sendo próximo do resultado do experimento E5 com DO de 6,98 uABS que também possui concentração de glicose acima da concentração controle.

Os experimentos com concentração de glicose 30g/L (E1, E2, E3 e E4), não foram capazes de favorecer melhores resultados para o crescimento do microrganismo quando comparados com os demais experimentos. Ainda assim, os experimentos E3 e E4 apresentaram concentração celular maior que os experimentos E1 e E2, isso pode estar relacionado com a presença da fonte de nitrogênio, que se encontra em uma concentração maior nos experimentos E3 e E4.

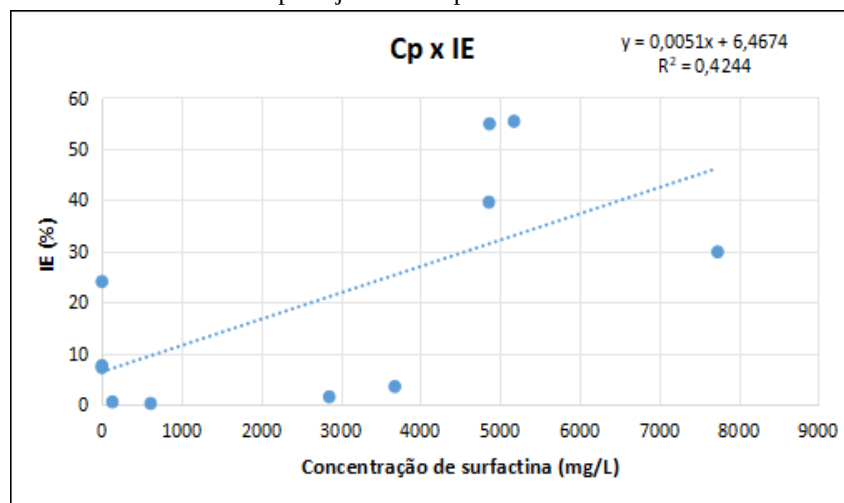
No gráfico da Figura 17, refere-se à concentração de surfactina, o experimento E8, que possui as maiores concentrações dos componentes, foi o que maior produziu o biosurfactante com concentração de surfactina de 7.735 mg/L, apesar de não ter apresentado a maior concentração celular. O experimento E9 (triplicata) foi o segundo experimento a apresentar maior concentração, com valor de 4.970 mg/L. Os experimentos E5 e E6, que anteriormente obteve altos resultados para a concentração celular, agora

apresentou baixas concentrações do biossurfactante, como 612 mg/L e 131 mg/L, respectivamente. Outro experimento que vale observar, é o experimento E2, que apesar de ter apresentado baixa concentração celular, conseguiu obter uma concentração intermediária de surfactina com 3.680 mg/L.

Desse modo, vale ressaltar que os resultados de maiores concentrações celulares obtidos e descrito no gráfico da Figura 16 não tiveram relação direta com as maiores concentrações de surfactina. De toda maneira, estudos indicam que a menor produção de surfactina pode estar relacionada a perdas de biossurfactante na espuma, ocasionada tanto pela produção do produto tensoativo quanto pela agitação e aeração do meio (Debon *et al.*, 2015).

A Figura 18, retrata a correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina.

Figura 18 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina referente ao planejamento experimental 1



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

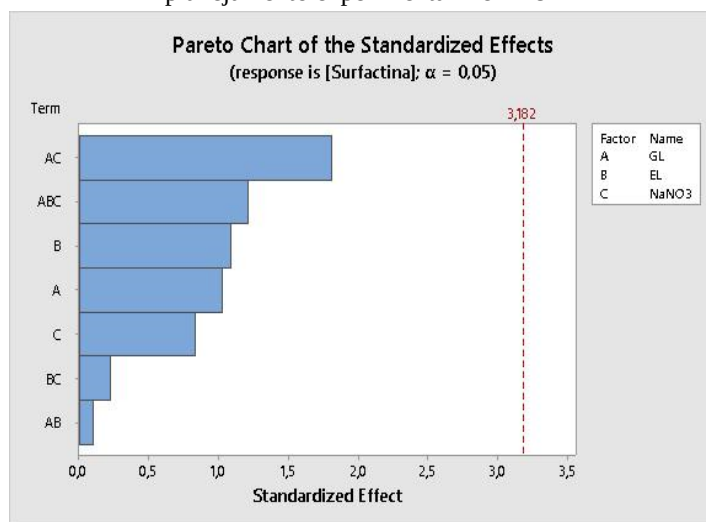
É possível notar que neste gráfico, existe uma tendência de que o aumento da concentração de surfactina está positivamente relacionado ao índice de emulsificação, mas a relação não é forte, como indicado pelo R^2 , apresentando coeficiente de determinação de 0,4244, valor muito inferior para provar a qualidade do ajuste do modelo de regressão linear.

Para contextualizar, Montgomery e colaboradores (2012) afirmam que um valor de R^2 próximo de 1,0 indica que o modelo explica a maior parte da variabilidade dos dados, mas valores menores, como 0,4244, indicam que há espaço para melhorias no ajuste do modelo (Montgomery, D. C., Runger, G. C., & Hubele, N. F., 2012). Ainda

assim, nos campos das engenharias, onde a precisão é frequentemente crítica, um R^2 maior seria ideal para assegurar que a maior parte da variabilidade é explicada e para reduzir o erro nas previsões.

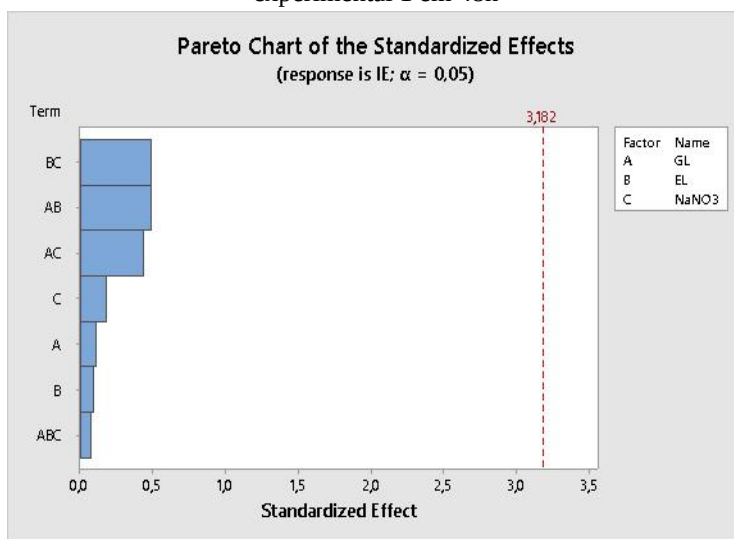
Com os resultados obtidos, pode-se realizar o tratamento estatístico por meio de gráficos de Pareto que são apresentados por um gráfico de barras, permitindo identificar quais parâmetros mais exercem influência na resposta de interesse (Concentração de surfactina e IE, respectivamente). Os gráficos das Figuras 19 e 20, mostra esse tratamento estatístico.

Figura 19 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 1 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 20 - Gráfico de Pareto para valores de índice de emulsificação (IE%) obtidos pelo planejamento experimental 1 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

É interessante ressaltar que no gráfico de Pareto, tem-se os valores absolutos de tcalculado (coef. de efeito dividido pelo erro padrão), assim denominados efeitos padronizados, os quais fornecem as alturas das barras que são dispostas de maneira decrescente. O valor tabelado (n, α) (tabela de valores da distribuição “t” de Student), onde o n significa o grau de liberdade, representado pela linha vermelha pontilhada indicando o nível de significância para um $\alpha = 0,05$, integra o gráfico de Pareto proporcionando o valor a partir do qual os efeitos são significativos, qualquer barra que ultrapasse essa linha é considerada estatisticamente significativa (Rodrigues; Iemma, 2005).

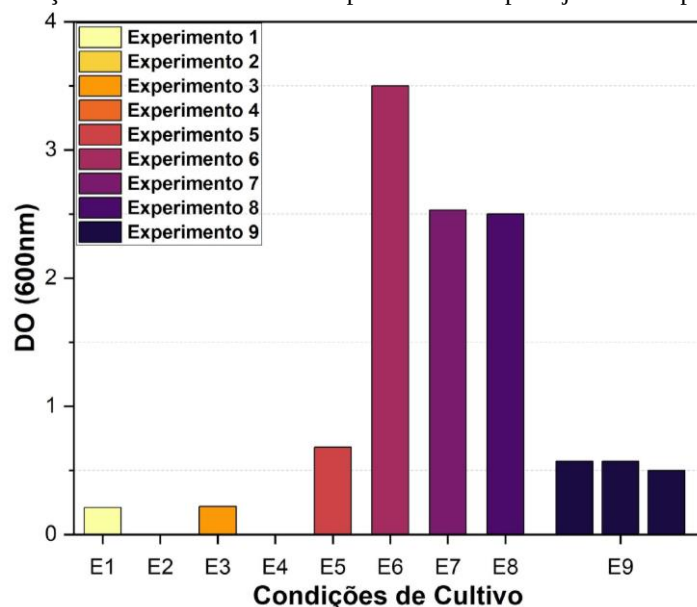
Diante dessas análises gráficas representadas pelas Figuras 19 e 20, observa-se que nenhuma interação de componentes apresentou valor próximo da probabilidade de significância do teste ($p=3,182$), indicando que nenhuma interação teve um resultado significativo no experimento.

Assim, notou-se que nenhum dos fatores ou interações teve um impacto estatisticamente significativo sobre a resposta da surfactina e IE% no nível de significância de 95%. Uma vez que, a análise de Pareto para a concentração de surfactina, o ajuste do modelo polinomial possui uma fraca correlação (R^2 em torno de 0,72), sendo assim, não foi possível detectar diferença estatística entre as condições avaliadas. Considerando a análise de Pareto para o índice de emulsificação, o modelo polinomial também não apresentou um bom ajuste, com uma fraca correlação ($R^2=0,19$). Sendo assim, optou-se por avaliar outra faixa da concentração dos componentes.

8.7 Planejamento Experimental 2

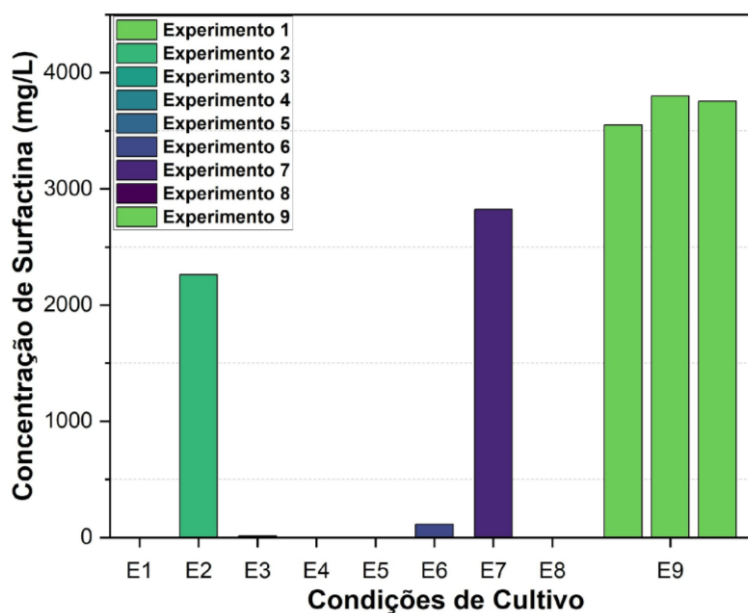
A partir desse planejamento deu-se início aos experimentos seguindo as condições já estabelecidas de meio conforme Tabela 3, tempo de fermentação, concentração de inóculo, realizando assim a análise da surfactina, concentração celular e o tratamento de resultados estatísticos. Os gráficos das Figuras 21 e 22 ilustram os resultados obtidos.

Figura 21 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental 2 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 22 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

No gráfico da Figura 21, retratou-se que o experimento E6, o qual tem como a seguinte concentração dos componentes, 30 g/L de glicose e 40 g/L de NaNO_3 , sem nenhuma adição de extrato de levedura, apresentou o maior resultado para a concentração celular, obtendo densidade óptica de 3,5 uABS. O experimento E7 composto por apenas 30g/L e 4g/L de extrato de levedura e o experimento E8 com as maiores concentrações dos componentes também apresentaram concentração celular maiores com densidade óptica em torno de 2,5 uABS.

Observa-se que os experimentos E1, E2, E3 e E4, os quais são isentos de glicose, assim como já esperado, não estimularam a concentração celular, visto que a glicose, fonte de carbono, é um fato essencial no meio de cultura para promover o crescimento celular (Yang, H.; Yu, H.; Shen, Z., 2015).

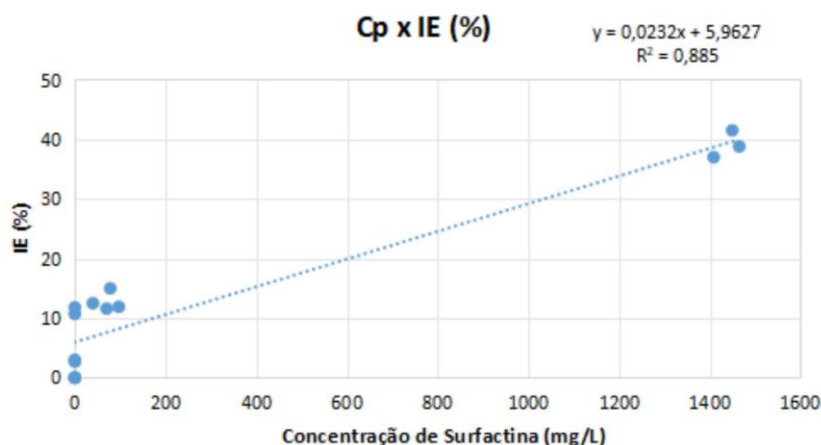
Os experimentos com 15 g/L de glicose (E9, E10 e E11) não foram capazes de favorecer resultados melhores para o crescimento do microrganismo quando comparado com os demais experimentos com concentração de 30 g/L de glicose.

No gráfico da Figura 22, trata-se da concentração de surfactina, o experimento E9 (triplicata) corresponde ao ponto central, pôde produzir maior concentração de biosurfactante com valor de 3.701 mg/L apesar de não ter apresentado a maior concentração celular. O experimento E7 foi o segundo experimento a apresentar maior concentração com 2.825 mg/L. Vale comparar os resultados do experimento E2, que anteriormente não apresentou resultado para a concentração celular, mas produziu surfactina obtendo concentração de 2.261 mg/L, e deste modo, não mostrando confiabilidade nos resultados.

O experimento E6, embora apresentou bons resultados no crescimento celular, não conseguiu produzir a surfactina. Isso pode estar relacionado com a carência de nutrientes que este experimento apresenta, uma vez que conseguiu consumir um pouco dos nutrientes para promover o crescimento celular, mas que não foi suficiente para produzir o bioproduto (Agarry *et al.*, 2015).

A Figura 23, retrata a correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina.

Figura 23 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina referente ao planejamento experimental 2

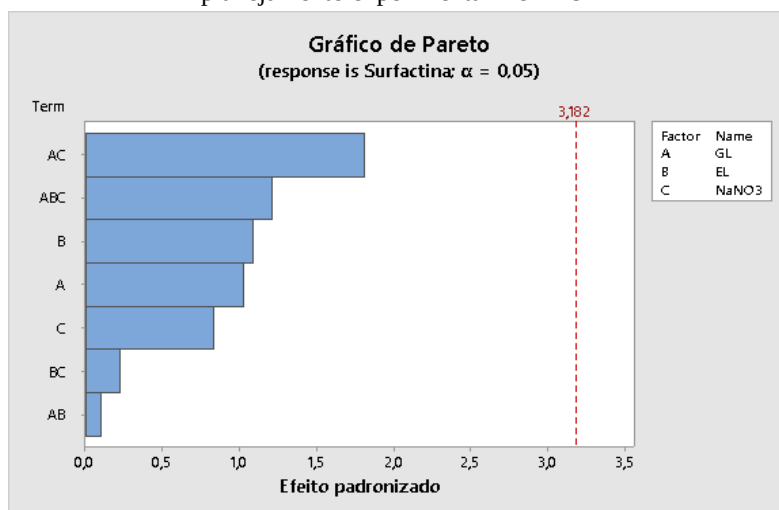


Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Diante desta correlação, nota-se um R^2 com valor de 0,885, indicando que 88,5% da variação do IE% está correlacionada com a concentração de surfactina. No entanto, em concentrações baixas de surfactina, há maior dispersão dos pontos, sugerindo maior incerteza ou influência de outros fatores. Além disso, há uma possível saturação em concentrações mais altas, onde o IE parece não aumentar tanto.

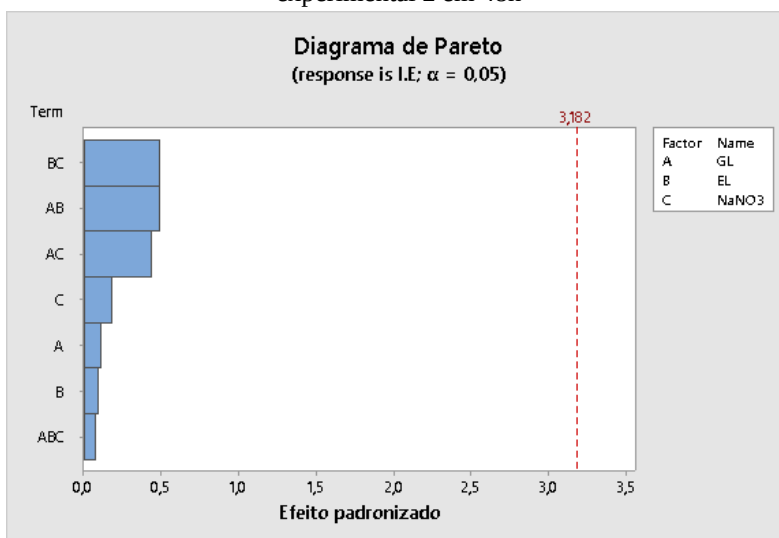
Os gráficos das Figuras 24 e 25 mostram essas análises estatísticas, para a concentração de surfactina e para o índice de emulsificação.

Figura 24 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 2 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 25 - Gráfico de Pareto para valores de índice de emulsificação (IE%) obtidos pelo planejamento experimental 2 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

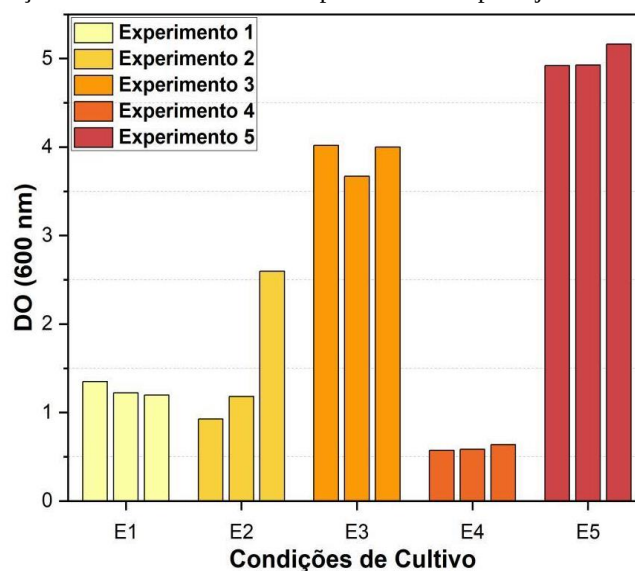
Desse modo, pelos gráficos de Pareto interpreta-se que novamente, nenhum dos fatores ou interações ultrapassou o valor crítico de 3,182, o que significa que nenhum dos fatores ou interações é estatisticamente significativo no nível de 95%. Isso sugere que, apesar de alguns fatores aparentarem ter algum impacto, não é possível afirmar com segurança que esses efeitos são reais e não resultado do acaso.

Além disso, deve-se ressaltar que o modelo não se ajustou bem aos resultados experimentais, indicado para a concentração de surfactina em que se obteve um R^2 igual a 0,72 (esperava-se valores superiores a 0,9). Em relação ao índice de emulsificação, obteve-se um R^2 igual a 0,193. Sendo assim, foi realizada nova tentativa, visando obter um melhor ajuste do modelo.

8.8 Planejamento Experimental 3

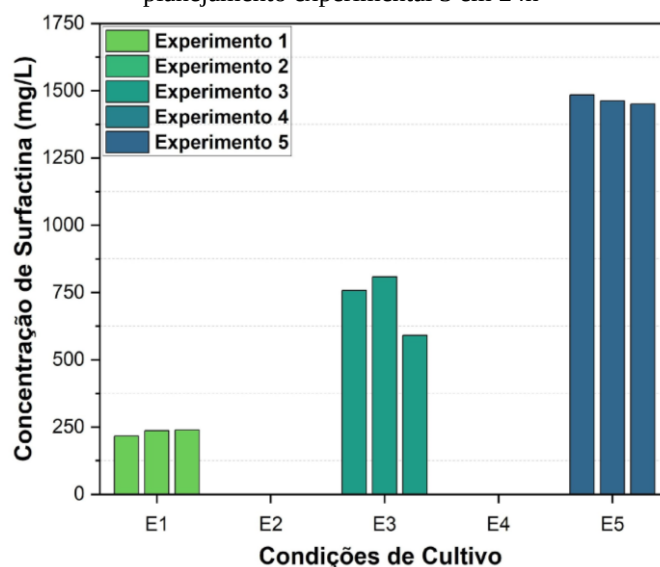
A partir desse planejamento deu-se início aos experimentos seguindo as condições já estabelecidas de meio conforme Tabela 4, tempo de fermentação e concentração de inóculo, realizando a análise da surfactina, concentração celular e o tratamento de resultados estatísticos. Os gráficos das Figuras 26 e 27 ilustram os resultados obtidos.

Figura 26 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental 3 em 24h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 27 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental 3 em 24h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

No gráfico da Figura 26, foi verificado que no período de 24h, o experimento E5 o qual tem a concentração controle, 60 g/L de glicose e 2 g/L de extrato de levedura, apresentou o maior resultado para a concentração celular, obtendo densidade óptica em torno de 5,0 uABS. O experimento E3 também apresentou concentração celular satisfatória com densidade óptica de aproximadamente 4,0 uABS, sendo o experimento que possui a concentração máxima de 90 g/L de glicose, mas isento de extrato de levedura.

O experimento E4, embora com as concentrações máximas de glicose e extrato de levedura, apresentou concentração celular inferior quanto aos outros experimentos, podendo estar relacionado com o nível acima da concentração máxima que o microrganismo consegue absorver para conseguir crescer, assim deixando componente residual.

Os experimentos E1 e E2, conseguiram promover o crescimento celular, com densidades ópticas de 1,257 uABS e 1,568 uABS, respectivamente. Logo, o experimento E5 (controle), mostrou o melhor resultado de concentração celular no período de 24h.

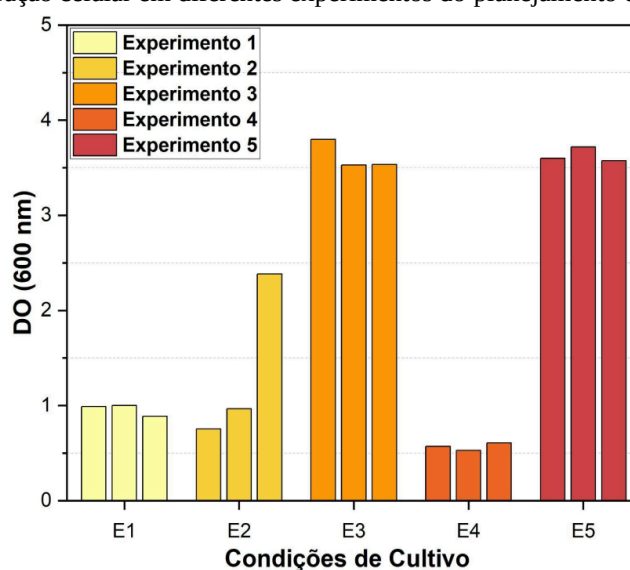
No gráfico da Figura 27, quanto à concentração de surfactina, o experimento E5 (controle) foi o que maior produziu o biosurfactante com concentração no valor de 1.466 mg/L. O experimento E3 apresentou um resultado intermediário com uma concentração de 719 mg/L. E o experimento E1, portanto, apresentou baixa concentração de surfactina com 231 mg/L, enquanto os experimentos E2 e E4 embora demonstraram pequeno

crescimento celular não apresentaram nenhum resultado para a produção do biossurfactante.

Dessa maneira, a concentração controle que possui concentração de 60 g/L de glicose e 2g/L de extrato de levedura têm demonstrado uma concentração ideal para que se produza o biossurfactante, não carecendo de nutrientes e nem saturando o meio de cultura e os microrganismos pelo excesso dos mesmos.

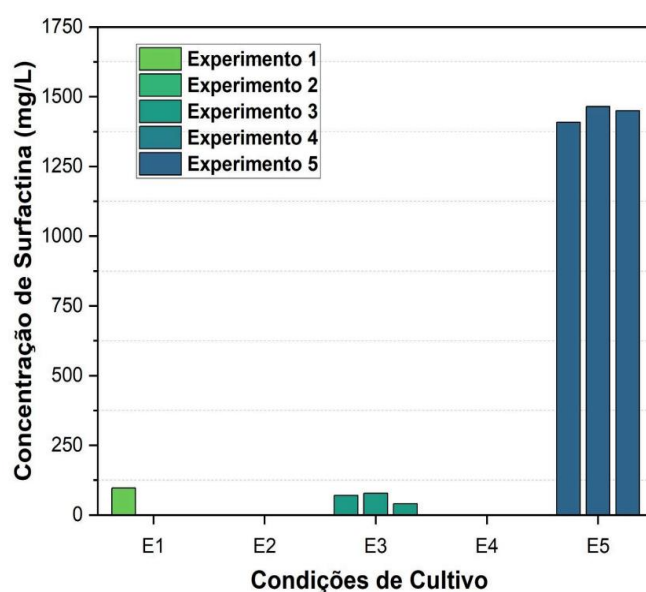
Nos gráficos das Figuras 28 e 29, observa-se os resultados para as análises de 48h.

Figura 28 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental 3 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 29 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental 3 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

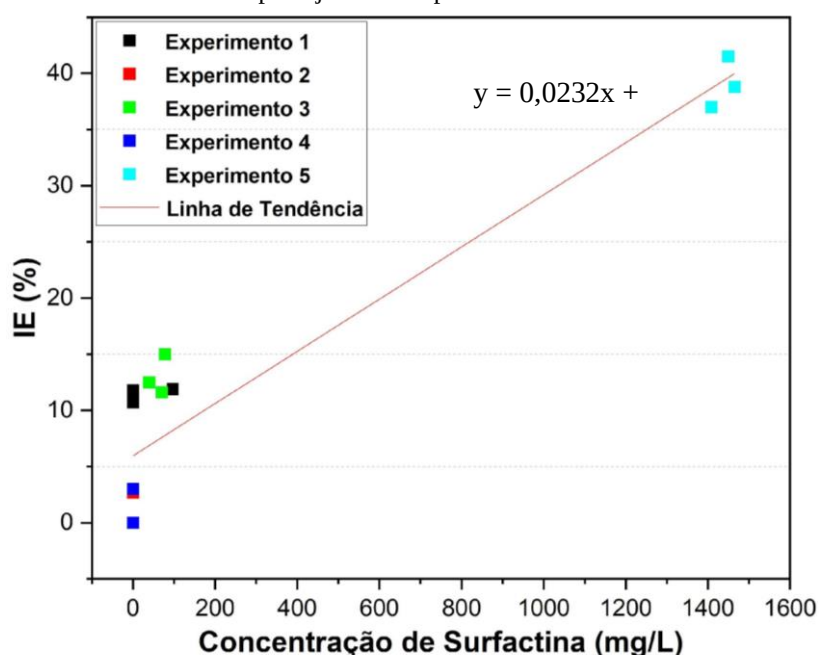
No gráfico da Figura 28, verifica-se que no período de 48h, o experimento E5 assim como o experimento E3 apresentaram o mesmo resultado com DO de 3,6 uABS, onde ambos experimentos tiveram uma morte celular de 24h para 48h mas permaneceram com resultados superiores quando comparados aos outros experimentos que apresentaram DO na faixa de 1,5 uABS para baixo. Assim, o experimento E5 (controle) têm conseguido manter seus resultados de concentração celular superiores também no período de 48h.

No gráfico da Figura 29, no período de 48h, novamente o experimento E5 foi o que mais produziu o biossurfactante com concentração de 1.441 mg/L, mantendo aproximadamente quase o mesmo resultado do experimento de 24h. No entanto, para os experimentos E1 e E3, as concentrações diminuíram não indicando bons resultados de produção neste período.

Os experimentos E2 e E4, assim como no período de 24h, embora demonstraram pequeno crescimento celular em 48h, não apresentaram nenhum resultado para a produção do biossurfactante neste mesmo período, indicando não possuir concentrações favoráveis para a produção.

No gráfico da Figura 30 é ilustrado a correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina realizado no período de 48h.

Figura 30 - Correlação entre o índice de emulsificação e a concentração de surfactina referente ao planejamento experimental 3

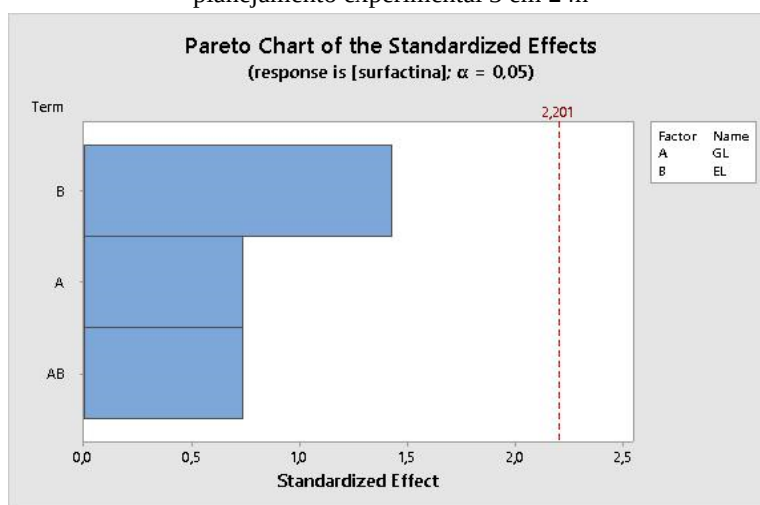


Fonte: Acervo pessoal, 2024.

É possível observar que os pontos referentes ao experimento E5 apresentam altos índices de emulsificação (IE%) superiores a 37% correspondendo ao experimento que mais produziu surfactina. Assim como os outros pontos os quais correspondem aos restantes dos experimentos apresentaram baixos IE, inferiores a 15%, o que se correlaciona com as baixas ou nulas produção de surfactina dos experimentos. Os pontos mais altos no gráfico, o experimento 5, estão concentrados nas concentrações mais elevadas de surfactina, sugerindo que, para concentrações superiores a 1000 mg/L, os resultados se tornam mais consistentes e seguem melhor a linha de tendência. Isso indica que, em concentrações mais altas, o efeito da surfactina no IE é mais previsível. Por outro lado, os experimentos 1 e 4 apresentam maior variabilidade em concentrações baixas, indicando que podem ser mais sensíveis a pequenas mudanças nas condições experimentais.

O gráfico da Figura 31 mostra a análise estatística para a concentração de surfactina para o período de 24h.

Figura 31 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 3 em 24h



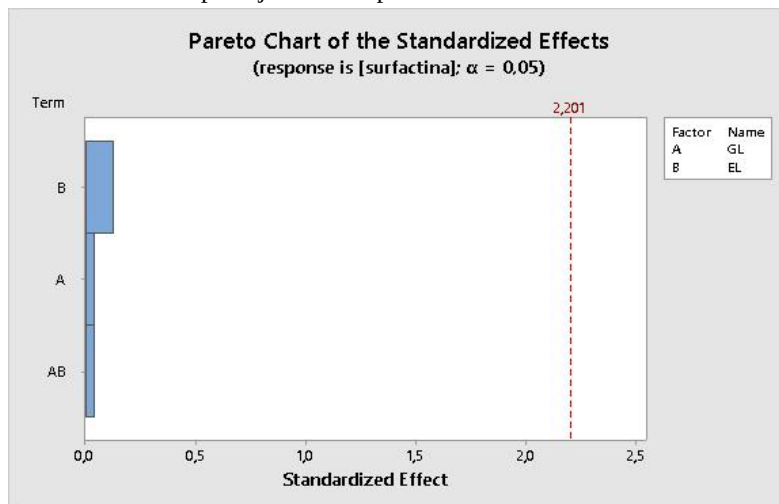
Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Mediante os gráficos de Pareto, novamente interpreta-se que nenhuma interação de componentes chegou próximo da probabilidade de significância do teste ($p=2,201$), indicando que nenhuma interação teve um resultado significativo no experimento neste nível de confiança (95%).

Além disso, deve-se ressaltar que o modelo não se ajustou bem aos resultados experimentais, indicando que para a concentração de surfactina, obteve-se um R^2 igual a 0,22 (esperava-se valores superiores a 0,9).

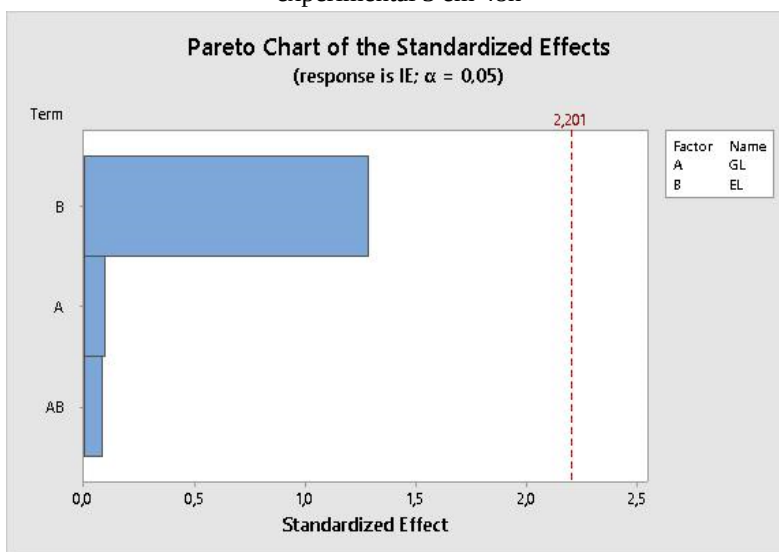
Os gráficos das Figuras 32 e 33 mostram as análises estatísticas para a concentração de surfactina e para o índice de emulsificação no período de 48h.

Figura 32 - Gráfico de Pareto para valores de concentração de surfactina (mg/L) obtidos pelo planejamento experimental 3 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 33 - Gráfico de Pareto para valores de índice de emulsificação (IE%) obtidos pelo planejamento experimental 3 em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Do mesmo modo, interpretou-se que nenhuma interação de componentes de ambas as análises estatísticas representadas pelas Figuras 32 e 33, se aproximou da probabilidade de significância do teste ($p=2,201$), indicando que nenhuma interação apresentou resultado significativo no experimento no nível de confiança (95%).

Além disso, deve-se ressaltar que o modelo não se ajustou bem aos resultados experimentais, indicando que para a concentração de surfactina, obteve-se um R^2 igual a

0,0017 (esperava-se valores superiores a 0,9). Em relação ao índice de emulsificação, obteve-se um R^2 igual a 0,1311. Sendo assim, foi realizada nova tentativa, visando obter um melhor ajuste do modelo.

8.9 Validação do Treinamento de Redes Neurais Artificiais

A partir do planejamento anterior, aplicou-se o treinamento da rede neuronal para que fosse dado a proposta dos experimentos deste item, deu-se início aos experimentos seguindo as condições já estabelecidas de meio, tempo de fermentação e concentração de inóculo, realizando a análise da surfactina, concentração celular e o tratamento de resultados estatísticos. A Tabela 11 retrata as novas concentrações.

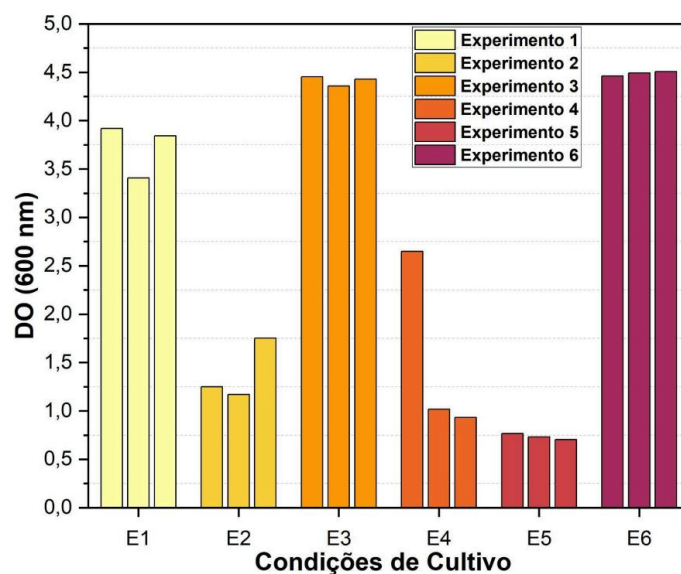
Tabela 11 - Planejamento experimental com seus respectivos níveis de variações utilizando redes neurais artificiais

Experimentos	Concentração de glicose (g/L)	Concentração de Ext. Levedura (g/L)
1	65,0	1,30
2	30,0	1,91
3	60,15	2,38
4	55,1	2,07
5	77,9	2,66
6	60,0	2,00
7	60,0	2,00
8	60,0	2,00

Fonte: Acervo pessoal, 2024.

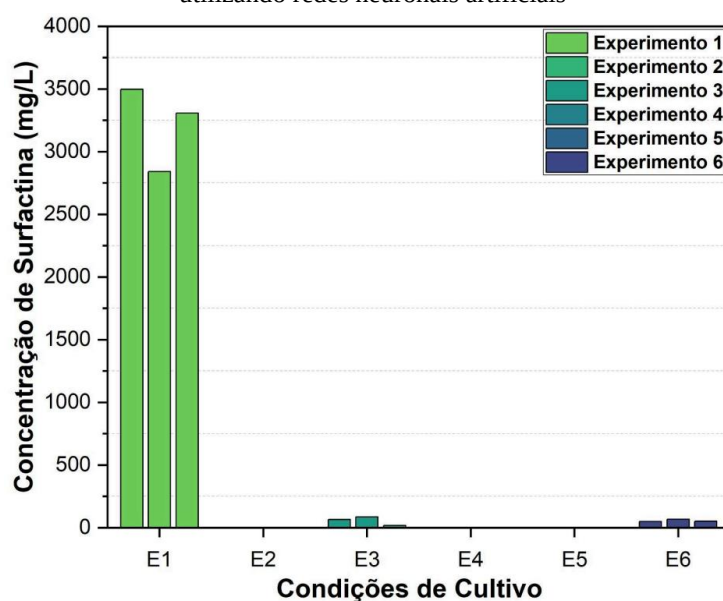
Os gráficos das Figuras 34 e 35 ilustram os resultados obtidos.

Figura 34 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 24h utilizando redes neurais artificiais



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 35 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 24h utilizando redes neurais artificiais



Fonte: Acervo pessoal, 2024

Pode-se notar que no gráfico da Figura 34, no período de 24h, os experimentos E3 e E6 (controle) foram os que mais apresentaram resultados altos para a concentração celular, apresentando densidade óptica de 4,4 uABS e 4,5 uABS, respectivamente, onde ambos experimentos se correlacionam, uma vez que o experimento E3 se aproxima da concentração do ponto central.

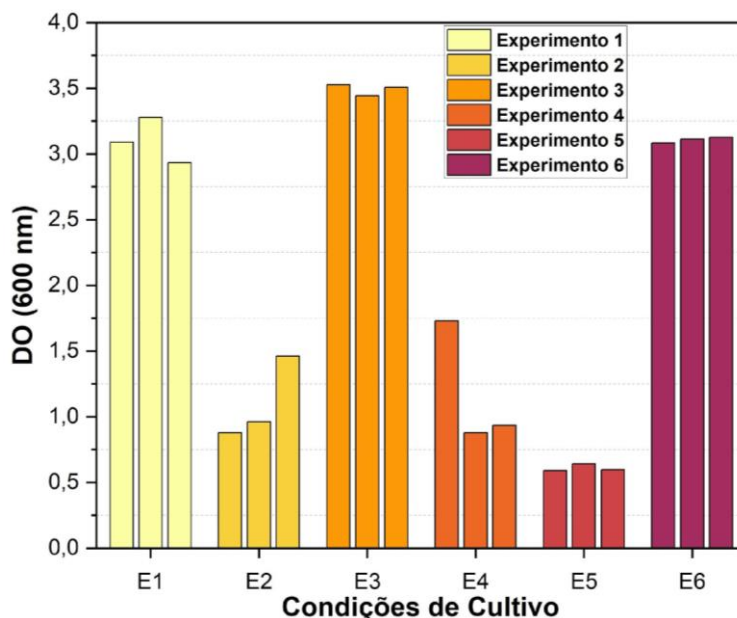
O experimento E1 apresentou concentração celular com densidade óptica de

aproximadamente 3,7 uABS, enquanto os outros experimentos E2, E4 e E5 apresentaram resultados inferiores, uma vez que também se dispersam das concentrações do ponto central.

No gráfico da Figura 35, no período de 24h, o experimento E1, adaptação da rede neural e uma extensão do ponto central, possuindo concentração de 65g/L de glicose e 1,3 g/L de extrato de levedura foi o que mais produziu o biossurfactante com concentração de 3.215 mg/L. Enquanto para os outros experimentos, não teve resultados ou teve resultados insatisfatórios com produção muito baixa. O experimento E6 (controle), dessa vez apresentou resultado inferior a 60 mg/L.

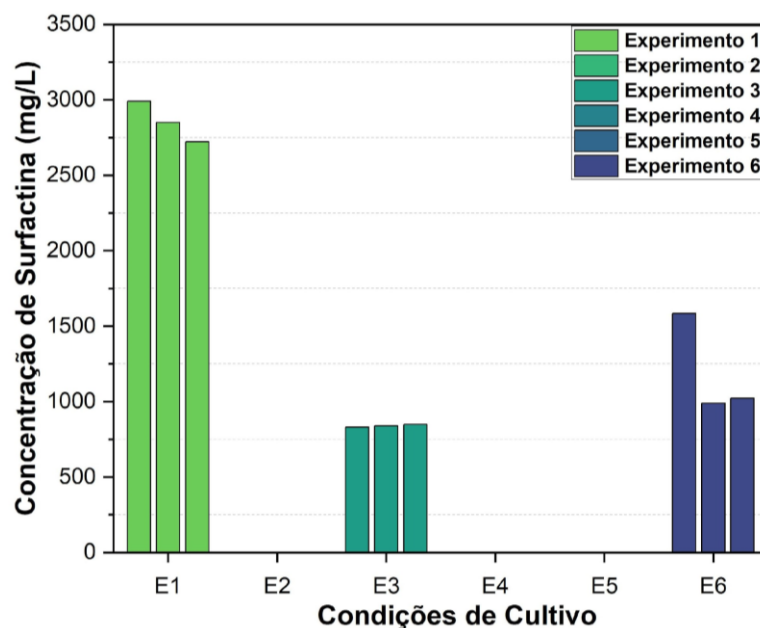
Nos gráficos das Figuras 36 e 37, observa-se os resultados para as análises de 48h.

Figura 36 - Concentração celular em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h utilizando redes neurais artificiais



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Figura 37 - Concentração de surfactina em diferentes experimentos do planejamento experimental em 48h utilizando redes neurais artificiais



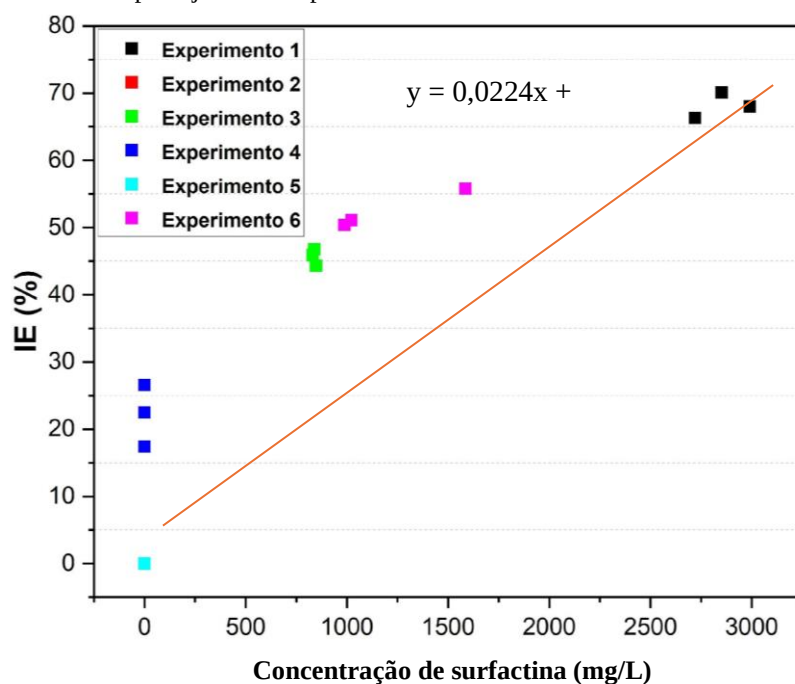
Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Notou-se no gráfico da Figura 36, que no período de 48h, o experimento E3 foi o que mais apresentou resultado para a concentração celular, apresentando densidade óptica de 3,5 uABS. Os experimentos E1 e E6 apresentaram resultados próximos, tendo densidade óptica de 3,1 uABS. Novamente, os outros experimentos E2, E4 e E5 apresentaram resultados inferiores, uma vez que também se dispersam das concentrações do ponto central.

No gráfico da Figura 37, no período de 48h, novamente o experimento E1 foi o que mais produziu o biosurfactante com concentração de 2.854 mg/L. Enquanto para os outros experimentos, não teve resultados ou teve resultados insatisfatórios com produção intermediária, como o experimento E3 e E6, apresentando concentração de 839 mg/L e 1199 mg/L, respectivamente.

O gráfico da Figura 38 retrata o teste do IE (%) e a análise da produção de surfactina.

Figura 38 - Correlação entre o índice de emulsificação (%) e a concentração de surfactina (mg/L) referente ao planejamento experimental utilizando redes neurais artificiais



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Nota-se que nos experimentos 1 e 6, onde as concentrações de surfactina são mais elevadas (acima de 2000 mg/L), os pontos parecem seguir mais de perto a linha de tendência, com IE mais alto e previsível (na faixa de 60% a 70%). Isso indica que, em concentrações de surfactina mais elevadas, o impacto no IE é mais consistente. Em concentrações de surfactina mais baixas (inferiores a 1000 mg/L), há uma dispersão maior dos pontos, especialmente nos experimentos 3, 4 e 5. Nesses casos, o IE varia bastante, sugerindo que em concentrações de surfactina mais limitadas, o comportamento do IE é menos previsível e pode estar sujeito a outros fatores não considerados no modelo.

O gráfico apresentou R^2 de 0,783, indicando que 78,3% da variação no IE (%) pode ser explicada pela variação nas concentrações de surfactina. Isso indica uma forte correlação entre as concentrações de surfactina e o IE, mas com uma variabilidade considerável ainda presente nos dados.

Relembrando os resultados experimentais da seção anterior, em que foi realizada uma análise estatística para avaliar o ajuste do modelo polinomial aos resultados experimentais. Onde para a concentração de surfactina, obteve-se um R^2 igual a 0,0017 ($R=0,0412$) e para o índice de emulsificação, obteve-se um R^2 igual a 0,1311 ($R=0,362$), tal como observado, o modelo não se ajustou bem aos resultados experimentais e, com isso, impossibilitou qualquer interpretação da análise estatística. Visto isso, utilizou-se a

técnica de redes neurais para a otimização do processo.

Para isso, avaliou-se a utilização de duas redes neurais (uma para prever a Concentração de Surfactina e outra para prever o Índice de Emulsificação) variando o número de neurônios na camada oculta de 1 a 6 neurônios. Com isso, obteve-se os resultados descritos na tabela 12.

Tabela 12 - Valores do Somatório dos Erros ao Quadrado (SEQ) coeficiente de Pearson (R) obtido para cada uma das redes treinadas considerando a saída para Concentração de Surfactina e Índice de Emulsificação

Número de neurônios	Concentração de surfactina		Índice de Emulsificação	
	SEQ	R	SEQ	R
1 neurônio	4888963	0,039	2429,039	0,431
2 neurônio	4236576	0,395	1642,518	0,707
3 neurônio	9664988	0,795	33,00167	0,994
4 neurônio	22265,97	0,998	32,015	0,995
5 neurônio	9436,61	0,999	31,77992	0,995
6 neurônio	10167,73	0,999	31,36985	0,995

Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Com isso, otimizou-se as condições considerando as redes neurais com R maior que 0,9. Após essa otimização, foram consideradas 5 propostas considerando o ponto ótimo para as redes selecionadas, para a concentração de surfactina escolheu-se acima de 3 neurônios e para o índice de emulsificação acima de 2 neurônios para a realização dos experimentos. Como houve uma grande variação dos resultados, optou-se por agrupar os resultados otimizados pela rede em 5 grupos/propostas para a realização dos experimentos em triplicata. Sendo assim, os resultados obtidos estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Condição otimizada, valores previstos pela rede (Concentração de surfactina ou Índice de Emulsificação) e resultados experimentais obtidos

			Valores previsto pela rede		Valores experimentais	
Condição avaliada	Glicose (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Índice de emulsão	Concentração de surfactina	Índice de emulsão	Concentração de surfactina
1	65,0	1,3	44,52	NC	68,1	2.854
2	30,0	1,91	51,78	NC	0	0
3	60,15	2,38	NC	1.479	45,7	839
4	55,12	2,07	NC	1.479	22,2	0
5	77,86	2,66	64,08	NC	0	0
Ponto Central	60,0	2,0	PC	PC	52,4	1.199

Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Onde:

NC: Não calculado

PC: Experimento realizados para evitar flutuações experimentais

Sendo assim, foram realizados os testes das cinco propostas, sendo que a condição que obteve o melhor resultados experimental e que proporcionou o melhor resultado foi a primeira condição (mostrada na Tabela 13), com concentração de surfactina de 2.854 mg/L e IE (%) de 68,1%. Tal resultado representou um aumento de 2,4 vezes em relação à condição inicial (ponto central).

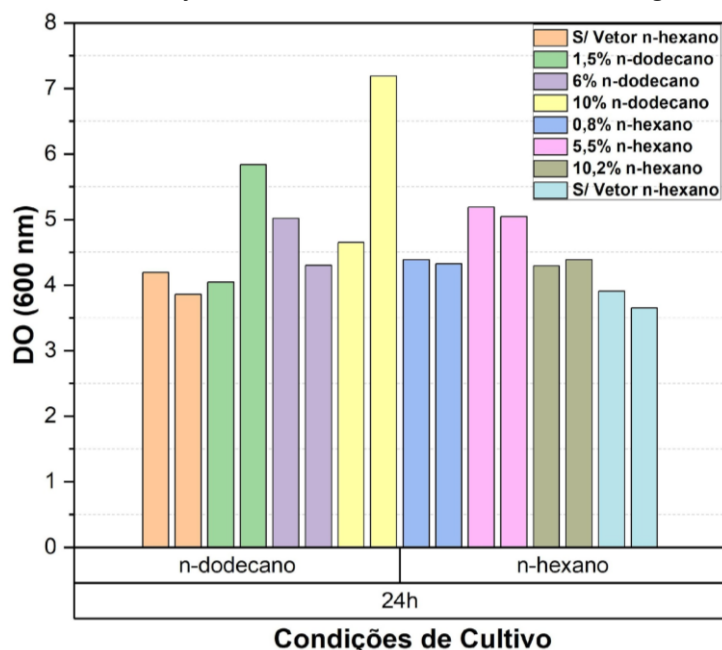
Dessa forma, optou-se por utilizar a otimização da concentração de 65g/L de glicose e 1,3 g/L de extrato de levedura e validar estas concentrações nos próximos experimentos.

8.10 Adição de vetores de oxigênio

Tendo como base a análise do tratamento de dados por redes neurais e os resultados do último planejamento experimental, escolheu-se continuar com a concentração de 65 g/L para glicose e 1,3 g/L para o extrato de levedura. Neste experimento, realizou-se a adição de vetores de oxigênio, iniciando com o n-dodecano e depois utilizando o n-hexano.

No gráfico da Figura 39 retrata a concentração celular para 24h com o uso do vetor de oxigênio.

Figura 39 - Concentração celular da análise do uso de vetor de oxigênio em 24h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

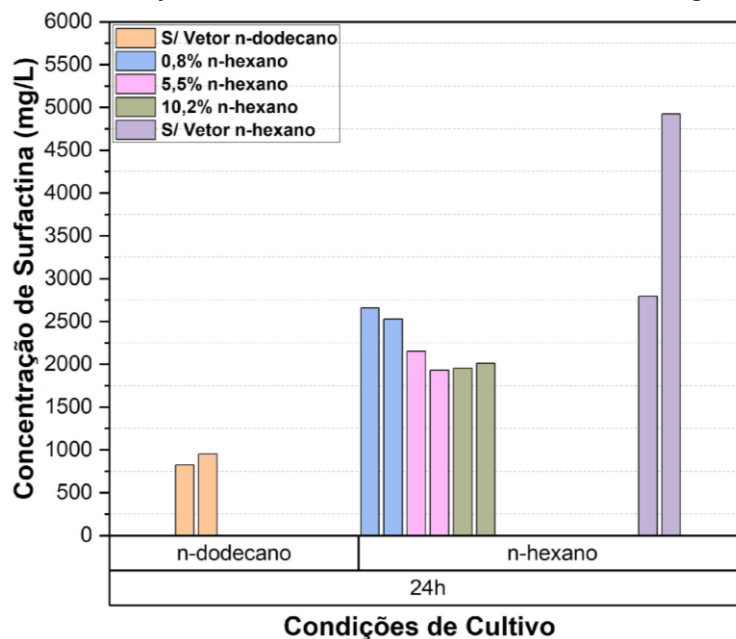
Com base no gráfico da Figura 39, para o vetor n-dodecano, o experimento com 10% de adição do vetor foi o que apresentou maior concentração celular, com densidade óptica de 5,9 uABS. O experimento com 1,5% de adição do vetor, foi o segundo a apresentar maior resultado, com densidade óptica de 4,9 uABS. O experimento com 6% de vetor, apresentou densidade óptica de 4,6 uABS e o experimento sem vetor apresentou densidade óptica de 4,0 uABS.

Nota-se que no caso do vetor n-dodecano, o experimento que maior teve percentual de adição foi o que mais estimulou o crescimento celular. Isso pode ser explicado pois o vetor de oxigênio, n-dodecano, contribui no aumento da solubilidade do oxigênio em soluções aquosas, relativamente à água, o que causa o aumento de oxigênio disponível para as células influenciando fortemente o crescimento celular (Guerreiro, 2013).

Para o vetor n-hexano, o experimento com 5,5% de adição do vetor apresentou maior concentração celular em relação aos outros experimentos do uso do vetor n-hexano com densidade óptica de 5,1 uABS. Os demais experimentos como 0,8%, 10,2% de vetor e o experimento sem vetor apresentaram resultados inferiores com densidade óptica de 4,3 uABS, 4,4 uABS e 3,8 uABS, respectivamente.

O gráfico da Figura 40 mostra os resultados para a concentração de surfactina em 24h.

Figura 40 - Concentração de surfactina da análise do uso de vetor de oxigênio em 24h

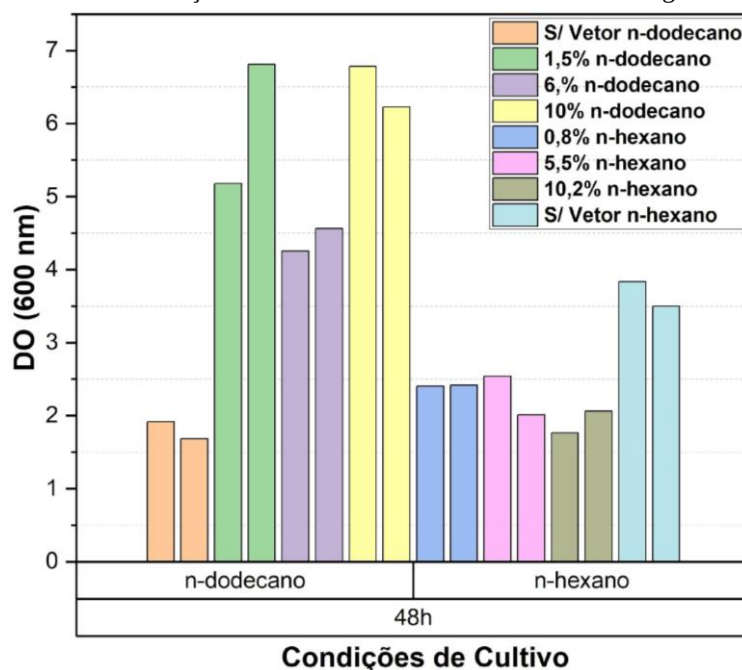


Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Quanto à concentração de surfactina, representada pelo gráfico da Figura 40, os experimentos com o uso de vetor n-dodecano, apenas o experimento sem vetor apresentou concentração de 890 mg/L. Para os experimentos com o uso de vetor n-hexano, os experimentos com percentual de adição do vetor apresentaram produção do biossurfactante, mas ainda assim o experimento sem vetor foi o que mais produziu a surfactina, com concentração de 3.860 mg/L. Logo, verifica-se em ambos os casos, que os experimentos sem vetor foi o que mais estimulou a concentração de surfactina, o que nos leva concluir que a presença o vetor de oxigênio na condição avaliada prejudica a produção de surfactina no tempo de 24 horas.

Em relação ao período de 48 horas, os gráficos das Figuras 41 e 42 mostram os resultados obtidos em 48h de cultivo.

Figura 41 - Concentração celular da análise do uso de vetor de oxigênio em 48h

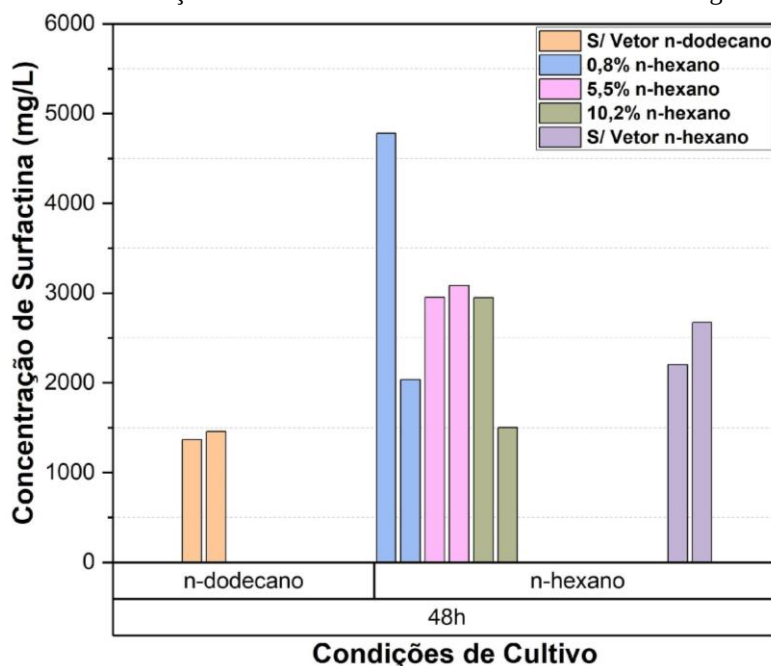


Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Considerando o tempo de 48 horas, para o vetor n-dodecano, o experimento com 10% de adição do vetor novamente foi o que apresentou maior concentração celular com densidade óptica de 6,5 uABS. O experimento com 1,5% de adição do vetor, foi o segundo a apresentar maior resultado com densidade óptica de 5,0 uABS. O experimento com 6% de vetor, apresentou densidade óptica de 4,4 uABS e o experimento sem vetor apresentou densidade óptica de 1,0 uABS. Nota-se que no caso do vetor n-dodecano, o experimento que maior possuía percentual de adição foi o que obteve a maior concentração de celular também neste período de 48h.

Para o vetor n-hexano, o experimento sem vetor apresentou maior concentração celular em relação aos outros experimentos do uso do vetor n-hexano com densidade óptica de 3,7 uABS. Os demais experimentos com adição de vetor apresentaram resultados inferiores abaixo de 2,5 uABS.

Figura 42 - Concentração de surfactina da análise do uso de vetor de oxigênio em 48h



Fonte: Acervo pessoal, 2024.

Quanto à concentração de surfactina neste período, os experimentos com o uso de vetor n-dodecano, novamente apenas o experimento sem vetor apresentou concentração de 1.411 mg/L. Para os experimentos com o uso de vetor n-hexano, os experimentos com percentual de adição de 0,8% foi o que mais produziu a surfactina com concentração de 3.409 mg/L, aumentando a sua produção em relação ao período de 24h. Os experimentos com 5,5% e 10,2% de vetor também sofreram aumento na sua produção, com concentração de 3.017 mg/L e 2.225 mg/L, respectivamente. Em relação ao experimento sem vetor, obteve uma concentração de 2.437 mg/L, havendo diminuição da produção comparado ao período de 24h.

9. CONCLUSÃO

A partir dos experimentos iniciais de testes de meio, verificou-se que o meio PW foi o meio que proporcionou maior produção de surfactina, uma vez que é enriquecido por alta concentração de fonte de carbono e fonte de nitrogênio, parâmetros essenciais para o consumo de energia e nutrientes do microrganismo. Além disso, nas condições de 48 horas de fermentação e adição de 10% de inóculo ao meio, obteve também os melhores resultados para o meio PW, sendo, portanto, escolhida essas condições para dar seguimento aos experimentos.

Ademais, pelo planejamento experimental analisou-se, que o fator de maior influência sobre a concentração de surfactina por *Bacillus subtilis* é a glicose. E de acordo com a literatura, os índices de emulsificação obtidos foram consideráveis para a produção realizada.

Quanto ao experimento realizado com as variações de fontes de carbono e nitrogênio, verificou-se que a fonte de carbono, glicose, é a que suporta a maior produção de surfactina quando comparado com a utilização da sacarose e do glicerol. Ainda assim, observou-se que a adição de peptona como fonte de nitrogênio, em combinação com o NaNO_3 , apresentou um desempenho superior em comparação com as outras duas fontes de nitrogênio testadas. Mesmo assim, observou-se que não houve muita diferença do resultado quando o meio PW tem apenas NaNO_3 , sendo assim não considerado nos experimentos futuros.

Desse modo, os experimentos realizados a partir do planejamento experimental, no qual há as variações das concentrações de glicose, extrato de levedura e NaNO_3 , o modelo polinomial se ajustou mal aos resultados experimentais e, por essa razão, não se notou uma certa padronização nos resultados. Esta discussão tem como base as análises realizadas a partir dos valores de R^2 e dos resultados apresentados nos gráficos de Pareto, onde observa-se que nenhum componente ou a interação deles chegam próximos da probabilidade de significância do teste (p), indicando que nenhuma interação ou componente isolado teve uma influência significativa no experimento diante das condições estudadas. Visto isso, utilizou-se a técnica de redes neurais artificiais para obter propostas para aumentar a produção de surfactina, sendo que somente a os meios contendo a concentração de 65 g/L de glicose e 1,3 g/L de extrato de levedura obteve uma produção de produto que foi comprovado experimentalmente.

Sendo assim, como alternativa, utilizou-se o método de Redes Neurais

Artificiais para melhorar a produção de surfactina. Através desta estratégia, houve várias propostas, sendo que, em uma delas, foi possível comprovar experimentalmente o aumento de produção de surfactina em 2,4 vezes em relação a composição original do meio PW.

Em relação às metodologias utilizadas para a determinação da concentração de surfactina, não foi possível ajustar um modelo que correlaciona a concentração de surfactina medida pelo método utilizado no presente trabalho com o índice de emulsificação, sendo necessário avaliar outros modelos para esse fim.

Ademais, nas avaliações dos usos de vetores de oxigênio, verificou-se que nos períodos de 24h e 48h, todos os experimentos foram capazes de estimular o crescimento celular. No entanto, quanto à produção do biossurfactante, no período de 24h o experimento sem vetor conseguiu atingir a maior concentração de surfactina, seguido do experimento com 0,8% (v/v) de n-hexano. No período de 48h, o experimento com 0,8%(v/v) conseguiu produzir a maior concentração de surfactina no valor de 3.408 mg/L. Indicando que com pequenos percentuais de adição do vetor de oxigênio pode ser benéfico para se produzir o biossurfactante, não se tornando tóxico para célula dentro da escala estudada. Sendo assim, a utilização de vetores de oxigênio (n-hexano) aparentemente não prejudica o processo, sendo uma proposta para estudos futuros de desenvolvimento de processo em biorreator.

REFERÊNCIAS

- ABDEL -MAWGOUD, A.M.; ABOULWABA, M.M.; HASSOUNA, N.A. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 150, p. 305-325, 2008b.
- ACIOLY, L. M. L. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* UCP 0999 em substratos não convencionais e de baixo custo.** 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.
- AGARRY, S. E., *et al.* Produção de biossurfactantes por espécies indígenas de *Pseudomonas* e *Bacillus* isoladas do ambiente automecânico do solo para recuperação microbiana aprimorada de petróleo. *Revista Europeia de Engenharia e Tecnologia*, v. 6, 2015.
- AGUILAR, C., *et al.* Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular microorganism. *Current opinion in microbiology*, v. 10, n. 6, p. 638-643, 2007.
- 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, 2018.
- ALLIED MARKET RESEARCH. **Surfactants Market by Type (Cationic, Anionic, Nonionic, Amphoteric, and Others) and Application (Household Detergent, Personal Care, Industrial & Institutional Cleaner, Oilfield Chemical, Agricultural Chemical, Food Processing, Paint & Coating, Adhesive, Plastic, Textile, and Others)** - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2018-2025. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/surfactant-market>. Acesso em: 20 ago. 2022.
- ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiologia plantarum*, v. 132, n. 2, p. 117-135, 2008.
- ALMEIDA, D. G. D., *et al.* Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1–14, 2016.
- ARGENTIN, M. N. **Produção de biossurfactante por uma linhagem termofílica de *Bacillus* isolada de amostra rochosa de reservatório de petróleo.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 31, n. 3, p. 488-494, 1968.
- ASARI, S., *et al.* Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, n. 6, p. fiw070, 2016.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Production and applications of lipopeptide

biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27 101, p. 168–178, 2015.

BICCA, F.; COLOMBO, F. L.; ZÁCHIA A.M.A. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Journal of Microbiology**, v. 30, pp. 231–236, set. 1999.

BINIZARS, P.; LUKASZEWICZ, M.; JANEK, T. Concepts of screening, characterization and structural analysis of microbe-derived bioactive lipopeptides: A review. **Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 393-410, 2017.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 73, p. 423-434, 2017.

CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113-1116, 2006.

CANET, R., *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. **Bioresour Technol**, v.76, n. 2, p. 113-117. Jan. 2001.

CASCAVAL, D., *et al.* Comparative study on the effects of n-dodecane addition on oxygen transfer in stirred bioreactors for simulated, bacterial and yeasts broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, n. 1, p. 56-66, 2006.

CHATER, K. F.; BIBB, M. J. Regulation of bacterial antibiotic production. **Biotechnology**, v. 7, p. 57-105, 1997.

CLARKE, K. G.; CORREIA, L. D. C. Oxygen transfer in hydrocarboneaqueous dispersions and its applicability to alkane bioprocesses: a review. **Biochemical engineering journal**, v. 39, n. 3, p. 405-429, 2008.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872 (1986) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **Springer**, p. 1105-1140.

COOK, L.; KORSTEN, N. Optimizing culturing conditions for *Bacillus subtilis*. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, v. 19, p. 54-8, 1996.

COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B. G. Agentes tensoativos de duas espécies de *Bacillus*. **Microbiologia aplicada e ambiental**, v. 53, n. 2, pág. 224-229, 1987.

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

DUBNAU, D. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 3, p. 395-424, 1991.

DUBNAU, D.; PROVVEDI, R. Internalizing DNA. **Research in microbiology**, v. 151,

n. 6, p. 475-480, 2000.

DUMAS, M. E.; KINROSS, J.; NICHOLSON, J.K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease.

Gastroenterology, v. 146, n. 1, p. 46-62, 2014.

FREITAS, B. G., *et al.* Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 1646, p. 1-9, 2016.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p.1245– 1248. 2017.

GALACTION, A. I., *et al.* Distribution of oxygen transfer rate in stirred bioreactors with simulated broths. **Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)**, v. 7, n. 3, 2008.

GHAFOOR, A.; HASNAIN, S. Production dynamics of *Bacillus subtilis* strains AG-1 and EAG-2, producing an extracellular alkaline protease. **Journal of Biotechnology**, n. 136, p. S305, 2008.

GIRI, S. S., *et al.* Antioxidant, antibacterial, and antiadhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. **Microb. Pathog.** v. 132, p. 66– 72, 2019.

GONG, G., *et al.* Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. **Food Technology**, p.47, v. 23-31, 2009.

HARRIGAN, G. G.; GOODACRE, R. (ed.). Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis: its role in biomarker discovery and gene function analysis. **Springer Science & Business Media**, 2003.

HU, F.; LIU, Y.; LI, S. Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2019.

JACKSON, S.A., *et al.* Metagenomics for the discovery of novel biosurfactants of environmental interest from marine ecosystems. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 176-182, 2015.

JAVAHERI, M., *et al.* Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. **Environ. Microbiol**, v. 50, p. 698–700. 1985.

KASHIF, A., *et al.* Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants – A critical review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 306, p. 102718, 2022.

KEARNS, D. B., *et al.* A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 55, n. 3, p. 739-749, 2005.

KLOEPPER, J. W. Current status and future trends in biocontrol research and

development in the US. In: **Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture**, p. 49-52, 1997.

KRÄTZSCHMAR, J.; KRAUSE, M.; MARAHIEL, M. A. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 10, p. 5422-5429, 1989.

KU, J., *et al.* Expression of a functional non-ribosomal peptide synthetase module in *Escherichia coli* by coexpression with a phosphopantetheinyl transferase. **Chemistry & biology**, v. 4, n. 3, p. 203-207, 1997.

LIU, F. F., *et al.* Improvement surfactin production by substitution of promoters in *Bacillus subtilis* TD7. **Environmental Biotechnology**, v. 6, p. 31-41, 2021.

LÓPEZ, D., *et al.* Paracrine signaling in a bacterium. **Genes & development**, v. 23, n. 14, p. 1631-1638, 2009a.

LÓPEZ, D., *et al.* Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 1, p. 280-285, 2009b.

MAGNUSON, R.; SOLOMON, J.; GROSSMAN, A. D. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. **Cell**, v. 77, n. 2, p. 207-216, 1994.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C.; HUBELE, N. F. **Engineering Statistics**. 5. ed. Hoboken: Wiley, 2012.

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 8, p. 981-987, 2009.

PALMER, M.; HATLEY, H. The role of surfactants in wastewater treatment: Impact, removal and future techniques: A critical review. **Water Research**, v. 147, p. 60-72, 2018.

PARK, S. A., *et al.* *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 827-848, 2021.

PIGGOT, P. J.; HILBERT, D. W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 6, p. 579-586, 2004.

RAMOS, H.C., *et al.* Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. **Journal of bacteriology**, v.182, n.11, p.3072-3080, 2000.

RUDNER, D. Z., LOSICK, R. Morphological coupling in development: lessons from prokaryotes. **Developmental cell**, v. 1, n. 6, p. 733-742, 2001.

SANTIAGO, M. R. F. **Produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis*: caracterização, otimização e aplicação na indústria do petróleo.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro, 2019. 154 f.

SANTOS, D. K. F., *et al.* Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-31, 2016.

SARUBBO, L. A., *et al.* Production of a low-cost biosurfactant for application in the remediation of sea water contaminated with petroleum derivatives. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49, p. 523-528, 2016.

SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – a review of biosynthesis, fermentation, purification and applications. **Food Technol Biotechnol**, v. 48, p.119-134, 2010.

SHODA, M. Review: Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SIERRA-GARCIA, I.N., *et al.* In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archaeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 136346, 2020.

SOO, E. L., *et al.* Methodological study of response surface in the lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. **Process Biochemistry**, v.39, n. 11, pág. 1511-1518, 2004.

STACHELHAUS, T.; SCHNEIDER, A.; MARAHIEL, M. A. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. **Science**, v. 269, n. 5220, p. 69-72, 1995.

TURBEKAR, R., *et al.* Development of rhamnolipid based white board cleaner. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 570-573, 2014.

VALPUESTA, R.R.F. **Otimização da Produção de Biossurfactante por *Bacillus subtilis* Isolado de Matéria-Prima Renovável e de Baixo Custo.** Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 104 p., Rio de Janeiro, 2008.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389-397, 2017.

VASQUEZ, A. *Bacillus* species are superior probiotic feed-additives for poultry. **J Bacteriol Mycol Open Access**, v. 2, n. 3, p. 00023, 2016.

VEENING, J. W., *et al.* Transient heterogeneity in extracellular protease production by *Bacillus subtilis*. **Molecular systems biology**, v. 4, n. 1, p. 184, 2008.

VIEIRA, I.M.M., *et al.* An overview of current research and developments in biosurfactants. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 100, p. 1-18, 2021.

VLAMAKIS, H., *et al.* Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. **Genes & development**, v. 22, n. 7, p. 945-953, 2008.

WEIR, J., *et al.* Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *Bacillus subtilis* sigma H factor. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 521-529, 1991.

XU, P., *et al.* Enhancement of l-amino acid oxidase production by *Bacillus subtilis* HLZ-68 with oxygen-vector and asymmetric degradation of dl-arginine to d-arginine. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 34, n. 1, p. 1273-1279. 2020.

YANG, H.; YU, H.; SHEN, Z. 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**, v. 42, n. 8, p. 1139-1147, 2015.

YING, G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**, v. 32, p. 417–431, 2006.

YOUSSEF, N.H., *et al.* Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal Microbiology Methods**, v. 56, p. 339 -346, 2004.

ZANOTTO, A. W., *et al.* New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21, p. 8647-8656, 2019.

ZHANG, Q. *et al.* Production of proteins and commodity chemicals using engineered *Bacillus subtilis* platform strain. **Essays in Biochemistry**. v. 65, n. 2, pp. 173–185, 2021. p. 39 -346, 2004.